

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2555

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์ ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการ ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆ ให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

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

งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร AOZ หรือ สารอนุพันธ์ NPAOZ ซึ่งเป็นรูปสารสำหรับการตรวจหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์โดยการฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยอนุพันธ์ CPAOZ ที่เชื่อมต่อด้วย cBSA (CPAOZ-cBSA) และ AOZ ที่เชื่อมต่อกับ BSA (AOZ-BSA) จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า CPAOZ-cBSA เหมาะสมที่จะใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองมากกว่า AOZ-BSA เพราะสามารถผลิตไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดี ซึ่งมีความสามารถในการจับกับสาร NPAOZ ,CPAOZ และ FZD ในรูปอิสระได้ จากการคัดเลือกไฮบริโดมาเซลล์โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ มีจำนวน 8 โคลน ได้แก่ เซลล์จากหลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,109 และ 112 มีความไวในการจับกับสาร NPAOZ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.17 ,4.87 ,6.38 ,3.87 ,10.49 ,10.27 ,11.46 และ 11.83 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทุกโคลนเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร FZD และ CPAOZ จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยตรวจสอบไอโซไทป์ พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หลุมต้น 8/12D และ 6/6E เป็นชนิด IgG₁ และ IgG_{2b} ตามลำดับ จึงทำการคัดเลือกโคลน หมายเลข 181 จากเซลล์หลุมต้น 8/12D และหมายเลข 102 จากเซลล์หลุมต้น 6/6E เพื่อทำการผลิตเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

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

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

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

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

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

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

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

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

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

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

สารบัญตาราง (List of Tables)

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

สารบัญตาราง (ต่อ)

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

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการหาความเข้มข้นของ

แอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

48

ตารางที่ 17 แสดงค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี indirect competitive ELISA

52

สารบัญภาพ (List of Illustration)

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

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

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

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

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