

การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคน

นางสาวปาริชาติ เดชพิชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2553  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF  
MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN SERUM ALBUMIN

Miss Parichat Detpichai

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโม่โนโคลนอล
	แอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคน
โดย	นางสาวปาริชาติ เดชพิชัย
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา นพพรพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา หลายวัฒนไพศาล)

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

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ศิริพร ชี้อชวาถกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ ดร.กาญจนา ชูสุวรรณทิม)

ปาริชาติ เดชพิชัย : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคน.  
(PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY  
AGAINST HUMAN SERUM ALBUMIN) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. วนิตา  
หลายวัฒนไพศาล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. กิตติพันธ์ โกมลภิส จำนวนหน้า  
123 หน้า.

ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะที่เพิ่มขึ้นในระยะที่เรียกว่า ไมโครอัลบูมินูเรีย สามารถใช้ในการบ่งชี้การเป็นโรคไตจากเบาหวานได้เร็วที่สุด ดังนั้นการตรวจวัดระดับอัลบูมินในปัสสาวะจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยทางคลินิก ในงานวิจัยนี้ ได้ผลิตและศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินจากซีรัมคน ในการทดลองได้นำเซลล์มี้มของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c ที่ผ่านการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ด้วยอัลบูมินจากซีรัมคนที่บริสุทธิ์ มาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโอมาสายพันธุ์ SP2/0 จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตได้ มาทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution จนได้โมโนโคลนที่สร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออัลบูมิน ทำการเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  จากการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA เท่ากับ 0.30  $\mu\text{g/ml}$  มาทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่าผลที่ได้มีความสัมพันธ์กับวิธี Immunonephelometry ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ( $r^2 = 0.971$ ,  $n = 7$ ) โดยมีช่วงของการวัดที่ 0.7-40  $\mu\text{g/ml}$  และค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.057  $\mu\text{g/ml}$  และจากการทดสอบความแปรปรวนของการวิเคราะห์ทั้งแบบ intra-assay variation และ inter-assay variation พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 3.02-4.23% และ 15.02-16.79% ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้ มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะต่อไปในอนาคตได้

ภาควิชา:.....เคมีคลินิก.....

สาขาวิชา: ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

ปีการศึกษา: .....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต: .....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษานิพนธ์หลัก: .....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษานิพนธ์ร่วม:.....

## 5177213637 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS : MICROALBUMINURIA / HUMAN SERUM ALBUMIN / HYBRIDOMA / MONOCLONAL ANTIBODY

PARICHAT DETPICHAI : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HUMAN SERUM ALBUMIN. ADVISOR : ASST.PROF. WANIDA LAIWATTANAPAISAL, Ph.D., CO-ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 123 pp.

Increased urinary albumin excretion also known as microalbuminuria (MAU), is the earliest clinical manifestation of diabetic nephropathy. Thus, the determination of albumin in urine is very useful for clinical diagnosis. Herein, monoclonal antibodies against human serum albumin (HSA) have been produced and characterized. To obtain the hybridomas, spleen cells from HSA immunized mice (BALB/c) were fused with SP2/0 myeloma cells. The single hybridoma cell was obtained using limiting dilutions. As a result, 4/B11/G3/H11/G11 was selected for further study. The sensitivity reported as the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of HSA was 0.30  $\mu\text{g/ml}$ , as assessed by indirect competitive ELISA. To demonstrate the ability of generated mAbs to MAU determining, indirect competitive ELISA using those mAb has been developed. The results showed good correlation with the conventional immunonephelometry method ( $r^2 = 0.971$ ,  $n = 7$ ) for the detection range of 0.7-40  $\mu\text{g/ml}$  at the limit of detection of 0.057  $\mu\text{g/ml}$ . Variation of the analysis of both intra- and inter-variation assay was tested. The result showed that the coefficient of variations were 3.02-4.23% and 15.02-16.79 %, respectively. In conclusion, the generated mAbs were very promising for further development of the microalbuminuria assay kit.

Department : Clinical Chemistry

Student's Signature .....

Field of Study : Clinical Biochemistry

Advisor's Signature .....

and Molecular Medicine

Co-advisor's Signature .....

Academic Year : 2010

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาของ ผศ.ดร.วนิดา หลายวัฒนไพศาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ อ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำในการทำงาน ตลอดจนการแก้ไขปัญหา กระทั่งงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จ ลุล่วงลงได้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อ.ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุลกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อ.ดร. กาญจนา อู่สุวรรณทิม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัยที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองเนื่องในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนวิจัยจากโครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้าน Omics-Nano Medical Technology ทุนพัฒนาวิชาการ จุฬาฯ 100 ปี จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณโครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่อง microplate reader

ขอขอบคุณ คุณทรงจันทร์ ภูทอง ที่คอยดูแลให้คำปรึกษาในทุกๆปัญหา คอยช่วยเหลือชี้แนะความรู้ต่างๆ รวมถึงกำลังใจและสิ่งดีๆ ที่มีให้ตลอดการทำงาน ขอขอบคุณคุณอนุมาศ บัวเขียว คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ และสมาชิกชั้น 8 สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกคน ในทุกความช่วยเหลือ คำแนะนำและคำปรึกษาที่มีให้เสมอมา รวมถึงทุกคำปรึกษาแนะนำและกำลังใจ จากเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ทุกคน

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ ที่ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จ เช่นในวันนี้ได้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. อัลบูมินในซีรัมคน (Human serum albumin, HSA).....	5
2. การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ.....	7
3. สิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (Antigen, Ag).....	14
4. แอนติบอดี (Antibody, Ab).....	17
4.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน.....	24
4.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดี.....	25
4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	28

บทที่	หน้า
4.3.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Phage display.....	32
4.3.2 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปประยุกต์ใช้.....	34
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	38
1. สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
3. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	40
4. วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	43
4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ HSA.....	43
4.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HSA.....	48
4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี..	51
4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	53
4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	56
4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์.....	58
4.7 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการหาปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี Indirect competitive ELISA.....	58
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	63
1. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ HSA.....	63
1.1 การหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองด้วยวิธี indirect ELISA.....	63



บทที่	หน้า
1.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อ HSA ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA.....	65
2. การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อ HSA.....	66
3. การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	69
3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้....	69
3.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้ต่อ HSA.....	71
3.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) เบื้องต้นของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้.....	75
4. การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	77
4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์.....	77
4.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA.....	79
5. การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์.....	79
6. การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HSA หลังการทำให้ บริสุทธิ์.....	82
7. การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการ วิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี Indirect competitive ELISA.....	85
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	90
รายการอ้างอิง.....	94
ภาคผนวก.....	102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	122

## สารบัญญัตินี้

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณสมบัติทางซีภาพของอิมมูโนโกลบูลิน..... 19
2.2	การเปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลีโคลนอนแอนติบอดีและ โมโนโคลนอนแอนติบอดี..... 31
2.3	แสดงโมโนโคลนอนแอนติบอดีที่ประยุกต์ในการรักษาโรค..... 36
3.1	สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 38
3.2	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย..... 38
3.3	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย..... 40
3.4	การเตรียมสิ่งตัวอย่างเพื่อใช้ในการตรวจวัดด้วยวิธี nephelometry..... 61
4.1	ระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลองจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA..... 64
4.2	ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลง จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เมื่อเติม HSA รูปอิสระ..... 66
4.3	ผลการหอยรวมเซลล์ม้ากับเซลล์ไมอีโลมาของหนูทดลองทั้ง 3 ตัว..... 67
4.4	โมโนโคลนอนแอนติบอดีที่ได้จากการหอยรวมเซลล์ครั้งที่ 2..... 68
4.5	โมโนโคลนอนแอนติบอดีที่ได้จากการหอยรวมเซลล์ครั้งที่ 3..... 69
4.6	ผลการศึกษาระดับการเจือจางโมโนโคลนอนแอนติบอดีที่เหมาะสม จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA..... 72
4.7	ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอนแอนติบอดีแต่ละโคลน..... 73
4.8	ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอนแอนติบอดีที่ผลิตได้..... 76
4.9	สรุปลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอนแอนติบอดีโคลนที่ได้รับการคัดเลือก นำไปทำให้บริสุทธิ์..... 77
4.10	ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และในสารละลาย โมโนโคลนอนแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์..... 79

ตารางที่	หน้า
4.11 ค่า $R_0$ และน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ .....	82
4.12 ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2 หลังทำให้บริสุทธิ์และแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุมด้วยวิธี indirect ELISA.....	83
4.13 ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/E12/E5 หลังทำให้บริสุทธิ์และแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุมด้วยวิธี indirect ELISA.....	83
4.14 ผลการทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 หลังทำให้บริสุทธิ์และแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุมด้วยวิธี indirect ELISA.....	84
4.15 ผลการทดสอบหาค่า LOD ของไมโครอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	87
4.16 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA และวิธี immunonephelometry.....	88
4.17 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินระหว่างวิธี indirect competitive ELISA และวิธี nephelometry.....	88
4.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง ด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	89
ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ HSA รูปอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	103
ก.2 ชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 28 โคลน จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit.....	103

ตารางที่	หน้า	
ก.3	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ต่อ HSA รูปอิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	105
ก.4	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่น ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	110
ก.5	ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอิสระได้ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	111
ก.6	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์.....	112
ก.7	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน จากการทดสอบด้วยวิธี BCA.....	113
ก.8	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2 จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	114
ก.9	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/E12/E5 จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	115
ก.10	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 หลังการทำให้บริสุทธิ์ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	116

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างสามมิติของอัลบูมินจากซีรัมคน .....	6
2.2	ขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการ ตรึงแอนติเจนไว้ที่ก้นหลุม.....	9
2.3	ขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการ ตรึงแอนติบอดีไว้ที่ก้นหลุม .....	10
2.4	ขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินด้วยวิธี indirect sandwich ELISA.....	11
2.5	ส่วนประกอบของแถบตรวจวิเคราะห์.....	13
2.6	ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในหลักการ sandwich immunochromatography assay.....	14
2.7	Electrophoretogram ของซีรัมโปรตีนจากการแยกด้วย วิธี Electrophoresis.....	18
2.8	โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน.....	19
2.9	โครงสร้างส่วน variable และ constant region ของแอนติบอดี.....	20
2.10	การย่อยอิมมูโนโกลบูลินของเอนไซม์ papain และ pepsin .....	21
2.11	โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละชนิด .....	24
2.12	กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ .....	30
2.13	ลักษณะของ Filamentous phage.....	33
2.14	ขั้นตอนการคัดเลือก phage ที่แสดงออกของโปรตีนที่สนใจ .....	34
3.1	ขั้นตอนการหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลองด้วยวิธี indirect ELISA.....	45
3.2	ขั้นตอนการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	47
3.3	การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์.....	54
3.4	การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ .....	55
3.5	อุปกรณ์ที่ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE.....	57

ภาพที่	หน้า
3.6 หลักการตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีด้วยวิธี immunonephelometry.....	60
3.7 เครื่อง TURBOX <sup>®</sup> plus Protein Analyzer .....	60
4.1 ผลการทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองที่ระดับความเจือจางต่างๆ โดยใช้สาร HSA เคลือบกันหลุม .....	65
4.2 ผลการเปรียบเทียบการศึกษาชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1-14 จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit.....	70
4.3 ผลการเปรียบเทียบการศึกษาชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 15-28จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit.....	71
4.4 โครมาโทแกรมจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography.....	78
4.5 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE.....	80
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล (kDa) กับค่า R <sub>f</sub> ของ Molecular weight marker.....	81
4.7 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	85
4.8 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	86
ก.1 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/A3, 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E7/H8, และ 4/B11/G3/B7/G12 ต่อ HSA อีสระจากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	106
ก.2 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/C10/D3, 4/B11/G3/C10/G4, 4/B11/G3/E12/C8, และ 4/B11/G3/E12/E5 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	107

ภาพที่	หน้า
ก.3 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/D11, 4/B11/G3/H11/G11, 11/E12/D10/A3/G3, และ 11/E12/D10/C4/E6 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	107
ก.4 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11/E12/D10/D4/G12, 11/E12/D10/E5/G2, 11/E12/D10/G5/G7, และ 11/E12/D10/G6/C12 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	108
ก.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D1/D1/D2/G6, 6/D1/D1/G2/H7, 6/D1/D1/E3/G10, และ 6/D1/G1/E7/G5 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	108
ก.6 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D1/G1/G7/G8, 6/D1/G1/D8/E10 6/D2/D6/C11/A2, และ 6/D2/D6/C11/C3 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirectcompetitiveELISA.....	109
ก.7 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D2/D66/C11/E4, 6/D2/D6/C11/E5, 6/D2/D6/G11/A8, และ 6/D2/D6/G11/A9 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA.....	109
ก.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA จากการทดสอบด้วยวิธี BCA....	113

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ**

Abs	Absorbance
B	Absorbance obtained from ELISA with competitors
B <sub>0</sub>	Absorbance obtained from ELISA without competitors
BCA	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
CH	Constant region of heavy chain
CHD	coronary heart disease
CL	Constant region of light chain
CVD	cardiovascular disease
Da	Dalton (g/mol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
FIA	Freund's incomplete adjuvant
HAT	Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine
Hb	Hemoglobin
HT	Hypoxanthine-Thymidine
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HRP	Horseradish peroxidase
IC <sub>50</sub>	50% of inhibition concentration
Ig	Immunoglobulin
LOD	Limit of detection
M	Molar (mol/L)



mAb	monoclonal antibody
OPD	o-Phenylenediamine
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-T	0.05% Tween 20 in Phosphate buffer saline
PEG	Polyethylene glycol
R <sub>f</sub>	Relative mobility
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylenediamine
TK	Thymidine kinase
G	gram
M	milli
μ	micro

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin, Ig) หรือ แอนติบอดีเป็นสารชีวโมเลกุลจำพวกไกลโคโปรตีน สามารถพบได้ทั่วไปในสารน้ำของร่างกาย เช่น เลือด น้ำลาย น้ำตา มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (Antigen) ที่เข้ามาในร่างกายได้อย่างจำเพาะเจาะจง ช่วยทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมให้หมดไปจากร่างกาย แอนติบอดีแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โพลีโคลนอลแอนติบอดี คือแอนติบอดีที่สร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดบี (B lymphocyte) ต่างๆ กัน สามารถจับได้กับหน่วยย่อยบนผิวของแอนติเจน (antigen determinants หรือ epitope) หลายตำแหน่ง การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถทำได้โดยการฉีดแอนติเจนเข้าไปในสัตว์ทดลอง อาจเป็นกระต่าย ม้า แพะ หรือ แกะ ข้อดีของโพลีโคลนอลแอนติบอดีคือสามารถผลิตได้ง่าย ใช้เวลาในการผลิตไม่นาน และจากคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีในการจับได้กับ epitope หลายๆ ตำแหน่งบนโมเลกุลของแอนติเจน จึงสามารถทำให้เกิดการสานกันเป็นร่างแหระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีให้เห็นได้ แอนติบอดีชนิดนี้จึงเหมาะสมในการนำไปใช้ในปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) และการตกตะกอน (precipitation) เช่น immunoturbidimetry, immunoblotting, immunoprecipitation เป็นต้น

สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น เป็นแอนติบอดีที่ถูกสร้างมาจาก B lymphocyte เซลล์เดียวกัน แอนติบอดีชนิดนี้จึงมีลักษณะความเป็นโมโนโคลน มีความจำเพาะต่อหน่วยย่อยบนผิวของแอนติเจน เพียงหนึ่งตำแหน่ง ในปี ค.ศ. 1975 Kohler และ Milstein (1) ได้พัฒนาวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลอดทดลองขึ้น โดยการนำ B lymphocyte มาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็ง ได้เป็นเซลล์ลูกผสมที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ตามคุณสมบัติของ B lymphocyte และเซลล์ลูกผสมที่ได้สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัดตามคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง เรียกเทคนิคนี้ว่า hybridoma technique การพัฒนาเทคนิคดังกล่าว ทำให้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น ใช้ในการ

วินิจฉัยโรค ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ใช้ในการเตรียมสารให้บริสุทธิ์ ใช้ในการนับแยกชนิดของ เซลล์เม็ดเลือดขาว ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของ cell surface molecule ต่างๆ

ดังเช่นในงานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินของคน (Human serum albumin, HSA) โปรตีนดังกล่าวถูกสร้างขึ้นจากตับ มีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดัลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 585 ลำดับ ทำหน้าที่รักษาระดับแรงดันเลือด (blood pressure) ให้อยู่ในระดับสมดุล ช่วยรักษาความเป็นกรดเบสในเลือด เป็นโปรตีนขนส่งสาร (transporter protein) หลายชนิด เช่น ยา กรดไขมันอิสระ บิลิรูบิน ฮอร์โมน เป็นต้น การมีอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไตได้ โดยในการกรองสารน้ำของไต จะอาศัย glomerular basement membrane (GMB) ซึ่งมีลักษณะเป็นตาข่าย มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 10 นาโนเมตร ทำหน้าที่ร่วมกับ heparan sulfate ซึ่งเป็นประจุลบ เพื่อคัดกรองโมเลกุลตามขนาดและประจุ ทำให้อัลบูมินซึ่งมีประจุลบไม่สามารถรั่วออกมาในปัสสาวะได้ ในคนปกติจะพบอัลบูมินในปัสสาวะได้ไม่เกิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ในภาวะที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่ไต ทำให้คุณสมบัติในการคัดกรองสารของไตเปลี่ยนแปลงไป โดยระยะแรกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้านประจุของ heparan sulfate เกิดขึ้นก่อน (2) ทำให้อัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะมากกว่าปกติเล็กน้อย ในปริมาณ 30-300 มิลลิกรัมต่อวัน (30-300 มิลลิกรัมต่อลิตร) เรียกภาวะดังกล่าวว่าภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria, MAU) (3) จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างของ GMB ส่งผลให้ขนาดของช่องตาข่ายมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้สารต่างๆ ที่มีขนาดเล็กกว่าช่องตาข่าย รั่วออกมาในปัสสาวะได้เพิ่มขึ้น เกิดภาวะที่มีอัลบูมินในปัสสาวะมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อวันหรือมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เรียกภาวะนี้ว่า (macroalbuminuria) ในระยะนี้จะมีคามผิดปกติอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น มีปริมาณยูเรียไนโตรเจนในเลือด (Blood Urea Nitrogen) เพิ่มขึ้น ปริมาณสารครีเอทีนีน (creatinine) ในเลือดสูงกว่าค่าปกติ ซึ่งการตรวจพบความผิดปกติของไตในระยะเริ่มแรกที่ตรวจพบไมโครอัลบูมินในปัสสาวะสามารถทำการรักษาให้หายกลับสู่ภาวะปกติได้ แต่หากตรวจพบในระยะที่ไตมีความผิดปกติมากแล้ว การรักษาจะทำได้เพียงการประคับประคองตามอาการ เพื่อชะลอการดำเนินของโรคที่จะเข้าสู่โรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายให้เกิดช้าลงเท่านั้น ดังนั้นการตรวจคัดกรองระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจึงมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเบาหวาน

สมาคมโรคเบาหวานแห่งอเมริกาได้มีคำแนะนำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ที่มีการดำเนินของโรคนานกว่า 5 ปี และผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ควรได้รับการตรวจคัดกรอง

ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ เป็นประจำทุกปี (4) ทั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันการเป็นโรคแทรกซ้อนโรคไตจากเบาหวานได้ในระยะเริ่มแรก

การตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ สามารถตรวจวัดได้ทั้งในเชิงปริมาณและกึ่งปริมาณ ในการตรวจวัดเชิงปริมาณนั้น ทำได้หลายวิธี เช่น immunoturbidimetry (5), immunofluorescence (6), radioimmunoassay (RIA) (7, 8) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (9) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้มีขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์หลายขั้นตอน ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน ไม่เหมาะที่จะใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรอง ซึ่งวิธีที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ทั่วไปนิยมใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรอง คือการตรวจโดยวิธี immunochromatography (10) เป็นการตรวจวัดเชิงกึ่งปริมาณ โดยใช้แถบตรวจปัสสาวะที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินเป็นตัวตรวจจับ วิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนในการตรวจวัดไม่ยุ่งยาก สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยดูจากแถบสีที่เกิดขึ้น ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ไม่นาน มีความไวและความจำเพาะที่ยอมรับได้ในทางการแพทย์

อย่างไรก็ตาม สำหรับประเทศไทย ชุดตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะรวมทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินที่ใช้ในปัจจุบัน ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ทำให้การตรวจวัดภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคนในงานวิจัยครั้งนี้ จึงเป็นการนำแอนติบอดีที่ผลิตเองมาใช้แทนแอนติบอดีที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจวัดอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะได้ต่อไปในอนาคต เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองการเป็นโรคไตจากเบาหวาน เช่นพัฒนาเป็นชุดตรวจวัดแบบไบโอเซนเซอร์หรือชนิดแถบตรวจปัสสาวะที่สามารถทราบผลได้ทันที เป็นการลดการพึ่งพาเทคโนโลยีและลดการนำเข้าจากต่างประเทศได้ทางหนึ่ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วยเบาหวานจำนวนมากในประเทศ

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนอัลบูมินในคน
- 2 เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้
- 3 เพื่อทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

### ขอบเขตของการวิจัย

- 1 คำนคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- 2 ศึกษาระดับระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อ HSA
- 3 หลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HSA
- 4 ศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้
- 5 ทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์
- 6 ศึกษาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์
- 7 วิเคราะห์ สรุปผลการทดลองและเขียนวิทยานิพนธ์

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

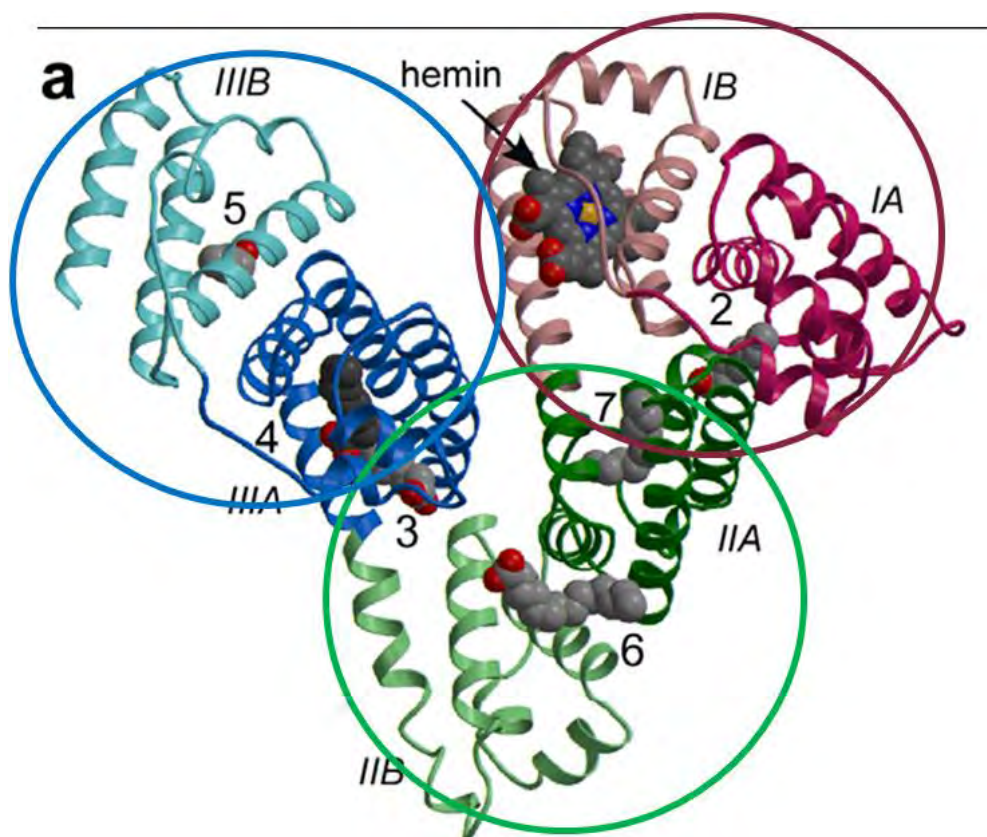
สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความไวและความจำเพาะต่อ HSA แทนการนำเข้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพง โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ สามารถใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยหรือแถบตรวจอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะที่มีความไวและความจำเพาะขึ้นใช้เองภายในประเทศ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 อัลบูมินในซีรัมคน (Human serum albumin, HSA)

อัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดในเลือด เมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยคิดเป็น 40-60% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในซีรัม อัลบูมินถูกสร้างมาจากเซลล์ตับในรูปของ preproalbumin ซึ่งมีส่วนของ N-terminal ติดอยู่ preproalbumin จะถูกเปลี่ยนรูป โดยมีการตัดส่วนปลาย N-terminal ที่ และถูกปล่อยออกมาจาก rough endoplasmic reticulum ซึ่งเป็น organelle หนึ่งภายในเซลล์ ในรูปของ proalbumin จากนั้น proalbumin จะถูกเปลี่ยนรูปอีกครั้ง โดยการทำงานของ Golgi vesicles จนได้เป็นอัลบูมินในซีรัม (11) จากการศึกษาในระดับโมเลกุลของอัลบูมินในเลือด พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 585 ลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดัลตัน มีคุณสมบัติในการละลายน้ำ และมีอายุครึ่งชีวิตประมาณ 20 วัน อัลบูมินมีหน้าที่ในการขนส่งสารต่างๆ (transporter protein) เนื่องจากเป็นโปรตีนที่สามารถจับได้กับสารหลายชนิด เช่น บิลิรูบิน สเตอรอยด์ กรดไขมันอิสระ แคลเซียม ยาชนิดต่างๆ ฮอร์โมน มีหน้าที่ในการรักษาความเป็นกรดด่างของเลือด ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาระดับความดันของเส้นเลือด (oncotic pressure) โดยเป็นตัวควบคุมสมดุลน้ำระหว่างในและนอกเส้นเลือด ในกรณีที่ระดับอัลบูมินต่ำกว่าปกติ จะส่งผลให้น้ำภายในหลอดเลือด แพร่ออกสู่เนื้อเยื่อ มีผลให้เกิดอาการบวม โดยค่าปกติของซีรัมอัลบูมินในผู้ใหญ่คือ 35-55 g/L ซึ่งอาการบวมมักเกิดขึ้นเมื่อระดับอัลบูมินต่ำกว่า 20 g/L การมีอัลบูมินต่ำกว่าปกติ อาจมีสาเหตุมาจาก การสูญเสียอัลบูมินทางปัสสาวะในผู้ป่วยโรคไตกรวยไตอักเสบเรื้อรัง การสูญเสียอัลบูมินทางอุจจาระในผู้ป่วยโรคมะเร็งทางเดินอาหาร การสูญเสียอัลบูมินทางผิวหนัง เช่น คนที่ถูกไฟไหม้ หรือ น้ำร้อนลวก และเนื่องจากอัลบูมินถูกสร้างขึ้นจากตับ จึงใช้ระดับอัลบูมินในซีรัมเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของตับในการสังเคราะห์สารว่าเป็นปกติหรือไม่ ใช้ในการประเมินความรุนแรงของการเกิดพยาธิสภาพของตับ ใช้ในการติดตามผลการรักษาในผู้ป่วยโรคตับเรื้อรัง นอกจากนี้ จากการศึกษาที่ระดับซีรัมอัลบูมินแปรตามปริมาณโปรตีนที่ร่างกายได้รับ จึงสามารถใช้ระดับอัลบูมินในซีรัมเป็นตัวบ่งชี้ภาวะโภชนาการได้



**รูปที่ 2.1** โครงสร้างสามมิติของอัลบูมินจากซีรัมคน ซึ่งประกอบด้วย 3 domain ที่เป็น Homologous กัน (I-III) และแต่ละ domain ประกอบด้วย 2 subdomain คือ A และ B subdomain (12-14)

นอกจากนี้ อัลบูมินในปัสสาวะยังสามารถเป็นตัวบ่งชี้การเกิดพยาธิสภาพที่ไตได้ด้วย โดยในภาวะที่ไตมีการทำงานเป็นปกติ จะสามารถพบอัลบูมินในปัสสาวะได้เล็กน้อยในปริมาณไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (15, 16) แต่หากมีพยาธิสภาพที่ส่งผลต่อโครงสร้างและการสูญเสียหน้าที่ของไตเกิดขึ้น พบว่าปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะจะมีค่าสูงขึ้นเกินค่าปกติ เรียกภาวะนี้ว่า ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria) ซึ่งเป็นภาวะที่มีโปรตีนชนิดอัลบูมินรั่วออกมาในปัสสาวะในช่วง 20-200 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับปัสสาวะที่เก็บแบบสุ่ม (random urine) หรือระหว่าง 30-300 มิลลิกรัมสำหรับปัสสาวะที่เก็บใน 24 ชั่วโมง การตรวจพบภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะมีความสำคัญเนื่องจากทำให้ทราบถึงการเกิดพยาธิสภาพที่ไตในระยะเริ่มแรก ซึ่งสามารถทำการรักษาให้การทำงานของไตกลับเข้าสู่ภาวะปกติได้ การตรวจคัดกรองอัลบูมินในปัสสาวะจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ทั้งนี้เนื่องจากผู้ป่วยเบาหวานมีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคไตจากเบาหวานได้สูง (17, 18)

นอกจากนี้ ภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ (coronary heart disease, CHD) (19-21) ซึ่งส่งผลต่อการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (22-24) มีข้อแนะนำจากสมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association) ให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ควรเข้ารับการตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะตั้งแต่เริ่มแรกที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวาน และควรเข้ารับการตรวจคัดกรองต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี และในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 ควรเข้ารับการตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะเป็นประจำทุกปีหลังจากมีการดำเนินของโรคเบาหวานมานานกว่า 5 ปี (4, 25) นอกจากนี้ ยังพบว่าในประชากรทั่วไปที่มีภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะจะมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ และเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตในเวลาต่อมา (26-31)

## 2.2 การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ

### วิธี Immunoturbidimetry

เป็นการตรวจวัดในเชิงปริมาณ หลักการคือ เมื่อมีการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนเกิดขึ้น เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า antigen-antibody complex ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดได้โดยการนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ซึ่งปริมาณของ antigen-antibody complex ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณแอนติเจนที่มีในสิ่งตัวอย่าง (32-34) มีงานวิจัยที่ทำการตรวจวัดระดับอัลบูมินในตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธี Immunoturbidimetry (35) จากการศึกษาพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโดยวิธีนี้ มีค่าระหว่าง 5-400 mg/L เมื่อนำค่าที่วัดได้จากวิธีนี้มาเปรียบเทียบกับผลจากการทดสอบโดยวิธี radial immunodiffusion พบว่าให้ผลการตรวจวัดที่สอดคล้องกันสูง มีค่า linear correlation เท่ากับ 0.99 นอกจากนี้ วิธี immunoturbidimetry ยังมีข้อดีคือ เทคนิคไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ใช้เวลาในการตรวจวัดไม่นาน เหมาะสำหรับกรณีที่ต้องตรวจสิ่งตัวอย่างจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้แอนติบอดีปริมาณมากในการวัดแต่ละปฏิกริยา

### วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

วิธี ELISA นี้ จะมีแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ถูกตรึงไว้บน solid phase ซึ่งอาจจะเป็นผิวของ microplate หรือ bead ปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่เกิดขึ้นสามารถ

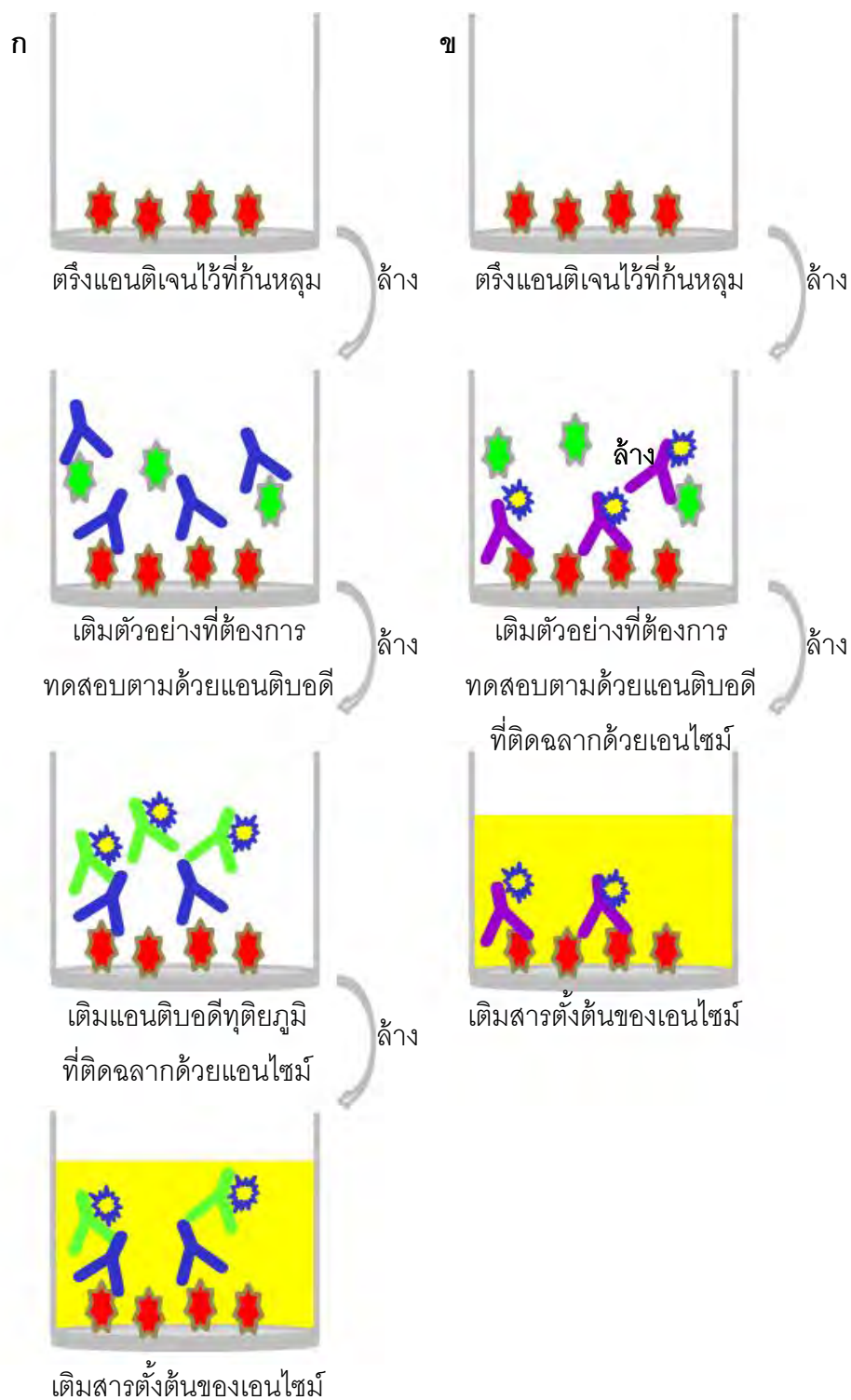


ตรวจหาได้โดยดูจากการย่อยสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่ติดฉลากไว้ที่แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) (36, 37) การเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ELISA reader หรือสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะด้วยหลักการ ELISA สามารถทำได้หลายแบบ ดังนี้

