รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสเพื่อประยุกต์ใช้เตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟี่

โดย

ดร.ละเอียด ประพันธดารา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้รับทุนวิจัยงบประมาณประจำปี 2546
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2546 งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการภายในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ฉายสุรีย์ ศุภวิไล ดร.จิรประภา วิภาษาและเจ้าหน้าที่ประจำห้องสัตว์ทดลองที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดหาสถานที่ การดูแล และเลี้ยงดูหนูทดลองเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ ดร.สุกัญญา ลินไพศาล คุณโพธิ์ศรี ลีลาภัทร์ คุณวริศรา สุวรรณ คุณกุลรัญญา พรหมเมืองยอง และ คุณสมบูรณ์ บุญปราบ ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ Spectrophotometer และขอบคุณ คุณทองใบ ใจเป็งบุตร คุณสิงห์แก้ว สายกลับ และคุณณรงค์ สิทธิวงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในงานทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เช่นการล้างเครื่องแก้ว

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Associate Professor Dr. Albert Ketterman และเจ้าหน้าที่ของสถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเตรียมแอนติเจน GST คณะผู้วิจัยใคร่ขอกล่าวขอบคุณอย่างสูงสำหรับ รศ. ดร. วัชระ กสินฤกษ์ คณะเทคนิคการแพทย์ และ ผศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำเทคนิคต่างๆ และขอขอบคุณ คุณวัชรพงษ์ เรือนคำ นักเทคนิคการแพทย์ ซึ่งเป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
บรรณานุกรมอักษรย่อ	3
สารบัญภาพประกอบ	4
สารบัญตาราง	5
บทคัดย่อ	6
1. บทนำ	7
2. วัตถุประสงค์	8
3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	8
4. ผลการทดลอง	12
5. เอกสารอ้างอิง	22

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บรรณานุกรมอักษรย่อ

GST	=	Glutathione-S-transferase
^{o}C	=	Degree Celsius
BSA	=	Bovine serum albumin
PBS	=	Phosphate buffer saline
CFA	=	Complete Freund's adjuvant
IFA	=	Incomplete freund's adjuvant
OPD	=	Ortho-phenylene diamine
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
O.D.	=	Optical density
µl	=	microliter
µg	=	microgram
ml	=	milliliter
mg	=	milligram
nm	=	nanometer
Ig	=	Immunoglobulin
HRP	=	Horse raddish peroxidase
SDS-PAGE	=	Sodium dodexyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
DAB	=	diaminobenzidine
rpm	=	round per minute
mM	=	millimolar
EDTA	=	Ethylenediamine tetra acetic acid
IPTG	=	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
DTT	=	1,4-Dithiothreitol
IMDM	=	Iscove's modified Dulbecco 's medium
FCS	=	Fetal craft serum
PEG	=	polyethyleneglycol
HAT	=	Hypoxanthine aminopterin thymidine
HT	=	Hypoxanthine thymidine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1.	**ระดับแอนติบอดีต่อ GST1-3 ในหนูทดลองเมื่อได้รับการฉีดด้วย GST1-3** สัญลักษณ์ลูกศรแสดงวันที่ฉีดด้วย GST1-1 และ GST1-5 และเส้นกราฟแต่ละเส้นแสดงระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว	21
รูปที่ 2.	**ระดับแอนติบอดีต่อ GST1-3 ในซีรัมหนูทดลองภายหลังที่ได้รับการฉีดด้วย GST1-3 ครบ 3 ครั้ง** ซีรัมที่นำมาตรวจเก็บในวันที่ 12 นับจากวันที่ฉีดด้วยแอนติเจนครั้งสุดท้าย เส้นกราฟแต่ละเส้นแสดงค่าเฉลี่ยของระดับแอนติบอดีของซีรัมที่เจือจางในความเข้มข้นต่าง ๆ	22
รูปที่ 3.	**ชนิดแอนติบอดีต่อ GST1-3 ในซีรั่มหนูทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย GST1-3** ซีรัมที่นำมาตรวจเก็บในวันที่ 12 นับจากวันที่ฉีดด้วยแอนติเจนครั้งสุดท้าย โดยวิธี ELISA ดังที่ได้อธิบายไว้ในวิธีการทดลอง แท่งกราฟแต่ละแท่งแสดงระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัวในที่นี้ให้สัญลักษณ์ของหนูแต่ละตัวเป็น NM, 1R และ 1L	23

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1.	ระดับการสร้างแอนติบอดีต่อ GST1-3 ของ hybridoma clones ที่ได้จากการทดลองครั้งที่สี่	18
ตารางที่ 2.	ระดับการสร้างแอนติบอดีต่อ GST1-3 ของ hybridoma clones ที่ได้จากการทดลองครั้งที่ห้า โดยเก็บ supernatant ในวันที่แปดหลังจากการ fusion	19
ตารางที่ 3.	ระดับการสร้างแอนติบอดีต่อ GST1-3 ของ hybridoma clones ที่ได้จากการทดลองครั้งที่ห้า โดยเก็บ supernatant ในหลังจากวันที่แปดของการ fusion	20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

กลูตาไธโอน-เอส-ทราสเฟอเรส หรือ จีเอสที เป็นเอนไซม์ที่สำคัญตัวหนึ่งของเซลล์สิ่งมีชีวิต ทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษทั้งที่เกิดขึ้นเองภายในเซลล์หรือมาจากภายนอก จีเอสทีเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งในการเกิดการดื้อยาฆ่าแมลงของแมลงต่าง ๆ แต่กลไกในการดื้อยายังไม่ทราบแน่ชัด และยังต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าวการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อจีเอสทีจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยในระยะต่อไป โดยในการศึกษานี้ใช้ จีเอสที 1-3 ในการฉีดหนูทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดีก่อนนำเซลล์ม้ามของหนูดังกล่าวมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็ง (myeloma cells) เพื่อให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่สร้างแอนติบอดีชนิดหนึ่งๆได้ และสามารถเลี้ยงในหลอดทดลองได้ตลอดไป

Abstract

Glutathione-S-transferease (GST) is an important enzyme in elimination of toxic substances in all living cells including plants and animals. GST is one factor involving in the increase of insecticide-resistance in insects but the mechanism is not understood and purified GST and its isoenzymes are needed. We aim to establish an antibody affinity chromatography as a tool for GST purification. For this purpose, we try to generate monoclonal antibodies specific for GST isoenzymes and in this study we used GST1-3 for immunization of mice. The immunization was successful that a very good response was obtained. However generation of hybridoma was not successful although 5 experiments were conducted. The conditions for cell fusion was adjusted, i.e., ratio of spleen cells and myeloma and the addition of feeder cells.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทนำ

เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (glutathione S tranferase, GST) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่กำจัดสารพิษในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดรวมทั้งพืชและสัตว์ (1) สารพิษดังกล่าวอาจเป็นสารที่เกิดจากขบวนการเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์เอง หรือสารพิษที่ได้รับจากนอกเซลล์ ความสำคัญของเอนไซม์ GST ทางด้านโรคติดเชื้อที่มีแมลงเป็นพาหะนับว่าสำคัญมากโดยเฉพาะในการควบคุมแมลงพาหะนำโรคโดยใช้ยาฆ่าแมลงซึ่งพบว่า ในปัจจุบันแมลงดื้อต่อยาฆ่าแมลงมากขึ้น และเอนไซม์ GST เป็นตัวการหนึ่งที่เกี่ยวข้องในกลไกการดื้อยาฆ่าแมลงที่เกิดขึ้น (2) การศึกษาวิจัยเอนไซม์ GST จึงเป็นหนทางหนึ่งที่ช่วยนักวิจัยสามารถเข้าใจกลไกการดื้อยาดังกล่าวได้ และนำความรู้ที่ได้ไปปรับปรุงแก้ไขปัญหาการดื้อต่อยาฆ่าแมลงในอนาคตต่อไป

เอนไซม์ GST ในยุงก้นปล่องสามารถแยกสกัดได้โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่ (3, 4) และแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ 1 (class I) และกลุ่มที่ 2 (class II) ในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) จำนวน 3 ชนิด คือ GST-4a GST-4b และ GST-4c ไอโซเอนไซม์ทั้งสามสามารถจับกับ S-hexylglutathione ได้ดีจึงสามารถใช้สารดังกล่าวในการแยกไอโซเอนไซม์ทั้งสามชนิดได้ สำหรับกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเอนไซม์ GST-5 และ GST-6 ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการจับเกาะกับ S-hexylglutathione และไม่สามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้ เนื่องจากยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมาตั้งการเตรียมในตอนต้น

ในการศึกษาโดยเทคนิคทางด้าน Molecular biology ได้มีการค้นพบ GST isoenzyme อื่นๆ อีกมากมาย ได้แก่ adGST 1-1, adGST 1-2, adGST 1-3, adGST 1-4 และ adGST 1-5 ทำให้ได้ทราบลำดับกรดอะมิโน และกรดนิวคลีอิกของยีนที่สังเคราะห์ไอโซเอนไซม์เหล่านี้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถเชื่อมความรู้เกี่ยวกับ recombinant GST เหล่านี้กับ wildtype GST ที่แยกสกัดโดยตรงจากยุงได้ เนื่องจากยังขาดข้อมูลส่วนใหญ่ของ wildtype GST ด้วยเหตุนี้การศึกษาโครงการแยกสกัด wildtype GST จากยุงจึงยังคงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

Hybridoma technique เป็นเทคนิคการสร้างเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า Hybrid หรือ Hybridoma ที่เกิดจากการเอาเซลล์ม้ามซึ่งมี B-lymphocyte ที่สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ฉีดมารวมตัวกับเซลล์มะเร็งของ B-lymphocyte ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า myeloma cells โดย hybridoma ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติของทั้งเซลล์มะเร็งและ B-lymphocyte รวมกัน กล่าวคือ สามารถแบ่งตัวได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุดทั้งในหลอดทดลองและร่างกายหนู ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง และสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ B-lymphocyte เนื่องจาก hybridoma เกิดจากการรวมตัวของ B-lymphocyte เพียง 1 เซลล์ กับ myeloma cell 1 เซลล์ ดังนั้นเมื่อเกิด hybridoma เจริญเติบโตแบ่งตัวเป็นกลุ่ม แอนติบอดีที่สร้างโดยกลุ่มนี้จึงจำเพาะต่อหนึ่ง antigenic determinant บนแอนติเจนเท่านั้น หรือเรียกว่า monoclonal antibody

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Antibody affinity chromatography เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถจะช่วยแยกสกัด GST isoenzyme ต่างๆ ให้บริสุทธิ์ได้ หลักการของวิธีนี้คือ นำแอนติบอดีที่จำเพาะกับไอโซเอนไซม์หนึ่งๆ ที่ได้จากการทำ hybridoma technique มาจับไว้กับเม็ดวุ้น (agarose) จากนั้นบรรจุลงในคอลัมน์ เมื่อนำสารละลายที่เตรียมได้จากยุงมาใส่ในคอลัมน์ แอนติบอดีจะจับกับไอโซเอนไซม์ที่จำเพาะที่ต้องการ และปล่อยให้ไอโซเอนไซม์ที่ไม่ต้องการไหลผ่านไป หลังจากล้าง non specific binding ออกจากคอลัมน์แล้ว เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมลงไปในคอลัมน์จะทำให้แอนติบอดีปล่อยไอโซเอนไซม์ที่ถูกจับไว้ออกมา

ด้วยหลักการดังกล่าวข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงได้จัดทำโครงการศึกษาวิจัยในเรื่องนี้ขึ้น โดยทำการเตรียม monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ GST ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ GST 1-3 เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunization) ในหนูทดลอง แล้วนำเซลล์ม้ามจากหนูดังกล่าวไปเตรียม hybridoma cells ให้สร้าง monoclonal antibody ที่ต้องการ การเลือกใช้แอนติเจนทั้งสองชนิดด้วยเหตุผลที่ว่า GST 1-3 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ GST 1-1, GST 1-2 และ GST 1-4 อยู่มากกว่า 75%

วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส

1.2 เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสที่ได้ไปใช้เตรียมแอนติบอดี-แอฟฟินิตีเจล (antibody-affinity gel)

1.3 เพื่อนำแอนติบอดี-แอฟฟินิตีเจล (antibody-affinity gel) ไปใช้ในการแยกเอนไซม์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์จากโปรตีนของยุง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

หนูทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้หนูทดลอง สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุเมื่อเริ่มการทดลองประมาณ 6 ถึง 8 สัปดาห์ หนูเหล่านี้บางส่วนซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม และบางส่วนเลี้ยงเองในห้องสัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การเตรียมแอนติเจน GST

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส (Glutathione-S-transferase) สองชนิดสำหรับการฉีดหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีคือ GST1-3 ซึ่งได้จากการตัดต่อยีนจากยุงก้นปล่องชนิด *An. dirus* B และยีน GST นำมาใส่ในแบคทีเรีย *E. coli* โดยมีวิธีการดังนี้

นำ *E.coli* BL21 (DE3) pLys5 ที่มี recombinant plasmid มา steak บน agar plate และอบในตู้เลี้ยงเชื้อที่ 37°C 1 คืน นำ colony ของเชื้อที่ขึ้น 1 colony ใส่หลอดทดลองที่มี broth media 2 ml แล้วอบในตู้เลี้ยงเชื้อที่ 37°C ใน orbital shaker 1 คืน จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงใน flask ขนาด 250 ml ที่มี broth media อยู่ 50 ml เลี้ยงต่ออีกประมาณ 4 ชั่วโมง ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 nm เป็นระยะๆ จนได้ O.D. มีค่าเท่ากับ 0.6 จึงเติม IPTG ลงไปให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mM (5 µl 1M IPTG) เลี้ยงต่อไปอีก 3 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์โดยนำไปปั่นในหลอดทดลองที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำออก และเก็บส่วนเซลล์แบคทีเรียนำไปสกัดเอาเอนไซม์ GST ต่อไป

ในการสกัดเอนไซม์ GST นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาเติมด้วย Tris buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4 ที่มี 1 mM EDTA อยู่) 4.8 ml ในหลอดทดลอง ดูดเป่าให้เซลล์กระจายตัวด้วย pasture pipet แล้วเติม lysozyme (100 mg/ml) ปริมาตร200 µl และ β-mercaptoethanol (1.4 M) ปริมาตร 3.6 µl ลงไป แล้วนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวไปแช่ในน้ำแข็งนาน 20 นาที จากนั้นเติม 1 M DTT ปริมาตร 50 µl ลงไป แล้วทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยใช้เครื่อง soniprep 150 French pressure ที่ระดับ18 amplitude micron ที่ 4°C จนสังเกตเห็นสารละลายใสขึ้นซึ่งว่าเซลล์แตกแล้ว นำไปปั่นด้วยความเร็ว 10,000xg ที่ 4°C นาน 20 นาที แล้วเก็บส่วนที่เป็นน้ำไว้

จากส่วนน้ำที่เก็บได้ นำมาแยกสกัดเอา GST ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยใช้สาร S-hexylglutathione agarose gel เริ่มต้นจากล้างเจลด้วย buffer (50 mM Tris Cl pH 7.4, 0.2 M NaCl, 1mM EDTA and 10 mM DTT) อย่างน้อย 10 ครั้ง ครั้งสุดท้ายรินbuffer ออกจนหมด แล้วเติมส่วนน้ำที่ได้จากข้างต้นลงไป และผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในน้ำแข็งนาน 5-10 นาที จากนั้นล้างเจลด้วย buffer ประมาณหกครั้ง จากนั้นดำเนินการชะล้างเอา GST ที่จับกับเจลออกด้วยการเติม buffer ที่มี 0.2 M NaCl และ 5 mM S-hexylglutathione ลงไป โดยให้ปริมาตรแต่ละครั้งที่เติมเท่าปริมาตรเจล เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน รินส่วนน้ำเก็บไว้ทำซ้ำ 4 ครั้ง จากนั้นเทส่วนน้ำรวมกัน ซึ่งสิ่งที่ได้เป็น GST

นำส่วนสารละลายที่มี GST มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยกรองผ่าน PD-10 column (Pharmacia) ซึ่ง equilibrate ด้วย 50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.5 ที่ใส่ 10 mM DTT สุดท้ายกำจัดการปนเปื้อนของ S-hexylglutathione ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายสุดท้ายที่ได้มาปั่นกรองด้วย Centriprep-10 ที่มีเยื่อ membrane และกรองเก็บโปรตีนไว้ใน 40% glycerol ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะใช้งาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การฉีดหนูทดลองด้วยแอนติเจน GST

นำหนูทดลองเพศเมีย สายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัวมาฉีดด้วยแอนติเจน GST1-3 โดยโปรแกรมการฉีดมีดังนี้ คือ ในวันแรก ฉีดหนูด้วยแอนติเจน GST1-3 ที่ผสมกับ Complete Freund's adjuvant (CFA, บริษัท Sigma) โดยการฉีดเข้าช่องท้องของหนู (intraperitoneal) โดยให้หนูแต่ละตัวได้รับแอนติเจนเท่า 30 μg ในปริมาตรของส่วนผสม 100 μl และฉีดซ้ำในวันที่ 14, 28, และ 42 ด้วยแอนติเจนในปริมาณเท่าเดิม แต่ผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA, บริษัท Sigma) แทน

ทำการติดตามการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST ที่ใช้ฉีดโดยการเก็บเลือดจากหนูสองวันก่อนฉีดด้วยแอนติเจน นั่นคือในวันที่ –2, 12, 26 และ 40 และนำมาทดสอบแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST

การตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST

การตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST โดยวิธี ELISA

เคลือบเพลท (96-well flat bottom ELISA plate, บริษัท Nunc) ด้วยแอนติเจน GST (100 μg/ml in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6) ในปริมาตร 100 μl ต่อหลุม ที่ 4°C ค้างคืน ล้างเพลทด้วย 0.05%Tween /PBS (PBST) จำนวน 4 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายเติม 1%BSA/PBS ปริมาตร 200 μl ลงในทุกหลุม อบที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด 1%BSA/PBS ออกจากหลุม แล้วเติมซีรัมหนูที่ต้องการทดสอบที่เจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (two-fold dilution) ด้วย 1%BSA/PBST หลุมละ 100 μl อบที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง แล้วเติม horse raddish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (บริษัท Organon Teknika) ที่เจือจาง 1/3,000 หลุมละ100 μl อบที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วย PBST จำนวน 4 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate (บริษัท Sigma) หลุมละ 100 μl ตั้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1N H_2SO_4 หลุมละ 50 μl นำเพลทไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัด ELISA (Ceres UV 900 Hdi, BIO TEK) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 492 นาโนเมตร

การตรวจหาชนิดแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST โดยวิธี ELISA

ในการทดสอบหาชนิดของแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST มีวิธีการทำเช่นเดียวกับการตรวจหาระดับแอนติบอดี ยกเว้นในขั้นตอนการเติม conjugate ใช้ HRP-conjugated anti-mouse IgG1,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA หรือ IgM antibody (Mouse monoAB IP/SP KIT; Zymed Laboratories. Inc) แทน

การเตรียมเซลล์ม้าม

สามวันก่อนทำ cell fusion ฉีดแอนติเจน GST ที่ละลายอยู่ใน PBS ให้กับหนูทดลองที่ได้รับการฉีดด้วยแอนติเจน GST มาแล้วโดยให้ทางเส้นเลือดดำ (intravenous) เมื่อครบกำหนดเวลานำหนูทดลองดังกล่าวมาผ่าเปิดช่องท้องด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อ (aseptic technique) นำเอาม้าม (spleen) ออกมา ใส่ในจานพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ (sterile petridish) ที่มี IMDM medium (บริษัท GIBGO BRL) อยู่ 3 ml บดโดยใช้ด้านปลายของ puncture ของกระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 5 ml เก็บเซลล์ที่ออกมาใน media ลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ให้เศษเซลล์ตกตะกอน ถ่าย media ส่วนบนที่มีเซลล์อยู่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,600 rpm นาน 7 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เติม lysing solution ปริมาณ 3 ml (ต่อ 1 spleen) ทำให้เซลล์กระจายตัวโดยใช้ pasture pipet ดูดเป่าหลายๆ ครั้ง ตั้งไว้ที่ 37^{o}C นาน 7 นาที เติม IMDM medium ให้ได้ปริมาตรเป็น 14 ml นำปั่นด้วยความเร็ว 1,600 rpm นาน 7 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เติม IMDM medium และทำให้เซลล์กระจายตัว นำไปปั่นอีกครั้ง เทส่วนน้ำทิ้ง เติม IMDM medium และทำให้เซลล์กระจายตัว จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ได้โดยใช้ hemocytometer และ 0.1% tryphan blue/PBS solution

การเตรียม myeloma cells

ในการศึกษานี้ใช้ myeloma cell line ชื่อ P3X63Ag8.653 โดยนำมาเลี้ยงใน 10%FCS/IMDM ก่อนทำ cell fusion นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มารวมกัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 rpm นาน 7 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เจือจางด้วย IMDM medium และนับจำนวนเซลล์ที่ได้โดยใช้ hemocytometer และ 0.1% tryphan blue/PBS solution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำ cell fusion

ผสมเซลล์ม้าม และ myeloma cells เข้าด้วยกันในอัตราส่วนจำนวนเซลล์ 3:1 แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 rpm นาน 10 นาที ให้เซลล์ตกลงก้อนหลอด ในระหว่างนี้อุ่นสารละลาย 50% polyethylene glycol (PEG, บริษัท Sigma) IMDM medium และ 10%FCS/IMDM/HAT ใน water-bath ที่อุณหภูมิ 37^{o}C ในขณะที่ทำ fusion ต้องทำใน beaker น้ำอุ่น 37^{o}C แล้วค่อยๆ เติมสารละลายตามลำดับดังนี้ คือ เติม 50% PEG (0.8 ml/1x10^{8} cells) โดยค่อยๆ หยดพร้อมทั้งเขย่าหลอดทดลองให้ส่วนผสมเข้ากันโดยใช้เวลาในการหยดให้หมดใน 1 นาที จากนั้นค่อยๆ เติม IMDM medium 1 ml พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ ตลอดเวลาโดยใช้เวลาให้หยดให้หมดใน 2-3 นาที แล้วค่อยๆ เติม IMDM

medium อีก 3-4 ml พร้อมทั้งเขย่าหลอดทดลองเบาๆ ตลอดเวลาโดยใช้เวลาในการหยดให้หมดใน 3-4 นาที จากนั้นค่อยๆ เติม IMDM medium ปริมาตร 8 ml เขย่าหลอดทดลองเบาๆ ตลอดเวลาโดยใช้เวลาในการหยดให้หมดใน 4-5 นาที และสุดท้ายค่อยๆ เติม IMDM medium อีก 8 ml พร้อมทั้งเขย่าเบาๆตลอดเวลาโดยใช้เวลาในการเติมให้หมดใน 5-6 นาที นำหลอดทดลองไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 rpm นาน 10 นาที นำมาตั้งใน water-bath ที่ 37°C นาน 5 นาที ก่อนดูดส่วนน้ำทิ้งแล้วทำให้เซลล์กระจายตัวใน 10%FCS/IMDM /HAT medium และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ $1x10^6$ cells/ml ดูดเซลล์ใส่ในหลุมของเพลท (96-well flat bottom tissue culture plate) หลุมละ 200 µl (เท่ากับ $2x10^5$cells) นำเข้าตู้อบที่ 37°C ที่มี 5%CO_2 จากนั้นสังเกตหลุมที่มีเซลล์ขึ้นโดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope ซึ่งสามารถเห็นได้ภายใน 4 วัน และมองเห็นกลุ่มเซลล์ด้วยตาเปล่าได้ใน 7-8 วัน จากนั้นเก็บ supernatant จากหลุมดังกล่าวไปตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี ELISA ดังได้กล่าวแล้วในข้อที่ 3.4.1 และบันทึกผลไว้

หลังจากวันที่ 10 ของการทำ cell fusion เซลล์เริ่มมีจำนวนมากขึ้น แยกเซลล์จำนวนครึ่งหนึ่งมาเลี้ยงใน 10%FCS/IMDM/HT medium ส่วนเซลล์อีกครึ่งหนึ่งยังคงเลี้ยงใน 10%FCS/IMDM/HAT medium ในเพลทเดิม เมื่อเซลล์ใน 10%FCS/IMDM/HT medium มีจำนวนมากขึ้นจึงขยายการเลี้ยงเซลล์ไปเลี้ยง 24-well plate ต่อไปใน 10%FCS/IMDM medium

การคัดเลือกโคลน (clonal selection) ด้วยวิธี limiting dilution

นำเซลล์ hybridoma ที่เลี้ยงใน 24-well plate ใน 10%FCS/IMDM medium มาปั่นล้างด้วย IMDM medium และนับจำนวนเซลล์ จากนั้นเตรียมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 cells/ml และ 10 cells/ml อย่างละ 5 ml และ 3 cells/ml ปริมาตร 10 ml ใน 10%FCS/IMDM medium เติมเซลล์แต่ละความเข้มข้นใน 96-well plate หลุมละ 100 µl โดยในแต่ละหลุมมีเซลล์ม้ามที่เตรียมจากหนูปกติไว้ก่อนแล้วหนึ่งวัน เพื่อทำหน้าที่เป็น feeder cells ในปริมาณ $1x10^5$ cells/100 µl/well นำเพลทเข้าตู้อบที่ 37°C ที่มี 5% CO_2 สังเกตหลุมที่มีเซลล์ขึ้น จากนั้นเก็บ supernatant ไปตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน GST โดยวิธี ELISA ตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 3.4.1

ในการทำ limiting dilution อาจต้องทำซ้ำ เพื่อให้ได้โคลน (clone) ของ hybridoma ที่มีความจำเพาะ และมีความแข็งแรงตามที่ต้องการให้มากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

1. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูทดลองด้วย GST1-3

หนูทดลองจำนวน 5 ตัวได้รับการฉีดด้วย GST1-3 ตัวละ 30 ไมโครกรัมต่อครั้ง จำนวน 4 ครั้งในวันที่ 0, 14, 21 และ 42 โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ก่อนการฉีดแอนติเจนหนึ่งหรือสองวัน ได้เก็บเลือดมาแยกเอาซีรัมเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ GST1-3 โดยวิธี ELISA รูปที่ 1

แสดงระดับแอนติบอดีในหนูทดลองแต่ละตัวที่ได้รับการฉีดกระตุ้น ผลการทดลองแสดงว่า หลังจากการฉีดด้วย GST1-3 เพียง 3 ครั้ง ระดับแอนติบอดีขึ้นสูงสุด การฉีดแอนติเจนให้ในครั้งที่ 3 ไม่ช่วยเพิ่มระดับแอนติบอดีมากนัก ภายหลังการฉีดกระตุ้นครบ 4 ครั้ง ได้ทำการเก็บซีรัมมาตรวจหา Titer (รูปที่ 2) และชนิดของแอนติบอดี (รูปที่ 3) พบว่าหนูทดลองทั้ง 5 ตัว มีการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีเท่าๆ กัน ชนิดของแอนติบอดี ที่เด่น คือ ชนิด IgG1 และ IgG2b รองลงมาเป็นชนิด IgG2a และ IgG3 (รูปที่ 3)

2. การผลิต hybridoma

การทดลองครั้งที่ หนึ่ง

สามวันก่อนทำการหลอมเซลล์ ทำการกระตุ้นหนูด้วย แอนติเจน GST1-3 20 μg ที่ละลายใน 100 μl PBS buffer ฉีดเข้าทางเส้นเลือดที่อยู่ปลายหาง ช่วงนี้ก็ทำการเตรียม Myeloma สายพันธุ์ P3X63Ag8.653 ที่ใช้สำหรับทำการหลอมเซลล์ไปด้วย ในวันที่ทำการทดลอง เตรียมเซลล์ม้ามตามวิธีที่กล่าวข้างต้น หลังจากทำการแตกเม็ดเลือดแดงแล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่เตรียมได้ พบว่ามีจำนวนเซลล์ม้ามที่มีชีวิตอยู่ด้วยน้อยมาก (น้อยกว่า $10X10^6$cells) โดยสันนิษฐานว่า น้ำยาที่ใช้ในการแตกเม็ดเลือดแดงมีปัญหา ทำให้การทดลองนี้ล้มเลิกไป จากนั้นจึงทำการเตรียมน้ำยาในการแตกเม็ดเลือดแดงใหม่ เมื่อเตรียมเสร็จแล้ว ทำการทดสอบโดยการเตรียมเซลล์ม้ามของหนูทดลองที่เลี้ยงไว้ พบว่าน้ำยาแตกเม็ดเลือดแดงได้ผลดี จึงนำไปใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

การทดลองครั้งที่สอง

สามวันก่อนการทดลองกระตุ้นด้วย GST1-3 20 μg เหมือนกับการทดลองครั้งที่หนึ่ง ในวันที่ทำการทดลอง เตรียมเซลล์ม้าม จากนั้นนับจำนวนได้ $90X10^6$cells ส่วน myeloma cells เตรียมให้ได้ปริมาณสุดท้าย $30X10^6$cells (อัตราส่วน spleen: myeloma เท่ากับ 1:3) ทำการหลอมเซลล์ดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น หลังจากนั้นนำไปเติมลงใน 96 well pate นำไปไว้ที่ 37^oC 5%CO_2 จากนั้นติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ ทุกวัน พบว่า ในวันแรกหลังจากที่ทำการทดลอง เซลล์มีกระจัดกระจายทั่วๆ ไปในแต่ละหลุม มีเซลล์บางส่วนที่อยู่ใกล้ชิดกัน ระหว่าง เซลล์ม้ามกับกับ myeloma cell วันที่สามพบว่า มี myeloma บางส่วนเริ่มตายลงแต่ยังมีหลงเหลือบ้าง ส่วน media ยังสีปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในวันที่ห้า เซลล์ในหลุมตายหมด ส่วน media ยังสีปกติ โดยสันนิษฐานว่า เซลล์ที่เจริญเติบโตในช่วงสามวันแรกเป็น myeloma ที่ไม่ได้รวมกับเซลล์ม้ามจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน HAT media ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองครั้งที่สาม

ทำเช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่สอง เตรียมเซลล์ม้ามได้ 148X10^{6}cells ส่วน myeloma cells 48 X10^{6}cells (อัตราส่วน spleen: myeloma เท่ากับ 1:3) ทำการหลอมเซลล์ดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น หลังจากนั้นนำไปเติมลงใน 96 well pate นำไปไว้ที่ 37^{o}C 5%CO_2 จากนั้นติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ ทุกวัน ผลการทดลองเช่นเดียวกับครั้งที่สอง คือเซลล์ที่มีอยู่เจริญเติบโตได้ประมาณ 3-5 วัน จากนั้นก็ตาย หลังจากการทดลองครั้งที่สาม เราได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมว่าปัจจัยใดบ้างที่น่าจะมีผลต่อการหลอมเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ สิ่งแรกที่คิดถึงคือ อัตราส่วนระหว่าง เซลล์ม้ามกับ myeloma ใน Current protocols in Immunology ได้แนะนำไว้ว่า ควรใช้อัตราส่วน myeoma ต่อเซลล์ม้ามที่ต่ำกว่า 1 ต่อ 20 เหตุผลต่อมาคือ การที่ hybridoma อยู่ใน HAT media ซึ่งเป็น selective media นานเกินไป อาจทำให้ เซลล์ไม่เจริญเติบโตเป็นได้ และอีกหนึ่งเหตุผลคือ การที่ hybridoma cell ที่เกิดขึ้น มีจำนวนน้อยและไม่แข็งแรงพอ อาจต้องอาศัย cytokine บางชนิดเพื่อการเจริญเติบโต James W Goding กล่าวไว้ใน หนังสือ Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. ว่า Lymphoid cell จะเจริญเติบโตได้ไม่ดีหรือตาย เมื่อเจริญเติบโตในความหนาแน่นต่ำๆ เพราะว่าเซลล์พวกนี้ต้องการสารพวกหนึ่งที่หลั่งออกมาจากเซลล์ เพื่อช่วยในการเจริญเติบโต (Growth factors) จากเหตุผลข้างต้นดังกล่าว ทำให้เราได้ออกแบบการทดลองครั้งที่สี่เพื่อพิสูจน์เหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น

การทดลองครั้งที่สี่

สามวันก่อนทำการหลอมเซลล์ ทำการกระตุ้นหนูด้วย แอนติเจน GST1-3 20 ไมโครกรัม ที่ละลายใน 100 ไมโครลิตร PBS buffer ฉีดเข้าทางเส้นเลือดที่อยู่ปลายหาง หนึ่งวันก่อนทำการหลอมเซลล์เตรียมเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cell) โดยการเตรียมเซลล์ม้ามจากหนูธรรมดาที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น การเตรียมเซลล์ม้ามดังที่กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นนำไปเติมลงใน 96-well plate 100 ไมโครลิตร (1X10^{5}cells) นำไปเลี้ยงที่ 37^{o}C 5%CO_2 ในวันที่ทำการทดลอง เตรียมเซลล์ม้าม จากนั้นนับจำนวนได้ 130 X10^{6}cells ส่วน myeloma cells เตรียมได้ปริมาณ 30X10^{6}cells

จากนั้น แบ่งเซลล์ทั้งสองออกเป็นชนิดละสองส่วน โดยใช้อัตราส่วนต่างกัน อัตราส่วนแรก หนึ่งต่อห้า โดยใช้ myeloma 75X10^{6}cells เซลล์ม้าม 15X10^{6}cells ส่วนที่สองใช้อัตราส่วน หนึ่งต่อสามเหมือนสามครั้งที่ผ่านมา โดยใช้ myeloma 45X10^{6}cells เซลล์ม้าม 15X10^{6}cells ทำการหลอมเซลล์ดังวิธีที่กล่าวข้างต้น จากนั้นนำไปลง 96-well plate โดยแบ่งอย่างละครึ่ง คืออัตราส่วน หนึ่งต่อสาม เติม 100 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate ที่มี เซลล์พี่เลี้ยงจำนวน 2 เพลท และเติม 200 ไมโครลิตร ลงในเพลทเปล่าจำนวนสองเพลท ในอัตราส่วนหนึ่งต่อห้าก็ทำเช่นเดียวกัน นำไปไว้ที่ 37^{o}C 5%CO_2 จากนั้นติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกวัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในวันแรกหลังจากที่ทำการทดลอง เซลล์มีกระจัดกระจายทั่วไปในแต่ละหลุม มีเซลล์บางส่วนที่อยู่ใกล้ชิดกัน ระหว่าง เซลล์ม้ามกับกับ myeloma cell

วันที่สามพบว่า มี myeloma บางส่วนเริ่มตายลงแต่ยังมีหลงเหลือบ้าง ส่วน media ยังสีปกติ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในวันนี้ได้เปลี่ยน media ครึ่งหนึ่ง คือ จาก เพลทที่มีเซลล์พี่เลี้ยงและไม่มีเซลล์พี่เลี้ยงอย่างละหนึ่งเพลท ของแต่ละอัตราส่วน เปลี่ยนจาก HAT media เป็น HT media

ในวันที่ห้า เซลล์ในส่วนที่มีเซลล์พี่เลี้ยง มีเซลล์ที่เจริญเติบโตได้ดีทั้งในส่วนที่เป็น HAT media และ HT media ส่วนในเพลทที่ไม่มีเซลล์พี่เลี้ยง ปรากฏว่าไม่มีเซลล์ที่เจริญเติบโต โดยไม่มีแตกต่างกันระหว่างอัตราส่วนของ แสงว่าข้อสันนิษฐานข้างต้น พอจะสรุปได้ว่า อัตราส่วนระหว่างเซลล์ม้ามกับ myeloma หนึ่งต่อสามและหนึ่งต่อห้า ไม่มีผลต่อการหลอมเซลล์และการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่นเดียวกับการที่เซลล์อยู่ใน HAT media นานๆ ก็ไม่มีผลเช่นกัน โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์น่าจะอยู่ที่ cytokine ที่หลั่งออกมาจากเซลล์มากกว่า

วันที่แปด เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยเซลล์มีการเกาะกลุ่มกันใหญ่ขึ้น ทั้งในส่วน HT และ HAT แต่การเจริญเติบโตเป็นไปอย่างช้ามาก

วันที่สิบสอง ทำการเปลี่ยน media หลุมที่เจริญเติบโต ใน HAT เป็น HT และหลุมที่เป็น HT เปลี่ยนเป็น 10 % FCS/IMDM

วันที่สิบห้า กลุ่มเซลล์เริ่มใหญ่ขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงสีของ media เป็นสีเหลืองในบางหลุม ทำการเลือกหลุมที่เจริญได้ดี ขนาดใหญ่ มาทำ ELISA โดยดูดส่วน supernatant 100 ไมโครลิตร ผลการทำ ELISA (ตารางที่ 1) พบว่า หลุมที่ให้ค่า O.D. สูงสุดอ่านค่าได้เพียง 0.216 ในขณะที่หลุมอื่นๆ อ่านค่าประมาณ 0.15-0.18 (Negative control เท่ากับ 0.133, positive control มากกว่า 3.00) ดังนั้นสันนิษฐานว่า hybridoma ที่เกิดขึ้น อาจจะไม่สร้างแอนติบอดีหรือสร้างในระดับต่ำๆ จึงได้ย้ายเซลล์จาก 96-well plate ไปไว้ที่ 24-well plate จากนั้นรอให้เซลล์เจริญเติบโตอีกสักระยะเพื่อที่จะทำ ELISA อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองครั้งนี้

วันที่ยี่สิบ เซลล์ที่ออยู่ใน 24-well plate เริ่มมีการเจริญเติบโต ทำการดูด supernatant เพื่อทำ ELISA ยืนยันผลการทดลองเดิม ผลการทดลองพบว่า ไม่มีแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจาก hybridoma เหล่านี้เลย สันนิษฐานว่า เซลล์เหล่านี้อาจจะเกิดจากการรวมตัวของ myeloma กับ เซลล์ม้ามจริงที่รวมนั้นไม่สร้างแอนติบอดี จึงไม่ได้ทำการทดลองต่อ

การทดลองครั้งที่ห้า

จากการทดลองครั้งที่ผ่านมาเราทราบแล้วว่า ก่อนที่เราจะทำการหลอมเซลล์รวมกันเราควรที่จะเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงไว้ก่อนเพื่อให้หลั่งพวก cytokine เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของ hybridoma cell ทำการทดลองเช่นเดิม กระตุ้นแอนติเจนล่วงหน้าสามวัน เตรียมเซลล์พี่เลี้ยงก่อนหน้าหนึ่งวัน การทดลองครั้งนี้เตรียม เซลล์ม้ามได้ $130X10^6$ cells และ myeloma $50X10^6$ cells แปดวันหลังการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลอง เปลี่ยน media จาก HAT เป็น HT เซลล์มีการเจริญเติบโตดี วันที่สิบสองเซลล์เจริญพอที่จะสามารถเก็บ supernatant มาทำการตรวจสอบแอนติบอดีที่สร้างขึ้นได้พบว่า การทำ ELISA ครั้งนี้ มีบางหลุมที่ให้ O.D. ถึง 0.371 (ตารางที่ 2) ในขณะที่ Blank ให้ O.D. 0.12-0.15 จากผลการทดลองนี้น่าจะบอกได้ว่า มีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีเกิดขึ้น ทำการย้ายหลุมที่ให้ O.D สูง ๆ ลงใน 24-well plate เปลี่ยน media เป็น 10%FCS/IMDM เตรียม เซลล์พี่เลี้ยงสำหรับการทำ limitng dilution คัดเลือกสองโคลน คือ 9A3 และ 9D5 มาทำ limiting dilution เพราะเห็นว่าเซลล์ในหลุมมีเยอะและสมบูรณ์ที่สุด

หลังจากการเปลี่ยน media ให้เซลล์ hybridoma แล้ว พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงไว้ใน 10%FCS/IMDM ไม่ค่อยเจริญเติบโตเท่าทีควรบางส่วนตายลงไป และเซลล์ในส่วนที่ทำการ limiting ก็ไม่เจริญเติบโตและตายไปในที่สุด ในระหว่างนี้ในส่วนของ 96-well plate ยังมีเซลล์ที่เจริญเติบโตได้ดีและสามารถนำมาตรวจหาแอนติบอดีได้ จึงได้ทำ ELISA อีกรอบเพื่อทำการตรวจสอบ ผลดังตาราง นำเซลล์ที่คิดว่าน่าจะมีแอนติบอดี ไปเลี้ยงไว้ใน 24-well plate ใน 10%FCS/IMDM เลี้ยงต่อไปอีกระยะหนึ่ง จากการเปลี่ยน media และสังเกตเซลล์เราจะพบว่าเมื่อเปลี่ยนจาก HT เป็น 10%FCS/IMDM เซลล์จะไม่ค่อยเจริญเติบโตเท่าที่ควร หรือเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติ อาจเป็นเพราะเราเปลี่ยนจาก หลุมใน 96-well plate มาอยู่ใน 24-well plate ทำให้เซลล์ที่มีอยู่น้อยเพราะเซลล์ต้องการการอยู่รวมกันมากๆจึงจะเจิญเติบโตได้ดี

จากนั้นเมื่อนำเซลล์ที่เจริญได้ดีใน 24 well plate มาทำ ELISA อีกครั้ง พบว่า จากเดิมที่เคยสร้างแอนติบอดีในระดับต่ำๆ เซลล์เหล่านี้กลับไม่มีการสร้างแอนติบอดีให้เห็นเลย ในทุก ๆ หลุม โดยให้ O.D. ประมาณ 0.100 ทำการเปลี่ยน media และเลี้ยงต่อไปอีกระยะ นำมาทำ ELISA อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง พบว่าเซลล์ทั้งหมดก็ยังไม่สร้างแอนติบอดีเหมือนเดิม

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์จะทำการวิจัยต่อเนื่องจากการทดลองครั้งก่อนที่สามารถสร้าง monoclone ที่ให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรสในยุงก้นปล่อง *An. dirus* แต่ว่าเมื่อเริ่มการทดลองได้ทำการนำ clone ที่แช่แข็งออกมาทำการเพาะเลี้ยงพบว่า clone เหล่านั้นไม่สามารถเจริญเติบโตขึ้นมาอีกได้ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจาก clone ไม่แข็งแรงมาก่อน การทดลองจึงต้องเริ่มต้นใหม่ด้วยการเตรียมหนูทดลองใหม่ ตั้งแต่การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันตรวจสอบผลการกระตุ้น แล้วจึงเริ่มทำ cell fusion ใหม่ ซึ่งผลการกระตุ้นจากการตรวจสอบชนิดของแอนติบอดีก่อนเริ่มทำ cell fusion ได้ผลดีตามที่คาดไว้ แต่การทำ cell fusion ไม่ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี ได้พยายามปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ในการทำ cell fusion เช่น ปรับเปลี่ยนอัตราส่วน spleen : myeloma และมีการเติม feeder cell ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยง hybridoma ผลปรากฏว่า cell เจริญเติบโตขึ้นแต่ไม่มีการสร้างแอนติบอดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1. ระดับการสร้างแอนติบอดีต่อ GST1-3 ของ hybridoma clones ที่ได้จากการทดลองครั้งที่สี่

Hybridoma clone	Antibody activity O.D. at 492 nm ครั้งที่ 1	Antibody activity O.D. at 492 nm ครั้งที่ 2
1A2	0.216	0.085
1H6	0.191	0.090
1H10	0.152	0.086
2A2	0.114	0.083
2A4	0.133	0.079
2A8	0.103	0.086
2B8	0.097	0.093
2B9	0.086	0.087
2C2	0.136	0.095
2C9	0.133	0.069
2C12	0.159	0.075
2D4	0.130	0.099
2D8	0.115	0.081
2D10	0.126	0.085
3E1	0.146	0.070
3E5	0.141	0.086
3E8	0.156	0.083
3E10	0.152	0.069
4A2	0.172	0.086
448	0.148	0.083
4E10	0.155	0.097
4H2	0.200	0.055
4H6	0.171	0.069
4H7	0.162	0.085
4H12	0.178	0.082
Pos control	**>3.00**	**>3.00**
Neg control	**0.133**	**0.081**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2. ระดับการสร้างแอนติบอดีต่อ GST1-3 ของ hybridoma clones ที่ได้จากการทดลองครั้งที่ห้าโดยเก็บ Supernatant ในวันที่แปดหลังจากการ fusion

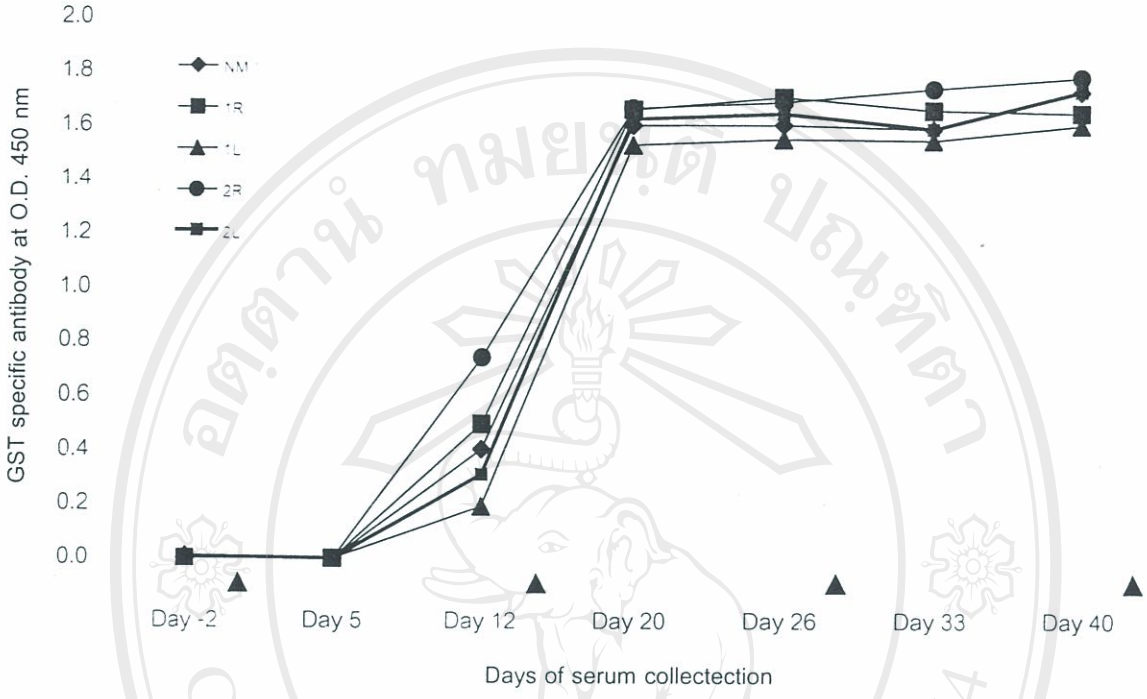
Hybridoma clone	Antibody activity O.D. at 492 nm	Hybridoma clone	Antibody activity O.D. at 492 nm
1F10	0.141	7E10	0.133
2E7	0.157	7F8	0.118
2E8	0.371	8C12	0.199
2F4	0.131	8D2	0.180
2G6	0.121	8G1	0.220
4G1	0.224	9A1	0.190
6C8	0.120	9A3	0.233
6D3	0.149	9B1	0.188
6D9	0.153	9B4	0.193
6F7	0.119	9C4	0.171
6G10	0.129	9C5	0.204
7B7	0.140	9D4	0.194
7C8	0.136	9D5	0.211
7E3	0.149	9D6	0.231
Neg control	**0.154**	**Pos control**	**2.431**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3. ระดับการสร้างแอนติบอดีต่อ GST1-3 ของ hybridoma clones ที่ได้จากการทดลองครั้งที่ห้า โดยเก็บ Supernatant หลังจากวันที่แปดของจากการ fusion

Hybridoma clone	Antibody activity O.D. at 492 nm	Hybridoma clone	Antibody activity O.D. at 492 nm	Hybridoma clone	Antibody activity O.D. at 492 nm
1D3	0.102	6G6	0.107	8H7	0.246
1D11	0.107	6G8	0.097	9A1	0.174
1H10	0.107	7B7	0.127	9A2	0.203
2B8	0.115	7B11	0.117	9A3	0.118
2C10	0.100	7C2	0.148	9A4	0.235
2C12	0.130	7C8	0.124	9A5	0.272
2D10	0.110	7D4	0.154	9A6	0.255
2E11	0.097	7E3	0.142	9B1	0.190
2F4	0.100	7E7	0.133	9B2	0.186
2G5	0.096	7E10	0.101	9B3	0.217
4A1	0.242	7F8	0.093	9B4	0.226
4A11	0.242	8A2	0.115	9B5	0.236
4B5	.0181	8A6	0.100	9B10	0.281
4D11	0.088	8A7	0.130	9C2	0.242
4E9	0.195	8B9	0.110	9C5	0.111
4G11	0.262	8B11	0.097	9C7	0.249
4H1	0.179	8D10	0.100	9C8	0.225
4H4	0.207	8D11	0.096	9C10	0.200
4H10	0.199	8D12	0.234	9D1	0.256
4H12	0.204	8E9	0.175	9D2	0.246
6B6	0.103	8F1	0.243	9D3	0.271
6C10	0.094	8F10	0.218	9D4	0.216
6D7	0.124	8G6	0.222	9D5	0.211
6E12	0.130	8G7	0.199	9D6	0.211
Pos control	**2.811**	**Neg control**	**0.123**		

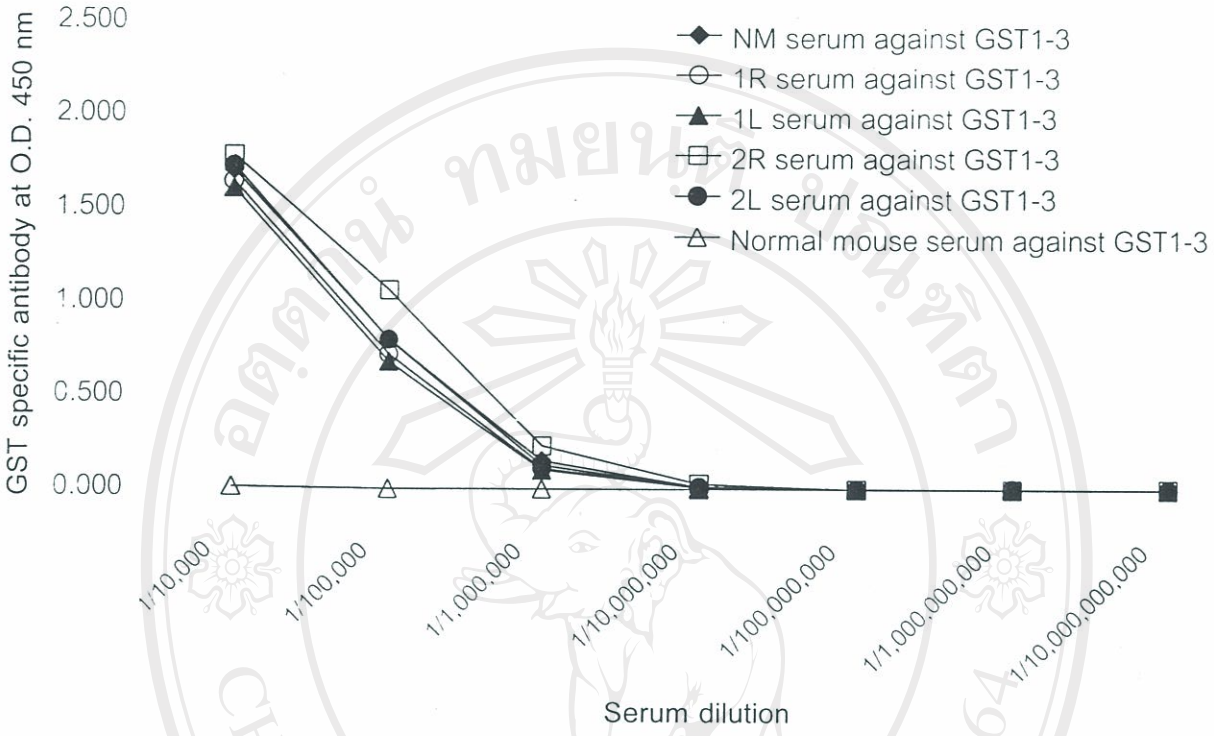
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



<u>รูปที่ 1.</u> ระดับแอนติบอดีต่อ GST1-3 ในหนูทดลองเมื่อได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย GST1-3

สัญลักษณ์ลูกศรแสดงวันที่ฉีดด้วย GST1-3 เส้นกราฟแต่ละเส้นแสดงระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว ในที่นี้ให้สัญลักษณ์ของหนูแต่ละตัวเป็น NM, 1R, 1L, 2R และ 2L

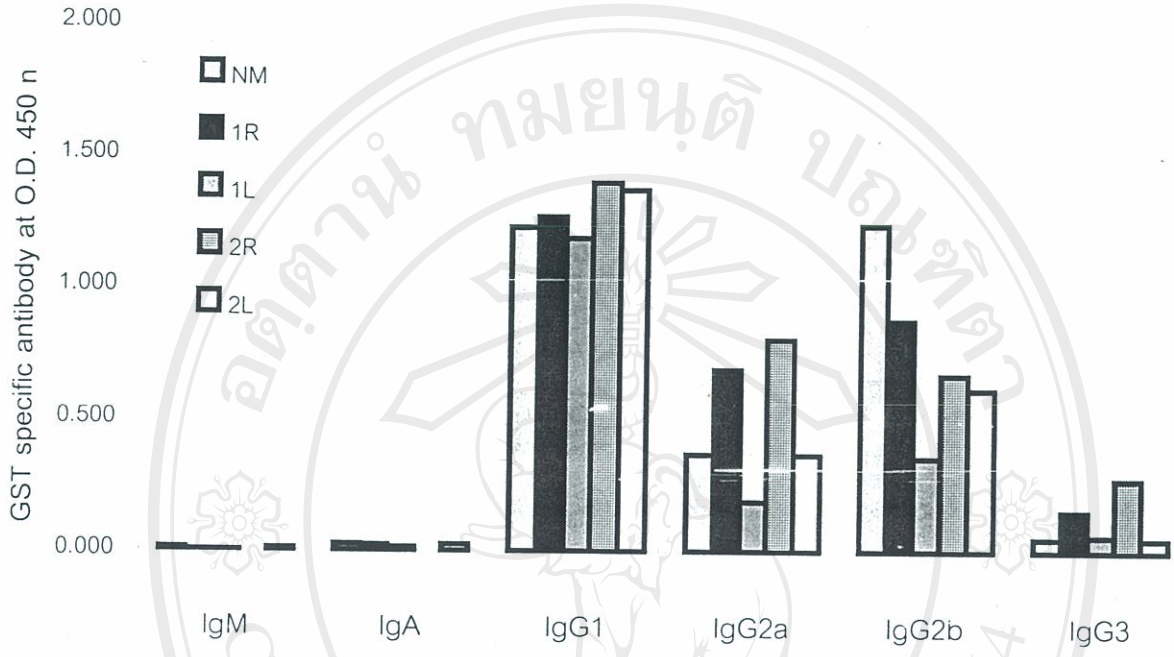
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2. ระดับแอนติบอดีต่อ GST1-3 ในซีรัมหนูทดลองภายหลังที่ได้รับการฉีดด้วย GST1-3 ครบสามครั้ง

ซีรัมที่นำมาตรวจเก็บในวันที่ 12 นับจากการกระตุ้นครั้งสุดท้ายโดยวิธี ELISA เส้นกราฟแต่ละเส้นแทนระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัวที่เจือจางในความเข้มข้นต่าง ๆ ในที่นี้ให้สัญลักษณ์ของหนูแต่ละตัวเป็น NM, 1R, 1L, 2R และ 2L

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



<u>รูปที่ 3.</u> ชนิดแอนติบอดีต่อ GST1-3 ในซีรัมหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วย GST1-3
ซีรัมที่นำมาตรวจเก็บในวันที่ 12 นับจากวันที่ฉีดด้วยแอนติเจนครั้งสุดท้ายโดยวิธี ELISA กราฟแท่งแต่ละแท่งแสดงระดับแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว ในที่นี้ให้สัญลักษณ์ของหนูแต่ละตัวเป็น NM, 1R, 1L, 2R และ 2L

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Beckett, G.J. and Hayes, J.D. (1993) Glutathione S-transferase: Biomedical application. Adv. Clin. Chem. 30: 281-379.
2. Soderlund, D.M. and Bloomquist,J.R. (1990) Molecular mechanisms of insecticide resistance, pp. 58-96. In R.T. Roush and P.E. Tabashnik (eds), Pesticide resistance in arthropods. New York.
3. Prapanthadara, L.,Hemingway, J. And Ketterman, A.J. (1993) Partial purification and characterization of a major glutathione-S-transferase involved in DTT-resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*.Pestic. Biochem. Physiol. 47: 119-133.
4. Prapanthadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., S.,Somboon, P. And Ketterman, A.J. (1999) Isoenzyme of glutathione-S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* species B: The purification, partial characterization and interaction with various insecticide. Insect Biochem. Mol. Biol. (in the press).
5. Jirajaroenrat, K., Pongjaroenkit, S., Krittanai, C., Prapanthadara, L. And Ketterman A.J. (2001) Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single Anopheles gene. Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 867-875.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved