ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของนกกระทาญี่ปุ่น

ชื่อผู้เขียน **นางสาวปิยมาส ตัณฑ์เจริญรัตน์**

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. เพทาย	พงษ์เพียจันทร์	ประธานกรรมการ
รศ. ดร.ปรัชญา	คงทวีเลิศ	กรรมการ
ผศ.นุชา	สิมะสาธิตกุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลสำหรับใช้เป็นแอนติบอดีในการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของนกกระทาญี่ปุ่นโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์ อิมมูโนซอร์เบนท์ แอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) การศึกษาครั้งนี้ใช้แอนติเจนที่ได้จากการเชื่อมระหว่างโคเลสเตอรอลกับโบวายซีรัม อัลบูมิน (Cholesterol-3-BSA) สำหรับกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล ในการศึกษาใช้เซลล์ไมอิโลมา (myeloma) สายพันธุ์ X63Ag8.653 หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจากการฉีด Cholesterol-3-BSA ปริมาณ 100 ไมโครกรัมโดยมี Freund's complete adjuvant เป็นสารช่วยการกระตุ้น ทำการฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุก 2 สัปดาห์ 3 ครั้ง ทำการเก็บเซลล์ม้าม (spleenocyte) จากหนูที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลเพื่อเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมาการเพาะเลี้ยงเซลล์ทำในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม จำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี direct ELISA โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธี competitive ELISA โดยเปรียบเทียบกับวิธีของ Zak (1957) ใช้ไข่นกกระทาจำนวน 40 ฟองสำหรับเป็นตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดง

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนู Balb/c มีการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในสัปดาห์ที่ 4 หลังการกระตุ้น เมื่อนำเซลล์ม้ามมาเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมาพบว่ามีโคลนทั้งหมด 35 หลุม จากทั้งหมด 352 หลุม ใน 35 หลุมพบ 20 หลุมที่โคลนสามารถผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล แยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution ได้ 12 โคลนทั้งหมดเป็นแอนติบอดีชนิดอิมมูโนโกลบูลิน จี (Immunoglobulin G, Ig G) จาก 12 โคลน มี 1 โคลนที่สามารถเจริญเติบโตต่อมาได้ ส่วนที่เหลือ 11 โคลนได้ตายไป โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3B6-6F4 มีปฏิกิริยา cross reaction กับโปรเจสเตอโรน (progesterone) และอีสตราไดออล (estradiol) เป็น 2.8 % และ 1.6 % ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ โคเลสเตอรอลด้วยวิธี ELISA พบค่าความเข้มข้นที่ 50% binding เท่ากับ 7.2 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร การใช้วิธี ELISA วัดโคเลสเตอรอลในไข่แดงของนกกระทาญี่ปุ่นเปรียบเทียบกับการวัดด้วยวิธีของ Zak (1957) พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ผลของโคเลสเตอรอลที่วัดด้วยวิธี ELISA และวิธี Zak (1957) มีค่าเฉลี่ย ± S.E (n) เท่ากับ 645.28 ± 40.91 (40) และ 656.20 ± 40.78(40) มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมไข่แดง ตามลำดับ

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในไข่แดงนกกระทาญี่ปุ่นโดยวิธี ELISA มีความไวมากกว่าวิธีของ Zak (1957)

Thesis Title Production of Monoclonal Antibodies for Determination of Egg Yolk Cholesterol from Japanese Quail.

Author Miss Piyamas Tancharoenrat

M.S. (Agriculture) Animal Science

Examining Committee

Assoc. Prof. Petai	Pongpiachan	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Prachya	Kongtawelert	Committee
Asst. Prof. Nucha	Simasatitkul	Committee

Abstract

This research aimed at producing monoclonal antibody against cholesterol for use as the antibody in measuring cholesterol level in egg yolk of Japanese quails. This measurement was undertaken through Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA. By conjugating cholesterol and BSA (cholesterol-3-BSA), antigen was created to stimulate antibody against cholesterol. Myeloma cells (X63Ag8.653) and 30 Balb/c mice at the age of six weeks were used in this study. Production of monoclonal antibody was initiated by injecting 100 micrograms of cholesterol-3-BSA with Freund's complete adjuvant as a stimulant. This subcutaneous injection has been done 3 times a fortnight. Spleenocytes from mice which had produced antibody against the cholesterol were collected for fusion with myeloma. Cell were cultured in 96 well microplates. Types of monoclonal antibody were classified by the direct ELISA method. The monoclonal antibody obtained was analyzed to quantify cholesterol using competitive ELISA and was compared to Zak's method (1957). 40 eggs of Japanese quail were used to determine cholesterol.

It was found that Balb/c mice produced antibody against cholesterol on the 4^{th} week after immunization. By fusion, clones were found in 35 wells among the total of 352 wells. Out of the 35 wells, 20 wells produced antibody against cholesterol. Individual clones were separated by limiting dilution technique to 12 clones. All of them produced Ig G . One of these 12 clones was

able to maintain further, while the rest (11 clones) were dead. The positive clones (3B6-6F4) which produced antibody showed cross reactivity with progesterone and estradiol at 2.8% and 1.6 %, respectively. By using ELISA technique, the concentration that gave 50% binding inhibition was found to be 7.2 pg/ml. The developed ELISA technique was use to quantitate cholesterol in egg yolk of Japanese quail in comparison to Zak's method. It was found that there was no significantly difference between these two methods ($p>0.05$). The cholesterol level resulted from ELISA and Zak (1957) by mean $\pm$ S.E. (n) was 645.28 $\pm$ 40.91 (40) and 656.20 $\pm$ 40.78 (40) mg/ 100 g of egg yolk, respectively.

It can be concluded that the quantitation of egg yolk cholesterol of Japanese quail by ELISA technique was more sensitive than the chemical one.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University