ก.) Indirect competitive ELISA โดยการตรึงแอนติเจนไว้ที่ก้นหลุม

จะเป็นการตรึงแอนติเจน ซึ่งในที่นี้คืออัลบูมิน ไว้ที่ก้นหลุมของ ELISA plate จากนั้นเติมอัลบูมินมาตรฐานหรือตัวอย่างปัสสาวะที่ต้องการทดสอบ ตามด้วยการเติมแอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่ออัลบูมินของคน ซึ่งได้จากซีรัมของกระต่าย (rabbit anti-human albumin, RaH-Alb) (38, 39) กรณีที่สิ่งตัวอย่างมีอัลบูมินปริมาณมาก ก็สามารถแข่งขันกับแอนติบอดีได้มาก ทำให้เหลือแอนติบอดีไปจับกับอัลบูมินที่ก้นหลุมได้น้อย ในทางกลับกันหากในสิ่งตัวอย่างมีอัลบูมินปริมาณน้อย ก็จะมีแอนติบอดีเหลือให้ไปจับกับอัลบูมินที่ก้นหลุมได้มาก จากนั้นทำการล้างเพื่อแยกอัลบูมินและแอนติบอดีที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ได้จากซีรัมแกะ ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีของกระต่ายและติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (goat anti-rabbit immunoglobulin labeled with horseradish peroxidase, GaR-IgG-HRP) ล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ทำการตรวจหาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ลงไปทำปฏิกิริยาและวัดความเข้มสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ELISA reader โดยค่าที่ได้จากการวัดจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง (รูปที่ 2.2 ก.) ซึ่งพบว่าวิธีดังกล่าวมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดเท่ากับ 0.2-12.5 mg/L และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์จากวิธีดังกล่าวกับวิธี immunoturbidimetry พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์มีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า r เท่ากับ 0.940 (38)

นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดให้มีความรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งมีหลักการเช่นเดียวกัน โดยทำการเคลือบอัลบูมินไว้ที่ก้นหลุม จากนั้นเติมปัสสาวะที่ต้องการทดสอบหรือสารละลายอัลบูมินมาตรฐานลงไป ตามด้วยแอนติบอดีต่ออัลบูมินของคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (รูปที่ 2.2 ข.) (40, 41) บ่มปฏิกิริยา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 37 องศาเซลเซียส เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น วิธีนี้ให้ความไวในการตรวจวัดเท่ากับ 10 ng มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 0.1-10 µg/ml ให้ค่า %recovery ที่ระดับ 95% และมีความรวดเร็วในการตรวจวัด โดยหลังจากเติมสิ่งตัวอย่างแล้ว ใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยาเพียง 1 ชั่วโมง ก็สามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ (41)



**รูปที่ 2.2** ขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการตรึงแอนติเจนไว้ที่ก้นหลุม วิธี ก.มีการใช้ secondary antibody ; วิธี ข ไม่มีการใช้ secondary antibody

### ข.) Indirect competitive ELISA โดยการตรึงแอนติบอดีไว้ที่ก้นหลุม

ทำการตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินไว้ที่ก้นหลุม จากนั้นเติมสารละลายอัลบูมินมาตรฐานหรืออัลบูมินจากสิ่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ พร้อมกับเติมอัลบูมินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งทราบความเข้มข้นลงไปพร้อมกัน อัลบูมินในสิ่งตัวอย่างและอัลบูมินที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีที่ก้นหลุม ทำการล้างอัลบูมินส่วนเกินที่ไม่ปฏิกิริยาออกไป เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยสัญญาณที่ได้จากการตรวจวัดจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง ช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดด้วยวิธีนี้มีค่าเท่ากับ 0.2-12.5 mg/L และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์จากวิธีดังกล่าวกับวิธี immunoturbidimetry พบว่าผลการตรวจวิเคราะห์มีความสัมพันธ์กัน โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.940 (38)

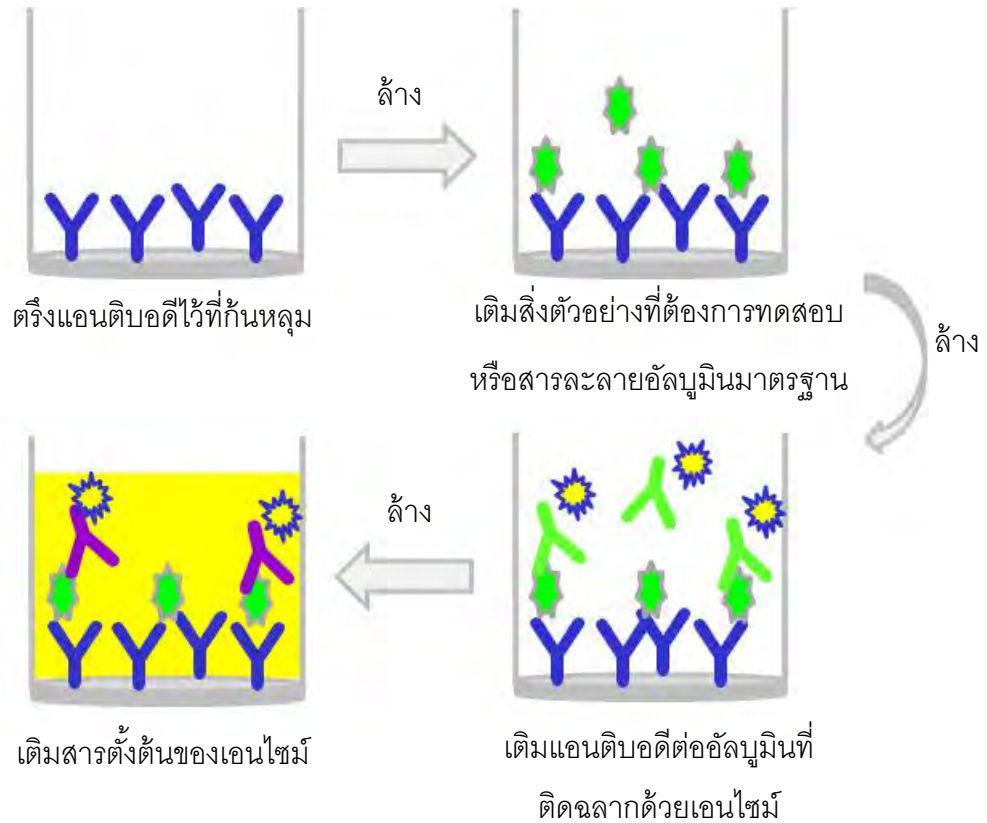


รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการตรึงแอนติบอดีไว้ที่ก้นหลุม

### ค.) Indirect sandwich ELISA

หลักการคือ ตรึงแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินไว้ที่ก้นหลุม อาจเป็นได้ทั้งโมโนโคลนอลแอนติบอดีหรือโพลีโคลนอลแอนติบอดี เมื่อเติมปัสสาวะที่ต้องการทดสอบหรือสารละลายอัลบูมินมาตรฐานลงไป อัลบูมินในสารละลายจะถูกจับไว้ด้วยแอนติบอดีที่ตรึงไว้ที่ก้นหลุม ทำการล้างอัลบูมินส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไป จากนั้นเติมแอนติบอดีต่ออัลบูมินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก (9, 42, 43) ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์และวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น (รูปที่ 2.4) การตรวจวัดด้วยวิธีดังกล่าว พบว่ามีความไวในการตรวจวัดเท่ากับ 1.6  $\mu\text{g/ml}$  สามารถตรวจวัดอัลบูมินได้ในช่วง

1.6-100  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจวิเคราะห์กับวิธี nephelometry (Behring BNII) พบว่าค่าที่ได้มีความสัมพันธ์กัน ( $r = 0.99$ ) (43)



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการตรวจวัดอัลบูมินด้วยวิธี indirect sandwich ELISA

### วิธี Radioimmunoassay

วิธี radioimmunoassay ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ.1960 โดย Yalow & Berson (44) เพื่อใช้ในการตรวจหาระดับอินซูลินในเลือด เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วในการตรวจวัด มีความแม่นยำ และความไวสูง โดยสามารถตรวจวัดสารปริมาณน้อยในระดับพิโคกรัมได้ จึงนิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น ฮอร์โมน ยา โปรตีน การตรวจวัดอัลบูมินในปัสสาวะโดยเทคนิค radioimmunoassay สามารถทำได้โดยใช้อัลบูมินที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ได้แก่  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  ซึ่งให้รังสีแกมมา หรือ  $^3\text{H}$  ซึ่งให้รังสีเบต้า เป็นตัวแข่งขันกับอัลบูมินที่มีในสิ่งตัวอย่าง อัลบูมินทั้งสองกลุ่มจะแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมิน จากนั้นทำการแยกอัลบูมินที่ติดฉลากที่ทำปฏิกิริยา (bound radiolabelled albumin) ออกจากอัลบูมินอิสระ (free radiolabelled albumin) โดยใช้ anti-immunoglobulin antibody เป็นตัวทำให้เกิดการตกตะกอน จากนั้นนำไปปั่นแยกเพื่อนำตะกอนซึ่งมีส่วน bound radiolabelled albumin อยู่ไปตรวจวัด

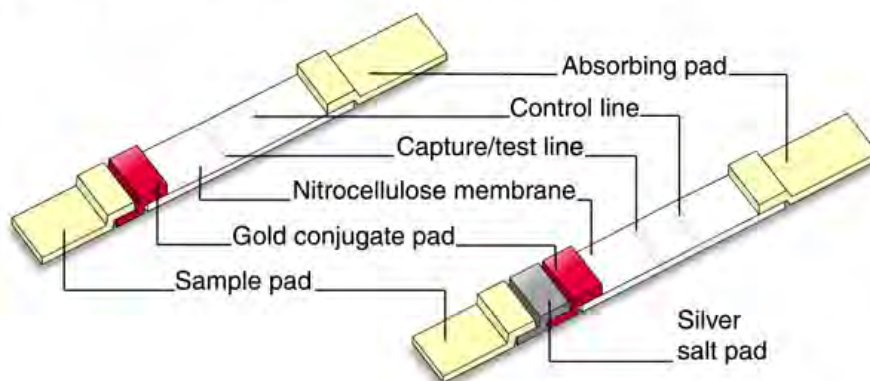
ปริมาณรังสี จากวิธีดังกล่าวนี้ ปริมาณรังสีที่ตรวจวัดได้จะมีส่วนกลับกันกับปริมาณอัลบูมินที่มีในสิ่งตัวอย่าง นอกจากนี้ได้มีการใช้กระดาษกรองมาช่วยในการแยก free radiolabelled albumin ออกจาก bound radiolabelled albumin แทนการทำให้ตกตะกอนด้วย anti-immunoglobulin antibody โดยวางกระดาษกรองไว้ที่ก้นของ scintillation counting tube ในแนวขวาง ก่อนทำการวัดปริมาณรังสี (7) นอกจากนี้ เทคนิค radioimmunoassay ยังสามารถทำได้บนผิวของ solid-phase เช่น Sepharose bead, polystyrene plate ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นจะเกิดบนผิวของ solid-phase โดยแต่ละขั้นตอนต้องมีการล้างเพื่อแยกแอนติบอดีหรือแอนติเจนส่วนเกินออก เรียกวิธีนี้ว่า Solid-phase radioimmunoassay (45)

### วิธี Immunochromatography assay

เป็นการตรวจแบบ rapid test ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกิดบน Nitrocellulose membrane หรือ Nylon membrane ซึ่งอาจมีลักษณะเป็น strip หรือ cassette หากพิจารณาจากลักษณะการไหลของของเหลว สามารถแบ่งชุดตรวจออกเป็น 2 ชนิด คือ vertical flow assay เป็นการไหลของของเหลวตามแนวตั้ง และ lateral flow assay เป็นการไหลของของเหลวตามแนวราบหรือแนวนอน

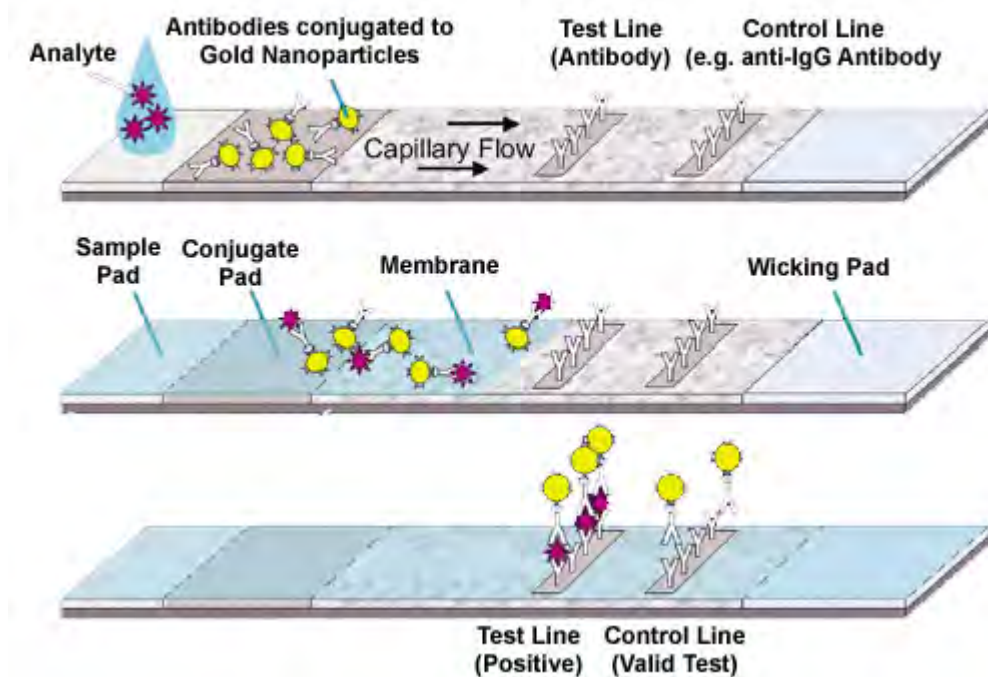
แผ่นทดสอบจะประกอบด้วยแถบแสดงผลอย่างน้อย 2 แถบ คือ แถบแสดงผล (Test line) เป็นแถบแสดงผลการทดสอบของสิ่งตัวอย่าง ที่แถบนี้อาจมีแอนติบอดีตรึงอยู่ และแถบควบคุม (Control line) เป็นแถบแสดงคุณภาพของชุดตรวจทดสอบที่ใช้ ซึ่งจะตรึง anti-immunoglobulin antibody แถบสีของจุดนี้จะต้องปรากฏสีเสมอในการทดสอบ การแปรผลจะขึ้นอยู่กับหลักการที่ใช้ในการทดสอบ

### Lateral Flow Immunochromatographic Devices



**รูปที่ 2.5** ส่วนประกอบของแถบตรวจวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย sample pad สำหรับหยดสิ่งตัวอย่างหรือจุ่มในสิ่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ, gold conjugate pad ซึ่งมีแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ติดฉลากตรึงอยู่, capture/test line สำหรับแสดงผลการทดสอบของสิ่งตัวอย่าง, และ control line สำหรับแสดงคุณภาพของแถบตรวจวิเคราะห์ (46)

ในกรณีของ sandwich method (10, 47-49) จะมีแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย colloidal gold ตรึงอยู่ที่บริเวณ gold conjugated pad เมื่อแอนติเจนในสารตัวอย่างผ่านมาเจอกับแอนติบอดี จะเกิดเป็น antigen-antibody complex ผ่านไปยังแถบทดสอบ เกิดการจับกับแอนติบอดีที่ตรึงอยู่ในลักษณะของแซนด์วิช ในขณะเดียวกัน ที่แถบควบคุม complex ดังกล่าวจะถูกจับไว้ด้วย anti-Ig antibody ในกรณีนี้ จะเห็นแถบสีปรากฏขึ้นทั้งสองแถบ แปลผลว่า positive หาก control line ปรากฏสีเพียงแถบเดียว แปลผลว่า negative



**รูปที่ 2.6** ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์แอนติเจนด้วยแถบตรวจวิเคราะห์ โดยใช้หลักการ sandwich lateral flow immunochemistry assay (50)

ในกรณีของ competitive method (51) จะใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วย gold colloidal ตรึงไว้ที่ gold conjugated pad เป็นตัวแข่งขันกับแอนติเจนจากสารตัวอย่าง เพื่อจับกับแอนติบอดีที่ตำแหน่ง test line และตรึงแอนติบอดีต่อสารที่ต้องการทดสอบ ไว้ที่แถบควบคุมคุณภาพ หากในสารตัวอย่างมีแอนติเจนอยู่ แอนติเจนจะแย่งจับกับแอนติบอดีที่แถบทดสอบ ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากไม่สามารถจับกับแอนติบอดีที่แถบทดสอบได้ จึงปรากฏสีที่แถบควบคุมเพียงแถบเดียว และแปลผลว่า positive ในทางตรงกันข้าม หากในสารตัวอย่างไม่มีแอนติเจน จะปรากฏสีทั้งในแถบทดสอบและแถบควบคุม และแปลผลว่า negative

### 2.3 สิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจน (Antigen, Ag) (52)

แอนติเจน คือ สารใดๆ ก็ตามที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับตัวรับแอนติเจนบนเซลล์ลิมโฟซัยท์ (T cell receptor) หรือทำปฏิกิริยาได้กับแอนติบอดี เรียกคุณสมบัติดังกล่าวว่า มีความเป็น Antigenicity แอนติเจนมีความแตกต่างจากอิมมูโนเจน โดยอิมมูโนเจนคือสารที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้ว สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่อสารนั้นๆ หรือมีคุณสมบัติ

ของการเป็น Immunogenicity ดังนั้น อิมมูโนเจนถือเป็นแอนติเจน แต่แอนติเจนไม่ทั้งหมดที่มีคุณสมบัติของการเป็นอิมมูโนเจน อย่างไรก็ตาม คำว่าแอนติเจนมักถูกใช้แทนคำว่าอิมมูโนเจนในกรณีที่สารชนิดนั้นมีทั้งคุณสมบัติของการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของทางระบบภูมิคุ้มกันและสามารถทำปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นได้ โดยสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีแตกต่างกัน ขึ้นกับคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

#### ก.) การเป็นสิ่งแปลกปลอม (Foreignness)

ร่างกายสามารถแยกสิ่งที่เป็นของตนเอง (self) ออกจากสิ่งแปลกปลอม (non self) ได้ กลไกดังกล่าวเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาการของเซลล์ลิมโฟไซต์ โดยสารใดก็ตามที่เซลล์ลิมโฟไซต์ไม่เคยพบเจอในระยะดังกล่าว จะถูกจัดเป็นสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย ยิ่งความเป็นสิ่งแปลกปลอมยิ่งมาก ก็ยิ่งกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การปลูกถ่ายอวัยวะ ถ้าผู้รับและผู้ให้เป็นฝาแฝดชนิด identical twin ร่างกายของผู้รับจะไม่เห็นอวัยวะที่ปลูกถ่ายเป็นสิ่งแปลกปลอม แต่หากอวัยวะที่ปลูกถ่ายมาจากผู้ให้ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับผู้รับ ร่างกายก็จะเห็นอวัยวะนั้นเป็นสิ่งแปลกปลอมและเกิดการตอบสนองต่ออวัยวะที่ได้รับมา อย่างไรก็ตาม มีสารบางอย่างในร่างกายที่ถูกเห็นเป็นสิ่งแปลกปลอมได้ ทั้งนี้เนื่องจากในภาวะปกติ สารเหล่านี้จะไม่พบโดยระบบภูมิคุ้มกันเลย เช่น cornea ของตา, อสุจิ เป็นต้น

#### ข.) ขนาดของโมเลกุล

พบว่ายิ่งสารมีขนาดใหญ่ก็ยิ่งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้น โดยเฉพาะสารที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 1,000 กิโลดัลตัน ในขณะที่สารที่มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดัลตัน มักจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีจำนวนของ antigenic determinant มากกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก

Antigenic determinant หรือ epitope เป็นหน่วยย่อยที่จะไปทำปฏิกิริยากับ T cell receptor หรือทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี มีการประมาณว่าในแต่ละ 5 กิโลดัลตัน จะประกอบไปด้วย 1 antigenic determinant เป็นสาเหตุให้สารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีกว่า เพราะมีจำนวนของ epitope มากกว่า

#### ค.) ความคงตัวของสาร

สารที่มีรูปทรงไม่แน่นอน มีรูปทรงที่ไม่เสถียร จะกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี เช่น เจลลาติน หรือแป้ง ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลไม่คงตัว จึงเป็นอิมมูโนเจนที่ไม่ดี ด้วยเหตุนี้ จึงเป็นเหตุให้โปรตีนมีคุณสมบัติของการเป็นอิมมูโนเจนที่ดีเมื่อเทียบกับ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และกรดนิวคลีอิก



### ง.) คุณสมบัติทางชีวเคมี

สารที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อน จะยังเป็นอิมมูโนเจนที่ดี มีสารประกอบชีวโมเลกุลหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดีได้ แต่พบว่าโปรตีนสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ เกิดเป็นสายพอลิเปปไทด์ขนาดต่าง ซึ่งสายพอลิเปปไทด์นี้ยังมีการม้วนพับไปมาจนเกิดเป็นรูปทรงต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีความหลากหลายของกรดอะมิโน จะมีความเป็น immunogenicity ที่ดีกว่าโปรตีนที่มีกรดอะมิโนชนิดเดียวกันซ้ำๆ (homopolymer)

### จ.) ปริมาณและช่องทางที่สารเข้าสู่ร่างกาย

การให้แอนติเจนในปริมาณที่มากหรือน้อยเกินไป อาจส่งผลให้เกิดภาวะที่ร่างกายไม่ตอบสนองต่อแอนติเจนที่ได้รับ เรียกภาวะดังกล่าวว่า immunological tolerance ดังนั้น ปริมาณแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายต้องให้ในปริมาณที่เหมาะสม และมีการกระตุ้นซ้ำหลายครั้ง (booster) นอกจากนี้ ช่องทางที่ร่างกายได้รับแอนติเจนก็มีผลต่อการตอบสนองที่แตกต่างกัน เช่นกัน แอนติเจนบางชนิด หากเข้าสู่ทางเดินหายใจอาจก่อให้เกิดภูมิแพ้ หรือการให้แอนติเจนทางเส้นเลือด แอนติเจนจะไปที่ม้ามก่อน หากให้ในปริมาณที่มากไป มีโอกาสก่อให้เกิด tolerance ได้สูง การให้แอนติเจนเข้าสู่ทางเดินอาหาร มักกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีที่บริเวณลำไส้ หรือการให้แอนติเจนโดยฉีดเข้าทางผิวหนัง แอนติเจนที่ได้รับจะไปต่อมน้ำเหลืองที่อยู่บริเวณใกล้เคียง ซึ่งมักให้การตอบสนองที่ดี

### ฉ.) พันธุกรรมของร่างกายผู้รับ

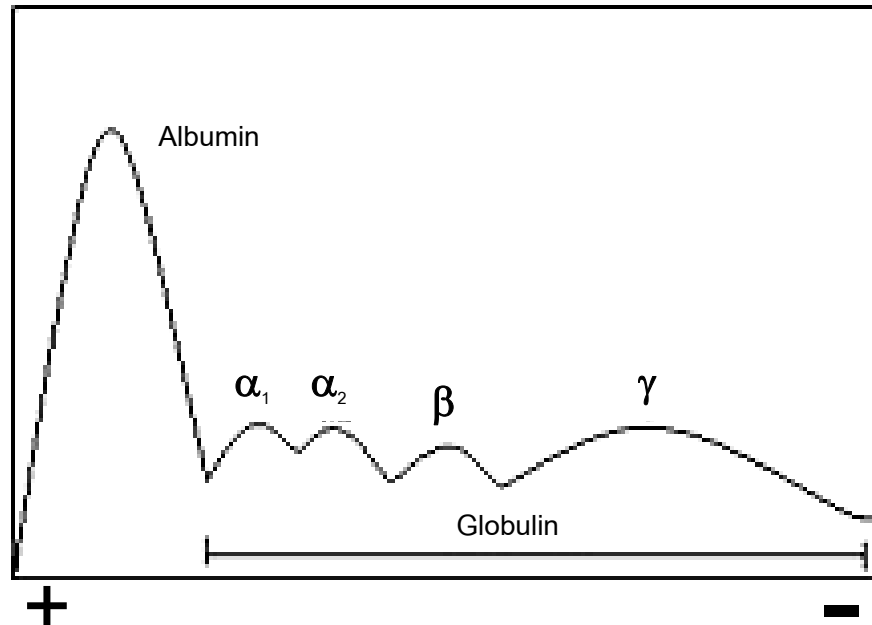
ระบบภูมิคุ้มกันถูกควบคุมโดยพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด แอนติเจนชนิดเดียวกัน อาจกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ดีในสัตว์ชนิดหนึ่ง แต่อาจจะกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ไม่ดีในสัตว์อีกชนิดหนึ่ง หรือแอนติเจนชนิดเดียวกัน อาจกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในแต่ละคนได้แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม สามารถเพิ่มความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารหนึ่งๆ ให้ดีขึ้นได้ โดยการนำสารดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับ hapten ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เมื่อ hapten รวมตัวกับสารอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจนแล้วจะสามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่โดยตัวเองแล้วไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ตัวอย่างของ hapten เช่น ยาต่างๆ, ฮอร์โมน ไขมัน หรือสารสังเคราะห์ เช่น dinitrophenyl (DNP)

## 2.4 แอนติบอดี (Antibody, Ab)

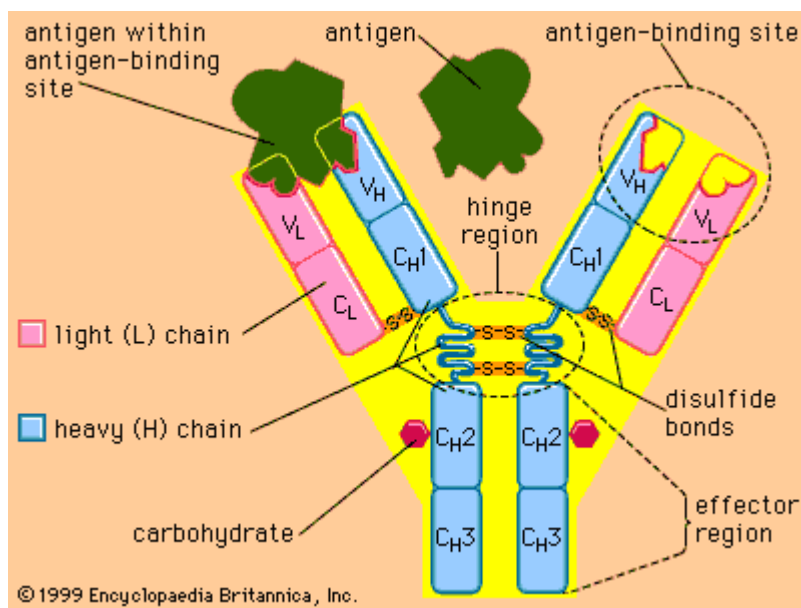
แอนติบอดีคือสารชีวโมเลกุลประเภทไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ (polypeptide) 82-96% และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) 4-18% เกิดจากการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันชนิด humoral mediated immunity respond (HMIR) ของร่างกายต่อแอนติเจนที่ได้รับ โดยแอนติเจนที่เข้าไปจะไปกระตุ้นเซลล์ B-lymphocyte ให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) และเปลี่ยนแปลง (differentiation) ตัวเองไปเป็น plasma cells ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างแอนติบอดี แอนติบอดีที่สร้างขึ้นจะถูกหลั่งเข้าสู่กระแสเลือดและสารคัดหลั่งทั่วไปในร่างกาย เช่น น้ำตา น้ำลายหรือน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหาร เพื่อมาจับและทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่มากระตุ้นได้อย่างจำเพาะ

จากการนำซีรัมของสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีมาทำการแยกส่วนของโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) พบว่าซีรัมโปรตีนแยกออกเป็นแถบดังรูปที่ 2.7 โดยอัลบูมินซึ่งมีขนาดเล็กและมีประจุลบมากที่สุด จะสามารถเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวกได้เร็วที่สุด ถัดมาคือ อัลฟ่า 1, อัลฟ่า 2, เบต้า, และแกมมา-โกลบูลิน เมื่อนำซีรัมมาแยกเอาแอนติบอดีออกโดยใช้แอนติเจนเป็นตัวดูดซับ และนำไปแยกส่วนโดยใช้กระแสไฟฟ้าอีกครั้ง พบว่า electrophoretogram ที่ได้มีส่วนของ แกมมา-โกลบูลินลดลง การทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนของแกมมา-โกลบูลิน จึงเป็นที่มาของการเรียกแอนติบอดีอีกชื่อหนึ่งว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig)



รูปที่ 2.7 electrophoretogram ของซีรัมโปรตีนจากการแยกด้วยวิธี Electrophoresis (53)

แอนติบอดี หรือ อิมมูโนโกลบูลิน ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 4 สาย ที่เชื่อมต่อกันด้วย disulfide bond ดังรูปที่ 2.8 แยกเป็นโปรตีนสายยาว 2 สายที่เหมือนกัน เรียกว่า heavy chain น้ำหนักโมเลกุล 50,000 กิโลดัลตัน และโปรตีนสายสั้น 2 สายที่เหมือนกัน เรียกว่า light chain น้ำหนักโมเลกุล 25,000 กิโลดัลตัน โดยแอนติบอดีจะใช้ส่วนปลายของด้าน amino terminal ในการจับกับแอนติเจน เรียกบริเวณดังกล่าวว่า antigen binding site ส่วนปลายอีกด้าน เรียกว่า carboxyl terminal ทำหน้าที่ด้านชีวภาพอื่น (ตารางที่ 2.1)



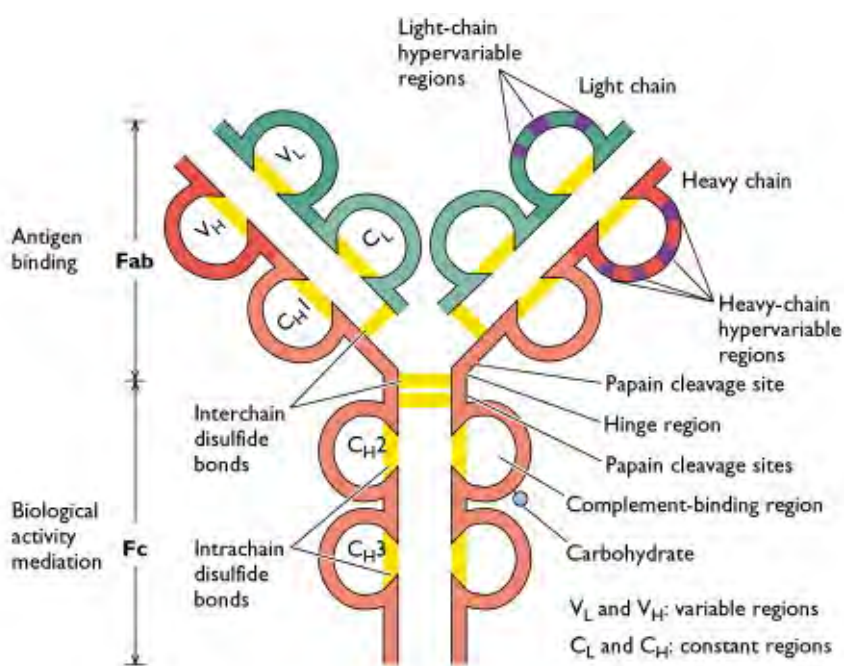
**รูปที่ 2.8** โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสายสั้น (light chain) และโปรตีนสายยาว (heavy chain) โดยมีพันธะ disulfide bond เป็นตัวเชื่อมโปรตีนแต่ละสายเข้าด้วยกัน (54)

**ตารางที่ 2.1** คุณสมบัติทางชีวภาพของแต่ละ domain ของอิมมูโนโกลบูลิน

Domain	หน้าที่
VH, VL	จับกับแอนติเจน
CH1	จับกับคอมพลีเมนต์ C4b
CH2	จับกับคอมพลีเมนต์ C1q
CH2+CH3	<ul style="list-style-type: none"> <li>จับกับ Fc receptor บน mononuclear cells, neutrophils, eosinophils, เกล็ดเลือด</li> <li>ทำปฏิกิริยากับ staphylococcus protein A</li> </ul>

