

ตารางที่ 1 ค่า R_f ของสารต่างๆในการสังเคราะห์ CPAOZ

สาร	ค่า R_f			
	การทดลองนี้		Copper และคณะ (2004)	
	ข้อมด้วยนินไฮดริน	ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต	ข้อมด้วยนินไฮดริน	ดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต
CBA	-	0.08	-	0.11
AOZ	0.18	-	0.27	-
CPAOZ	-	-	-	0.03
ไพรีดีน	-	0.55	-	-
ตัวอย่างก่อนทำการไหลกลับด้วยไพรีดีน	-	0.03	-	-
	-	0.09		
	0.18	-		
	-	0.53		
ตัวอย่างหลังทำการไหลกลับด้วยไพรีดีน	-	0.03	-	-
	0.18	-		
	-	0.53		
ตัวอย่างหลังทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน	-	0.03	-	-
	0.18	-		

จากการคำนวณค่า R_f ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้หลังจากการทำให้แห้งโดยแก๊สไนโตรเจน พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.03 และ 0.18 เมื่อเปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้ดังกล่าวกับค่า R_f ของสารต่างๆในปฏิกิริยาสรุปได้ว่า น่าจะเป็นสาร CPAOZ และ AOZ ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่า R_f ของสาร CPAOZ ในการทดลองนี้กับของ Cooper และคณะ (2004) พบว่าให้ค่าเท่ากัน แสดงว่าสามารถทำการเตรียมสาร CPAOZ ได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม ยังสามารถตรวจพบ AOZ ในปริมาณน้อยได้ ทั้งนี้เนื่องจากการสังเคราะห์นั้นได้ใช้สาร AOZ ปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยากับสาร CBA ทำให้พบสาร AOZ เหลืออยู่จากการทำปฏิกิริยา

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

จากนั้นนำสารที่เตรียมได้มาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนโดยวิธี TNBSA โดยมีหลักการคือ สาร TNBS จะไปจับกับหมู่เอมีนอิสระแล้วเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีส้ม สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารจาก เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ ลบ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนที่เชื่อมกับสาร หาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ คูณ 100

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

ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดระหว่างสารกับโปรตีน ที่ความเข้มข้นโปรตีน 1,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

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

3.2 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร NPAOZ หรือ AOZ

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

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

ตารางที่ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดี

ในซีรัมหนูโดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 1 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA และ หนู

ชุดที่ 2 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย AOZ-BSA

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

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

ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู

โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

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

NMS = ซีรัมหนูปกติ

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

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูในการจับกับ AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี

indirect competitive ELISA เคลือบหลุมทดสอบด้วย AOZ-BSA ของหนูชุดที่ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย

CPAOZ-cBSA

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

ตารางที่ 6 แสดงค่า IC_{50} ของการจับกันของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ

หนูตัวที่	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)		
	สาร AOZ	สาร CPAOZ	สาร NPAOZ
1	> 50	0.781	6.250
2	25	0.024	0.049
3	> 50	0.586	6.250

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

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนูโดย

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

ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

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

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

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัม

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

indirect competitive ELISA

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

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

ตารางที่ 9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีในซีรัมหนู โดยวิธี indirect ELISA ของหนูชุดที่ 5

ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย CPAOZ-cBSA

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

3.3 การหลอมรวมเซลล์และคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

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

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

ตารางที่ 10 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร สำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิต

แอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร CPAOZ และ AOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect

competitive ELISA

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

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

ตารางที่ 11 การทดสอบแอนติบอดีที่มีความสามารถในการจับกับสาร AOZ ,CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดย

วิธี indirect competitive ELISA

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

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

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

ตารางที่ 12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการทดสอบความสามารถของแอนติบอดี

ในการจับกับ CPAOZ และ NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

3.4 การศึกษาลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เนื่องจากได้ทำการเลือกเก็บโคลนไว้เป็นจำนวนมาก จากหนูชุดที่ 3 จำนวน 22 โคลน จาก 7 หลุมต้น และ หนูชุดที่ 5 จำนวน 221 โคลน จาก 9 หลุมต้น จึงทำการคัดเลือกโคลน โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้จากการเก็บแช่แข็งเซลล์ มาทดสอบแอนติบอดี เลือกโคลนที่ยังคงมีการผลิตแอนติบอดี และเลือกบางโคลนในแต่ละหลุมต้น เพราะโคลนที่มาจากหลุมต้นเดียวกันมีโอกาสที่จะมีคุณสมบัติเหมือนกันสูง โดยมีโคลนที่เลือกมาดังนี้ คือ หนูชุดที่ 3 เลือกโคลนจากหลุมต้น 1/2B ,2/2G ,4/1H และ 7/6H หมายเลข 3 ,4 ,6 ,8 ,17 ,19 ,21 ,26 ,28 ,32 ,37 และ 42 สำหรับหนูชุดที่ 5 เลือกโคลนจากหลุมต้น 6/12D ,6/1D ,2/9A ,8/12D ,6/6E ,4/11H ,7/10F ,4/10G และ 7/6H หมายเลข 2 ,4 ,10 ,72 ,73 ,43 ,50 ,62 ,66 ,75 ,79 ,89 ,181 ,96 ,102 ,112 ,109 ,117 ,123 ,217 ,140 ,152 ,194 ,163 ,164 ,165 ,172 ,177 และ 207 รวมทั้งหมด 40 โคลน มาทดสอบคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มไนโตรฟูแรนและยาปฏิชีวนะชนิดอื่นๆ

3.4.1 การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับยาปฏิชีวนะ

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

ตารางที่ 13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโน

โคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

ตารางที่ 13 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 3 โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

ตารางที่ 14 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆของโมโน

โคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยาล้างกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

ตารางที่ 14 (ต่อ) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ในการทำปฏิกิริยข้ามกับสารต่างๆของ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากการหลอมรวมเซลล์หนูชุดที่ 5 โดยวิธี indirect competitive ELISA

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

3.4.2 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

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

ตารางที่ 15 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร จากการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอล

แอนติบอดี

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

3.4.3 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

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

ตารางที่ 16 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่

เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

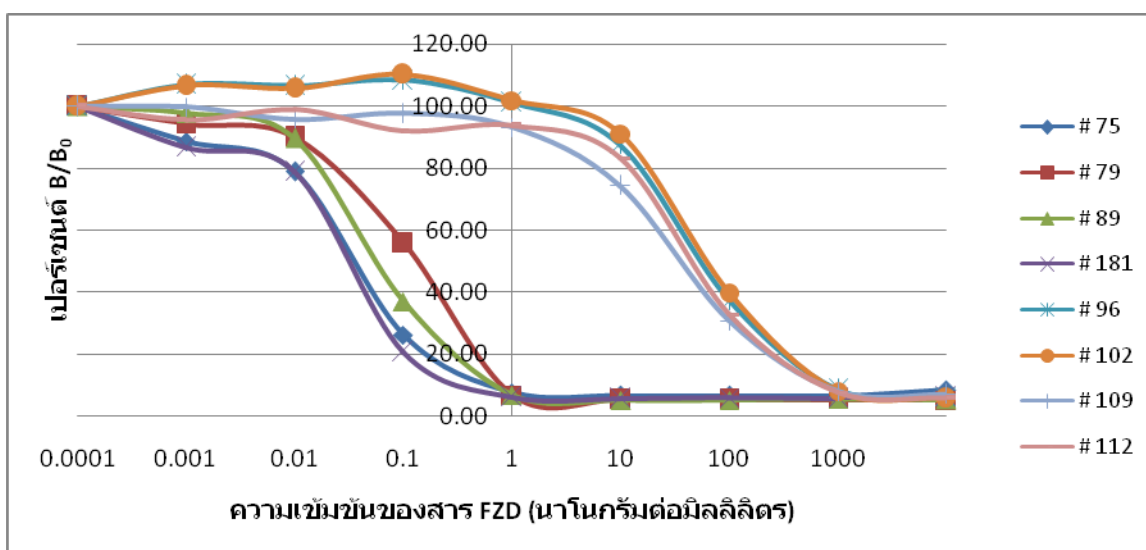
แอนติบอดี หมายเลข	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร									
	การเจือจางแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ (เท่า)									
	ไม่เจือจาง	5	10	20	40	80	160	320	640	1,280
75	2.07	2.00	1.93	1.74	1.63	1.33	1.05	0.72	0.50	0.40
79	2.00	1.98	1.99	1.91	1.88	1.72	1.58	1.28	1.08	0.78
89	1.94	1.98	1.95	1.98	1.81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

3.4.4 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี indirect competitive ELISA

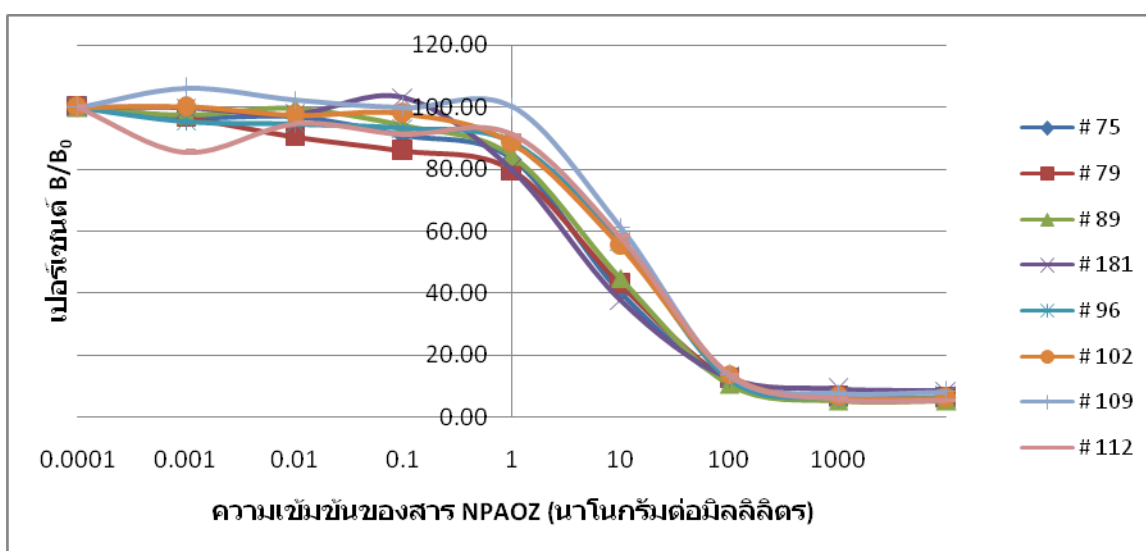
เนื่องจากการทดสอบการทำให้ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี หมายเลข 75 ,79 ,89 ,181 ,96 ,102 ,109 และ 112 โดยวิธี indirect competitive ELISA พบว่า แอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับ FZD ,NPAOZ และ CPAOZ ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้ จึงทำการทดสอบความไวในการจับสารทั้ง 3 ตัว โดยแปรความเข้มข้นเป็น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

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

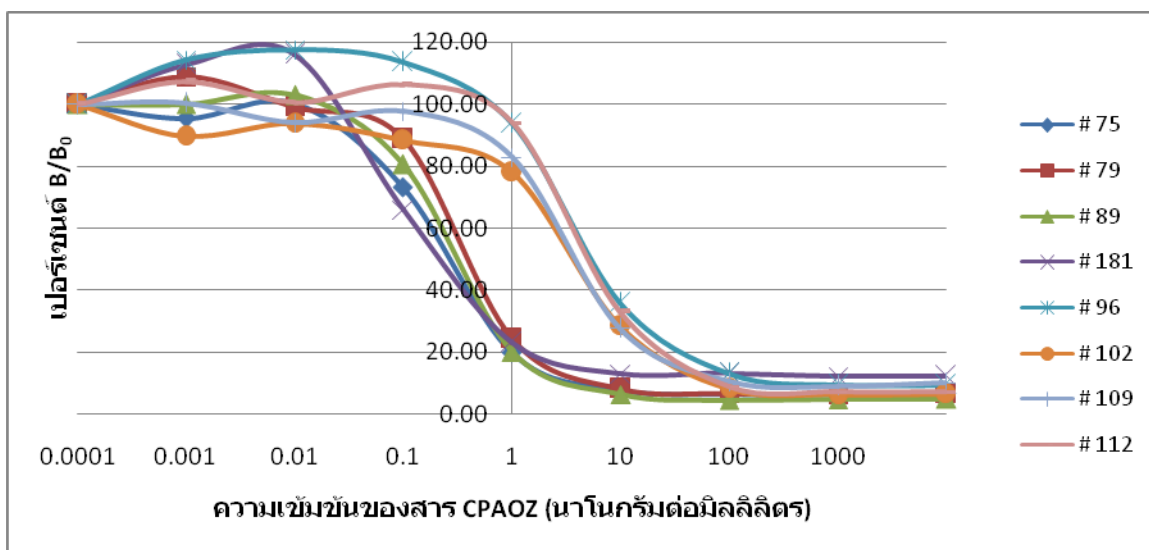
พบว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D หมายเลข 75 ,79 ,89 และ 181 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสาร FZD และ CPAOZ สูงกว่า โคลนที่ได้จากเซลล์หลุมต้น 6/6E หมายเลข 96 ,102 ,104 และ 112 และโคลนจากเซลล์หลุมต้น 8/12D มีความไวในการจับกับสาร NPAOZ ,CPAOZ และ FZD สูงกว่า โคลนจากเซลล์หลุมต้น 6/6E จึงทำการคัดเลือกโคลน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



รูปที่ 2 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร FZD โดยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ 3 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร NPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA



รูปที่ 4 กราฟแสดงการทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสาร CPAOZ โดยวิธี indirect competitive ELISA

ตารางที่ 17 แสดงค่า IC_{50} และเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบโดยวิธี indirect

competitive ELISA

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