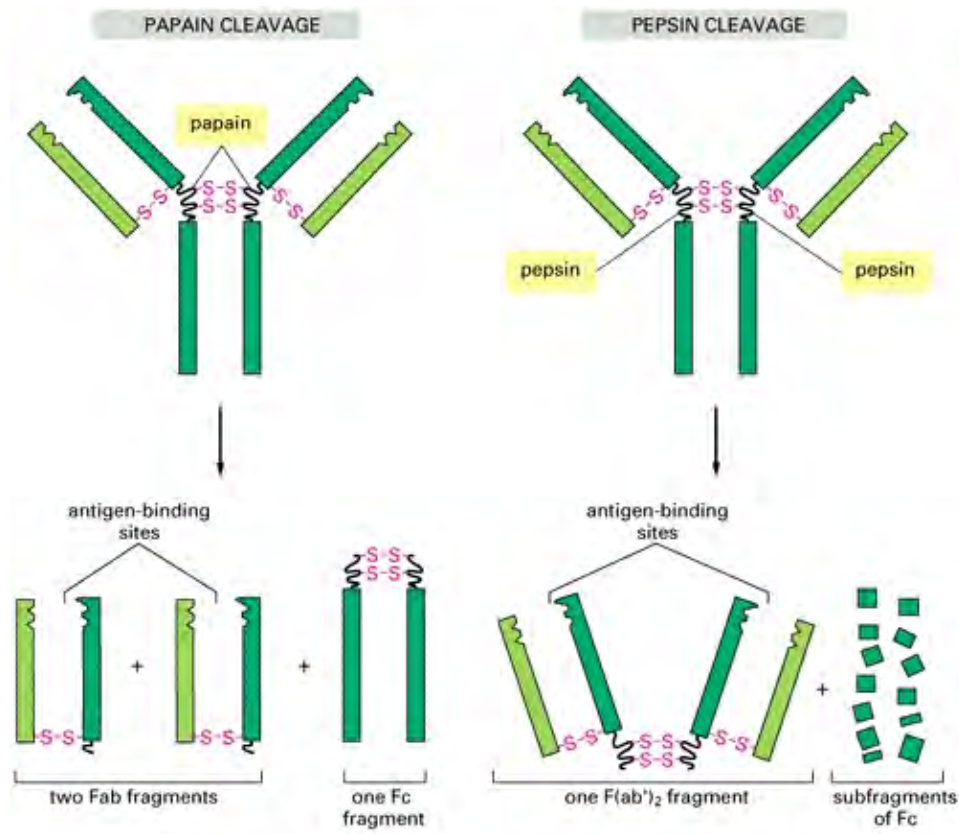
จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของสายโปรตีนแต่ละสาย พบว่า กรดอะมิโนลำดับที่ 1-100 ตัวแรกทางด้านปลาย amino terminal เป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนสูงในแต่ละโมเลกุล เรียกบริเวณนี้ว่า variable region ส่วนบริเวณอื่นของสายโปรตีนที่มีลำดับของกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่ เรียกบริเวณนี้ว่า constant region ซึ่ง light chain 1 สาย จะมี variable region 1 ส่วน ( $V_L$ ) และ constant region 1 ส่วน ( $C_L$ ) ในขณะที่ heavy chain 1 สาย จะมี variable region 1 ส่วน ( $V_H$ ) และ constant region 3-4 ส่วน ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ) และพบว่า

บริเวณกึ่งกลางของสาย heavy chain เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโนชนิด proline เป็นจำนวนมาก เรียกบริเวณนี้ว่า hinge region ซึ่งจากการที่บริเวณนี้มีกรดอะมิโนชนิดนี้อยู่มาก จึงส่งผลให้บริเวณนี้มีความยืดหยุ่นสูง ทำให้ปลายด้าน amino terminal สามารถยืดเปลี่ยนรูปร่างเพื่อจับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งของ variable region ทั้งของ heavy และ light chain พบว่าลำดับกรดอะมิโนส่วนใหญ่ 80-85% ค่อนข้างคงที่ แต่มีเพียง 3 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 30, 50, และ 95 ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ค่อนข้างมาก แต่ละตำแหน่งมีกรดอะมิโนประมาณ 10 ตัว เรียกตำแหน่งเหล่านี้ว่า hypervariable regions ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จับกับแอนติเจน โดยสามารถจับได้กับแต่ละ epitope ของแอนติเจนแต่ละชนิดได้อย่างพอเหมาะ จึงเรียกตำแหน่งนี้อีกชื่อหนึ่งว่า complementarity determining regions (CDRs) และเรียกตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่ซึ่งคั่นระหว่างแต่ละ CDRs ว่า framework regions ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของแอนติบอดี ซึ่งประกอบด้วย variable region (V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>) และ constant region (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>) (55)

ได้มีการนำแอนติบอดีมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ papain และ pepsin โดยเอนไซม์ papain จะย่อย Ig ที่บริเวณ hinge region เหนือพันธะ disulfide bond ทำให้ Ig ถูกตัดออกเป็น 3 ส่วน โดย 2 ส่วน สามารถจับกับแอนติเจนได้ แต่ไม่ทำให้ตกตะกอน เรียก 2 ส่วนนี้ว่า antigen binding fragment (Fab) อีกส่วนที่เหลือไม่สามารถจับกับแอนติเจนได้ แต่สามารถตกผลึกได้ เรียกส่วนนี้ว่า crytallizable fragmen (Fc) และจากการย่อย Ig ด้วยเอนไซม์ pepsin ซึ่งย่อยบริเวณ hinge region ได้พันธะ disulfide bond พบว่า Ig ถูกย่อยออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งสามารถจับกับแอนติเจนและทำให้ตกตะกอนได้ โดยมี Fab 2 แขนที่เชื่อมติดกันอยู่ เรียกชิ้นส่วนนี้ว่า  $F(ab')_2$  และพบว่าส่วน Fc ถูกย่อยออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ เรียกชิ้นส่วนย่อยของ Fc นี้ว่า pFc' ดังรูปที่ 2.10



**รูปที่ 2.10** การย่อยอิมมูโนโกลบูลินของเอนไซม์ papain ได้เป็นส่วนย่อย Fab 2 ส่วน และ Fc 1 ส่วน และผลจากการย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ได้เป็น  $F(ab')_2$  และ ชิ้นส่วนย่อยของ Fc fragment (56)

อิมมูโนโกลบูลินสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ชนิด (class) ตามความแตกต่างของ heavy chain คือ IgG, IgA, IgM, IgD, และ IgE แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในส่วน of ายละเอียดและคุณสมบัติต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

### Immunoglobulin G (IgG)

มีปริมาณมากที่สุดในซีรัมของคนปกติ ประมาณ 75-80% ของ Ig ทั้งหมด โมเลกุลของ IgG มีลักษณะเป็น monomer มี heavy chain เป็น gamma chain ส่วน light chain อาจเป็น kappa isotype หรือ lambda isotype ก็ได้ IgG ยังสามารถแบ่งออกเป็น 4 subclasses คือ IgG1 (60-70%), IgG2 (14-20%), IgG3 (4-8%), และ IgG4 (2-6%) โดยแต่ละ subclass มี heavy chain เป็น gamma1, gamma2, gamma3, และ gamma4 ตามลำดับ IgG สามารถผ่านจากแม่ไปสู่ลูกได้ เนื่องจาก IgG สามารถผ่านรกได้ จึงมีส่วนสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อในทารกแรกเกิดช่วง 2-3 สัปดาห์ และยังพบได้ในน้ำนมมารดา ร่วมกับ IgM และ IgA

IgG มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคติดเชื้อ โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ได้ IgG ที่จับอยู่บนเชื้อจุลินทรีย์สามารถกระตุ้นให้เกิดการจับกินจุลินทรีย์ของ phagocyte (opsonization) กระตุ้นให้เกิดการทำลายเชื้อผ่านขบวนการ antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) และยังทำให้แอนติเจนเกิดการเกาะกลุ่ม (agglutination) และตกตะกอน (precipitation) ได้

### Immunoglobulin A

มีปริมาณ 10-15% ของอิมมูโนโกลบูลินในซีรัม มี heavy chain เป็น alpha chain ที่จับกับ kappa หรือ lambda light chain IgA พบมากในสิ่งคัดหลั่งต่างๆ เช่น น้ำนมมารดา น้ำลาย น้ำตา หรือสิ่งคัดหลั่งในระบบทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และระบบขับถ่าย เรียกว่า secretory IgA ในสิ่งคัดหลั่งเหล่านี้ secretory IgA ส่วนใหญ่เป็น monomer ในขณะที่ secretory IgA ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น dimer ซึ่งเกิดจาก monomer 2 โมเลกุลที่มี J chain เป็นตัวเชื่อม secretory IgA มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อที่มักจะเข้าสู่ร่างกายทางเยื่อต่างๆ (mucosal immunity) เช่น เยื่อทางเดินอาหาร เยื่อทางเดินหายใจ นอกจากนี้ secretory IgA ในน้ำนมมารดา ยังมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อในทารก

### Immunoglobulin M

พบประมาณ 5-10% ของอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด เป็นแอนติบอดีตัวแรกที่ร่างกายสร้างขึ้นต่อแอนติเจนที่ได้รับ และเป็นแอนติบอดีชนิดแรกที่เด็กทารกสร้างได้เอง IgM มี heavy chain เป็น  $\mu$  chain เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็น pentamer ที่ประกอบจาก IgM 5 โมเลกุล เชื่อมเข้าด้วยกันด้วย disulfide bond และ J chain เนื่องจาก IgM มีจำนวน antibody binding site มากถึง 10 ตำแหน่ง จึงมีประสิทธิภาพในการจับกับแอนติเจนได้ดี สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ได้ดีมาก นอกจากนี้ในซีรัมแล้ว ยังพบ IgM ได้ในสิ่งคัดหลั่งต่างๆเช่นเดียวกับ secretory IgA และบนผิวเซลล์ของ B lymphocyte ทำหน้าที่เป็นที่รับสำหรับแอนติเจน และยังพบว่า แอนติบอดีต่อหมู่เลือดตามธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็น IgM

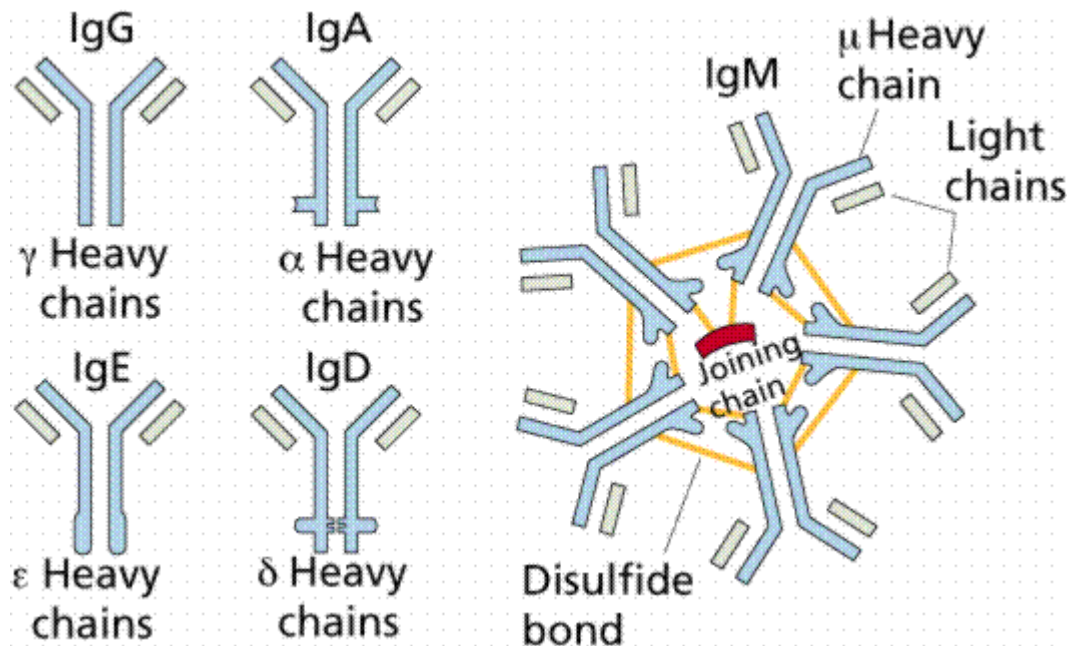
### Immunoglobulin D

มีปริมาณน้อยมากในซีรัม คือประมาณ 0.5% ของอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด มี heavy chain เป็น delta chain มีลักษณะเป็น monomer IgD เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่ไม่มี disulfide bonds เชื่อมระหว่าง heavy chain พบว่า IgD ส่วนใหญ่อยู่บน B lymphocyte ทำหน้าที่เป็นที่รับแอนติเจนและกระตุ้นการทำงานของ B cell

### Immunoglobulin E

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีปริมาณน้อยที่สุด มี heavy chain เป็น epsilon chain IgE เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคภูมิแพ้ โดย Fc ของ IgE สามารถจับได้อย่างแน่นหนา กับ Fc receptor ที่อยู่บนผิวของ mast cell และ basophils พบว่าเมื่อมีสารที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้มาจับกับ IgE ที่อยู่บน mast cell และ basophils ส่งผลให้เซลล์ดังกล่าวมีการหลั่งสารภายในเซลล์ซึ่งก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้อย่างเฉียบพลันออกมา นอกจากนี้ IgE ยังมีบทบาทในการป้องกันเชื้อปรสิตอีกด้วย





รูปที่ 2.11 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG, IgA, IgM, IgD, IgE (57)

#### 2.4.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immune response)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละชนิด และสามารถตอบสนองได้ไม่จำกัดนี้ สามารถอธิบายได้โดยทฤษฎีที่มีชื่อว่า Clonal selection ซึ่งกล่าวไว้ว่า ในร่างกายของคนแต่ละคนจะมีเซลล์ลิมโฟไซต์ประมาณ  $10^9 - 10^{11}$  โคลน เซลล์ในแต่ละโคลน จะสามารถตอบสนองต่อ epitope เดียว โดยแอนติเจนจะเป็นตัวกระตุ้นเซลล์ลิมโฟไซต์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ ส่งผลให้เซลล์ลิมโฟไซต์ในโคลนนั้นเกิดการเพิ่มจำนวนและแปรรูปไปเป็น effector cells และ memory cells ซึ่งกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

##### 1. Recognition phase

ขั้นตอนนี้ประกอบด้วย การจับกันระหว่างแอนติเจนกับ receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ลิมโฟไซต์ โดย surface immunoglobulin (sIg) ที่อยู่บนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี จะสามารถจับได้กับแอนติเจนที่เป็นโปรตีน, polysaccharides, lipids หรือสารเคมีทั้งรูปอิสระและที่ติดอยู่กับเซลล์ ส่วน receptor ที่อยู่บนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที (T lymphocyte) จะรับรู้และตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์ที่ถูกนำเสนอโดย antigen presenting cells (APC) เท่านั้น

## 2. Activation phase

ระยะนี้จะเกิดขบวนการต่างๆขึ้นภายในเซลล์ลิมโฟไซต์หลังการรับรู้แอนติเจนที่มากกระตุ้น ขบวนการที่เกิดขึ้นได้แก่

2.1 การเพิ่มจำนวน (Proliferation) ลิมโฟไซต์โคลนที่มีความจำเพาะกับแอนติเจน จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เพื่อให้ได้ลิมโฟไซต์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนมีจำนวนมากขึ้น

2.2 การแปรรูป (Differentiation) ลิมโฟไซต์ที่เพิ่มจำนวนนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็น effector cells หรือ memory cells โดยหากเป็นเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี จะแปรรูปไปเป็น plasma cell และทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีออกมาทำลายแอนติเจน และตายไปในที่สุด นอกจากนี้เซลล์ลิมโฟไซต์ส่วนหนึ่งจะมีการแปรรูปไปเป็น memory B cells ที่มีอายุยืนยาว ในขณะที่ T lymphocytes นั้น เมื่อมีการรับรู้แอนติเจน ก็จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและแปรรูปเช่นเดียวกัน โดยหากเป็น  $CD4^+$  T lymphocyte จะเกิดการเพิ่มจำนวนและแปรรูปเป็น activated  $T_H$  lymphocyte ทำหน้าที่หลั่งไซโตไคน์ต่างๆ ที่ช่วยทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ส่วน  $CD8^+$  T lymphocyte จะเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็น cytotoxic T lymphocyte ที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์อื่นที่มีแอนติเจนอยู่ภายใน หรือเซลล์มะเร็งได้

## 3. Effector phase

ระยะนี้จะเป็นระยะที่ลิมโฟไซต์ที่ได้รับการกระตุ้น มีการออกฤทธิ์ในการกำจัดแอนติเจน โดยในกรณีของ humoral immunity จะมีแอนติเจนที่จะไปจับกับแอนติเจนและเกิดการทำให้หมดฤทธิ์ (neutralization) หรือช่วยเสริมให้เกิดการ phagocytosis ได้ดีขึ้น (opsonization) ส่วนในด้านของ cell-mediated immunity จะมี activated  $T_H$  cells และ cytotoxic T cells ทำหน้าที่เป็น effector cells โดยการหลั่งไซโตไคน์มาเสริมความสามารถในการจับกินจุลชีพของเซลล์แมคโครฟาจ และไซโตไคน์ดังกล่าวยังย้อนมากระตุ้น  $T_H$  cell ให้มีการเพิ่มจำนวนและแปรรูป ส่วน cytotoxic T cells จะมีส่วนช่วยในการทำลายเซลล์ที่มีจุลชีพอยู่ภายใน หรือเซลล์ผิดปกติของร่างกายเอง เช่น เซลล์มะเร็ง

### 2.4.2 โพลีโคลนอลแอนติบอดี

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า เมื่อมีแอนติเจนหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย แอนติเจนจะไปกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ได้รับ ระบบภูมิคุ้มกันชนิด humoral mediated

immunity เป็นกลไกหนึ่งที่ถูกกระตุ้น ทำให้ B lymphocyte มีการเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็น plasma cell และสร้างแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็นตัวกระตุ้น อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาแอนติเจนโมเลกุลหนึ่งๆ จะพบว่าประกอบด้วย epitope มากมาย แต่ละ epitope สามารถไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อตัวมันเองได้ ดังนั้นแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นต่อแอนติเจนโมเลกุลหนึ่งๆ จึงเป็นผลรวมของแอนติบอดีต่อ Epitope ต่างๆ ที่อยู่บนแอนติเจนโมเลกุลนั้นๆ โดยแอนติบอดีเหล่านี้ถูกสร้างมาจาก B lymphocyte ที่ต่างกัน จึงเรียกแอนติบอดีเหล่านี้ว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody)

จากการที่โพลีโคลนอลแอนติบอดี สามารถทำปฏิกิริยาได้กับหลาย epitope บนแอนติเจน ทำให้การจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เกิดการสานต่อกันเป็นร่างแหที่เรียกว่า lattice formation ได้ดี โพลีโคลนอลแอนติบอดีจึงมีความเหมาะสมมากในการทำปฏิกิริยา agglutination และ precipitation อย่างไรก็ตาม มีการนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีไปใช้ในเทคนิคอื่นๆ เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence โดยข้อจำกัดในการนำโพลีโคลนอลแอนติบอดีไปใช้งาน คือ การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนอื่นที่มี epitope ร่วมกันได้ นอกจากนี้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมในแต่ละครั้งก็มีความแตกต่างกันทั้งด้านความไว ความแข็งแรงในการจับ และความจำเพาะ

โพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถเตรียมขึ้นได้ โดยการนำแอนติเจนที่สนใจ ฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง แอนติเจนจะไปกระตุ้น B lymphocyte ให้เปลี่ยนตัวเองไปเป็น plasma cell และผลิตแอนติบอดีเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งประกอบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ epitope ต่างๆ บนโมเลกุลของแอนติเจน จากนั้นจึงทำการเจาะเลือดและแยกเก็บซีรัม ซึ่งมีโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการอยู่ ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีได้แก่

### แอนติเจน

ควรมีคุณสมบัติของการเป็นสิ่งแปลกปลอม มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ปริมาณและทิศทางที่สัตว์ทดลองได้รับ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อแอนติเจน แอนติเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

#### ก.) Soluble antigen

เป็นแอนติเจนที่อยู่ในรูปสารละลาย เช่น ซีรัมโปรตีน อิมมูโนโกลบูลิน แอนติเจนชนิดนี้มักจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่ดี ในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จึงมักใช้ร่วมกับ adjuvant เพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดีได้ดียิ่งขึ้น

#### ข.) Insoluble antigen

เป็นแอนติเจนที่มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็ก เช่น aggregated protein หรือ inclusion body แอนติเจนชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ดีกว่าแอนติเจนในรูปสารละลาย เนื่องจากเมื่อแอนติเจนชนิดนี้เข้าสู่ร่างกาย จะถูกจับกินได้โดย antigen presenting cells เช่น macrophages, B lymphocyte หรือ dendritic cells ทำให้สามารถกระตุ้น T lymphocyte ได้ดี

#### ค.) Particulate antigen

เป็นแอนติเจนที่อยู่ในรูปสารเม็ด (particle) เช่น เซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ เชื้อโรคต่างๆ หรือ soluble antigen ที่ถูกนำมาเคลือบบนสารเม็ด แอนติเจนชนิดนี้สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีมาก ไม่จำเป็นต้องใช้ adjuvant เป็นตัวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ

### สัตว์ทดลอง

การเลือกสัตว์ทดลองควรคำนึงถึงชนิดของแอนติเจน คือ แอนติเจนที่ฉีดต้องถือเป็นสิ่งแปลกปลอมต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ หากมีแอนติเจนที่ต้องการฉีดในปริมาณน้อย ควรเลือกสัตว์ทดลองที่มีขนาดเล็ก เพราะจะใช้ปริมาณแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นน้อยกว่าสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ ควรทำการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองอย่างน้อย 2 ตัวขึ้นไป เนื่องจากสัตว์ทดลองส่วนใหญ่เป็นชนิด outbred แต่แต่ละตัวจึงมีการตอบสนองต่อแอนติเจนที่แตกต่างกัน ยกเว้น หนูสายพันธุ์ BALB/c ซึ่งเป็นชนิด inbred สัตว์ทดลองที่ใช้ควรมีสุขภาพแข็งแรง มีอายุไม่อ่อนหรือแก่เกินไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ เช่น อายุที่เหมาะสมของกระต่ายคือ 2-6 เดือน สำหรับเพศของสัตว์ทดลอง มักใช้สัตว์ทดลองเพศเมีย เนื่องจากเพศเมียจะแข็งแรงมากกว่าเพศผู้ ทำให้ง่ายต่อการดำเนินการต่างๆ ทั้งนี้และทั้งนั้น สัตว์ทดลองควรได้รับการเลี้ยงดูอย่างถูกสุขลักษณะ มีอาหารและน้ำเพียงพอ อยู่ในโรงเรือนที่มีระบบระบายอากาศและระบบรักษาความสะอาดเป็นอย่างดี ไม่ให้สัตว์มีสภาวะเครียด ซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างแอนติบอดีของสัตว์ทดลอง

### ช่องทางที่สัตว์ทดลองได้รับแอนติเจน

การจะเลือกฉีดแอนติเจนเข้าไปในช่องทางใด ขึ้นอยู่กับปัจจัยชนิดของแอนติเจน ชนิดของ Adjuvant และปริมาณแอนติเจนที่ใช้ เช่น การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) เหมาะสำหรับสัตว์ที่มีขนาดใหญ่รวมทั้งกระต่าย แอนติเจนที่เข้าไปจะสะสมอยู่ที่กล้ามเนื้อและจะค่อยๆ ถูกปล่อยออกสู่ต่อมน้ำเหลือง ใช้ได้กับแอนติเจนและ adjuvant ชนิดต่างๆ

การฉีดเข้าชั้นผิวหนัง (intradermal injection) วิธีนี้เหมาะกับสัตว์ขนาดใหญ่ แอนติเจนจะค่อยๆ ถูกปล่อยเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง เช่นเดียวกับการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เหมาะกับกรณีที่แอนติเจนมีปริมาณน้อยและแอนติเจนที่มีความเข้มข้นสูงๆ วิธีนี้ใช้ได้กับแอนติเจนทุกชนิด การฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) สามารถใช้ได้กับสัตว์หลายชนิด และใช้ได้กับแอนติเจนทั้งชนิด particulate antigen และ soluble antigen โดยแอนติเจนที่ฉีดเข้าใต้ผิวหนังจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณที่ฉีดอย่างรวดเร็ว การฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) เป็นวิธีที่สะดวกโดยเฉพาะกับสัตว์ที่มีขนาดเล็ก สามารถใช้ได้กับแอนติเจนชนิด particulate antigen และ soluble antigen และใช้ได้กับ adjuvant ทุกชนิด โดยแอนติเจนที่ฉีดจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง thoracic เข้าสู่เส้นเลือด vena cava ไปยังม้าม นอกจากนี้ยังมีการฉีดแอนติเจนเข้าสู่ lymphoid organ โดยตรง เช่น ต่อมน้ำเหลือง ม้าม ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยาก ต้องมีการวางยาสลบสัตว์ทดลอง อาจต้องผ่าตัดเปิดอวัยวะ และไม่สามารถใช้กับ adjuvant ได้

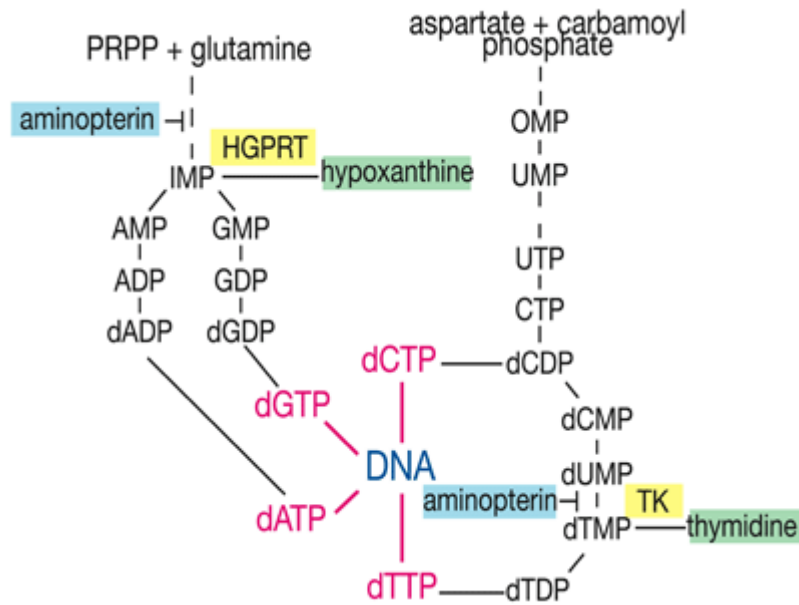
#### 2.4.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (58)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่ถูกสร้างมาจาก B lymphocyte เซลล์เดียวกัน และมีความจำเพาะต่อ antigenic determinant ตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งไม่มีทางเกิดขึ้นได้จริงในร่างกายสัตว์หรือมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ. 1975 Kohler และ Milstein (1) ได้พัฒนาวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่สามารถกำหนดความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ เรียกเทคนิคนี้ว่า hybridoma technique การคิดค้นเทคนิคนี้ได้นำมาซึ่งความรู้ งานวิจัย และเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยต่างๆ อีกมากมาย

Hybridoma technique เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย George Kohler และ Cesar Milstein ในปี ค.ศ. 1975 โดยการฉีดแอนติเจนเข้าไปในหนู เมื่อหนูมีการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่กระตุ้น จึงทำการฆ่าหนู เพื่อนำเอาม้ามซึ่งมี B lymphocyte อยู่ มาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) ได้เป็นเซลล์ลูกผสม เรียกว่า hybridoma ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นตามคุณสมบัติของ B lymphocyte และสามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัดตามคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง ภายหลังขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์ อาจมีเซลล์ม้ามที่หลอมรวมกันเอง เซลล์มะเร็งที่หลอมรวมกันเอง หรือเซลล์ม้ามหรือเซลล์มะเร็งที่ไม่หลอมรวมกับเซลล์ใดๆ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ต้องการ จึงต้องทำการคัดเลือกให้มีเพียง hybridoma cell เท่านั้น โดยการนำเซลล์หลังการหลอมรวมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hypoxanthine-Aminopterin-

Thymidine (HAT) medium ประมาณ 7-10 วัน หลังจากนั้นทำการคัดเลือก hybridoma cell ที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีการเจริญเติบโตของ hybridoma cell มาตรวจหาความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA เลือก hybridoma cell ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการ มาทำการแยกให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution สุดท้ายเมื่อได้ single hybridoma cell ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการ จึงนำ hybridoma cell ไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณมากๆ แล้วจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ หรืออีกวิธีหนึ่ง คือนำ hybridoma cell ไปฉีดเข้าช่องท้องของหนู เพื่อให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้างแอนติบอดีภายในช่องท้องของหนู แล้วจึงเก็บน้ำจากช่องท้องมาแยกเก็บแอนติบอดีก่อนนำไปใช้งาน

เซลล์ myeloma ที่ใช้ใน hybridoma techniques เป็นเซลล์มะเร็งชนิด B lymphocyte ของหนู มีคุณสมบัติพิเศษ คือ เป็น myeloma cell ที่ไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินโดยตัวมันเอง (59) และเป็นเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดย Salvage pathway ในเซลล์ปกติทั่วไป จะสามารถสร้างดีเอ็นเอได้ 2 ทาง คือ De novo pathway และ Salvage pathway โดยการสร้างดีเอ็นเอจากกระบวนการ Salvage pathway จำเป็นต้องมีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ thymidine kinase (TK) และ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่มีใน myeloma cell ดังนั้น myeloma cell จึงสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจาก De novo pathway ได้เพียงทางเดียว อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ myeloma cell มาเลี้ยงใน selective medium ที่มีชื่อว่า HAT medium (60) ซึ่งมี aminopterin เป็นตัวขัดขวางการสร้างดีเอ็นเอใน De novo pathway ส่งผลให้ myeloma cell ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในขณะที่ hybridoma cell ซึ่งเกิดจากการหลอมรวมระหว่าง myeloma cell และ B lymphocyte จะสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ใน HAT medium โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอจาก Salvage pathway เพราะเซลล์ไฮบริโดมาได้รับยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ HGPRT มาจาก B lymphocyte



**รูปที่ 2.12** กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ผ่านทาง De novo pathway และ salvage pathway ในกรณีที่ De novo pathway ถูกยับยั้งโดย aminopterin เซลล์จะเปลี่ยนไปสร้างดีเอ็นเอโดยกระบวนการ Salvage pathway ซึ่งจำเป็นต้องมีเอนไซม์ hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และ thymidine kinase (TK) (61)

เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่ามีความจำเพาะสูงกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี เกิดปฏิกิริยาข้ามได้น้อยกว่า เนื่องจากมีความจำเพาะต่อ epitope เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลแอนติเจน สามารถผลิตได้ในปริมาณเยอะตามต้องการ โดยคุณสมบัติที่ต่างกันระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.2

**ตารางที่ 2.2** การเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	โพลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (specificity)	เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ เนื่องจากมีความจำเพาะกับหลาย epitope	มีความจำเพาะสูง และคงที่
ความแข็งแรงในการจับ (Affinity)	ไม่คงที่ และไม่เท่ากันในแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล	คงที่ สามารถเลือกได้ตามต้องการในระหว่างการทำ cloning
ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ผลิตได้	ประมาณ 1 mg/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ประมาณ 100 ug/ml ใน เซลล์เพาะเลี้ยง</li> <li>● ประมาณ 20 mg/ml ใน ascitic fluid</li> </ul>
ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่ปนเปื้อน	มีการปนเปื้อนค่อนข้างสูงอาจสูงถึง 100%	ประมาณ 10% ใน ascitic fluid และไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	ใช้ Ag ที่บริสุทธิ์พอสมควร	ต้องใช้ Ag ที่บริสุทธิ์มาก หรือ ต้องทำ serum absorption
ต้นทุนในการผลิต	ต่ำ	ใช้เงินทุนค่อนข้างสูง

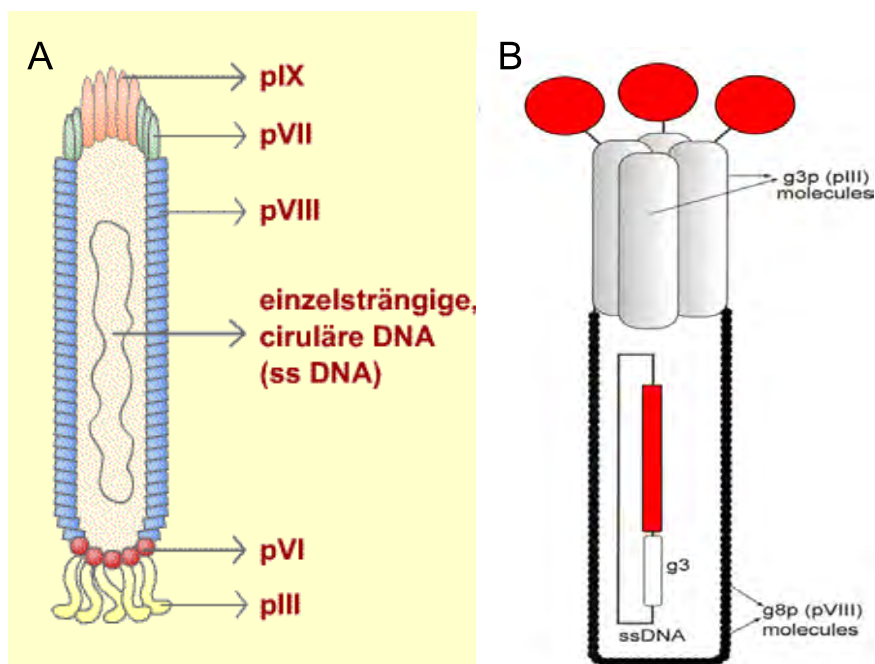
หลังจากการคิดค้น hybridoma technique ในปี 1975 ดังกล่าว โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารต่างๆ ก็ได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างมากมาย ทั้งเพื่อการศึกษาวิจัยและการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่นในปี 2007 ได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคน (62) โดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัว ด้วยการฉีดอัลบูมินเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ของหนูทดลอง ในการฉีดกระตุ้นครั้งแรก ใช้แอนติเจน 50 ไมโครกรัมที่ผสมใน Freund' s complete adjuvant (FCA) หลังจากนั้นทำการกระตุ้นซ้ำโดยการใช้อัลบูมิน 30 ไมโครกรัม ผสมใน Freund' s incomplete adjuvant (FIA) ทุกๆ 15 วันเป็นเวลา 5 เดือน ในแต่ละเดือนจะทำการเก็บซีรัมของหนูทดลองมาตรวจสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA หนูตัวที่มีระดับแอนติบอดีต่อ HSA สูง จะถูกเลือกและนำเอาม้ามมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ SP2/0 โดยมี 50% PEG เป็นสารสื่อกลาง



สุดท้ายเมื่อได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว ทำการศึกษาความไว, ความจำเพาะ, class, และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน พบว่าโคลนที่สามารถทำปฏิกิริยากับ HSA ได้ดีที่สุดจากการทดสอบด้วยวิธี ELISA คือ EMRC1 และ EMRC3 ทั้งสองโคลนมีไอโซไทป์ชนิด IgG1 และมี light chain ชนิด kappa ( $k$ ) ค่า affinity constant ของแต่ละโคลนมีค่าเท่ากับ  $4.1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  และ  $3.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  ตามลำดับ จากการทดสอบความสามารถในการจับได้กับสาร HSA, BSA, human immunoglobulin, และ hemoglobin พบว่า แอนติบอดีโคลน EMRC1 และ EMRC3 มีความจำเพาะต่อ HSA และไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่นำมาทดสอบ เมื่อนำแอนติบอดีทั้งสองโคลนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography และทำการทดสอบด้วยวิธี competitive ELISA เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงของอัลบูมินที่แอนติบอดีสามารถตรวจวัดได้ พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่แอนติบอดีโคลน EMRC1 และ EMRC3 สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 10-100 พิโคกรัมต่อหลอด (0.4-400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

#### 2.4.3.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยเทคนิค Phage display

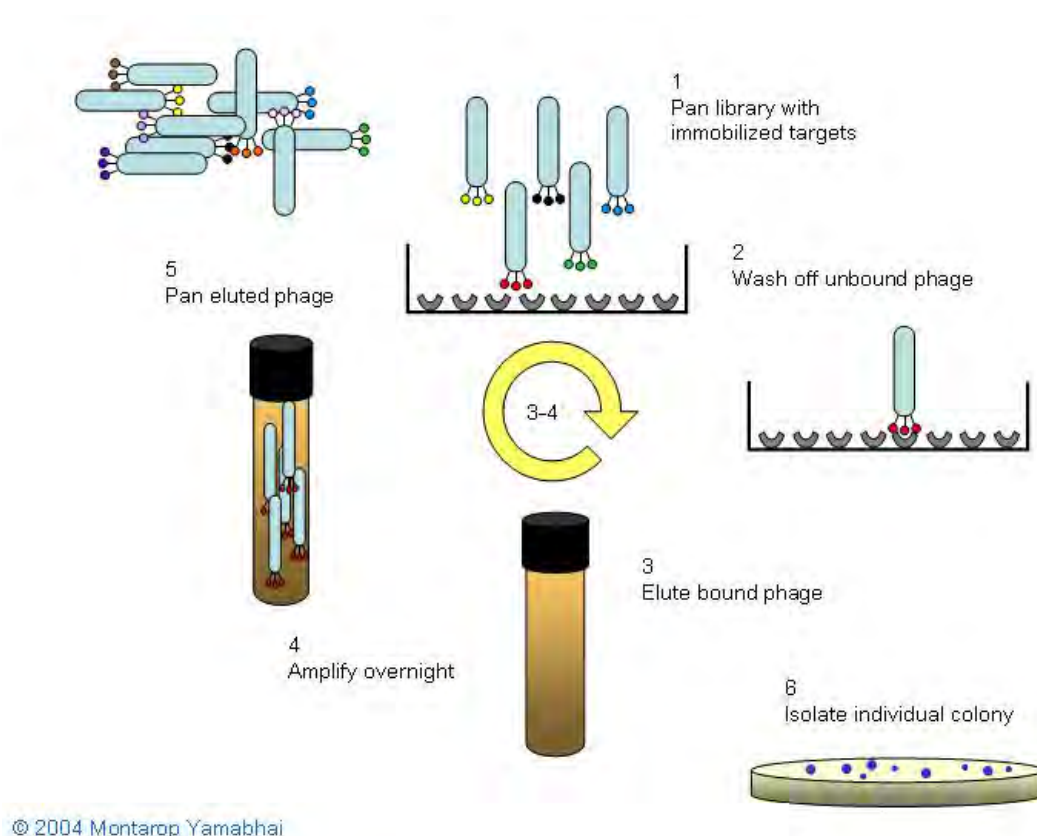
ในปัจจุบัน นอกจาก hybridoma technique แล้ว การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดียังสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค phage display technology ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย G.Smith ในปี 1985 (63) เทคนิค phage display เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจรวมทั้งแอนติบอดีหรือ peptide บนผิวของ filamentous phage (64) (รูปที่ 2.13 A) ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่ทำให้เซลล์ *E. coli* ที่ติดเชื้อเกิด lytic infection แต่จะไปกระตุ้นให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการผลิตและหลั่ง phage particles โดยไม่เกิด lysis



รูปที่ 2.13 A. ลักษณะของ filamentous phage ซึ่งประกอบด้วย circular ssDNA ที่ถูกหุ้มด้วย coat protein; phage coat protein (65) B. แสดงลักษณะการแสดงออกของโปรตีนหรือเปปไทด์บนผิวของฟาจ (66)

การสร้างโปรตีนจากเทคนิค phage display ทำได้โดยการนำส่วนของ DNA ของโปรตีนที่สนใจใส่เข้าไปใน genome ของ filamentous bacteriophage ในตำแหน่งยีนของ phage coat protein ซึ่งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับ phage coat protein 2 ชนิด คือ gene 8 protein (g8p, pVIII) ซึ่งมี และ gene III (g3p, pIII)-encoded adsorption protein (67) (รูปที่ 2.13 A, B) โดย phage ที่มีชีวิตจะมีการแสดงออกของ g8p และ g3p ประมาณ 2700 copies และ 3-5 copies ตามลำดับ จากนั้นนำ bacteriophage ใส่เข้าไปในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) เซลล์แบคทีเรียจะทำหน้าที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านให้ phage ที่เข้าไปแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ทำการ infect bacteria host cell อีกครั้งด้วย helper phage (M13VCS or KO7) ซึ่ง helper cell จะช่วยให้ไวรัสที่เพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์แบคทีเรียถูกปล่อยออกมาออกเซลล์ได้ โดยมีส่วนของโปรตีนที่สนใจติดอยู่บริเวณ phage coat protein ดังรูปที่ 2.13 B ทำการคัดเลือก phage ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยวิธี Bio-panning โดยการนำ phage library มา incubate กับ

immobilized antigen ที่สนใจ จากนั้นทำการล้าง unbound phages ออกไป และทำการชะ phage ที่สามารถจับได้กับแอนติเจนที่สนใจออก โดยการเปลี่ยน binding conditions นำ phage ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะมาเพิ่มจำนวนใน *E.coli* โดยปกติกระบวนการในการคัดเลือกจะทำเพียง 1 รอบก็เพียงพอ แต่อาจมี nonspecific อยู่บ้าง ในทางปฏิบัติจึงอาจทำการคัดเลือกหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ antigen-specific clones ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ขั้นตอนการคัดเลือก phage ที่แสดงออกของโปรตีนที่สนใจ (66)

### 2.4.3.2 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปประยุกต์ใช้

#### โมโนโคลนอลแอนติบอดีกับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์

มีการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสารต่างๆ เพื่อการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์มากมาย ตัวอย่างเช่น การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาพัฒนาเป็นชุดตรวจหาระดับ cortisol ใน urine และ serum ใช้ตรวจสอบการทำงานของต่อม pituitary และ adrenal gland เพื่อการวินิจฉัยโรค adrenocortical diseases และ Cushing's syndrome (68),

การผลิตชุดตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ เพื่อการวินิจฉัยโรคไตในระยะเริ่มแรก (9), การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อจุลชีพต่างๆ

### โมโนโคลนอลแอนติบอดีกับการรักษาโรค

มีการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำมาใช้ในเชิงการรักษาโรคมากขึ้น โดยเฉพาะโรคมะเร็ง เช่น การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการรักษาผู้ป่วยโรค T-Cell Lymphoma (69), การใช้ Rituximab ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD20 (โปรตีนที่พบบนผิวเซลล์ของ B lymphocyte ปกติและ 95% ของ B-cell lymphomas) มาใช้รักษาผู้ป่วยโรค non-Hodgkin lymphoma (70, 71) เป็น anticancer monoclonal antibody ตัวแรกที่ได้รับใบอนุญาตจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1997 โดย Rituximab มีบทบาททั้งแบบ complement dependent, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity และยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis ได้โดยตรง นอกจากนี้ ยังมีโมโนโคลนอลแอนติบอดีอื่นๆที่ได้รับอนุญาตจากองค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา ให้สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้ในการรักษาโรคที่ได้รับการอนุมัติโดยองค์การอาหารและยา (72, 73)

ชื่อแอนติบอดี	แอนติเจนที่จำเพาะ	โรคที่มีความจำเพาะ
Orthoclone OKT3	CD3	Renal transplant rejection
Xolair	IgE	Asthma
Avastin	Vascular endothelial growth factor	Colorectal cancer
Erbix	Epidermal growth factor receptor	Colorectal cancer
ReoPro	GpIIb/gpIIa	Cardiovascular disease
Rituxan	CD20	Non-Hodgkin lymphoma
Bexxar	CD20	Non-Hodgkin lymphoma
Zenapax	CD25	Transplant rejection
Remicade	TNF-alpha	Rheumatoid arthritis, Crohn disease
Humira	TNF-alpha	Rheumatoid arthritis,
Simulect	CD25	Transplant rejection
Synagis	RSV	Respiratory syncytial virus
Herceptin	Her-2	Metastatic breast cancer
Mylotarg	CD33	Acute myeloid leukemia
CroFab	Snake venom	Rattlesnake antidote

## โมโนโคลนอลแอนติบอดีกับการศึกษาหน้าที่และบทบาทของแอนติเจนบนผิวเซลล์

มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนต่างๆ ที่อยู่บนผิวเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจนับจำนวนหรือแยกชนิดของเซลล์ต่างๆ เช่น การศึกษาแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง (74), การศึกษา CD133 บน prostate basal cell (75), การใช้แอนติเจนบนผิวเซลล์ในการแยกชนิดของ Natural killer cells และ antibody-dependent killer cells (76), การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนก helper T cells ออกจาก cytotoxic T cells (77), การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการศึกษาการแสดงออกของ receptor ต่อ Fc fragment ของ IgE บนผิวเซลล์ลิมโฟซัยต์ (78)

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

#### ตารางที่ 3.1 สัตว์ทดลองและเซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองและเซลล์	แหล่งที่มา
1. หนูเมาส์ สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์	สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. เซลล์ไมอีโดมา สายพันธุ์ SP2/0-Ag14	American Type culture collection ATCC No CRL 8287

### 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

#### ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1	เครื่องปั่นเหวี่ยง	บริษัท Hettich Zentrifugen (Germany)
2	เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (vortex)	บริษัท Scientific Industries, Inc. (USA)
3	เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	บริษัท BIO-TEK Instrument, Inc. (USA)
4	เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	บริษัท Metter Toledo (USA)
5	เครื่อง Microplate reader	บริษัท Titertek multiskan (Finland)
6	เครื่อง Microplate reader	บริษัท SynergyMx (USA)
7	ตู้ดูดควัน	บริษัท ชีวะเทคดั่ง (Thailand)
8	ตูบ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	บริษัท Thermo Electron Corporation (USA)
9	ตู้ปลอดเชื้อ	บริษัท International Scientific Supply Co.,Ltd. (Thailand)

ลำดับ	เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
10	ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	บริษัท ธเนศพัฒนา (Thailand)
11	ตู้อบฆ่าเชื้อ (autoclave)	บริษัท Udono-RII memmert (Japan)
12	อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	บริษัท Memmert (Germany)
13	กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	บริษัท Nikon (Japan)
14	เครื่องปั๊มอากาศ	บริษัท Iwaki (Japan)
15	ชุดอิเล็กทรอนิกส์	บริษัท Bio-Rad (USA)
16	Serological pipette	บริษัท HBG (Germany)
17	Pipette aids	บริษัท Gilson (France)
18	เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	บริษัท นิโปร (Thailand)
19	กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	บริษัท นิโปร (Thailand)
20	ขวดแก้วขนาดต่างๆ	บริษัท Boro (Germany)
21	ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร	บริษัท Nunc (Denmark)
22	ขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกวน	บริษัท Nunc (Denmark)
23	96-well ELISA plate	บริษัท Nunc (Denmark)
24	96-well, 48-well cell culture plate	บริษัท Corning Incorporated (USA)
25	จานเลี้ยงเซลล์	บริษัท Corning Incorporated (USA)
26	หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	บริษัท Axygen (USA)
27	หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	บริษัท CLP (USA)
28	หลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube)	บริษัท Nunc (Denmark)



### 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
1	Acetic acid	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
2	Acrylamide gel	ใช้ในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Bio-Rad (USA)
3	Aminopterin	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
4	Ammoniumpersulfate	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Bio-Rad (USA)
5	BCA™ protein assay kit	ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน	บริษัท Pierce (USA)
6	Bovine serum albumin (BSA)	ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานและทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
7	Calibrator	สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาไมโครอัลบูมิน	บริษัท Randox (USA)
8	Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck (Germany)
9	Coomassie brilliant blue G	ย้อมเจล SDS-PAGE	บริษัท Pierce (USA)
10	D-glucose	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
11	Diethyl ether	วางยาสลบหนูทดลอง	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
12	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	เตรียมอาหารเก็บเซลล์แช่แข็ง	บริษัท Fluke (Switzerland)
13	di-Sodium hydrogenphosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	บริษัท Merck (Germany)

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
14	Fetal calf serum	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Invitromax (USA)
15	Freund's complete adjuvant	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
16	Freund's incomplete adjuvant	เตรียมแอนติเจน	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
17	Glycine	เตรียม Running buffer	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
18	Hemoglobin (Hb)	ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
19	Human serum albumin (HSA)	เตรียมแอนติเจนและคัดเลือกแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
20	Hydrochloric acid (HCl)	เตรียม Tris buffer	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
21	Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	เตรียมสับสเตรท	บริษัท Fluka (Switzerland)
22	Hypoxanthine	เตรียมอาหารคัดเลือกเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
23	Immunoglobulin (Ig)	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
24	Isotyping kit	ทดสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
25	L-glutamine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
26	Methanol	เตรียมสีย้อมเจด	บริษัท BDH (England)
27	O-phenylenediamine (OPD)	เตรียมสับสเตรท	บริษัท Abkem Iberia L.S.(Spain)
28	Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ใช้ในเทคนิค ELISA	บริษัท Zymed (USA)
29	Polyethylene glycol (PEG)	ใช้ในการหลอมรวมเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)

ลำดับ	สารเคมี	การใช้งาน	แหล่งที่มา
30	Pyruvic acid	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
31	RPMI 1640 medium	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Biochrom AG (Germany)
32	Skim milk	ใช้ในเทคนิค ELISA	บริษัท Anline (Thailand)
33	Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )	เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
34	Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Merck (Germany)
35	Sodium chloride (NaCl)	เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Merck (Germany)
36	Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Carlo Erba (USA)
37	Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
38	Sodium pyruvate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
39	Sulfuric acid	ให้หยุดปฏิกิริยาของ เอนไซม์	บริษัท Merck (Germany)
40	N,N,N,N-Tetramethyl- Ethylenediamine (TEMED)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	บริษัท Pierce (USA)
41	Thymidine	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
42	Tris (hydroxymethyl) aminomethane(Trizma base)	เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)
43	Tween 20	เตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์	บริษัท Sigma-Aldrich (USA)

### 3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ Human serum albumin (HSA)

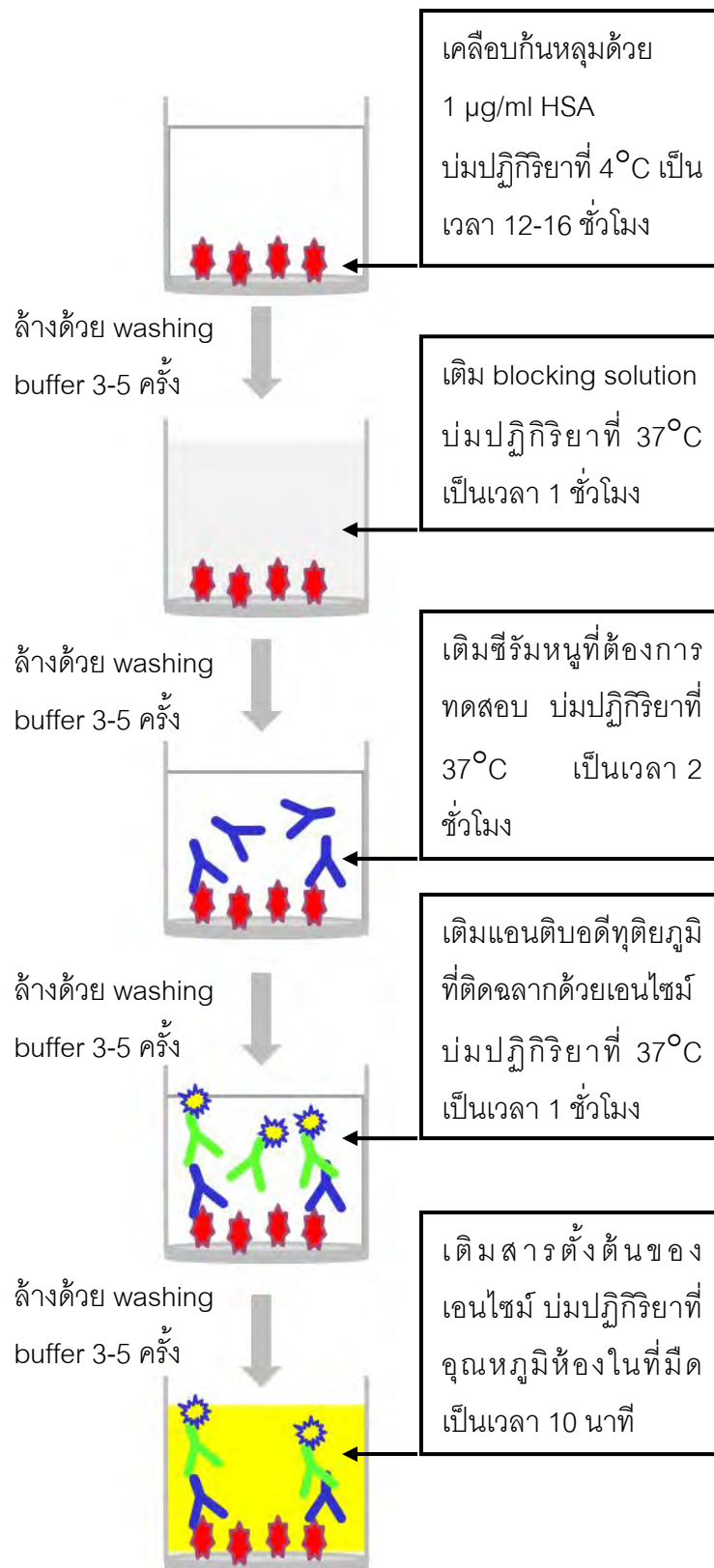
#### 3.4.1.1 การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วย HSA

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ ด้วย HSA โดยครั้งแรกจะทำการฉีดกระตุ้นด้วย HSA 50 ไมโครกรัม ที่เตรียมใน Freund's complete adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1(v/v) ด้วยการฉีดเข้าภายในช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของหนูทดลอง จากนั้นฉีดกระตุ้นซ้ำ (booster injection) อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 อาทิตย์ โดย immunogen ที่ใช้จะเตรียมใน Freund's incomplete adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1(v/v) เช่นกัน หลังจากฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ ทำการเก็บเลือดหนูจากปลายหาง (tail bleeding) มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บซีรัมนำมาทดสอบหาระดับแอนติบอดี (antibody titer) ต่อ HSA ด้วยวิธี indirect ELISA และทดสอบว่าแอนติบอดีดังกล่าวสามารถจับกับ HSA รูปอิสระได้หรือไม่ด้วยวิธี indirect competitive ELISA จากนั้นเลือกหนูทดลองตัวที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงและสามารถจับกับ HSA รูปอิสระได้ สำหรับนำไปใช้ในการหลอมรวมเซลล์ต่อไปโดยฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วย HSA ปริมาณ 50 ไมโครกรัม ที่ไม่ผสมกับ Freund's adjuvant ก่อนวันที่จะแยกเอาม้ามออกมา 3-4 วัน

#### 3.4.1.2 การหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบหลุม ELISA plate ด้วย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร HSA หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วย washing buffer (0.05% Tween 20 in PBS) 3-5 ครั้ง เติม blocking solution (5% w/v skim milk ใน PBS) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง จากนั้นเติมซีรัมหนูที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1:100 - 1:2,048,000 เท่า หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติม secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมต่อกับฮอสมเวดดิชเปอร์ออกซิเดส (goat anti-mouse IgG-HRP, GAM-HRP) ที่ถูกเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วนเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดี

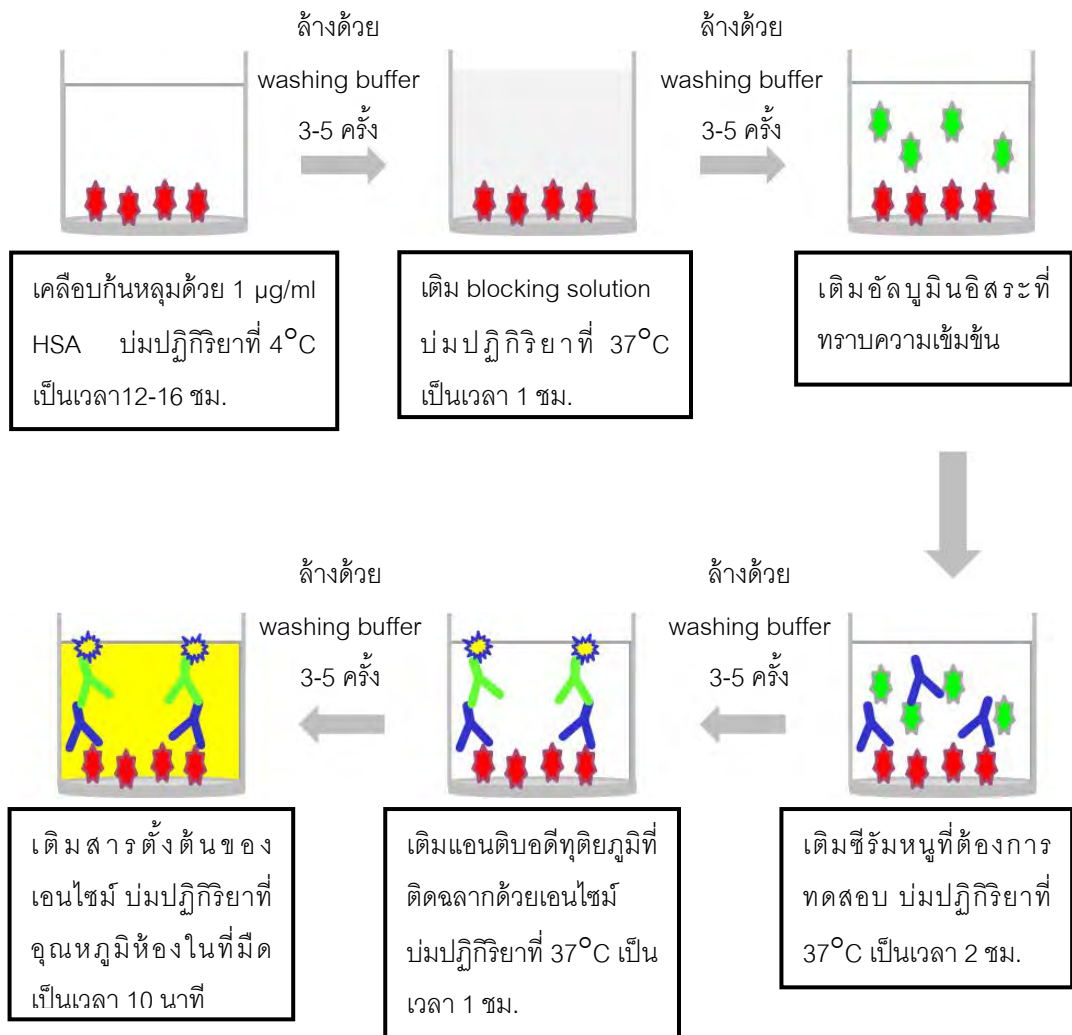
ส่วนเกินออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติมสารตั้งต้นของ HRP ซึ่งประกอบด้วย OPD (O-phenylenediamine) และ  $H_2O_2$  ที่ละลายใน 0.15 โมลาร์ ฟอสเฟตซีเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 (ภาคผนวก ข) หลุมละ 150 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M  $H_2SO_4$  หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลองด้วยวิธี indirect ELISA

### 3.4.1.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อ HSA ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA

นำซีรัมที่ได้มาทำการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เพื่อดูว่า หนูทดลองมีการสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ HSA ในรูปอิสระได้หรือไม่ ซึ่งในการทำ indirect competitive ELISA จะคล้ายกับการทำ indirect ELISA แต่จะมีการเติม HSA ในรูปอิสระลงไปในปฏิกิริยาด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดการแข่งขันระหว่าง HSA ที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุมและ HSA ที่อยู่ในรูปอิสระ หากในซีรัมของหนูมีแอนติบอดีที่สามารถจับได้กับ HSA ที่อยู่ในรูปอิสระ จะทำให้มีปริมาณแอนติบอดีที่เหลืออยู่ในซีรัมไปจับกับ HSA ที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุมลดน้อยลง จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ indirect competitive ELISA มีค่าลดลง ซึ่งการทดสอบสามารถทำได้โดยการเติม HSA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในถาดหลุมพลาสติกที่ถูกเคลือบด้วย HSA ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และผ่านการ block ด้วย 5% w/v skim milk แล้ว ล้างด้วย washing buffer แล้ว จากนั้นเติมซีรัมหนูที่ถูกเจือจางด้วย PBS หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติม secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ IgG ของหนู ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (goat anti-mouse IgG-HRP, GAM-HRP) ในอัตรา การเจือจาง 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ หลุมละ 150 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.2 บ่มปฏิกิริยาในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์  $H_2SO_4$  หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA



### 3.4.2 การเตรียมและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HSA

#### 3.4.2.1 การเตรียมเซลล์ไมอีโลมา

นำเซลล์ไมอีโลมาสายพันธุ์ SP2/0 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) ความเข้มข้น 10%(v/v) ผสมอยู่ ทำการเลี้ยงจนเซลล์มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเอกซโฟเนนเซียล และในวันที่ทำการหลอมรวมเซลล์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตควรมีจำนวนมากกว่า  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไมอีโลมามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นส่วนใสทิ้งไป เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนามัยซิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับนำไปหลอมรวมกับเซลล์ม้าของหนูทดลอง

#### 3.4.2.2 การเตรียมสารตัวกลางในการหลอมรวมเซลล์

นำโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ที่มีมวลโมเลกุล 3,000-3,700 ดัลดัน ปริมาตร 5 มิลลิกรัม ไปอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ 50% v/v PEG แบ่งเก็บใส่หลอดพลาสติก หลอดละ 1 มิลลิลิตร เตรียมโดยวิธีปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ให้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2.3 การเตรียมเซลล์ม้า

เลือกหนูตัวที่ให้ระดับแอนติบอดีสูงและแอนติบอดีที่ผลิต สามารถจับกับ HSA ในรูปอิสระได้ มาทำให้สลบด้วยไดเอทิลอีเธอร์ ทำการเจาะเลือดจากหัวใจหนูเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดสอบ ELISA จากนั้นทำการเปิดช่องท้อง นำเอาม้ามออกมาด้วยวิธีปราศจากเชื้อ ใช้กรรไกรตัดแต่งส่วนที่เป็นไขมันออกไป ตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็ก บดม้ามให้ละเอียดบนตะแกรงลวดตาถี่ นำเซลล์ม้าที่ผ่านตะแกรงลวดมาปั่นล้างในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนามัยซิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 มิลลิลิตรด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที 1-2 ครั้ง จากนั้นเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ RPM 1640 ที่มีเจนนามัยซิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมอยู่ เตรียมไว้สำหรับนำไปหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาที่เตรียมไว้

#### 3.4.2.4 การหลอมรวมเซลล์ไมอีโดมาและเซลล์ม้ามเข้าด้วยกัน

นำเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโดมาที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน มากกว่า 3:1 มาผสมให้เข้ากัน เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เขย่าเบาๆให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม 50% v/v PEG ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปช้าๆ ให้ PEG หมดภายในเวลา 1 นาที โดยขณะที่เติม PEG ให้หมุนหลอดทดลองไปด้วย แล้วจึงเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มีเจนนตามัยซิน ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายไม่จับตัวกันเป็นก้อน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ทำเช่นนี้ซ้ำอีกครั้งเพื่อล้าง PEG ออกไปจากเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 20%(v/v) แล้วจึงนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปเพาะเลี้ยงใน 96 well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 12-14 วัน เลือกหลุมที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ไฮบริโดมาอย่างน้อย 25% ของพื้นที่กันหลุม เพื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมดังกล่าวไปทดสอบว่ามีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA หรือไม่ด้วยวิธี Indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.1.2

#### 3.4.2.5 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA

หลังจากทำการหลอมรวมเซลล์ 10-14 วัน จะมีเพียงเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่มีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเห็นเป็นลักษณะของโคโลนี เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ไมอีโดมาที่ไม่ได้รวมตัวกับเซลล์ม้าม หรือเซลล์ไมอีโดมาที่รวมตัวกันเองจะตายไป เนื่องจากถูกยับยั้งกระบวนการสร้างดีเอ็นเอโดย aminopterin ที่อยู่ใน HAT medium ส่วนเซลล์ม้ามซึ่งอยู่ได้เพียง 3-7 วัน ก็จะตายไปเองตามธรรมชาติ จึงมีเพียงเซลล์ที่เกิดจากการรวมตัวระหว่างเซลล์ไมอีโดมาและเซลล์ม้ามเท่านั้นที่จะมีชีวิตรอดได้ การทดสอบสำหรับขั้นตอนในการทดสอบโดยการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ HSA สามารถทำได้โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ไฮบริโดมาลงในถาดหลุมพลาสติกที่ถูกเคลือบด้วย HSA หลุมละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งขั้นตอนในการทดสอบจะมีวิธีการเหมือนกับข้อ 3.4.1.2 เมื่อได้ผลการทดสอบจากขั้นตอนดังกล่าว เลือกหลุมที่ให้ผลบวกมาทดสอบต่อด้วยวิธี indirect competitive ELISA ขั้นตอนการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.3 เลือกหลุมที่มีการสร้าง

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA และสามารถจับได้กับ HSA ในรูปอิสระ นำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมดังกล่าวมาทำการแยกให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution

#### 3.4.2.6 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้โคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.2.5 มาทำให้ได้เป็นโคลนเดี่ยวโดยการเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 20% (v/v) ให้มีความเข้มข้น 1 เซลล์ต่อหลุม นำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ที่ได้ไปเลี้ยงใน 96 well plate รอให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเห็นเป็นโคลน เลือกหลุมที่โคลนมีขนาดอย่างน้อย 25% ของพื้นที่ก้นหลุม มาตรวจสอบดูว่าเซลล์ไฮบริโดมาดังกล่าว สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA อยู่หรือไม่ โดยการนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และ Indirect competitive ELISA เลือกหลุมที่มีการสร้างแอนติบอดีที่จับได้กับ HSA ในรูปอิสระมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำด้วยวิธีเดียวกันนี้อีก 2-3 ครั้ง เมื่อแน่ใจว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้มีความเสถียรและมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเซลล์ ก่อนที่จะเก็บเซลล์แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

#### 3.4.2.7 การเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการเก็บมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในจานเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 10% (v/v) รอให้เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะเอ็กซิฟเฟนเซียล นำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม 10% v/v FCS และ 20% v/v DMSO ในขณะที่เย็นประมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้พลาสติกเจอร์ริปเปตดูดขึ้นลงเบาๆ ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดสำหรับเก็บเซลล์แช่แข็ง (cryotube) ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน ก่อนย้ายไปแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2.8 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงใหม่

นำ cryotube ที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งเซลล์แขวนลอยละลายจนมีลักษณะคล้ายวุ้น จึงดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อ

นาที่ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน supernatant ทิ้งไป แล้วจึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ผสม FCS ความเข้มข้น 20%(v/v)

### 3.4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

#### 3.4.3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ด้วยชุดตรวจสอบ Isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยการเคลือบหลุม ELISA plate ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไอโซไทป์ (isotyping specific antibody) ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgGA, IgGM ซึ่งถูกเจือจางด้วย PBS ให้มีอัตราการเจือจาง 1:1,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มปฏิกิริยาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมนิโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมนแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อส่วน Fab ของ mouse IgG ซึ่งเชื่อมต่อกับ horseradish peroxidase (Anti-mouse IgG (Fab specific)-HRP) โดยเจือจางด้วย PBS-T ให้มีอัตราการเจือจาง 1: 2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมนสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย OPD และ  $H_2O_2$  ที่ละลายใน 0.15 โมลาร์ ฟอสเฟตซีเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.0 หลุมละ 150 ไมโครลิตร นำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที โดยเก็บไว้ในที่มืด จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

#### 3.4.3.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อ

HSA

ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่า inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) และ limit of detection (LOD) โดย  $IC_{50}$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับการที่ไม่เติมสารอิสระ และ LOD คือ ความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ การทดสอบ ทำได้โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA และใช้อัลบูมินในรูปอิสระที่ความเข้มข้น  $10^{-2}$ - $10^3$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวแข่งขัน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4 ให้แกน Y เป็น

ค่า  $\%B/B_0$  และแกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นอัลบูมินในรูปอิสระที่เติมลงไป ซึ่งค่า  $IC_{50}$  สามารถคำนวณได้จาก

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

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบ เมื่อเติมอัลบูมินในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ  
 $B_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่เติมอัลบูมินในรูปอิสระ

และ LOD สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$LOD = B_0 - 3SD$$

เมื่อ  $B_0$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่เติมอัลบูมินในรูปอิสระ  
 SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.3.3 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) เบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะรายงานเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (%cross reactivity) กับสารอื่น โดยการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเจือจางที่เหมาะสมมาทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการนำสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เติมลงไป ในปฏิกิริยา จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ของสารมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม ได้จากสูตร

$$\% \text{ cross reactivity} = \frac{IC_{50} \text{ ของอัลบูมิน}}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

โดย  $IC_{50}$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่เติมสารอิสระ

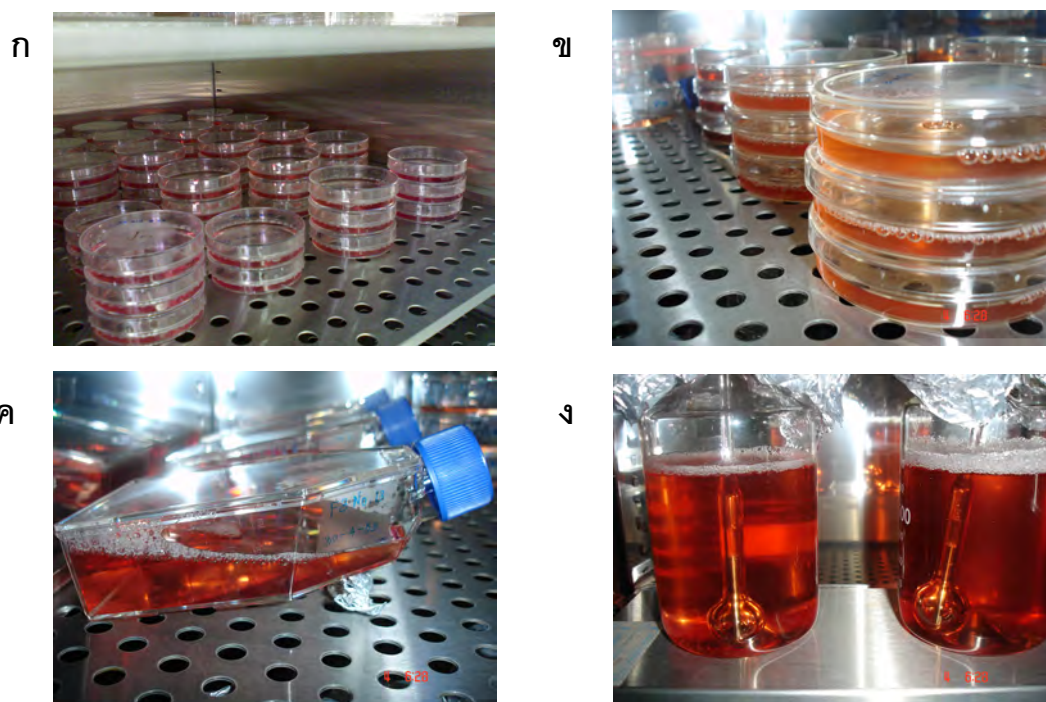
อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงไม่ถึงครึ่งหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่เติมสารแข่งขัน นั่นคือ  $IC_{50}$  ของสารที่นำมาทดสอบมีค่ามากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงได้กำหนดให้ค่า  $IC_{50}$  ของสารที่ทดสอบ มีค่าเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ดังกล่าวไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามดังนี้

$$\% \text{ cross reactivity} = \frac{IC_{50} \text{ ของอัลบูมิน}}{500 \mu\text{g/ml}} \times 100$$

#### 3.4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.4.4.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาเพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาณมาก

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินจากขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ย้ายลงในขวดเลี้ยงเซลล์แบบปั่นกววน (spinner flask) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยปั่นกววนด้วยอัตราเร็ว 20 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงนาน 7-10 วัน ซึ่งในระหว่างนี้ เซลล์ไฮบริโดมาจะผลิตแอนติบอดีออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ เก็บเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปทำการแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ต่อไป

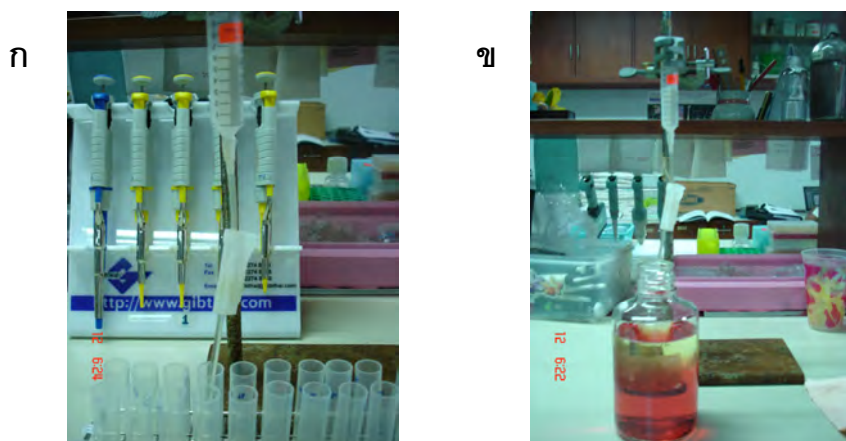


**รูปที่ 3.3** การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ ก. เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็ก ; ข. เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดใหญ่ ; ค. เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 100 มิลลิลิตร ; ง. เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 1000 มิลลิลิตร

#### 3.4.4.2 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีนจี (Protein G)

ทำการล้างคอลัมน์โปรตีนจีเซฟาโรส (G-Sepharose column) ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เพื่อปรับภาวะภายในคอลัมน์ให้เข้าสู่ภาวะสมดุล โดยปรับอัตราการไหลให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากข้อ 3.4.4.1 และผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 22 แล้ว ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ทำการล้างโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ต้องการโดยใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการชะแอนติบอดีที่ต้องการออกจากคอลัมน์ โดยใช้ไกลซีน-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (glycine hydrochloride buffer) pH 2.7 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ใช้หลอดทดลองที่มีทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-hydrochloride buffer) pH 9 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 65 ไมโครลิตร รองรับสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ โดยเก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการล้างคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เก็บคอลัมน์โดยให้อยู่ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลาย Thimerasol ความเข้มข้น 0.01%(v/v)

จากนั้นนำสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละหลอดมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตรวจสอบหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียน โครมาโทแกรม นำสารละลายจากหลอดที่มีแอนติบอดีมารวมกันเพื่อนำไปโคอะไลซิสด้วย PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



**รูปที่ 3.4** การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (ก.) การเก็บสารละลายแอนติบอดีที่ถูกชะออกมา เก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตร ; ข.) ทำการล้างคอลัมน์ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

#### 3.4.4.3 การหาปริมาณโปรตีน Bichoninic acid assay (BCA)

ทำการหาปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce ประกอบด้วย Reagent A ซึ่งมีส่วนผสมของ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate), โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate), กรดไบซินโคนินิก (bicinchoninic acid) และ โซเดียมทาร์เตรทในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ (sodium tartrate in 0.1 M sodium hydroxide) และ Reagent B ที่มีคิวปริคซัลเฟต (cupric sulfate) เป็นส่วนประกอบ การตรวจวัดโปรตีนด้วยวิธี BCA มีหลักการคือ ในภาวะที่เป็นต่าง โปรตีนในสิ่งตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ cupric ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ได้ผลิตภัณฑ์คือ cuprous ion ( $\text{Cu}^{1+}$ ) ซึ่งปฏิกิริยาในขั้นแรกนี้จะให้สารละลายที่มีสีฟ้า เมื่อเติม bicinchoninic acid ลงไป ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ cuprous ion ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนแรก ผลจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในขั้นที่สองนี้ จะให้สารละลายที่มีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ความเข้มของสารละลายสีม่วงที่เกิดขึ้นจะแปรตามปริมาณโปรตีนที่มีในสิ่งตัวอย่าง การทดสอบทำได้โดยการเจือจางโปรตีน BSA มาตรฐานให้มีความ



เข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย PBS เจือจางสารตัวอย่างด้วยอัตราการเจือจาง 4, 8, และ 16 เท่า จากนั้นเตรียม working reagent ด้วยการผสม Reagent A กับ Reagent B ในอัตราส่วน 50:1 (v/v) เติมน้ำละลายโปรตีนมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงใน ELISA plate หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติมน้ำ working reagent ลงไปหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ประมาณ 30 วินาที นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำ ELISA plate ออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้จานทดสอบเย็นลง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรและความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง

#### 3.4.4.4 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

ทำการหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้ว ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ได้จากสูตร

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

หมายเหตุ ค่า extinction coefficient ของสารละลายแอนติบอดี IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 1.35

#### 3.4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยขั้นแรกทำการประกอบแผ่นประกบเจลเข้ากับขาตั้งแผ่นประกบเจล ให้มีลักษณะดังรูปที่ 3.1 จากนั้นเตรียมสารละลาย 12% separating gel (ภาคผนวก ข) เติมน้ำ separating gel ที่เตรียมไว้ ลงในแผ่นประกบเจลประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของความสูงของแผ่นประกบเจล เติมน้ำ Milli Q water ตามลงไปทันทีให้เต็มแผ่นประกบเจล เพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ รอยนูนเจลแข็งตัวดี เท Milli Q water

ส่วนบนออก อาจใช้กระดาษทิชชูช่วยซับน้ำออกให้มากที่สุด จากนั้นทำการเตรียม 5% stacking gel (ภาคผนวก ข) เติม stacking gel ลงในแผ่นประกบเจลในส่วนที่เหลือด้านบนจนเต็มแผ่นประกบ นำหัวซึ่งหนา 0.75 มิลลิเมตร 10 well ใส่ที่ด้านบนของเจล เพื่อให้เกิดช่องสำหรับใส่สารละลายตัวอย่าง รอให้เจลเกิดการแข็งตัวดีแล้ว จึงดึงหัวออก นำแผ่นประกบเจลที่เตรียมได้ใส่ลงใน Tank เท running buffer (ภาคผนวก ข.) ลงใน Tank จนเกือบเต็ม



**รูปที่ 3.5** อุปกรณ์ที่ใช้ในเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (79)

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โปรตีนที่นำมาทดสอบควรมีปริมาณ 35  $\mu\text{g/ml}$  และใช้ปริมาตรไม่เกิน 20  $\mu\text{l/well}$  โดยนำสารละลายตัวอย่างมาผสมกับ laemmli sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำไปอุ่นในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายตัวอย่างดังกล่าวมาเติมลงในช่องของแผ่นเจล โดยช่องแรกเป็นช่องสำหรับ molecular weight marker ปิดฝา Tank ให้ถูกขั้ว ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับ power supply ในช่วงแรกของการแยกแถบโปรตีน ให้ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 90 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าแถบสีน้ำเงินของ laemmli sample buffer จะเคลื่อนผ่านส่วนของ stacking gel จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที หรือจนแถบสีน้ำเงินเคลื่อนมาถึงบริเวณส่วนล่างของเจล จึงหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue นาน 15 นาที จากนั้นทำการล้าง สีย้อมที่มากเกินไปออกด้วย destaining solution จนสามารถมองเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน บันทึกภาพแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gel Documentation system

### 3.4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

นำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี มาทดสอบความไว ด้วยวิธี indirect competitive ELISA ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.4.3.2

3.4.7 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการหาปริมาณ อัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

เพื่อเป็นการแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น สามารถนำไปใช้ พัฒนาชุดตรวจวัดอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะได้จริง จึงนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการ ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาทำการตรวจวัดอัลบูมินในสิ่งละลายตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยจากการศึกษาค่า  $IC_{50}$  และ LOD หลังการทำให้บริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน พบว่าแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 มีค่า  $IC_{50}$  และค่า LOD ต่ำที่สุด คือ 0.30  $\mu\text{g/ml}$  และ 0.004  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ จึงเลือกแอนติบอดีโคลนดังกล่าวมาใช้ในการศึกษา โดยใช้ สภาวะเดียวกับสภาวะที่ใช้ในการศึกษาความไวของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ คือ ความ เข้มข้นของอัลบูมินที่ใช้ตรึงกันหลุมเท่ากับ 1.0  $\mu\text{g/ml}$  และความเข้มข้นของแอนติบอดีปฐมภูมิ เท่ากับ 0.5  $\mu\text{g/ml}$

#### 3.4.7.1 ทดสอบหาช่วงความเป็นเส้นตรง

นำสารละลายอัลบูมินมาตรฐานที่ความเข้มข้น  $10^2$ - $10^{-2}$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางด้วยวิธี 2 fold serial dilution นำมาทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยการเคลือบหลุม ELISA plate ด้วย HSA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแอนติเจนส่วนเกินออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง เติม blocking solution หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง blocking solution ออกด้วย washing buffer 3-5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายอัลบูมินมาตรฐาน ที่ อัตราการเจือจางต่างๆ ที่ได้เตรียมไว้ข้างต้น หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายโมโน โคลนอลแอนติบอดี ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก ด้วย washing

buffer จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับข้อ 3.4.1.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน y เป็น % B/B<sub>0</sub> เมื่อ B และ B<sub>0</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เต็มและไม่เต็มอัลบูมินในรูปอิสระ และแกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมิน เลือกลค่าความเข้มข้นของอัลบูมินที่อยู่ในช่วงเป็นเส้นตรง นำมาสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธีเดียวกัน

3.4.7.2 การหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD)

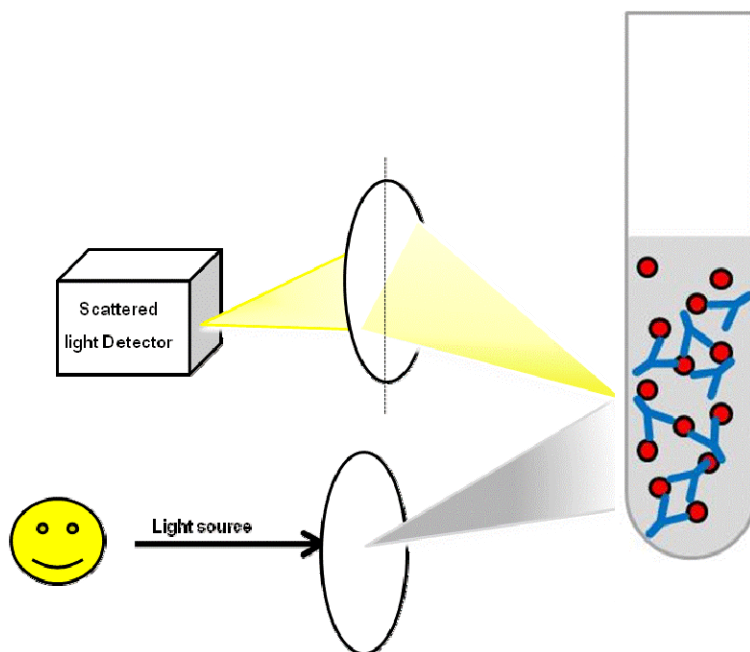
ทำการศึกษาค่าต่ำสุดที่วิธีดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA ที่ไม่เต็มอัลบูมินอิสระ จำนวน 9 ค่า มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ซึ่งในที่นี้ได้ใช้ PBS แทนการเติมสารละลายอัลบูมิน จากนั้นทำการคำนวณค่า LOD ได้จากสูตรดังต่อไปนี้

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

เมื่อ B<sub>0</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการใช้ PBS แทนสารละลายอัลบูมิน  
 SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
 S คือ Sensitivity ที่ได้จากความชันของกราฟมาตรฐาน

3.4.7.3 การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ Nephelometry

การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA จะเปรียบเทียบกับวิธี immunonephelometry โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Orion Diagnostica หลักการคือ ใช้แอนติบอดีเป็นตัวแอนติเจนที่มีในสิ่งตัวอย่าง เมื่อมีการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดเป็นร่างแหเกิดขึ้น ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้โดยการวัดการกระเจิงของแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ขั้นตอนในการเตรียมสิ่งตัวอย่างตามคำแนะนำที่ได้กำหนดไว้แสดงดังตารางที่ 3.3



รูปที่ 3.6 หลักการการตรวจวัดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีด้วยวิธี immunonephelometry



รูปที่ 3.7 เครื่อง TURBOX<sup>®</sup> plus Protein Analyzer ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินโดยใช้หลักการ nephelometry

### ก.) การตั้งค่าเครื่อง TURBOX<sup>®</sup> plus Protein Analyzer

เนื่องจากในการวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินจากสิ่งตัวอย่างด้วยเครื่อง TURBOX<sup>®</sup> นั้น เครื่องจะทำการวิเคราะห์ค่าออกมาเป็นหน่วย mg/L โดยเทียบค่าที่ได้จากการตรวจวัดสิ่งตัวอย่างกับค่า calibrator ที่มีในความจำของเครื่อง ดังนั้น เมื่อเปิดเครื่องครั้งแรก จะต้องทำการ calibrate เครื่อง โดยการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานที่มาพร้อมกับเครื่องวิเคราะห์ และสั่งให้เครื่องจดจำค่าที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐาน ดังนั้น ในการใช้เครื่องในต่อไป จึงสามารถทำการตรวจวิเคราะห์สิ่งตัวอย่างได้เลย โดยจะทำการตรวจวัดค่า control ควบคู่ไปกับสิ่งตัวอย่างด้วยทุกครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าค่าที่ได้จากการตรวจวัดมีความเชื่อถือได้

**ตารางที่ 3.4** การเตรียมสิ่งตัวอย่าง เพื่อใช้ในการตรวจวัดด้วยวิธี nephelometry (บริษัท Orion Diagnostica)

	สารมาตรฐาน		สิ่งตัวอย่าง	
	Blank (µl)	ตัวทดสอบ (µl)	Blank (µl)	ตัวทดสอบ (µl)
สิ่งตัวอย่าง			20	20
สารมาตรฐาน	20	20		
Blank buffer	500		500	
Antiserum dilution		500		500
ผสมสารให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที				
นำไปวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง TURBOX <sup>®</sup> plus protein analyzer				

3.4.7.4 การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

นำ control urine microalbumin มาเจือจางด้วย PBS ให้มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้แทนตัวอย่างปัสสาวะ จากนั้นนำมาทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เช่นเดียวกับข้อ 3.4.7.1 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณอัลบูมินที่ตรวจวัดได้ และสิ่งตัวอย่างในชุดเดียวกันนี้ ได้นำไปตรวจวัดหาปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยวิธี immunonephelometry และเปรียบเทียบผลการตรวจวัดทั้งสองวิธี โดยวิเคราะห์ค่า correlation coefficient โดยใช้โปรแกรม Sigmaplot

### 3.4.7.5 การทดสอบความแม่นยำ (precision) ของวิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น

การหาค่าความแม่นยำ (precision) ของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาความแปรปรวนของการทดลองซ้ำในครั้งเดียว (Intra-variation assay) และทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (Inter-variation assay)

Intra-variation assay สามารถหาได้โดย ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง เช่นเดียวกับวิธี 3.4.7.1 โดยทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่าง ทำ 12 ซ้ำ จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาคำนวณหาค่า mean, SD และ %CV จากสูตรดังนี้

$$\%CV = \frac{SD \times 100}{\text{mean}}$$

เมื่อ mean คือ ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

%CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

Inter-variation assay ทำได้โดยทำการทดสอบสิ่งตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง และทำ 12 ซ้ำเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้จำนวน 8 ครั้ง ที่เวลาต่างกัน นำข้อมูลที่ได้ มาหาค่า mean, SD, และ %CV

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อ HSA

##### 4.1.1 การหาระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองด้วยวิธี Indirect ELISA

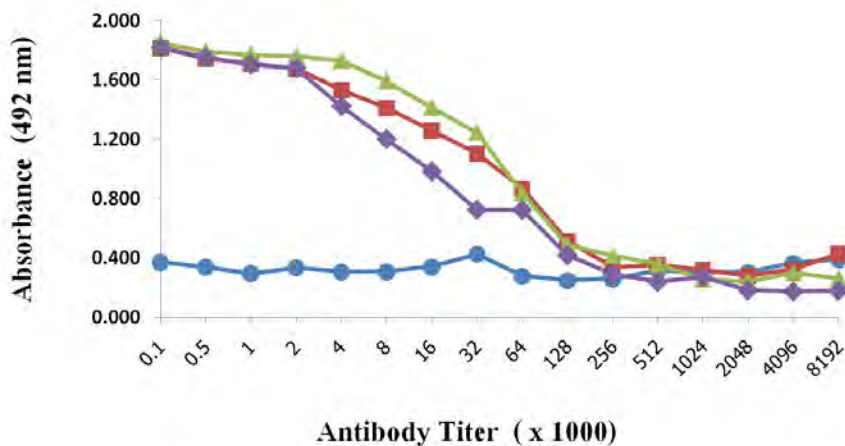
หลังการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c ด้วย HSA จำนวน 3 ตัว ครบ 4 ครั้ง นำซีรัมของหนูทดลองมาตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อ HSA ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลอง เลือกระดับการเจือจางสูงสุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ELISA และให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 2 เท่าของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากซีรัมหนูก่อนการฉีดกระตุ้น และจากการทดสอบ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาที่ได้จากซีรัมหนูก่อนการฉีดกระตุ้นสูงสุดคือ ระดับการเจือจางที่ 1: 32,000 มีค่าเท่ากับ 0.427 ดังนั้นเมื่อพิจารณา ค่าการดูดกลืนแสงจากซีรัมหนูหลังได้รับการฉีดกระตุ้น จะพบว่าระดับแอนติบอดีของหนูทดลอง ทั้ง 3 ตัว มีค่าเท่ากับ 1:64,000, 1:32,000, และ 1:16,000 ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับการเจือจางที่ยังคงให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 0.854 (2 เท่าของ 0.427) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

จากการทดสอบหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูทดลอง แสดงให้เห็นว่าหนูทดลอง ทั้งสามตัว มีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันต่ออัลบูมินที่ฉีดกระตุ้นเป็นอย่างดี มีการสร้างแอนติบอดีออกมาในกระแสเลือดได้ในระดับต่างๆ กัน โดยหนูทดลองตัวที่ 1 มีการสร้างแอนติบอดีสูงสุด รองลงมาคือตัวที่สอง และตัวที่สามสร้างแอนติบอดีน้อยสุด โดยระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองแต่ละตัว มีค่าเท่ากับ 1:64,000, 1:32,000, และ 1:16,000 ตามลำดับ



ตารางที่ 4.1 ระดับแอนติบอดีในซีรัมของหนูทดลองจากการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA

ระดับการเจือจางซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			
	ซีรัมหนูที่ไม่ได้ รับการฉีด กระตุ้น	ซีรัมหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้น		
		หนูตัวที่ 1	หนูตัวที่ 2	หนูตัวที่ 3
1:100	0.372	1.815	1.846	1.818
1:500	0.339	1.741	1.791	1.753
1:1000	0.296	1.709	1.769	1.704
1:2000	0.335	1.674	1.760	1.679
1:4000	0.308	1.531	1.728	1.423
1:8000	0.308	1.408	1.591	1.202
1:16,000	0.342	1.255	1.413	0.983
1:32,000	0.427	1.102	1.246	0.725
1:64,000	0.277	0.869	0.838	0.725
1:128,000	0.250	0.512	0.485	0.419
1:256,000	0.259	0.338	0.415	0.291
1:512,000	0.316	0.352	0.358	0.240
1:1,024,000	0.306	0.318	0.256	0.272
1:2,048,000	0.302	0.279	0.241	0.183
1:4,096,000	0.366	0.320	0.300	0.174
1:8,192,000	0.391	0.427	0.261	0.179



**รูปที่ 4.1** ผลการทดสอบระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของซีรัมหนูทดลองที่ระดับความเจือจางต่างๆ โดยใช้สาร HSA เคลือบกันหลุม : ● ซีรัมของหนูทดลองก่อนการฉีดกระตุ้น; ■ ซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 1; ▲ ซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 2; ◆ ซีรัมของหนูทดลองตัวที่ 3

#### 4.1.2 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อ HSA ในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

นำซีรัมหนูทดลองมาทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับ HSA ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ตารางที่ ก.1, ภาคผนวก ก) จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง เมื่อเติม HSA ในรูปอิสระลงไป ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อใช้ HSA ในรูปอิสระความเข้มข้น 10 µg/ml ที่ระดับการเจือจางซีรัมของหนูทั้ง 3 ตัว เท่ากับ 1:128,000 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเท่ากับ 80%, 84%, และ 76% ตามลำดับ และเมื่อเจือจางซีรัมที่ระดับ 1:256,000 หนูตัวที่ 1, 2, และ 3 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเท่ากับ 84%, 90%, และ 85% ตามลำดับ แต่เมื่อใช้โปรตีน bovine serum albumin (BSA) เป็นตัวแข่งขัน พบว่า เมื่อเจือจางซีรัมที่ระดับ 1:128,000 ค่าการดูดกลืนแสงลดลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อเจือจางซีรัมที่ระดับ 1:256,000 ไม่พบการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงเลย ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า หนูทั้ง 3 ตัวมีการสร้างแอนติบอดีที่สามารถจับกับ HSA ในรูปอิสระได้และไม่จับกับ BSA จึงเหมาะสมที่จะนำเซลล์ม้ามของหนูดังกล่าวมาทำการหลอมรวมกับเซลล์มะเร็ง เพื่อผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ HSA ต่อไปได้

ตารางที่ 4.2 ค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลง จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA เมื่อเติม HSA ในรูปอิสระลงไป

หนูทดลอง	เปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่ลดลง			
	ระดับการเจือจางที่ 1:128,000		ระดับการเจือจางที่ 1:256,000	
	HSA 10 µg/ml	BSA 10 µg/ml	HSA 10 µg/ml	BSA 10 µg/ml
หนูตัวที่ 1	80	0.10	84	0
หนูตัวที่ 2	84	5	90	0
หนูตัวที่ 3	76	4	85	0

#### 4.2 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA

หลังจากทำการทดสอบหาระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ HSA แล้ว พบว่าแอนติบอดีในซีรัมของหนูมีความจำเพาะต่อ HSA ในรูปอิสระ จึงนำเซลล์ม้ามจากหนูทดลองทั้ง 3 ตัว มาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาสายพันธุ์ SP2/0 หลังจากนั้นประมาณ 10-14 วัน ทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมจากจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ด้วยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ โดยเลือกหลุมที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฮบริโดมาจนเห็นเป็นโคโลนี นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมดังกล่าวมาทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยผลการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 3 ครั้ง สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.3 เซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA จะถูกนำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากจานเลี้ยงหลุมชนิด 48 หลุมมาทดสอบการจับกับ HSA ในรูปอิสระด้วยวิธี indirect competitive ELISA เมื่อได้กลุ่มเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA รูปอิสระแล้ว ทำการแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution 2-3 รอบ เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ยังคงสามารถผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับกับ HSA รูปอิสระได้และเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละเซลล์มาจากเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์เดียวกัน

ตารางที่ 4.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ากับเซลล์ไมอีโลมา ของหนูทดลองทั้งสามตัว

หนูตัวที่	ระดับแอนติบอดีในซีรัมหนูก่อนหลอมรวมเซลล์	จำนวนหลุมทั้งหมด	จำนวนหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมา	จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดีต่อ HSA		จำนวนหลุมที่ผลิตแอนติบอดีต่อ HSA อิสระ		จำนวนโคลนที่ได้
				จำนวนหลุม	เปอร์เซ็นต์ (%)	จำนวนหลุม	เปอร์เซ็นต์ (%)	
1	1:64,000	576	203	108	53.20	28	25.93	0
2	1:32,000	1,152	1,096	86	7.85	33	38.37	22
3	1:16,000	2,304	1,108	159	14.35	19	11.95	6

จากการนำเซลล์ม้าของหนูตัวที่ 1 มาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา หลังการทำ limiting dilution ครั้งที่ 1 เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA พบว่า ไม่มีเซลล์ไฮบริโดมาโคลนใดที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA ได้ ทั้งนี้เนื่องจากโครโมโซมของเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งนี้มีความไม่คงตัว ทำให้โครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนติบอดีถูกสลัดออกไปจากเซลล์ในระหว่างการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับการหลอมรวมเซลล์ในครั้งที่ 2 และ 3 หลังทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่จับได้กับ HSA ในรูปอิสระ และทำการแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution 3 รอบแล้ว พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA มีจำนวน 22 และ 6 โคลน ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 28 โคลนมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อนำเซลล์เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว และนำอาหารเลี้ยงเซลล์ของแต่ละโคลนไปศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

**ตารางที่ 4.4** โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการหลอมรวมเซลล์ม้ามจากหนูตัวที่ 2 จาก การทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร	
		ไม่มี HSA อิสระ	1 mg/ml HSA
1	4/B11/G3/F3/A3	1.732	0.067
2	4/B11/G3/F3/H2	1.728	0.070
3	4/B11/G3/E7/H8	0.738	0.059
4	4/B11/G3/B7/G12	1.032	0.058
5	4/B11/G3/C10/D3	1.070	0.062
6	4/B11/G3/C10/G4	1.305	0.065
7	4/B11/G3/E12/C8	0.930	0.057
8	4/B11/G3/E12/E5	0.921	0.062
9	4/B11/G3/H11/D11	0.972	0.062
10	4/B11/G3/H11/G11	0.102	0.059
11	11/E12/D10/A3/G3	0.734	0.069
12	11/E12/D10/C4/E6	0.766	0.062
13	11/E12/D10/D4/G12	0.375	0.061
14	11/E12/D10/E5/G2	0.594	0.058
15	11/E12/D10/G5/H7	0.469	0.065
16	11/E12/D10/G6/C12	0.708	0.059
17	6/D1/D1/D2/G6	0.459	0.067
18	6/D1/D1/G2/H7	0.739	0.077
19	6/D1/D1/E3/G10	1.374	0.102
20	6/D1/G1/E7/G5	0.832	0.075
21	6/D1/G1/G7/G8	0.773	0.077
22	6/D1/G1/D8/E10	0.677	0.070

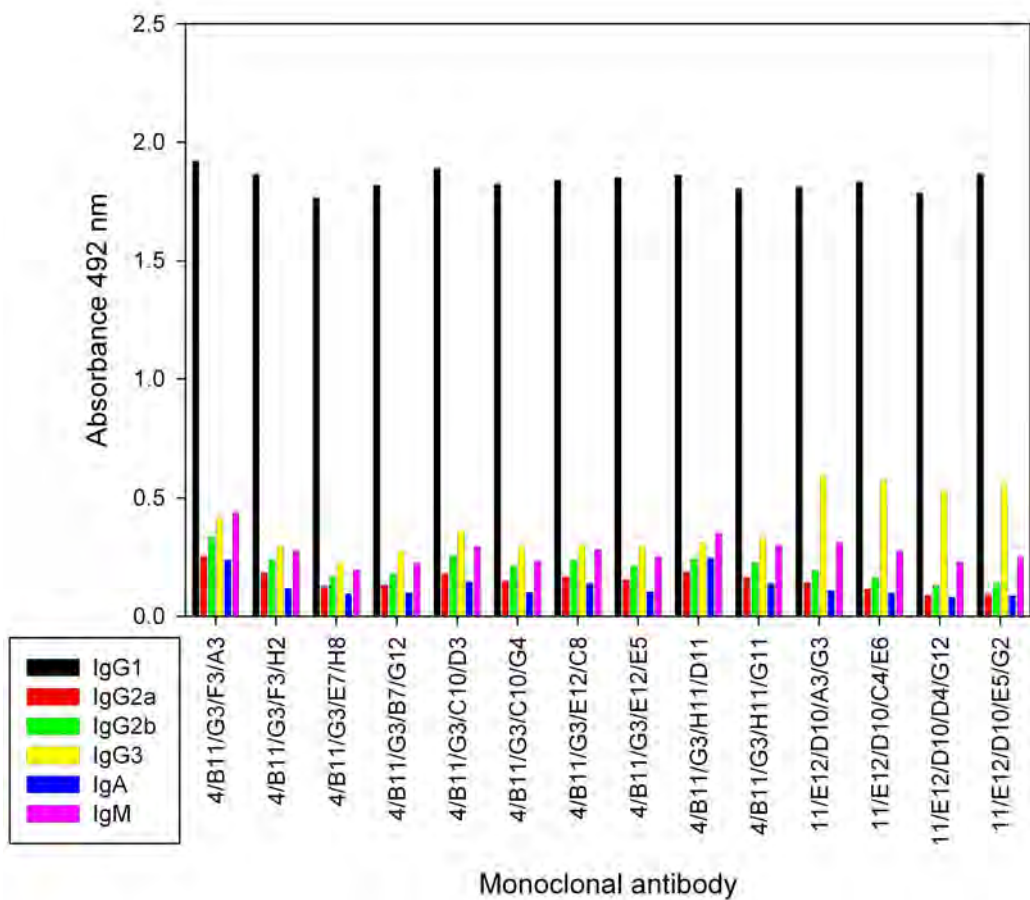
**ตารางที่ 4.5** โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการหลอมรวมเซลล์ม้ามจากหนูตัวที่ 3 จาก การทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร	
		ไม่มี HSA อิสระ	100 µg/ml HSA
1	6/D2/D6/C11/A2	1.744	0.186
2	6/D2/D6/C11/C3	1.752	0.214
3	6/D2/D6/C11/E4	1.970	0.296
4	6/D2/D6/C11/E5	1.555	0.186
5	6/D2/D6/G11/A8	1.862	0.254
6	6/D2/D6/G11/A9	1.757	0.198

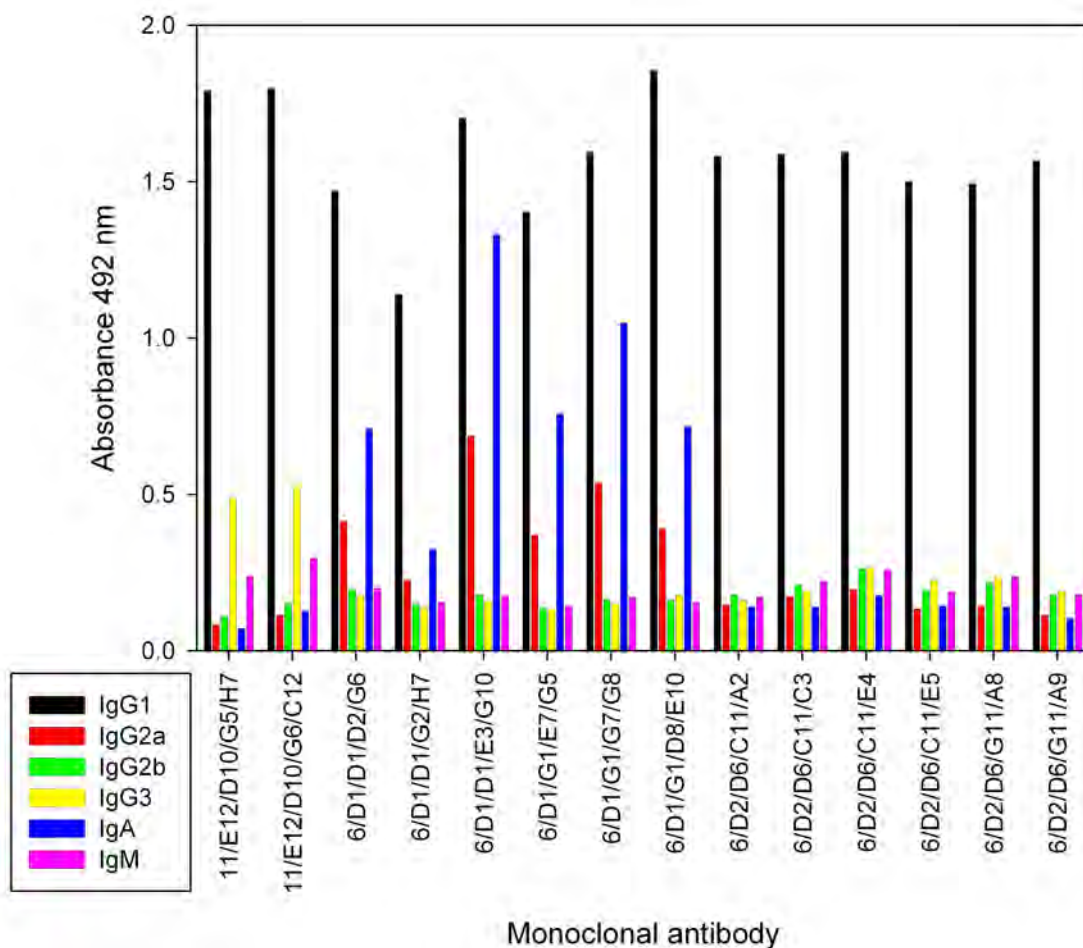
#### 4.3 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

##### 4.3.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

จากการตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 28 โคลน ด้วยชุด ตรวจสอบ isotyping kit ของบริษัท Sigma-Aldrich พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่มีไอโซไทป์ชนิด IgG, ยกเว้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D1/D1/D2/G6, 6/D1/D1/E3/G10, 6/D1/G1/E7/G5, 6/D1/G1/G7/G8, และ 6/D1/G1/D8/E10 ซึ่งจากการพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบชนิดไอโซไทป์ของแอนติบอดีโคลนดังกล่าว (ตารางที่ ก.2 ภาคผนวก ก) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงทั้งไอโซไทป์ชนิด IgG, และ IgA จึงมีความเป็นไปได้ที่แอนติบอดีโคลนดังกล่าวยังเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีอยู่ ทั้งนี้เนื่องจาก แอนติบอดีที่มาจากเซลล์ไฮบริโดมาเซลล์เดียวกัน จะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ รวมถึงชนิดไอโซไทป์ ดังนั้น หากต้องการนำแอนติบอดีโคลนดังกล่าวไปใช้งานต่อ จึงมีความจำเป็นต้องทำการ subclone อีก 2-3 รอบ เพื่อให้แน่ใจว่าแอนติบอดีโคลนดังกล่าว เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แท้จริง



รูปที่ 4.2 ผลการเปรียบเทียบการศึกษาชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1-14 จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit



**รูปที่ 4.3** ผลการเปรียบเทียบการศึกษาชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 15-28 จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit

#### 4.3.2 การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อ HSA

ทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect competitive ELISA แต่เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาจาแต่ละโคลนมีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แตกต่างกัน ทำให้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์แตกต่างกัน ดังนั้นก่อนทำการศึกษาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จึงจำเป็นต้องทำการหา ระดับความเจือจางแอนติบอดีที่เหมาะสมกับปริมาณแอนติเจนที่เคลือบอยู่ที่ก้นหลุม ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเลือก ระดับความเจือจางที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโน



เมตร ในช่วงประมาณ 1.0-1.5 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนต้องใช้ระดับการเจือจางที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6

จากนั้นทำการหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการหาค่า  $IC_{50}$  ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้ HSA รูปอิสระที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$ - $10^3$   $\mu\text{g/ml}$  เป็นตัวแข่งขัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 (ตารางที่ ก.3 และ รูปที่ ก.1-ก.7 ภาคผนวก ก)

**ตารางที่ 4.6** ระดับการเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมของแต่ละโคลน จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

ลำดับ	รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร							
		-	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200
1	4/B11/G3/F3/A3	1.808	1.763	1.727	1.698	1.506	<b>1.215</b>	0.755	0.410
2	4/B11/G3/F3/H2	1.920	1.817	1.731	1.666	<b>1.264</b>	0.768	0.450	0.318
3	4/B11/G3/E7/H8	1.918	1.817	1.726	1.582	<b>1.049</b>	0.599	0.367	0.247
4	4/B11/G3/B7/G12	1.915	1.825	1.771	1.752	<b>1.333</b>	0.845	0.479	0.323
5	4/B11/G3/C10/D3	1.811	1.762	1.736	1.630	<b>1.333</b>	0.899	0.578	0.360
6	4/B11/G3/C10/G4	1.923	1.843	1.786	1.785	1.598	<b>1.035</b>	0.642	0.408
7	4/B11/G3/E12/C8	1.793	1.732	1.731	1.701	1.460	<b>1.053</b>	0.613	0.401
8	4/B11/G3/E12/E5	1.888	1.813	1.854	1.847	1.724	<b>1.439</b>	0.873	0.521
9	4/B11/G3/H11/D11	1.904	1.838	1.799	1.747	<b>1.265</b>	0.789	0.282	0.298
10	4/B11/G3/H11/G11	1.830	1.777	1.744	1.650	<b>1.282</b>	1.029	0.538	0.335
11	11/E12/D10/A3/G3	1.877	1.812	1.788	1.850	1.814	1.804	1.560	<b>1.097</b>
12	11/E12/D10/C4/E6	1.899	1.835	1.793	1.857	1.805	1.829	1.598	<b>1.187</b>
13	11/E12/D10/D4/G12	1.876	1.817	1.775	1.814	1.716	1.522	<b>1.047</b>	0.695
14	11/E12/D10/E5/G2	1.901	1.814	1.782	1.856	1.799	1.749	<b>1.492</b>	0.988
15	11/E12/D10/G5/H7	1.872	1.811	1.784	1.818	1.767	1.634	<b>1.235</b>	0.771
16	11/E12/D10/G6/C12	1.887	1.842	1.769	1.854	1.799	1.822	1.572	<b>1.109</b>
17	6/D1/D1/D2/G6	1.970	1.902	1.924	1.936	1.925	1.869	1.549	<b>1.201</b>

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ระดับการเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมของแต่ละโคลน จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA

ลำดับ	รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร							
		-	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,600	1:3,200
18	6/D1/D1/G2/H7	1.973	1.892	1.896	1.922	1.892	1.736	<b>1.264</b>	0.826
19	6/D1/D1/E3/G10	2.006	1.892	1.926	1.935	1.931	1.891	<b>1.457</b>	0.899
20	6/D1/G1/E7/G5	1.973	1.878	1.909	1.914	1.885	1.808	<b>1.288</b>	0.942
21	6/D1/G1/G7/G8	1.958	1.883	1.873	1.887	1.856	1.745	<b>1.363</b>	1.067
22	6/D1/G1/D8/E10	1.971	1.910	1.903	1.919	1.879	1.643	<b>1.176</b>	0.822
23	6/D2/D6/C11/A2	2.141	2.108	1.960	1.664	<b>1.253</b>	0.676	0.402	0.372
24	6/D2/D6/C11/C3	2.220	2.116	1.994	1.799	<b>1.436</b>	0.661	0.391	0.284
25	6/D2/D6/C11/E4	2.152	2.107	2.084	1.942	<b>1.707</b>	0.946	0.601	0.398
26	6/D2/D6/C11/E5	2.186	2.129	1.966	1.748	<b>1.377</b>	0.813	0.434	0.412
27	6/D2/D6/G11/A8	2.101	2.119	2.027	1.904	<b>1.484</b>	0.872	0.468	0.356
28	6/D2/D6/G11/A9	2.069	2.053	1.891	1.742	<b>1.439</b>	0.873	0.364	0.298

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	รหัสโคลน	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
1	4/B11/G3/F3/A3	0.88
2	4/B11/G3/F3/H2	0.26
3	4/B11/G3/E7/H8	0.28
4	4/B11/G3/B7/G12	0.38
5	4/B11/G3/C10/D3	3.23
6	4/B11/G3/C10/G4	0.29
7	4/B11/G3/E12/C8	3.0
8	4/B11/G3/E12/E5	0.59
9	4/B11/G3/H11/D11	0.59
10	4/B11/G3/H11/G11	0.76
11	11/E12/D10/A3/G3	0.20

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลน จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	รหัสโคลน	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
12	11/E12/D10/C4/E6	0.20
13	11/E12/D10/D4/G12	0.34
14	11/E12/D10/E5/G2	0.19
15	11/E12/D10/G5/H7	0.31
16	11/E12/D10/G6/C12	0.17
17	6/D1/D1/D2/G6	5.03
18	6/D1/D1/G2/H7	6.86
19	6/D1/D1/E3/G10	8.88
20	6/D1/G1/E7/G5	6.50
21	6/D1/G1/G7/G8	9.46
22	6/D1/G1/D8/E10	7.58
23	6/D2/D6/C11/A2	2.42
24	6/D2/D6/C11/C3	2.34
25	6/D2/D6/C11/E4	6.30
26	6/D2/D6/C11/E5	2.13
27	6/D2/D6/G11/A8	0.38
28	6/D2/D6/G11/A9	0.27

จากผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 28 โคลน พบว่าโคลนที่ให้ค่าความไวสูงที่สุด คือ โคลน 11/E12/D10/G6/C12 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากค่าอัลบูมินในปัสสาวะที่ควรตรวจวัดได้ ซึ่งเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร (30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลน มีความไวสูงกว่าค่าที่ควรตรวจวัดได้ ดังนั้นแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 28 โคลน จึงมีศักยภาพด้านความไวในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะต่อไปได้

#### 4.3.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) เบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม มาทำการทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยดูจากค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารที่นำมาทดสอบ ได้แก่ BSA, Hb, Ig, โดยความเข้มข้นของสารอิสระที่ใช้ในการแย่งจับกับแอนติบอดีคือ 500  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีการลดลงไม่ถึงครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่เติมสารแข่งขัน แสดงว่าต้องใช้ความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบมากกว่า 500  $\mu\text{g/ml}$  จึงจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงครึ่งหนึ่ง ดังนั้น ค่า  $\text{IC}_{50}$  ของสารที่นำมาทดสอบจะต้องมีค่ามากกว่า 500  $\mu\text{g/ml}$  ในที่นี้ได้กำหนดความเข้มข้นของสารสูงสุดที่นำมาทดสอบเท่ากับ 500  $\mu\text{g/ml}$  เท่านั้น จากนั้นนำค่า  $\text{IC}_{50}$  ดังกล่าวมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม ดังแสดงในตารางที่ 4.8 (ตารางที่ ก.4 ภาคผนวก ก) โดยจากการทดสอบ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่ออัลบูมิน โดยสามารถทำปฏิกิริยากับอัลบูมินได้ 100% และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นที่นำมาทดสอบต่ำ จากผลการทดสอบความจำเพาะ จึงสรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีความจำเพาะต่อ HSA รูปอิสระ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารอื่นที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 4.8 ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จาก  
จากการทดสอบ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	รหัสโคลน	เปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม			
		HSA	Ig	BSA	Hb
1	4/B11/G3/F3/A3	100	< 0.35	< 0.35	< 0.35
2	4/B11/G3/F3/H2	100	< 0.10	< 0.10	< 0.10
3	4/B11/G3/E7/H8	100	< 0.11	< 0.11	< 0.11
4	4/B11/G3/B7/G12	100	< 0.15	< 0.15	< 0.15
5	4/B11/G3/C10/D3	100	< 1.29	< 1.29	< 1.29
6	4/B11/G3/C10/G4	100	< 0.12	< 0.12	< 0.12
7	4/B11/G3/E12/C8	100	< 1.20	< 1.20	< 1.20
8	4/B11/G3/E12/E5	100	< 0.23	< 0.23	< 0.23
9	4/B11/G3/H11/D11	100	< 0.24	< 0.24	< 0.24
10	4/B11/G3/H11/G11	100	< 0.30	< 0.30	< 0.30
11	11/E12/D10/A3/G3	100	< 0.08	< 0.08	< 0.08
12	11/E12/D10/C4/E6	100	< 0.08	< 0.08	< 0.08
13	11/E12/D10/D4/G12	100	< 0.14	< 0.14	< 0.14
14	11/E12/D10/E5/G2	100	< 0.08	< 0.08	< 0.08
15	11/E12/D10/G5/H7	100	< 0.12	< 0.12	< 0.12
16	11/E12/D10/G6/C12	100	< 0.07	< 0.07	< 0.07
17	6/D1/D1/D2/G6	100	< 2.01	< 2.01	< 2.01
18	6/D1/D1/G2/H7	100	< 2.75	< 2.75	< 2.75
19	6/D1/D1/E3/G10	100	< 3.55	< 3.55	< 3.55
20	6/D1/G1/E7/G5	100	< 2.60	< 2.60	< 2.60
21	6/D1/G1/G7/G8	100	< 3.78	< 3.78	< 3.78
22	6/D1/G1/D8/E10	100	< 3.03	< 3.03	< 3.03
23	6/D2/D6/C11/A2	100	< 0.97	< 0.97	< 0.97
24	6/D2/D6/C11/C3	100	< 0.93	< 0.93	< 0.93
25	6/D2/D6/C11/E4	100	< 2.52	< 2.52	< 2.52
26	6/D2/D6/C11/E5	100	< 0.85	< 0.85	< 0.85
27	6/D2/D6/G11/A8	100	< 0.15	< 0.15	< 0.15
28	6/D2/D6/G11/A9	100	< 0.11	< 0.11	< 0.11

เมื่อพิจารณาจากผลการทดสอบความไว และความจำเพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 28 โคลน เพื่อเลือกโคลนที่มีลักษณะสมบัติที่ดีที่สุดมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนและ ทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งพบว่าแอนติบอดีแต่ละโคลนมีความไวสูงกว่าค่าที่ควรตรวจวัดได้ทุกโคลน และมีความจำเพาะต่ออัลบูมินสูง และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนอื่นต่ำ แต่เมื่อนำค่าการดูดกลืน แสงจากการทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี indirect competitive ELISA (ตารางที่ ก.4 ภาคผนวก ก) มาพิจารณาความสามารถในการยับยั้งสารอิสระได้ของแอนติบอดี (ตารางที่ ก. 5 ภาคผนวก ก) โดยพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเมื่อมีสารอิสระเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี สารอิสระ จะพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 สามารถยับยั้ง HSA รูปอิสระได้ 93.29%, 95.30%, และ 93.40% ตามลำดับ และยับยั้งสารอิสระชนิดอื่นที่ทดสอบได้น้อย นั่นคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสาม โคลนดังกล่าว เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นได้น้อยสุด เมื่อเทียบกับแอนติบอดีโคลนอื่นๆ ดังนั้น จึงเลือกโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 ไปทำการ เลี้ยงเพิ่มจำนวน ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป โดยลักษณะสมบัติของโคลนทั้ง 3 สามารถสรุปได้ ดังตารางที่ 4.9

**ตารางที่ 4.9** สรุปลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 ซึ่งจะนำไปทำการให้บริสุทธิ์ต่อไป

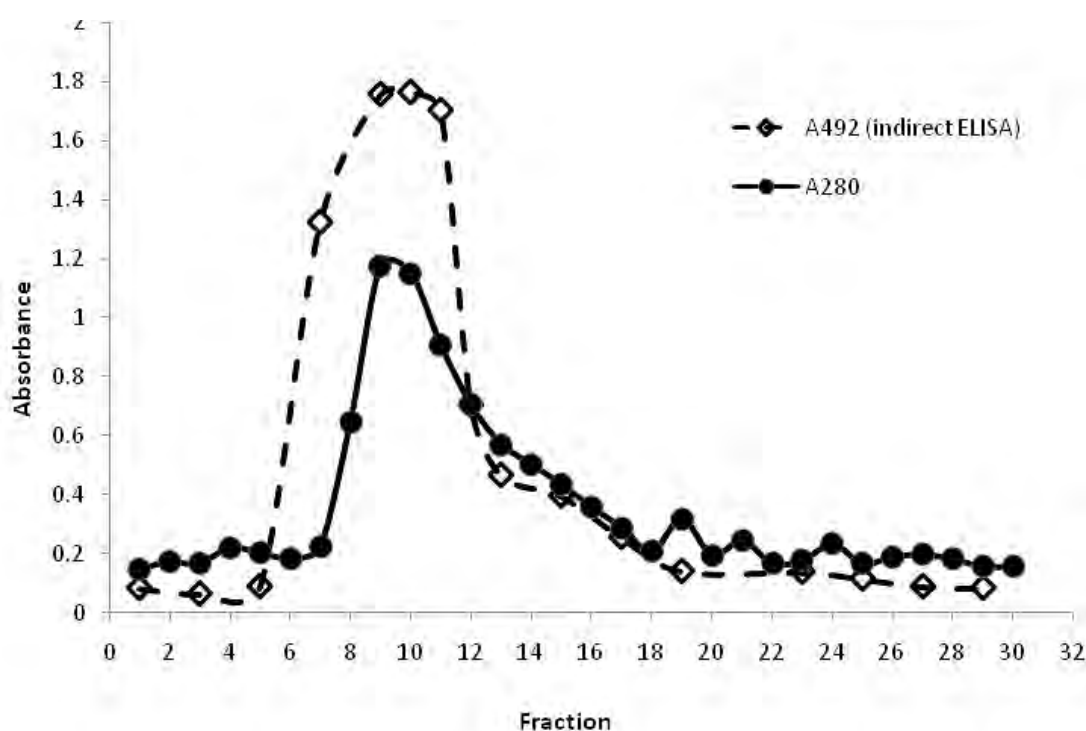
รหัสโคลน	ไอโซไทป์	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	% การเกิดปฏิกิริยาข้าม			
			HSA	Immunoglobulin	BSA	Hemoglobin
4/B11/G3/F3/H2	IgG <sub>1</sub>	0.25	100	0.10	0.10	0.10
4/B11/G3/E12/E5	IgG <sub>1</sub>	0.59	100	0.23	0.23	0.23
4/B11/G3/H11/G11	IgG <sub>1</sub>	0.76	100	0.30	0.30	0.30

#### 4.4 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

##### 4.4.1 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน คือ 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 ซึ่งเป็นโคลนที่มีความไวต่อ HSA สูงและมีความจำเพาะต่อ HSA รูปอิสระ มาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยง เซลล์ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เมื่อทำการเลี้ยงจนได้แอนติบอดีสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร

มากแล้ว จึงนำแอนติบอดีที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยในภาวะ pH 7.0 โปรตีนจีเซฟาไรสซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์จะทำหน้าที่ยึดจับกับ Fc region ของแอนติบอดี และสามารถแยกแอนติบอดีออกจากโปรตีนจีได้โดยการใช้กรด ดังนั้นเมื่อทำการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่ pH 2.7 แอนติบอดีที่อยู่ในคอลัมน์ก็จะหลุดออกมา นำสารละลายที่เก็บได้แต่ละแฟรคชันไปวัดปริมาณโปรตีนโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตรวจสอบแอนติบอดีในแต่ละแฟรคชันด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ระดับการเจือจางเท่ากับ 1:2,000 ดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ตารางที่ ก.6 ภาคผนวก ก)



**รูปที่ 4.4** โครมาโทแกรมจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์โปรตีนจีเซฟาไรส ขนาด 1.5x5 เซนติเมตร และทำการล้างคอลัมน์ด้วย glycine hydrochloride pH 2.7 โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่าง 31 แฟรคชัน แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร

จากโครมาโทแกรม พบว่า แฟรคชันที่ 6-13 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการวัดปริมาณโปรตีนที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ที่พบว่าแอนติบอดีอยู่ในแฟรคชันที่ 6-13 ดังนั้น จึงนำสารละลายแฟรคชัน

ดังกล่าว มารวมกัน จากนั้น นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยนำไปไดอะไลซิส ด้วย PBS

#### 4.4.2 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bichoninic acid assay (BCA)

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนการทำให้บริสุทธิ์และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA (ตารางที่ ก.7 และรูปที่ ก.8 ภาคผนวก ก) พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ของโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ มีค่าเท่ากับ 5.28, 5.06, และ 4.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 1.80, 1.74, และ 2.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.10

**ตารางที่ 4.10** ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนทำให้บริสุทธิ์และในสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์จากการทดสอบด้วยวิธี BCA

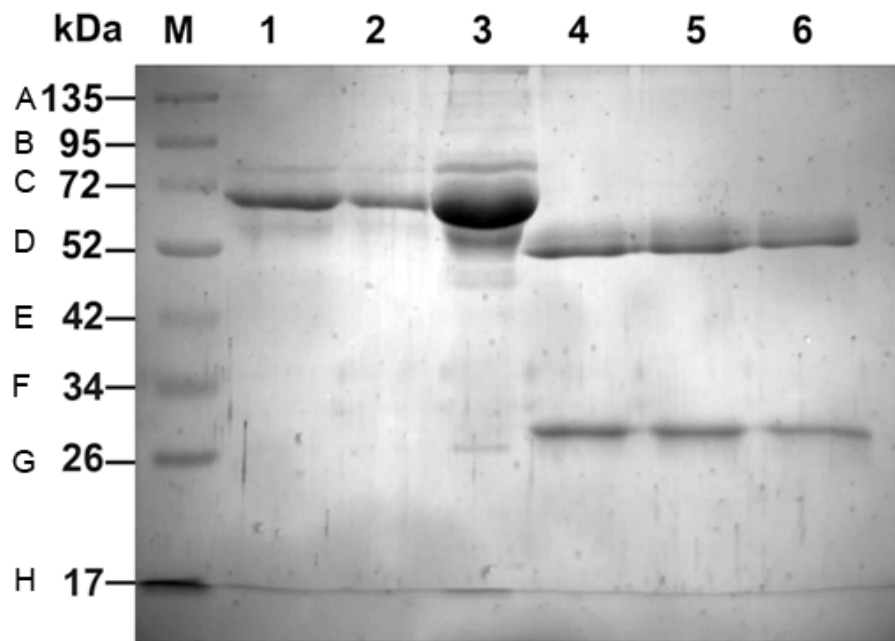
โคลน	ก่อนทำให้บริสุทธิ์			หลังทำให้บริสุทธิ์		
	ปริมาตร (ml)	ความ เข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)	ปริมาตร (ml)	ความ เข้มข้น (mg/ml)	รวม (mg)
4/B11/G3/F3/H2	800	5.28	4,224	14	1.80	25.20
4/B11/G3/E12/E5	800	5.06	4,048	19.4	1.74	33.76
4/B11/G3/H11/G11	800	4.55	3,640	11.5	2.28	26.22

#### 4.5 การหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

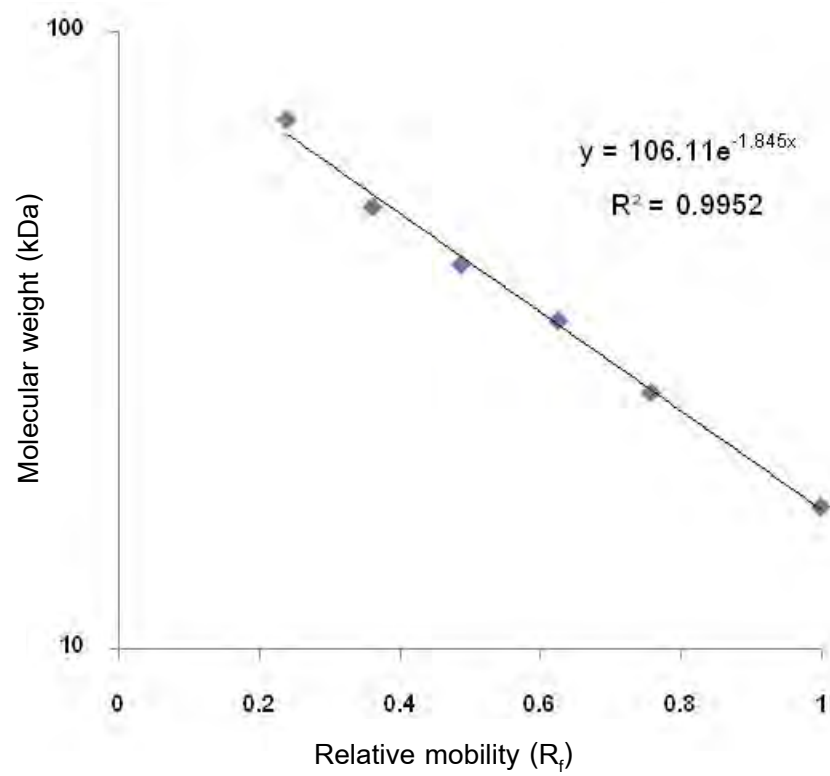
ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังรูปที่ 4.5 จากนั้น หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน โดยนำค่า relative mobility ( $R_f$ ) ของแถบโปรตีนที่ต้องการหาน้ำหนักโมเลกุลไปเปรียบเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐานซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว (รูปที่ 4.6) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ (Lane 4, 5, และ 6) จะเห็นเฉพาะแถบโปรตีนแอนติบอดีเพียงเท่านั้น ซึ่งแยกเป็นแถบ



โปรตีนสายสั้น (Light chain) และแถบโปรตีนสายยาว (Heavy chain) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29 และ 54 กิโลดัลตัน ตามลำดับ แต่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนจากซีรัมวัวเมื่อเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (Lane 1)



**รูปที่ 4.5** ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 หลังการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี SDS-PAGE; M, Molecular weight protein markers; 1, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี mAb ก่อนทำให้บริสุทธิ์; 2, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะ 20% FCS; 3, FCS; 4, mAb โคลน 4/B11/G3/F3/H2 หลังทำให้บริสุทธิ์; 5, mAb โคลน 4/B11/G3/E12/E5 หลังทำให้บริสุทธิ์; 6, mAb โคลน 4/B11/G3/H11/G11 หลังทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล (kDa) กับค่า  $R_f$  ของ Molecular weight marker

ตารางที่ 4.11 ค่า  $R_f$  และน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

โปรตีน	มวลโมเลกุล (kDa)	Relative mobility ( $R_f$ )
แถบโปรตีน A	135	0.07
แถบโปรตีน B	95	0.16
แถบโปรตีน C	72	0.24
แถบโปรตีน D	52	0.36
แถบโปรตีน E	42	0.49
แถบโปรตีน F	34	0.63
แถบโปรตีน G	26	0.76
แถบโปรตีน H	17	1
Heavy chain	54	0.36
Light chain	29	0.70

#### 4.6 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HSA หลังทำให้บริสุทธิ์

ทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุมจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว ด้วยวิธี indirect ELISA ดังแสดงในตารางที่ 4.12 – 4.14 เลือกความเข้มข้นที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 มีค่าเท่ากับ 0.1, 0.25, และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมที่ใช้ในการเคลือบกันหลุมสำหรับโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 เท่ากับ 0.5, 1, และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีของแต่ละโคลนด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยใช้สาร HSA อีสาระความเข้มข้น  $10^3$ - $10^{-3}$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวแข่งขัน พบว่า  $IC_{50}$  ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 มีค่าเท่ากับ 0.39, 0.31, และ 0.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า LOD ของแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 มีค่าเท่ากับ 0.021, 0.015, และ 0.004 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 (ตารางที่ ก.8-10 ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2 หลังทำให้บริสุทธิ์ และแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุม ด้วยวิธี indirect ELISA

HSA (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร						
	แอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2 (µg/ml)						
	0.05	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5
0.25	0.426	0.498	0.655	0.913	0.934	0.947	0.974
0.5	0.773	0.956	1.326	1.688	1.670	1.693	1.717
1	1.090	1.164	1.593	1.868	1.866	1.850	1.851
1.25	1.002	1.106	1.619	1.883	1.890	1.889	1.894
2.5	1.156	1.198	1.669	1.958	1.981	1.975	1.914
5	1.165	1.116	1.600	1.952	1.996	2.029	1.932
10	1.190	1.152	1.656	1.967	1.937	1.965	1.884

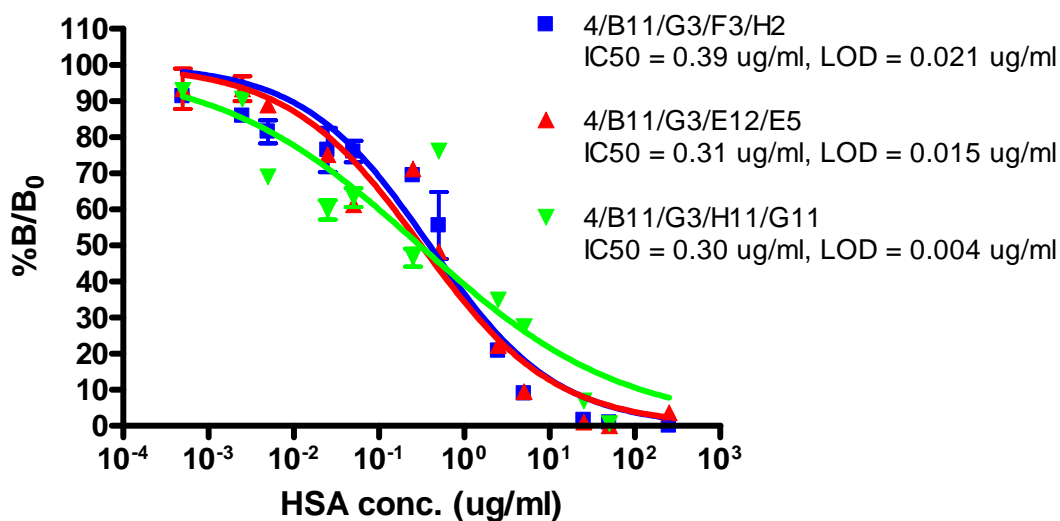
ตารางที่ 4.13 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/E12/E5 หลังทำให้บริสุทธิ์ และแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุม ด้วยวิธี indirect ELISA

HSA (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร						
	แอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/E12/E5 (µg/ml)						
	0.05	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5
0.25	0.234	0.393	0.590	0.737	0.866	0.970	0.980
0.5	0.415	0.778	1.076	1.393	1.586	1.659	1.647
1	0.504	0.900	1.300	1.645	1.803	1.830	1.860
1.25	0.487	0.868	1.342	1.668	1.803	1.852	1.840
2.5	0.541	0.985	1.424	1.742	1.931	1.960	1.917
5	0.541	0.941	1.439	1.778	1.926	1.951	1.946
10	0.534	0.971	1.428	1.717	1.912	1.968	1.888

ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 หลังทำให้บริสุทธิ์ และแอนติเจนที่ใช้เคลือบกันหลุม ด้วยวิธี indirect ELISA

HSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร						
	แอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	0.05	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5
0.25	0.159	0.274	0.432	0.597	0.748	0.838	0.888
0.5	0.286	0.494	0.793	1.226	1.478	1.622	1.640
1	0.340	0.633	1.065	1.441	1.725	1.815	1.847
1.25	0.337	0.618	1.008	1.500	1.713	1.848	1.847
2.5	0.370	0.685	1.068	1.546	1.849	1.914	1.888
5	0.355	0.620	1.080	1.488	1.848	1.897	1.951
10	0.353	0.686	1.094	1.494	1.890	1.898	1.909

เมื่อเปรียบเทียบ  $IC_{50}$  ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 ระหว่างก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า  $IC_{50}$  ของโคลน 4/B11/G3/F3/H2 หลังทำให้บริสุทธิ์ ( $0.39 \mu\text{g/ml}$ ) ต่ำกว่าก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ( $0.26 \mu\text{g/ml}$ ) เล็กน้อย ส่วนแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/E12/E5 และ 4/B11/G3/H11/G11 พบว่า  $IC_{50}$  หลังทำให้บริสุทธิ์ ( $0.31 \mu\text{g/ml}$  และ  $0.30 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) สูงกว่าก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ( $0.59 \mu\text{g/ml}$  และ  $0.76 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) ทั้งนี้เนื่องจากขั้นตอนในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้มีการกำจัดโปรตีนชนิดอื่นที่ปนเปื้อนซึ่งรบกวนการทำงานของแอนติบอดีออกไป จึงทำให้  $IC_{50}$  หลังการทำให้บริสุทธิ์ดีกว่าก่อนการทำให้บริสุทธิ์

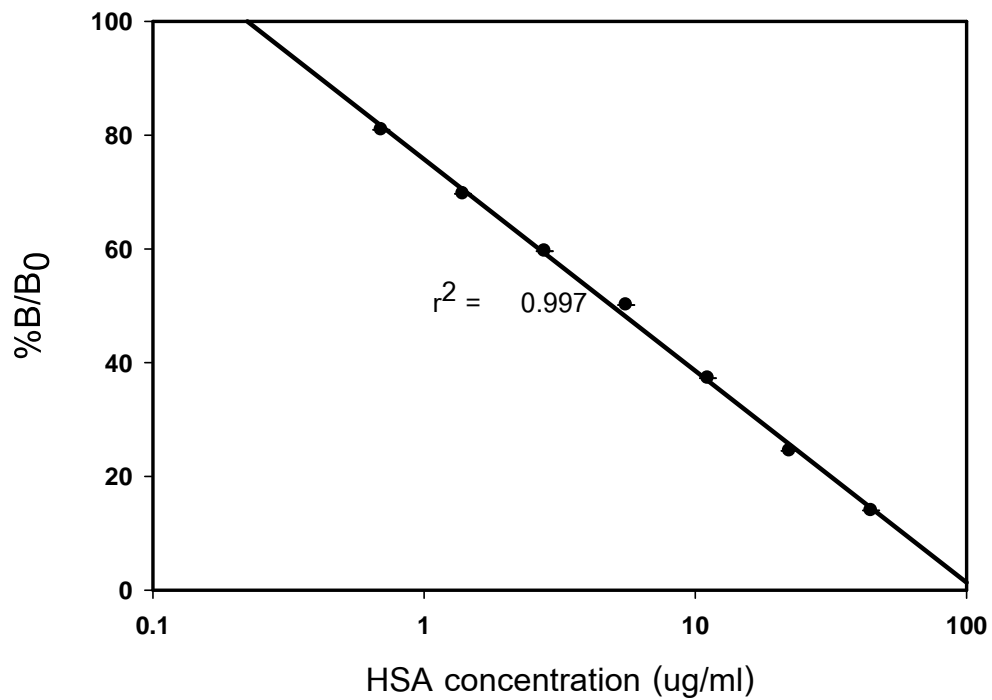


รูปที่ 4.7 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 ต่อ HSA จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

4.7 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ในการวิเคราะห์ปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

#### 4.7.1 การทดสอบหาช่วงมาตรฐานสำหรับการตรวจวัด

เมื่อนำสารละลายอัลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น  $10^2$ - $10^{-2}$  ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร มาทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟ มาตรฐานระหว่างความสัมพันธ์ของ %B/B0 และความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมินในรูปของ ลอการิทึม ดังรูปที่ 4.8 พบว่ากราฟมีความช่วงความเป็นเส้นตรงระหว่าง 0.70-40  $\mu\text{g/ml}$  ( $r^2 = 0.998$ )



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

4.7.2 การหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD)

เมื่อทำการศึกษาค่าความเข้มข้นของอัลบูมินที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจวัดด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยทำการตรวจวัด PBS pH 7.4 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ แทนสารละลายอัลบูมิน นำค่าการตรวจวัดที่ได้ มาคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และคำนวณหาค่า LOD พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.057  $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 4.15 ผลการทดสอบหาค่า LOD ของไมโครอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ค่าทางสถิติ	ไมโครอัลบูมิน
$B_0$	1.079
ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	0.05101
$3*SD$	0.15304
ค่าความชัน	16.16
LOD	0.057 ( $\mu\text{g/ml}$ )

4.7.3 การตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

นำ control urine microalbumin ที่ความเข้มข้นต่างกัน ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการตรวจวัดด้วยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี nephelometry ผลการวิเคราะห์ที่ได้ แสดงดังตารางที่ 4.16 จากนั้นนำผลที่ได้จากการตรวจวัดมาเปรียบเทียบกัน โดยใช้การคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม pair sample T-test จากสมมุติฐานที่ว่า การตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี nephelometry ไม่มีความแตกต่างกัน และจากการวิเคราะห์พบว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่าที่ได้จากการตรวจวัดจากสองวิธี มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยให้ค่า  $p = 0.169$  (ตารางที่ 4.17) และการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี nephelometry มีความสัมพันธ์กันโดยมีค่า  $r^2 = 0.971$



ตารางที่ 16 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่าง ด้วยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี immunonephelometry

ตัวอย่าง	ปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างที่ตรวจวัดได้ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	วิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น	วิธี immunonephelometry
1	5.93	16.00
2	14.00	29.00
3	28.00	57.00
4	49.23	41.50
5	50.23	81.00
6	240.00	217.00
7	183.00	221.00

ตารางที่ 4.17 ค่าสถิติที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินระหว่างวิธี indirect competitive ELISA และวิธี nephelometry

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean	t	Sig (2-tailed)
Pair 1 ELISA	81.5486	7	91.78247	34.69051		
Nephelometry	94.6429	7	87.42459	33.04339	-1.561	0.169

4.7.4 การทดสอบความแม่นยำ (precision) ของวิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น

จากการทำ Intra-variation assay และ Inter-variation assay และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) พบว่า intra-variation assay ให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 3.02 – 4.23 และ inter-variation assay ให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 15.02 – 16.79 ดังตารางที่ 4.18 ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 20 จึงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

**ตารางที่ 4.18** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น

สิ่งตัวอย่าง	Intra-variation assay (n = 12)			Inter-variation assay (N = 8)		
	mean	SD	%CV	mean	SD	%CV
1	0.814	0.03	3.05	0.851	0.14	16.79
2	0.987	0.04	4.23	0.996	0.17	16.70
3	1.148	0.03	3.02	1.175	0.18	15.02

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคน ซึ่งอัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดัลตัน จึงมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดี สามารถนำอัลบูมินจากซีรัมคนที่มีความบริสุทธิ์และมีจำหน่ายทางการค้า มาใช้ฉีดกระตุ้นหนูทดลองได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องทำการเชื่อมต่อกับ hapten จากการฉีดกระตุ้นหนู BALB/c ทั้ง 3 ตัว จำนวน 4 ครั้ง พบว่าหนูทดลองมีการตอบสนองที่ดีต่อแอนติเจนที่ได้รับ โดยเมื่อนำซีรัมของหนูมาตรวจหาระดับแอนติบอดี พบว่าระดับแอนติบอดีของหนูทดลองทั้ง 3 ตัวมีค่าเท่ากับ 1:64,000, 1:32,000, และ 1:16,000 ตามลำดับ และจากการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อ HSA และ BSA พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูมีความจำเพาะต่อ HSA ในรูปอิสระ ดังนั้นจึงนำเซลล์ม้ามของหนูทั้ง 3 ตัว มาทำการหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโดมา สายพันธุ์ SP2/0 และประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูตัวที่ 2 และ 3 แต่ไม่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ม้ามของหนูทดลองตัวที่ 1 ได้ เนื่องจากเมื่อนำเซลล์ม้ามมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโดมา หลังจากการทำ limiting dilution ครั้งที่ 1 เซลล์ไฮบริโดมาที่มีอยู่ทั้งหมด สูญเสียความสามารถในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งนี้อาจมีความไม่เสถียร ทำให้โครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนติบอดีของเซลล์ถูกสลัดออกจากเซลล์ในระหว่างการแบ่งตัวของเซลล์ไฮบริโดมา นอกจากนี้อาจเกิดจากการทำการ cloning เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีซ้ำ ทำให้เซลล์ไฮบริโดมาที่ขาดความสามารถในการผลิตแอนติบอดีเจริญเติบโตขึ้นปกคลุมเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ขาดความสามารถในการสร้างแอนติบอดี ดังนั้น วิธีการทดสอบหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ ควรเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก สามารถทราบผลได้ในวันเดียว เช่น วิธี ELISA เพื่อลดความเสี่ยงต่อการสูญเสียเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้

หลังจากได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HSA แล้ว ได้ทำการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่มีไอโซไทป์ชนิด IgG<sub>1</sub> โดยโคลนที่มีความไวต่อ HSA สูงสุด คือ 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 โดยให้ค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.25,

0.59, และ 0.76  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นที่นำมาทดสอบ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้ ได้กำหนดค่า  $\text{IC}_{50}$  ของสารที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี เท่ากับ 500  $\mu\text{g/ml}$  ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีแต่ละโคลนที่ได้ในงานวิจัยนี้ จึงยังไม่ใช่ค่าที่แท้จริง โดยค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่แท้จริง สามารถหาได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารอิสระที่นำมาทดสอบให้สูงขึ้น เมื่อได้ค่า  $\text{IC}_{50}$  ที่แท้จริงของสารที่ใช้ทดสอบ (ซึ่งต้องมีค่าสูงกว่า 500  $\mu\text{g/ml}$ ) มาใช้คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้าม จะทำให้ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามที่แท้จริง ซึ่งจะมีค่าต่ำกว่าค่าที่รายงานในครั้งนี้อยู่

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้คอลัมน์โปรตีนจี (Protein G column) เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน จะให้แถบของโปรตีนสายยาว (heavy chain) และสายสั้น (light chain) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54 และ 29 กิโลดัลตัน ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินในรูปอิสระ ด้วยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า ค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E12/E5, และ 4/B11/G3/H11/G11 มีค่าเท่ากับ 0.39, 0.31, และ 0.30  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นของอัลบูมินต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 0.021, 0.015, และ 0.004 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของแอนติบอดีที่ผลิตได้ แสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความไวและความจำเพาะต่ออัลบูมินสูง และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่นต่ำ

อย่างไรก็ตาม เพื่อเป็นการทดสอบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินได้จริง จึงนำแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/G11 ซึ่งมีความไวสูงสุดมาทำการทดลองตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA และเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับวิธี nephelometry ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดไมโครอัลบูมินด้วยวิธี indirect competitive ELISA มีค่าเท่ากับ 0.7-40  $\mu\text{g/ml}$  ( $r^2 = 0.998$ ) และค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี indirect competitive ELISA มีค่าเท่ากับ 0.057  $\mu\text{g/ml}$  เมื่อนำผลการตรวจวัดไมโครอัลบูมินที่ได้จากสองวิธี มาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่าการตรวจวัดด้วยวิธี indirect competitive ELISA และวิธี nephelometry มีความสัมพันธ์กันดี ( $r^2 = 0.971$ ,  $n = 7$ ;  $p > 0.05$ ) นอกจากนี้ ยังพบว่า วิธี indirect competitive ELISA ที่พัฒนาขึ้น มีความแม่นยำที่

ยอมรับได้ โดยจากการทดสอบด้วยวิธี intra-variation assay และ inter-variation assay พบว่าให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 3.02 – 4.23% และ 15.02 – 16.79% ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Omidfar และคณะ ซึ่งได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออัลบูมินจากซีรัมคน ผลที่ได้คือ สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออัลบูมินจำนวน 2 โคลน เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้งสองโคลนมาตรวจวัดอัลบูมิน และสร้างกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการตรึงอัลบูมินไว้ที่ก้นหลุมเช่นเดียวกัน พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีช่วงความเป็นเส้นตรงค่อนข้างมาก ระหว่าง 10 pg/well - 100 ng/well (62) ซึ่งค่อนข้างแตกต่างจากงานวิจัยนี้ ที่มีช่วงเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.7-40 µg/ml หรือเท่ากับ 35 pg/well – 2 ng/well อย่างไรก็ตามวิธีที่นำเสนอ มีความไวเพียงพอที่จะตรวจวัดระดับไมโครอัลบูมินในปัสสาวะได้ นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยของ LC Ng และคณะ (38) ที่ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะด้วยวิธี indirect competitive ELISA โดยการตรึงอัลบูมินไว้ที่ก้นหลุมเช่นเดียวกัน พบว่า กราฟมาตรฐานที่ได้ มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.2-12.5 µg/ml ซึ่งมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่นำเสนอ

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยนี้ ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง และการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวัดปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างด้วยวิธี indirect competitive ELISA ทำให้สรุปได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาชุดตรวจวัดอัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะ ได้ครอบคลุมทั้งในระดับปกติ และระดับที่มีความสำคัญทางคลินิกในช่วง 30-300 µg/ml ซึ่งเป็นระดับของภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะได้ โดยอาจนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจวัดไมโครอัลบูมินในปัสสาวะโดยหลักการ ELISA ซึ่งมีความไวในการตรวจวัดสูง แต่เนื่องจาก จากการทดลองมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดในช่วง 0.7-40 µg/ml ดังนั้นจำเป็นต้องทำการเจือจางปัสสาวะก่อนนำมาทดสอบ ซึ่งเป็นผลดีในการช่วยลดสารรบกวนอื่นที่มีในปัสสาวะ ทั้งนี้การตรวจวัดด้วยหลักการ indirect competitive ELISA อาจให้ผลบวกปลอม เนื่องจาก hook effect กรณีมีปริมาณอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างน้อย (80) ซึ่งสามารถแก้ไขได้ด้วยการเจือจางสิ่งตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำมาทำการตรวจวัดด้วยวิธี ELISA อย่างไรก็ตาม ข้อที่ควรตระหนักถึงในขั้นตอนการเจือจางสิ่งตัวอย่างคือ ความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นขณะทำการปิเปต (pipetting error) ซึ่งอาจเกิดผลเสียได้ โดยการตรวจด้วยวิธี ELISA นิยมใช้เป็นการตรวจยืนยันภาวะไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ ซึ่งมักมีการตรวจ

คัดกรองเบื้องต้นมาก่อน โดยจะทราบระดับของอัลบูมินในสิ่งตัวอย่างเบื้องต้นมาก่อนว่ามีปริมาณมากหรือน้อย

นอกจากนี้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยนี้ ยังสามารถนำไปพัฒนา แล็บตรวจไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ โดยอาศัยหลักการ competitive lateral flow immunochromatography assay ซึ่งมีความรวดเร็ว สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยการตรึง โมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้ที่ตำแหน่งของแถบแสดงผลและแถบควบคุมคุณภาพ และให้อัลบูมินที่ ติดฉลากด้วย colloidal gold เป็นตัวแข่งขันกับอัลบูมินในปัสสาวะ โดยการพัฒนาชุดตรวจ วิเคราะห์อัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะขึ้นใช้เอง ซึ่งมีราคาถูกกว่าการนำเข้าชุดตรวจสอบจาก ต่างประเทศนั้น จะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ป่วยเบาหวานซึ่งมีจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจาก ผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความจำเป็นต้องเข้ารับการตรวจคัดกรองภาวะไมโครอัลบูมินปริมาณน้อย เป็นประจำอย่างน้อย 1 ครั้งต่อปี เพื่อป้องกันการเกิดภาวะโรคไตแทรกซ้อน ซึ่งการตรวจพบการ บกพร่องของการทำงานของไตในระยะเริ่มแรกนั้น ย่อมส่งผลดีต่อการรักษาให้กลับสู่ภาวะปกติได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยเบาหวานแล้ว ยังส่งผลดีในกลุ่มประชากรทั่วไป ในแง่ของการป้องกันการเกิดได้รับการตรวจคัดกรองการทำงานของไต ซึ่งมีโอกาสในการได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที จากที่กล่าว มาข้างต้น จะเห็นได้ว่าการพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์อัลบูมินปริมาณน้อยในปัสสาวะขึ้นใช้เอง ภายในประเทศนั้น ก่อให้เกิดผลดีทั้งในด้านสุขภาพของประชากรและด้านเศรษฐกิจของประเทศ

## รายการอ้างอิง

- (1) Köhler, G., and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;495-7.
- (2) van den Born, J., and Berden, J.H. Is microalbuminuria in diabetes due to changes in glomerular heparan sulphate? Nephrology Dialysis Transplantation. 1995;10(8):1277-9.
- (3) Haffner, S.M., et al. Microalbuminuria. Potential marker for increased cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects? Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1990;10(5):727.
- (4) Molitch, M., et al. Nephropathy in diabetes. Diabetes Care. 2004;27:S79.
- (5) Giampietro, O., et al. Which method for quantifying "microalbuminuria" in diabetics? Acta Diabetologica. 1992;28(3):239-45.
- (6) Choi, S., Choi, E.Y., Kim, H.S., and Oh, S.W. On-site quantification of human urinary albumin by a fluorescence immunoassay. Clinical Chemistry. 2004 Jun;50(6):1052-5.
- (7) Miles, D., Mogensen, C., and Gundersen, H. Radioimmunoassay for urinary albumin using a single antibody. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. 1970;26(1):5-11.
- (8) Woo, J., Floyd, M., Cannon, D.C. and Kahan, B. Radioimmunoassay for urinary albumin. Clinical Chemistry. 1978;24(9):1464.
- (9) Aybay, C., and Karakus, R. Measurement of Urine Albumin Levels With A Monoclonal Antibody Based in-House Elisa. Turkish Journal of Medical Sciences. 2003;33(1):1-6.
- (10) Cho, J.H. and Paek, S.H. Semiquantitative, bar code version of immunochromatographic assay system for human serum albumin as model analyte. Biotechnology and Bioengineering. 2001;75(6):725-32.
- (11) Doumas, B.T., and Peters, T. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. Clinica Chimica Acta. 1997;258(1):3-20.

- (12) Zunszain, P.A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E. and Curry, S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. BMC Structural Biology. 2003;3(1):6.
- (13) He, X.M., and Carter, D.C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. 1992.
- (14) A molecule of human serum albumin. [online]; Available from: <http://www.pharmaceutical-technology.com/projects/chitose/chitose2.html>. [2011, March 30]
- (15) Choi, S., et al. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). Clinica Chimica Acta. 2004;339(1-2):147-56.
- (16) Gilbert, R.E., Akdeniz, A., and Jerums, G. Detection of microalbuminuria in diabetic patients by urinary dipstick. Diabetes Research and Clinical Practice. 1997;35(1):57-60.
- (17) Mogensen, C.E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. New England Journal of Medicine. 1984;310(6):356.
- (18) Viberti, G., et al. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. The Lancet. 1982;319(8287):1430-2.
- (19) Deckert, T., et al. Cohort study of predictive value of urinary albumin excretion for atherosclerotic vascular disease in patients with insulin dependent diabetes. BMJ. 1996;312(7035):871.
- (20) Gall, M.A., Borch-Johnsen, K., Hougaard, P., Nielsen, F., and Parving, H.H. Albuminuria and poor glycaemic control predict mortality in NIDDM. Diabetes. 1995;44(11):1303.
- (21) Rossing, P., Hougaard, P., Borch-Johnsen, K., and Parving, H.H. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 year observational follow up study. BMJ. 1996;313(7060):779.



- (22) Alzaid, A.A. Microalbuminuria in patients with NIDDM: an overview. Diabetes Care. 1996;19(1):79.
- (23) Anavekar, N.S., et al. Predictors of cardiovascular events in patients with type 2 diabetic nephropathy and hypertension: a case for albuminuria. Kidney International. 2004;66:S50-S5.
- (24) Mattock, M.B., et al. Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. Diabetes. 1992;41(6):736.
- (25) Krans, H., Porta, M., and Keen, H. Diabetes care and research in Europe: the St Vincent Declaration action programme, implementation document. 1992.
- (26) Arnlov, J., et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. Circulation. 2005;112(7):969.
- (27) Berton, G., et al. Prognostic significance of hypertension and albuminuria for early mortality after acute myocardial infarction. Journal of Hypertension. 1998;16(4):525.
- (28) Hillege, H.L., et al. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. Journal of Internal Medicine. 2001;249(6):519-26.
- (29) Jensen, J., et al. Microalbuminuria and its relation to cardiovascular disease and risk factors. A population-based study of 1254 hypertensive individuals. Journal of Human Hypertension. 1997;11(11):727-32.
- (30) Klausen, K., et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. Circulation. 2004;110(1):32.
- (31) Tomura, S., et al. Prevalence of microalbuminuria and relationship to the risk of cardiovascular disease in the Japanese population. American Journal of Nephrology. 2000;19(1):13-20.

- (32) Kearney, E., Mount, J., Watts, G., Slavin, B., and Kind, P. Simple immunoturbidimetric method for determining urinary albumin at low concentrations using Cobas-Bio centrifugal analyser. Journal of Clinical Pathology. 1987;40(4):465.
- (33) Spencer, K., and Price, C. Kinetic immunoturbidimetry: the estimation of albumin. Clinica Chimica Acta. 1979;95(2):263-76.
- (34) Van Munster, P., Hoelen, G., Samwel-Mantingh, M., and Meurs, M.H.V. A turbidimetric immuno assay (TIA) with automated individual blank compensation. Clinica Chimica Acta. 1977;76(3):377-88.
- (35) Teppo, A. Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine. Clinical Chemistry. 1982;28(6):1359.
- (36) Mehta, P., and Mehta, S. Quantitation of IgG and albumin in CSF and serum from multiple sclerosis patients by enzyme-linked immunosorbent assay. Acta Neurologica Scandinavica. 1987;75(2):125-9.
- (37) Mohamed, A., Wilkin, T., Leatherdale, B., and Davies, R. A microenzyme-linked immunosorbent assay for urinary albumin, and its comparison with radioimmunoassay. Journal of Immunological Methods. 1984;74(1):17-22.
- (38) Ng, L.C., Teng, L., Ng, M., Sazali, B., and Khalid, B. Microalbuminuria measurements by two in-house ELISA methods. Malaysian Journal of Pathology. 2000;22(2):73-8.
- (39) Torffvit, O., and Wieslander, J.Ö.R. A simplified enzyme-linked immunosorbent assay for urinary albumin. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. 1986;46(6):545-8.
- (40) Magnotti Jr, R., Stephens, G., Rogers, R., and Pesce, A. Microplate measurement of urinary albumin and creatinine. Clinical Chemistry. 1989;35(7):1371.
- (41) Neuman, R., and Cohen, M. Improved competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) for albuminuria. Clinica Chimica Acta. 1989;179(3):229-37.
- (42) Feldt-Rasmussen, B., Dinesen, B., and Deckert, M. Enzyme immunoassay: an improved determination of urinary albumin in diabetics with incipient

- nephropathy. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. 1985;45(6):539-44.
- (43) Wu, T.L., et al. Microplate ELISA for urine microalbumin: reference values and results in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease. Annals of Clinical & Laboratory Science. 2005;35(2):149.
- (44) Yalow, R.S., and Berson, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. Journal of Clinical Investigation. 1960;39(7):1157.
- (45) Berglund, A., Carlsson, C., and Dahlqvist, G. Solid phase RIA—a simple technique for the early detection of albuminuria in diabetes. Diabetic Nephropathy. 1984;3:89-91.
- (46) Nanoprobes e-News. [online]. 2007. Available from: [http://www.nanoprobes.com/newsletters/Vol8\\_Iss5.html](http://www.nanoprobes.com/newsletters/Vol8_Iss5.html). [2011, March 30]
- (47) Chiao, D.J., Shyu, R.H., Hu, C.S., Chiang, H.Y., and Tang, S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. Journal of Chromatography B. 2004;809(1):37-41.
- (48) Rong-Hwa, S., Shiao-Shek, T., Der-Jiang, C., and Yao-Wen, H. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. Food Chemistry. 2010;118(2):462-6.
- (49) Domínguez, J., et al. Detection of Streptococcus pneumoniae Antigen by a Rapid Immunochromatographic Assay in Urine Samples. Chest. 2001;119(1):243.
- (50) cytodiagnosics : Lateral Flow Immunoassays. [online]; Available from: <http://www.cytodiagnosics.com/lateral-flow-immunoassays.html>. [2011, March 30]
- (51) Takahashi, A., et al. Immunochromatographic assay using gold nanoparticles for measuring salivary secretory IgA in dogs as a stress marker. Science and Technology of Advanced Materials. 2009;10:034604.
- (52) Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Baker, D.L., and Baker, A. Basic immunology: functions and disorders of the immune system: Saunders Philadelphia; 2004.

- (53) Serum protein electrophoresis. [online]; Available from: [http://www.thefullwiki.org/Serum\\_protein\\_electrophoresis](http://www.thefullwiki.org/Serum_protein_electrophoresis). [2011, March 30]
- (54) Britannica Online Encyclopedia. [online]; Available from: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/107006>. [2011, March 30]
- (55) Antibody structure. [online]; Available from: <http://www.virology.ws/wp-content/uploads/2009/07/antibody2.jpg>. [2011, March 30]
- (56) Bruce, A., et al. The Functional Properties of Antibodies [online]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28311/>. [2011, March 30]
- (57) IgD antibody. [online]; Available from: <http://www.elec-intro.com/igd-antibody>. [2011, March 30]
- (58) Liddell, J.E., and Cryer, A. A practical guide to monoclonal antibodies: John Wiley & Sons Inc; 1991.
- (59) Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B., and Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. The Journal of Immunology. 1979;123(4):1548.
- (60) Littlefield, J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science (New York, NY). 1964;145:709.
- (61) De novo pathway and salvage pathway. [online]; Available from: (<http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunologv/monab.html>). [2011, March 30]
- (62) Omidfar, K., Kashanian, S., Paknejad, M., Larijani, B., and Roshanfekar, H. Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Human Serum Albumin. Hybridoma. 2007;26(4):217-22.
- (63) Smith, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 1985;228(4705):1315.
- (64) Azzazy, H.M.E., and Highsmith, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry. 2002;35(6):425-45.

- (65) Filamentous phage. [online]; Available from: [www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/...cml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/...cml.html). [2011, March 30]
- (66) Yamabahi, M. Phage Display Technology. [online2011 3103]; Available from: <http://www.sut.ac.th/iat/biotech/montarop/phd/index.htm>.
- (67) Hoogenboom, H.R., et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Research. 1991;19(15):4133.
- (68) Kobayashi, N., et al. Generation of a novel monoclonal antibody against cortisol-[C-4]-bovine serum albumin conjugate: Application to enzyme-linked immunosorbent assay for urinary and serum cortisol. Analytical Sciences. 2002;18(12):1309-14.
- (69) Miller, R.A., Oseroff, A.R., Stratte, P.T., and Levy, R. Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma. Blood. 1983;62(5):988.
- (70) Collins-Burow, B., and Santos, E.S. Rituximab and its role as maintenance therapy in non-Hodgkin lymphoma. Expert Review of Anticancer Therapy. 2007 Mar;7(3):257-73.
- (71) Hainsworth, J.D. Monoclonal antibody therapy in lymphoid malignancies. Oncologist. 2000;5(5):376-84.
- (72) Hudson, P.J., and Souriau, C. Engineered antibodies. Nature Medicine. 2003;9(1):129-34.
- (73) Presta, L.G. Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2005;116(4):731-6.
- (74) Barnstable, C., et al. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. Cell. 1978;14(1):9-20.
- (75) Richardson, G.D., et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. Journal of Cell Science. 2004;117(16):3539-46.

- (76) Abo, T., and Balch, C. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). The Journal of Immunology. 1981;127(3):1024.
- (77) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., and Schlossman, S.F. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1979;76(8):4061.
- (78) Bonnefoy, J.Y., Aubry, J.P., Peronne, C., Wijdenes, J., and Banchereau, J. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD 23 is a low affinity receptor for IgE. The Journal of Immunology. 1987;138(9):2970.
- (79) SDS-PAGE. [online]; Available from: [http://www.mdtekint.com/upfile/2009042717-073949109 .jpg](http://www.mdtekint.com/upfile/2009042717-073949109.jpg). [2011, March 30]
- (80) Hochel, I., and Musil, M. Development of an Indirect Competitive ELISA of DDT. Food and Agricultural Immunology. 2002;14(4):285-300.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ HSA รูปอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

หนูทดลอง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
	ระดับการเจือจาง 1:128,000			ระดับการเจือจาง 1:256,000		
	PBS	HAS 10 µg/ml	BSA 10 µg/ml	PBS	HAS 10 µg/ml	BSA 10 µg/ml
หนูตัวที่ 1	1.962	0.392	1.960	1.484	0.234	1.521
หนูตัวที่ 2	2.140	0.349	2.032	1.594	0.162	1.662
หนูตัวที่ 3	2.140	0.517	2.055	1.476	0.215	1.573

ตารางที่ ก.2 ชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 28 โคลน จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit

ลำดับที่	รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
		IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgA	IgM
1	4/B11/G3/F3/A3	1.921	0.254	0.334	0.414	0.237	0.439
2	4/B11/G3/F3/H2	1.865	0.184	0.238	0.296	0.118	0.276
3	4/B11/G3/E7/H8	1.765	0.130	0.167	0.224	0.096	0.197
4	4/B11/G3/B7/G12	1.818	0.134	0.179	0.276	0.100	0.225
5	4/B11/G3/C10/D3	1.888	0.182	0.254	0.361	0.146	0.294
6	4/B11/G3/C10/G4	1.822	0.150	0.212	0.292	0.102	0.234
7	4/B11/G3/E12/C8	1.840	0.166	0.237	0.298	0.138	0.283
8	4/B11/G3/E12/E5	1.851	0.157	0.211	0.293	0.104	0.252
9	4/B11/G3/H11/D11	1.862	0.188	0.242	0.311	0.246	0.351
10	4/B11/G3/H11/G11	1.804	0.164	0.227	0.329	0.139	0.300
11	11/E12/D10/A3/G3	1.812	0.143	0.195	0.591	0.108	0.312
12	11/E12/D10/C4/E6	1.833	0.115	0.160	0.573	0.099	0.277
13	11/E12/D10/D4/G12	1.787	0.089	0.134	0.526	0.081	0.230



ตารางที่ ก.2 (ต่อ) ชนิดไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 28 โคลน จากการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ isotyping kit

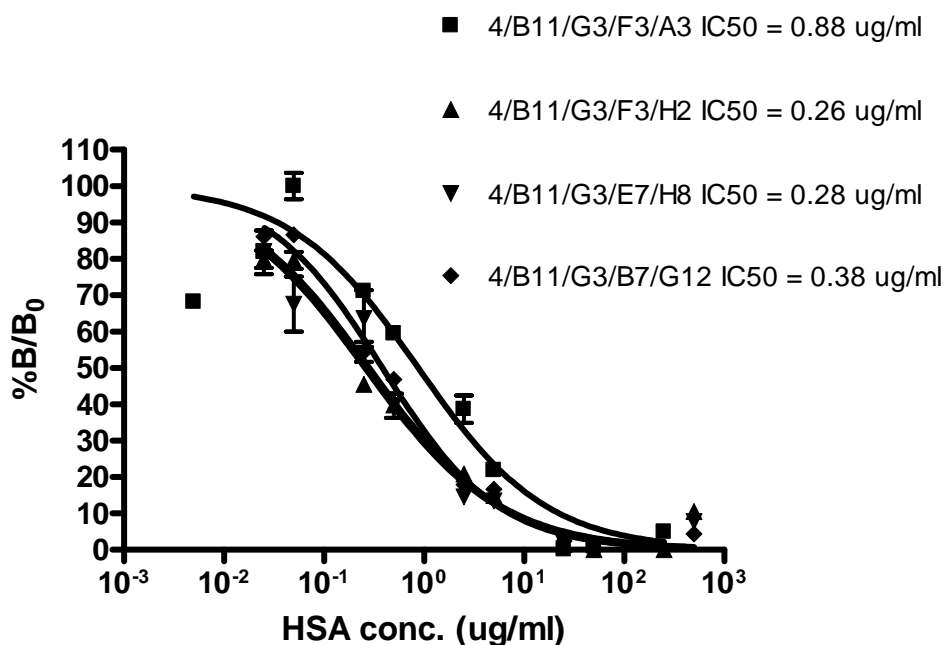
ลำดับที่	รหัสโคลน	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร					
		IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2a</sub>	IgG <sub>2b</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgA	IgM
14	11/E12/D10/E5/G2	1.867	0.093	0.145	0.552	0.086	0.253
15	11/E12/D10/G5/H7	1.791	0.085	0.111	0.487	0.071	0.238
16	11/E12/D10/G6/C12	1.798	0.115	0.151	0.520	0.128	0.297
17	6/D1/D1/D2/G6	1.471	0.414	0.195	0.175	0.710	0.200
18	6/D1/D1/G2/H7	1.140	0.226	0.150	0.138	0.325	0.155
19	6/D1/D1/E3/G10	1.703	0.686	0.180	0.158	1.331	0.177
20	6/D1/G1/E7/G5	1.403	0.370	0.137	0.132	0.757	0.143
21	6/D1/G1/G7/G8	1.595	0.537	0.163	0.150	1.050	0.171
22	6/D1/G1/D8/E10	1.856	0.390	0.161	0.178	0.717	0.154
23	6/D2/D6/C11/A2	1.582	0.147	0.180	0.160	0.141	0.172
24	6/D2/D6/C11/C3	1.587	0.174	0.210	0.191	0.141	0.222
25	6/D2/D6/C11/E4	1.595	0.196	0.262	0.265	0.177	0.259
26	6/D2/D6/C11/E5	1.501	0.134	0.193	0.224	0.144	0.187
27	6/D2/D6/G11/A8	1.494	0.143	0.217	0.234	0.141	0.238
28	6/D2/D6/G11/A9	1.568	0.114	0.180	0.190	0.103	0.181

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ ต่อ HSA รูปอิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

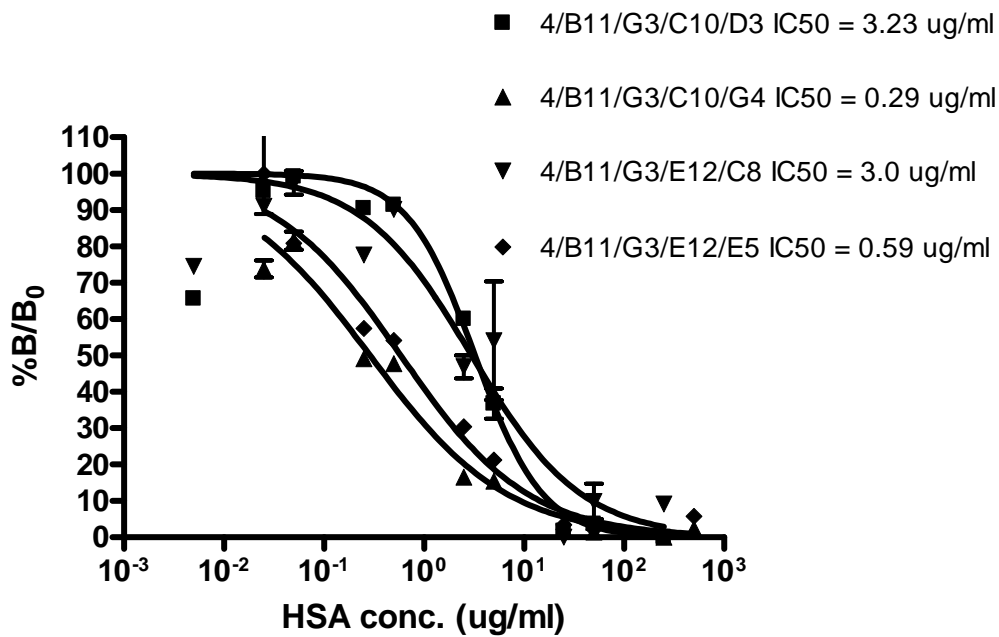
แอนติบอดี	ความเข้มข้นของ HSA ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100	500
4/B11/G3/F3/A3	0.910	0.817	0.949	0.740	0.656	0.506	0.385	0.227	0.233	0.262
4/B11/G3/F3/H2	0.882	0.723	0.720	0.450	0.404	0.254	0.206	0.100	0.086	0.088
4/B11/G3/E7/H8	0.754	0.629	0.530	0.502	0.337	0.164	0.156	0.075	0.064	0.064
4/B11/G3/B7/G12	1.129	0.983	0.987	0.648	0.568	0.263	0.250	0.100	0.080	0.075
4/B11/G3/C10/D3	1.833	1.761	1.820	1.692	1.705	1.242	0.900	0.383	0.411	0.358
4/B11/G3/C10/G4	1.056	0.802	0.877	0.564	0.550	0.249	0.238	0.111	0.102	0.089
4/B11/G3/E12/C8	1.025	0.954	1.005	0.848	0.947	0.604	0.661	0.232	0.310	0.304
4/B11/G3/E12/E5	1.403	1.495	1.227	0.902	0.856	0.525	0.397	0.149	0.131	0.102
4/B11/G3/H11/D11	1.202	1.001	1.042	0.786	0.708	0.372	0.336	0.110	0.099	0.078
4/B11/G3/H11/G11	1.626	1.643	0.369	1.415	1.463	0.945	0.779	0.441	0.355	0.365
11/E12/D10/A3/G3	0.697	0.578	0.525	0.357	0.289	0.156	0.125	0.081	0.069	0.070
11/E12/D10/C4/E6	0.906	0.746	0.654	0.455	0.400	0.228	0.184	0.104	0.101	0.085
11/E12/D10/D4/G12	0.747	0.609	0.603	0.435	0.380	0.256	0.180	0.114	0.088	0.077
11/E12/D10/E5/G2	0.784	0.601	0.558	0.400	0.345	0.202	0.143	0.088	0.073	0.063
11/E12/D10/G5/H7	0.966	0.781	0.797	0.551	0.435	0.243	0.181	0.093	0.076	0.063
11/E12/D10/G6/C12	0.903	0.711	0.635	0.451	0.366	0.205	0.152	0.099	0.087	0.075
6/D1/D1/D2/G6	0.659	0.615	0.488	0.573	0.580	0.507	0.406	0.237	0.167	0.117
6/D1/D1/G2/H7	0.889	0.826	0.786	0.715	0.785	0.679	0.627	0.312	0.207	0.121
6/D1/D1/E3/G10	1.219	1.118	1.129	1.085	1.071	0.959	0.892	0.429	0.283	0.131
6/D1/G1/E7/G5	1.106	1.016	1.082	1.001	0.933	0.804	0.738	0.333	0.253	0.116
6/D1/G1/G7/G8	0.876	0.847	0.916	0.835	0.860	0.756	0.675	0.304	0.225	0.111

ตารางที่ ก.3 (ต่อ) ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ต่อ HSA รูปอิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

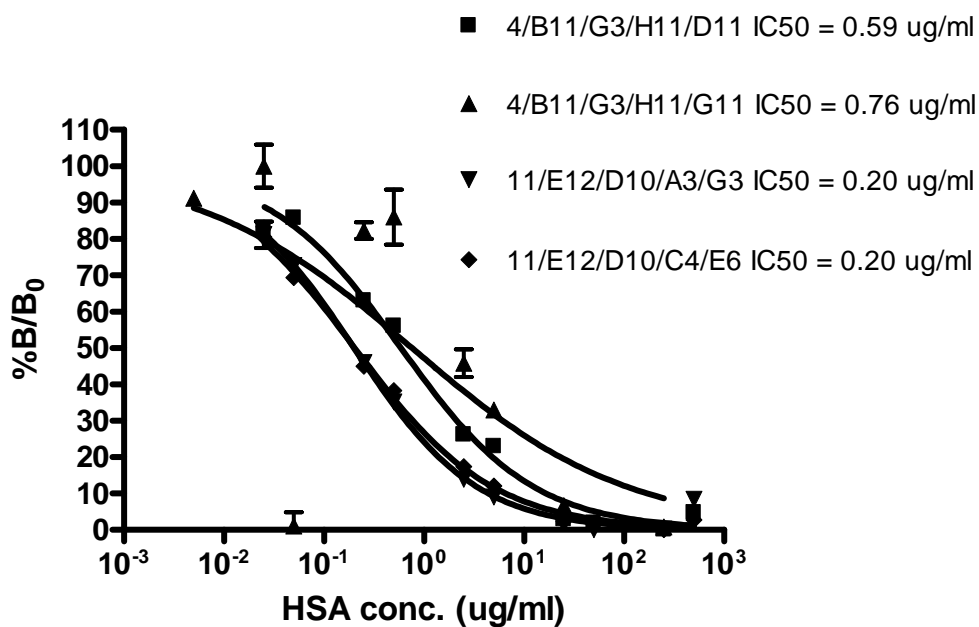
แอนติบอดี	ความเข้มข้นของ HSA (µg/ml)									
	0	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100	500
6/D1/G1/D8/E10	0.690	0.678	0.670	0.624	0.659	0.536	0.472	0.218	0.159	0.090
6/D2/D6/C11/A2	1.668	1.699	1.442	1.592	1.174	1.014	0.727	0.280	0.189	0.120
6/D2/D6/C11/C3	1.673	1.703	1.437	1.605	1.167	0.982	0.691	0.253	0.187	0.093
6/D2/D6/C11/E4	1.996	1.937	1.862	1.949	1.738	1.544	1.148	0.512	0.310	0.127
6/D2/D6/C11/E5	1.627	1.719	1.375	1.490	1.220	0.938	0.717	0.292	0.189	0.087
6/D2/D6/G11/A8	1.471	1.517	0.980	1.212	0.603	0.420	0.288	0.159	0.120	0.113
6/D2/D6/G11/A9	1.296	1.357	0.741	1.004	0.485	0.298	0.191	0.094	0.067	0.072



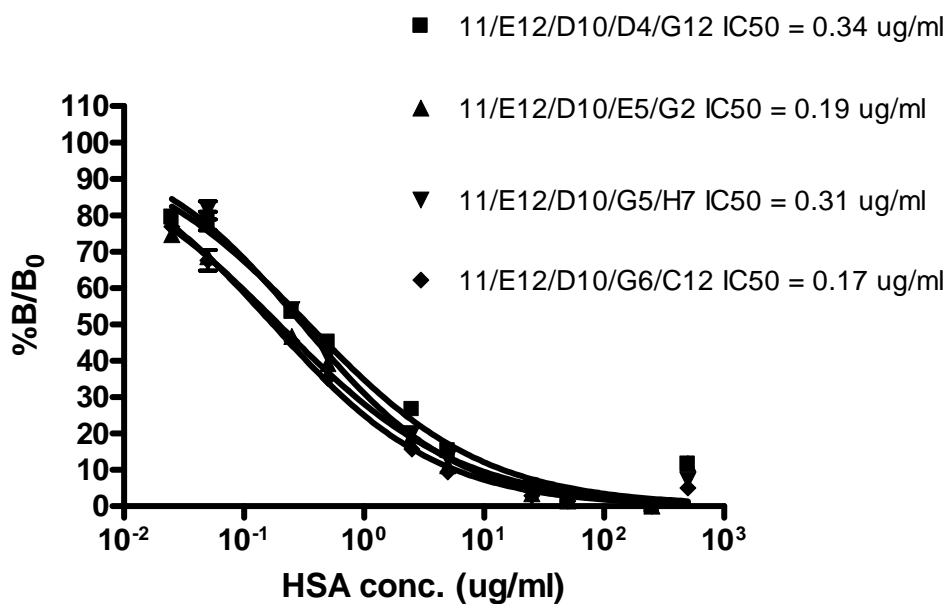
รูปที่ ก.1 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/F3/A3, 4/B11/G3/F3/H2, 4/B11/G3/E7/H8, และ 4/B11/G3/B7/G12 ต่อ HSA อิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA



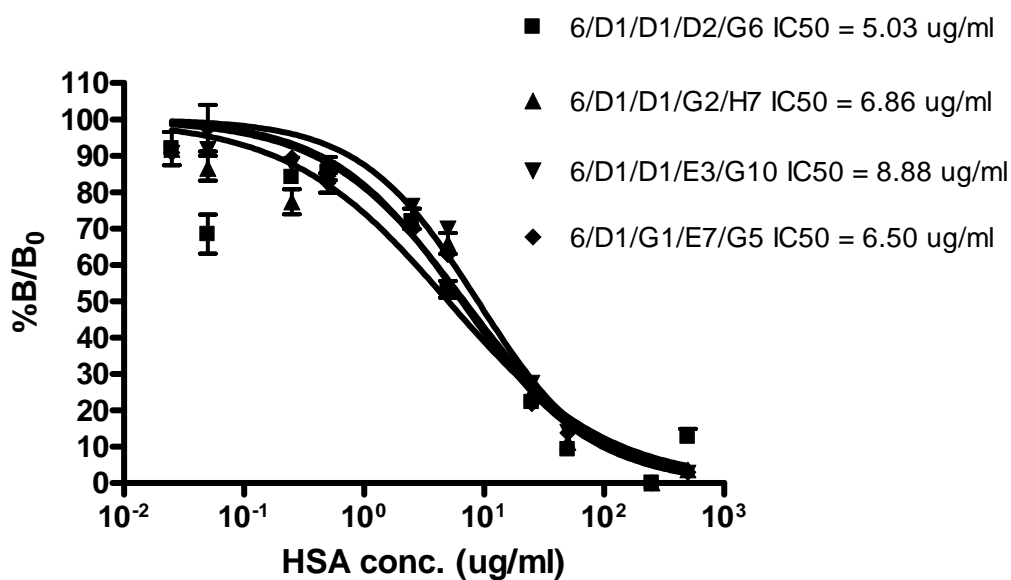
รูปที่ ก.2 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/C10/D3, 4/B11/G3/C10/G4, 4/B11/G3/E12/C8, และ 4/B11/G3/E12/E5 ต่อ HSA อีตระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA



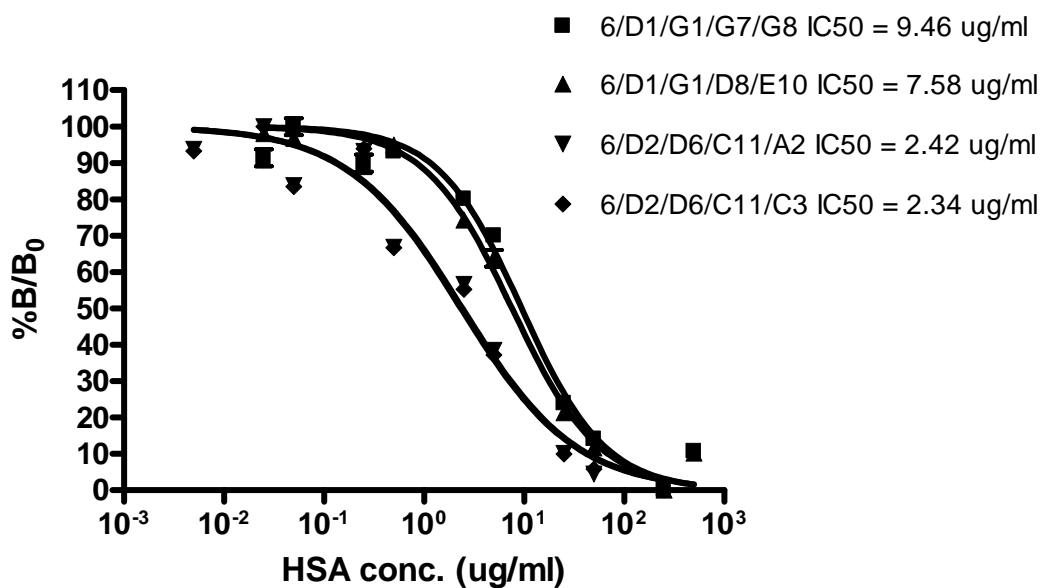
รูปที่ ก.3 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 4/B11/G3/H11/D11, 4/B11/G3/H11/G11, 11/E12/D10/A3/G3, และ 11/E12/D10/C4/E6 ต่อ HSA อีตระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA



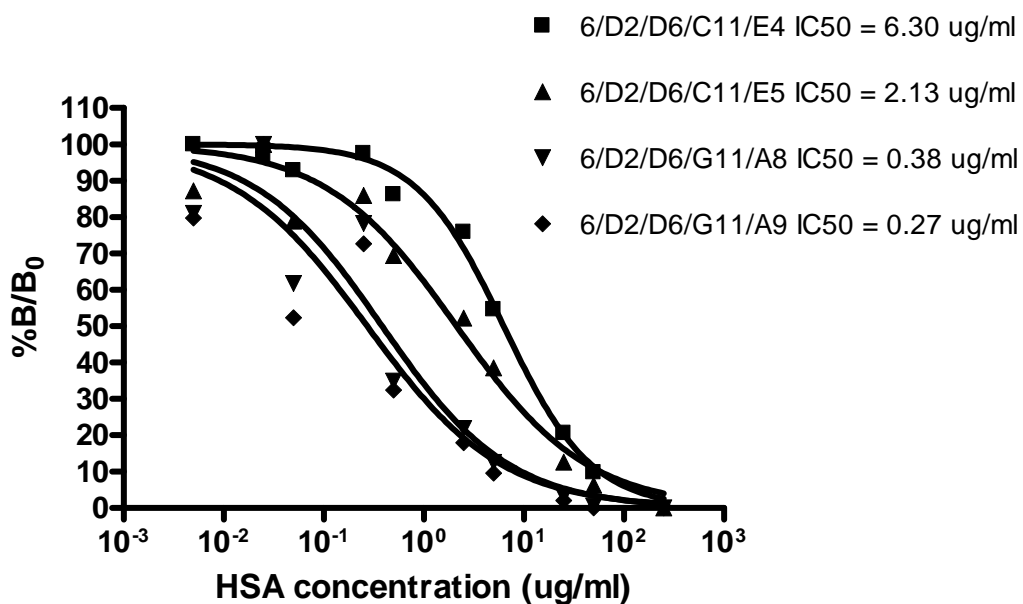
รูปที่ ก.4 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 11/E12/D10/D4/G12, 11/E12/D10/E5/G2, 11/E12/D10/G5/G7, และ 11/E12/D10/G6/C12 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ ก.5 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D1/D1/D2/G6, 6/D1/D1/G2/H7, 6/D1/D1/E3/G10, และ 6/D1/G1/E7/G5 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ ก.6 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D1/G1/G7/G8, 6/D1/G1/D8/E10 6/D2/D6/C11/A2, และ 6/D2/D6/C11/C3 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ ก.7 ความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 6/D2/D66/C11/E4, 6/D2/D6/C11/E5, 6/D2/D6/G11/A8, และ 6/D2/D6/G11/A9 ต่อ HSA อีสระ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการนำโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้ มาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนชนิดอื่น ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	แอนติบอดี	ชนิดตัวทดสอบ				
		PBS	HSA	Ig	BSA	Hemoglobin
1	4/B11/G3/F3/A3	1.854	0.199	1.776	1.661	1.766
2	4/B11/G3/F3/H2	2.058	0.138	2.064	2.046	1.948
3	4/B11/G3/E7/H8	1.293	0.080	1.265	1.072	1.143
4	4/B11/G3/B7/G12	1.697	0.103	1.671	1.446	1.584
5	4/B11/G3/C10/D3	2.101	0.131	2.070	2.002	2.027
6	4/B11/G3/C10/G4	1.483	0.163	1.502	1.350	1.454
7	4/B11/G3/E12/C8	1.497	0.131	1.578	1.387	1.373
8	4/B11/G3/E12/E5	1.712	0.081	1.785	1.676	1.683
9	4/B11/G3/H11/D11	1.605	0.067	1.644	1.456	1.484
10	4/B11/G3/H11/G11	2.091	0.138	2.106	2.104	2.110
11	11/E12/D10/A3/G3	1.522	0.059	1.497	1.350	1.044
12	11/E12/D10/C4/E6	1.395	0.062	1.393	1.311	0.956
13	11/E12/D10/D4/G12	1.049	0.062	1.126	0.966	0.649
14	11/E12/D10/E5/G2	1.581	0.131	1.644	1.613	1.162
15	11/E12/D10/G5/H7	0.889	0.107	0.995	0.931	0.557
16	11/E12/D10/G6/C12	0.599	0.056	0.700	0.573	0.345
17	6/D1/D1/D2/G6	0.867	0.072	1.042	0.714	0.480
18	6/D1/D1/G2/H7	1.410	0.092	1.545	1.233	1.037
19	6/D1/D1/E3/G10	2.036	0.233	2.008	1.867	1.626
20	6/D1/G1/E7/G5	1.631	0.100	1.684	1.433	1.120
21	6/D1/G1/G7/G8	1.397	0.087	1.605	1.365	0.977
22	6/D1/G1/D8/E10	1.415	0.178	1.539	1.427	0.962
23	6/D2/D6/C11/A2	1.128	0.052	1.046	1.095	0.583
24	6/D2/D6/C11/C3	1.148	0.044	1.081	1.097	0.628
25	6/D2/D6/C11/E4	1.483	0.044	1.390	1.386	0.914
26	6/D2/D6/C11/E5	1.171	0.039	1.111	1.081	0.616
27	6/D2/D6/G11/A8	1.253	0.042	1.186	1.166	0.679
28	6/D2/D6/G11/A9	1.196	0.048	1.159	1.128	0.631

ตารางที่ ก. 5 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอิสระได้ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากการทดสอบ  
ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ลำดับที่	แอนติบอดี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง			
		HSA	Ig	BSA	Hemoglobin
1	4/B11/G3/F3/A3	89.26	4.18	10.39	4.75
2	4/B11/G3/F3/H2	93.29	0	0.61	5.37
3	4/B11/G3/E7/H8	93.85	2.20	17.09	11.60
4	4/B11/G3/B7/G12	93.93	1.50	14.77	6.66
5	4/B11/G3/C10/D3	93.79	1.45	4.69	3.52
6	4/B11/G3/C10/G4	89.04	0	8.94	1.96
7	4/B11/G3/E12/C8	91.28	0	7.32	8.29
8	4/B11/G3/E12/E5	95.30	0	2.10	1.67
9	4/B11/G3/H11/D11	95.82	0	9.26	7.51
10	4/B11/G3/H11/G11	93.40	0	0	0
11	11/E12/D10/A3/G3	96.12	1.64	11.30	31.41
12	11/E12/D10/C4/E6	95.59	0.18	6.06	31.47
13	11/E12/D10/D4/G12	94.14	0	7.91	38.18
14	11/E12/D10/E5/G2	91.71	0	0	26.48
15	11/E12/D10/G5/H7	87.96	0	0	37.35
16	11/E12/D10/G6/C12	90.65	0	4.42	42.49
17	6/D1/D1/D2/G6	91.75	0	17.70	44.64
18	6/D1/D1/G2/H7	93.51	0	12.55	26.45
19	6/D1/D1/E3/G10	88.58	1.38	8.33	20.16
20	6/D1/G1/E7/G5	93.90	0	12.14	31.34
21	6/D1/G1/G7/G8	93.81	0	2.29	30.08
22	6/D1/G1/D8/E10	87.42	0	0	32.05
23	6/D2/D6/C11/A2	95.39	7.27	2.93	48.34
24	6/D2/D6/C11/C3	96.17	5.88	4.44	45.34
25	6/D2/D6/C11/E4	97.03	6.27	6.54	38.40
26	6/D2/D6/C11/E5	96.67	5.13	7.65	47.42
27	6/D2/D6/G11/A8	96.65	5.35	6.91	45.83
28	6/D2/D6/G11/A9	96.03	3.09	5.69	47.28

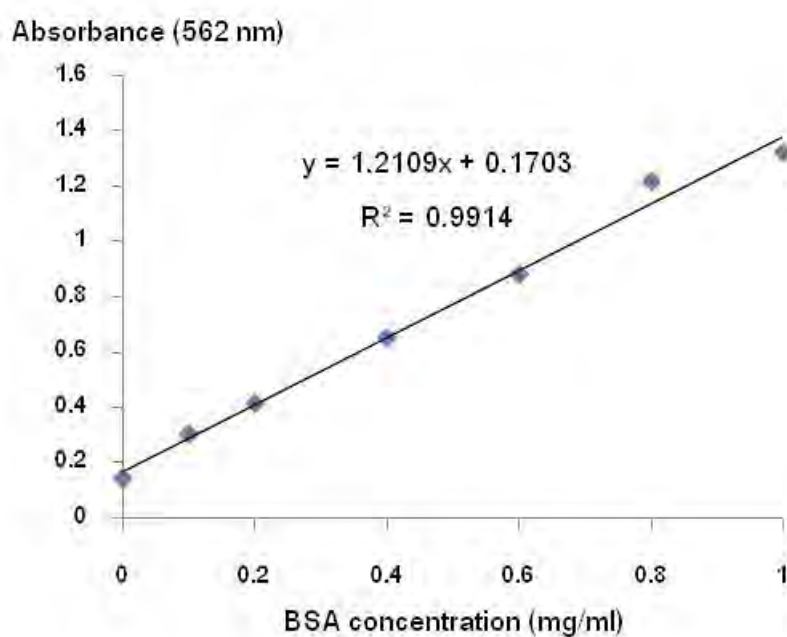


ตารางที่ ก. 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจาก การทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์

Fraction	A <sub>492</sub>	A <sub>280</sub>	Fraction	A <sub>492</sub>	A <sub>280</sub>
1	0.082	0.148	16	-	0.359
2	-	0.173	17	0.255	0.289
3	0.063	0.167	18	-	0.208
4	-	0.222	19	0.140	0.319
5	0.088	0.203	20	-	0.195
6	-	0.186	21	0.405	0.246
7	1.322	0.227	22	-	0.167
8	-	0.647	23	0.137	0.178
9	1.756	1.176	24	-	0.233
10	-	1.152	25	0.114	0.167
11	1.702	0.908	26	-	0.190
12	-	0.706	27	0.088	0.197
13	0.465	0.572	28	-	0.183
14	-	0.504	29	0.083	0.156
15	0.395	0.436	30	-	0.159

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตรของสารละลาย BSA มาตรฐาน จากการทดสอบด้วยวิธี BCA

ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน BSA (mg/ml)	Abs (562)
0	0.145
0.1	0.305
0.2	0.417
0.4	0.653
0.6	0.883
0.8	1.219
1.0	1.324



รูปที่ ก.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA จากการทดสอบด้วยวิธี BCA

ตารางที่ ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดี โคลน 4/B11/G3/F3/H2 หลังการทำให้บริสุทธิ์ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของ HSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			
	Abs1	Abs2	Abs3	ค่าเฉลี่ย
0	1.105	1.066	1.006	1.059
0.001	0.998	0.983	0.934	0.972
0.005	0.909	0.947	0.895	0.917
0.01	0.823	0.934	0.862	0.873
0.05	0.930	0.819	0.718	0.822
0.1	0.870	0.817	0.767	0.818
0.5	0.758	0.782	0.715	0.752
1	0.733	0.675	0.431	0.613
5	0.293	0.259	0.242	0.265
10	0.155	0.144	0.138	0.146
50	0.073	0.069	0.075	0.072
100	0.070	0.060	0.065	0.065
500	0.057	0.056	0.056	0.056

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดี โคลน 4/B11/G3/E12/E5 หลังการทำให้บริสุทธิ์ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของ HSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			
	Abs1	Abs2	Abs3	ค่าเฉลี่ย
0	1.171	1.083	1.174	1.143
0.001	1.185	1.047	0.983	1.072
0.005	1.145	1.042	1.029	1.072
0.01	1.042	1.030	0.999	1.024
0.05	0.870	0.858	0.903	0.877
0.1	0.704	0.759	0.723	0.729
0.5	0.816	0.843	0.846	0.835
1	0.602	0.549	0.620	0.590
5	0.319	0.319	0.300	0.313
10	0.189	0.183	0.156	0.176
50	0.083	0.090	0.085	0.086
100	0.077	0.074	0.072	0.074
500	0.086	0.114	0.139	0.113

ตารางที่ ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของแอนติบอดี โคลน 4/B11/G3/H11/G11 หลังการทำให้บริสุทธิ์ จากการทดสอบด้วยวิธี indirect competitive ELISA

ความเข้มข้นของ HSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			
	Abs1	Abs2	Abs3	ค่าเฉลี่ย
0	1.040	0.953	1.000	0.998
0.001	0.946	0.953	0.980	0.960
0.005	0.915	0.966	0.933	0.938
0.01	0.770	0.720	0.726	0.739
0.05	0.611	0.696	0.654	0.654
0.1	0.660	0.733	0.663	0.685
0.5	0.562	0.545	0.487	0.531
1	0.833	0.802	0.778	0.804
5	0.417	0.414	0.437	0.423
10	0.347	0.355	0.361	0.354
50	0.154	0.170	0.168	0.164
100	0.101	0.109	0.107	0.106
500	0.095	0.099	0.106	0.100

### ภาคผนวก ข

#### 1. สารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

##### 1) 0.2 M Phosphate buffer pH 7.4 (Stock reagent)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>      27.6    g      ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>      71.63    g      ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

ไตเตรดค่าด้วยกรด จนได้ pH 7.4

##### 2) 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4

0.2 M Phosphate Buffer pH 7.4      1      L

NaCl      175.2    g

Distilled water      18      L

##### 3) PBS- Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween 20      500    µl

PBS      1000    ml

##### 4) 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย      5      g

PBS      100    ml

\*เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน

##### 5) 0.15 M Phosphate Citrate buffer pH 5.0

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>      11.9    g      ละลายในน้ำกลั่น 1000 ml

Citric acid      7      g

ไตเตรดต่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 เก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่ 4°C

##### 6) Substrate OPD

O-phenylene diamine      40      mg

0.15 M Phosphate citrate buffer      100    ml

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>      0.04    ml

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

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	256	ml
--------------------------------------	-----	----

Distilled water	744	ml
-----------------	-----	----

ค่อยๆเทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน เนื่องจากเมื่อผสมกรดกับน้ำ จะมีความร้อนเกิดขึ้น จึงควรนำขวดไปแช่ในน้ำจันกว่าจะหายร้อน

## 2. อาหารเลี้ยงเซลล์

## 1) Stock HAT 100X

Hypoxanthine	0.1361 g	ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
--------------	----------	-----------------------

Aminopterin*	0.0018 g	ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
--------------	----------	-----------------------

Thymidin	0.0388 g	ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
----------	----------	-----------------------

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 ml นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวดๆละ 10 ml เก็บไว้ที่ 0°C

\*Aminopterin ละลายยาก ให้นำไปอุ่นใน Water bath จะช่วยให้ละลายดีขึ้น

## 2) Stock HT 100X

Hypoxanthine	0.1361 g	ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
--------------	----------	-----------------------

Thymidin	0.0388 g	ละลายในน้ำกลั่น 20 ml
----------	----------	-----------------------

นำสารละลายทั้ง 2 สารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 ml นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 µm แบ่งใส่ขวดๆละ 10 ml เก็บไว้ที่ 0°C

## 3) อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640	10.4	g
-----------	------	---

NaHCO <sub>3</sub>	2	g
--------------------	---	---

L-glutamin	0.1	g
------------	-----	---

Glucose	2	g
---------	---	---

Pyruvic acid	0.11	g
--------------	------	---

Distilled water 1	L	
-------------------	---	--

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองด้วย Millipore 0.22 µm แบ่งใส่ขวดๆละ 100 ml เก็บไว้ที่ 4° C

## 4) อาหารเลี้ยงเซลล์ HT

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	L
----------------------------	---	---

HT 100 X	10	ml
----------	----	----

ผสมให้เข้ากัน กรองด้วย Millipore 0.22  $\mu\text{m}$  แบ่งใส่ขวดๆละ 90 ml เก็บไว้ที่ 4°C

## 5) อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT (Selective medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	L
----------------------------	---	---

HAT 100 X	10	ml
-----------	----	----

ผสมให้เข้ากัน กรองด้วย Millipore 0.22  $\mu\text{m}$  แบ่งใส่ขวดๆละ 90 ml เก็บไว้ที่ 4°C

## 3. สารสำหรับใช้ในการหลอมรวมเซลล์ (Fusion)

50% Polyethylene glycol (PEG)

PEG*	2	ml
------	---	----

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	2	ml
----------------------------	---	----

ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดๆละ 1 ml เก็บไว้ที่ 4 °C ก่อนใช้ให้นำมาอุ่นที่ 37 °C

\*นำมาอุ่นให้ละลายที่อุณหภูมิประมาณ 50 C

## 4. น้ำยาเก็บเซลล์เพื่อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	70	ml
----------------------------	----	----

Fetal Bovine Serum	20	ml
--------------------	----	----

Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	ml
---------------------------	----	----

ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ที่ 0 °C ใช้งานขณะอุณหภูมิประมาณ 4 °C

## 5. สารละลายสำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

## 1) 4 M NaCl

NaCl	233.76	g
------	--------	---

Distilled water	1	L
-----------------	---	---

## 2) 0.1 M Citrate buffer, pH 6, 4.5, 3.5, และ 3

Citric acid	0.1	M
-------------	-----	---



$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.1	M
---------------------------	-----	---

ไตเตรดกรดด้วยต่างจนได้ pH 6, 4.5, 3.5, และ 3 นำไปกรองด้วย Millipore 0.22  $\mu\text{m}$

3) 0.1 M Phosphate buffer, pH 8

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	13.8	g	ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml
---------------------------	------	---	--------------------------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	35.8	g	ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml
---------------------------	------	---	--------------------------

ไตเตรดต่างด้วยกรด จนได้ pH 8 นำไปกรองด้วย Millipore 0.22  $\mu\text{m}$

4) 1 M Tris HCl buffer, pH 9

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	121	g
-----------------------------------	-----	---

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml

Hydrochloric acid (HCl)	1	M
-------------------------	---	---

ไตเตรดต่างด้วยกรด จนได้ pH 9 นำไปกรองด้วย Millipore 0.22  $\mu\text{m}$

## 6. สารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค SDS-PAGE

1) 12% Separatine gel

Milli Q water	1.6	ml
---------------	-----	----

30% acrylamide mix	2.0	ml
--------------------	-----	----

1.5 M Tris pH 8.8	1.3	ml
-------------------	-----	----

10% SDS	50	$\mu\text{l}$
---------	----	---------------

10% ammonium persulfate	50	$\mu\text{l}$
-------------------------	----	---------------

TEMED	2	$\mu\text{l}$
-------	---	---------------

2) 5% Stacking gel ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

Milli Q water	2.1	ml
---------------	-----	----

30% acrylamide mix	500	$\mu\text{l}$
--------------------	-----	---------------

1.0 M Tris pH 6.8	380	$\mu\text{l}$
-------------------	-----	---------------

10% SDS	30	$\mu\text{l}$
---------	----	---------------

10% ammonium persulfate	30	$\mu\text{l}$
-------------------------	----	---------------

TEMED	3	$\mu\text{l}$
-------	---	---------------

## 3) Running buffer (1X) ปริมาตร 1 ลิตร

25 mM Tris	3.03	g
192 mM Glycine	14.42	g
0.1% SDS	1	g
ละลายในน้ำกลั่น 1,000 ml		

## 4) Coomassie brilliant blue G

สี Coomassie brilliant blue G	0.1	g
100% Methanol (เป็นตัวละลายสี)	50	ml
Milli Q water	40	ml
Acetic acid (เติมหลังน้ำเสมอ)	10	ml

ควรเทสีให้ท่วมเจล ปิดฝาภาชนะ และเขย่าตลอดเวลาด้วย Rotator

## 5) Destain solution

100% Methanol	120	ml
Milli Q water	810	ml
Acetic acid	70	ml

ควรเตรียมในปริมาณมาก เนื่องจากต้องใช้ล้างสีบนเจล 2-3 ครั้งๆ ละประมาณ 100 ml ขณะล้าง ควรเขย่าด้วย Rotator ตลอดเวลา ใช้เวลาล้างประมาณ 15 นาที/ครั้ง หรือเมื่อเห็นว่า Destain solution มีสีเข้มแล้ว จึงเปลี่ยน Destain solution ใหม่ ให้ล้างจนกว่าแผ่นเจลจะใสเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปาริชาติ เดชพิชัย เกิดเมื่อวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัด นครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2550 และเข้าศึกษาต่อระดับ บัณฑิตศึกษา หลักสูตรชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2551 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองเนื่องในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุ ครบ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย