บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ไซโตไคนิน (Cytokinins, CKs)

การค้นพบฮอร์โมนกลุ่มนี้เริ่มจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1940-1950 แสดงให้เห็นว่ามีสารชนิดหนึ่งเกิดอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพาร์เรนไคมาในหัวมันฝรั่งกลับกลายเป็นเนื้อเยื่อเจริญได้ ซึ่งแสดงว่าสารชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์ต่อมา มีการพบว่าน้ำมะพร้าวมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์เนื้อเยื่อของหัวแครอท (Srivastava, 2001)

นักวิทยาศาสตร์หลายท่าน ทำการทดลองในสหรัฐอเมริกา โดยการศึกษาความต้องการสิ่งที่ใช้ในการเจริญเติบโตของกลุ่มก้อนของเซลล์ (callus) ซึ่งเป็นเซลล์ที่แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับ pith ของยาสูบและรากของ แครอท จากผลการทดลองนี้ทำให้ได้รู้จักไซโตไคนิน (ในระยะปี ค.ศ. 1950) ต่อมาได้ค้นพบสารที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ pith ของยาสูบและเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยได้จาก autoclaved DNA จึงให้ชื่อว่า ไคเนติน (kinetin) (Srivastava, 2001)

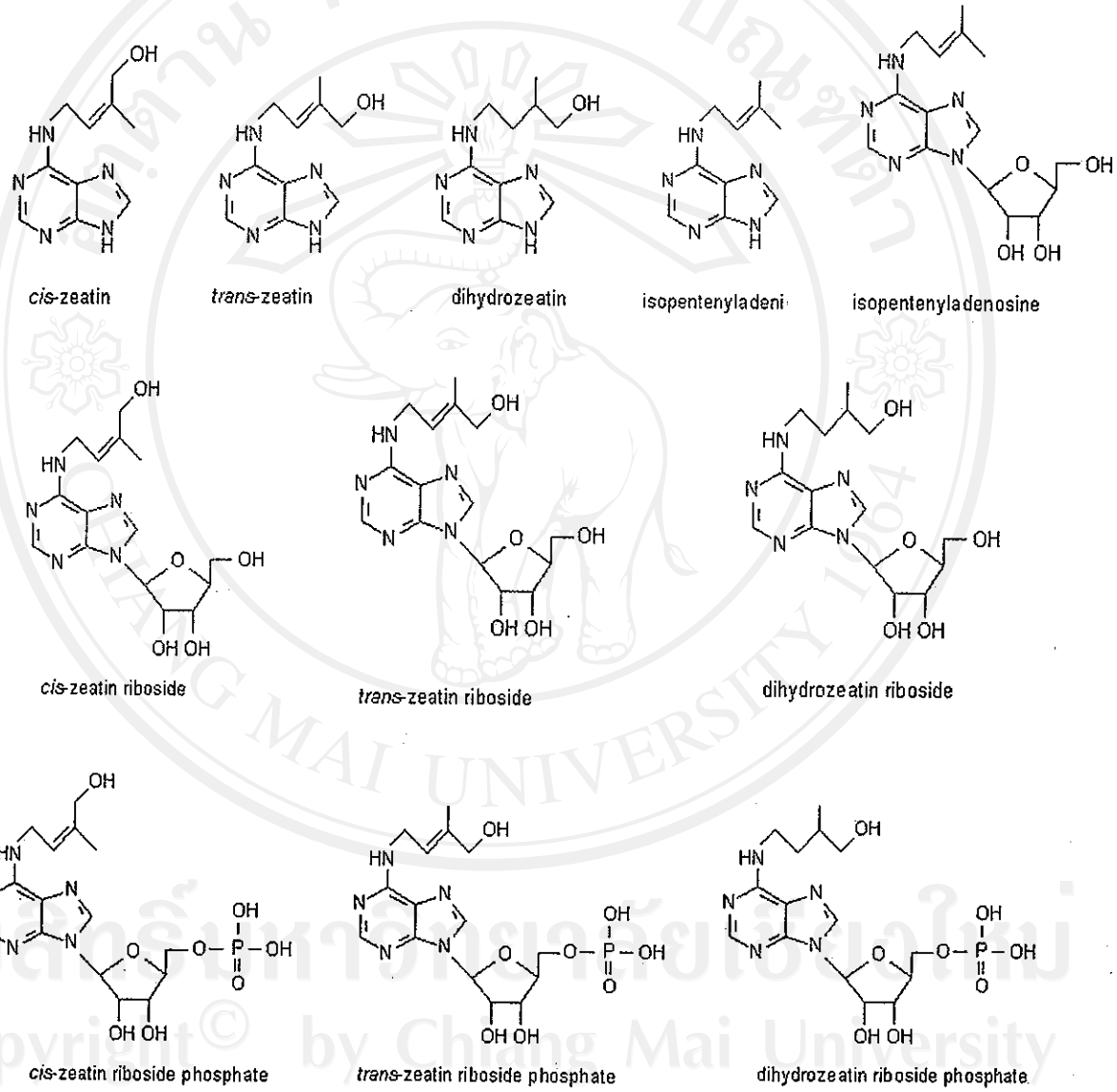
ไซโตไคนินที่พบส่วนมากในธรรมชาติ คือ ซีเอติน (zeatin) ซึ่ง Zeatin และไซโตไคนินในธรรมชาติเกิดจาก ribosides หรือ ribotides ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพของเนื้อเยื่อ ไซโตไคนินมักมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของยอดและรากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การเจริญเติบโตของคลอโรพลาสต์ (Hopkins and Huner, 2004) และการเสื่อมสภาพ (senescence) ของพืช (Gen and Richard, 1995)

โครงสร้างของไซโตไคนิน

ในธรรมชาติโดยทั่วไป ไซโตไคนินจะประกอบด้วย วงแหวนอะดีนีนมี side chain ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอมเกาะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 ของวงแหวนอะดีนีน ไซโตไคนินในธรรมชาตินอกจากซีเอตินแล้ว ยังสามารถสร้าง ไอโซเพนทีนิล อะดีนีน และการลดรูปของซีเอตินได้เป็นไดไฮโดรซีเอติน เนื่องจากส่วน side chain ของซีเอตินมีพันธะคู่ เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นไอโซเมอร์ได้เป็น ซิส-ซีเอติน (*cis*-zeatin) และทราน-ซีเอติน (*trans*-zeatin) โครงสร้างของอะดีนีนหากมีน้ำตาลไรโบส (ribose) มาเกาะจะเป็นโครงสร้างของอะดีโนซีน และหากมีน้ำตาลไรโบสที่มีอนุพันธ์ของฟอสเฟสเกาะอยู่ด้วย จะเป็นโครงสร้างของ อะดีโนซีน 5' ฟอสเฟส ซึ่งเป็นโครงสร้างปกติที่พบในพืช โดยไรโบสมักจับกับ N ตำแหน่งที่ 9 ของวงแหวนอะดีนีน ดังนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในธรรมชาติจะพบอนุพันธ์ของน้ำตาลคือ N^9 riboside และ ribotide (น้ำตาลที่มีกลุ่มของฟอสเฟส) โดยทั่วไปแล้ว การเปลี่ยนสภาพของวงแหวนอะดีนีนจะเป็นผลให้เกิดการลดประสิทธิภาพของไซโตไคนิน ดังนั้นอนุพันธ์ที่เป็นไรโบไทด์หรือไรโบไซด์ (Ribotide หรือ Riboside) ของไซโตไคนินจึงมีประสิทธิภาพต่ำกว่าไซโตไคนินอิสระ การมีสารอื่นไปเกาะโมเลกุลของอะดีนีนจะลดคุณสมบัติของไซโตไคนินลง (Srivastava, 2001)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไซโตไคนิน (Srivastava, 2001; Hopkins and Huner, 2004)

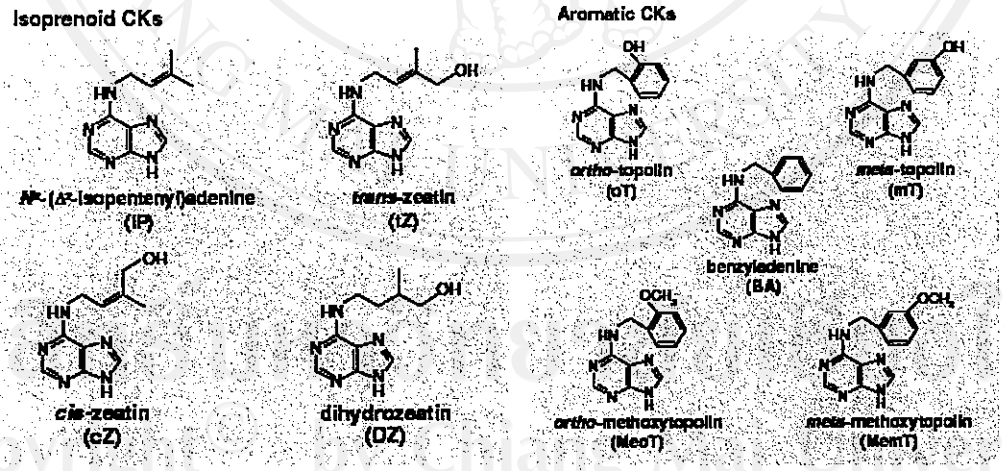
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเคราะห์ไซโตไคนิน

แหล่งที่มีการสังเคราะห์ไซโตไคนินในพืชที่สำคัญ คือ ราก ปริมาณไซโตไคนินจะพบมากที่ราก โดยเฉพาะปลายราก ใน xylem sap ของราก embryos ที่กำลังพัฒนาและตายอด พืชจะลำเลียงไซโตไคนินขึ้นไปด้านบนผ่านทางท่อน้ำ (xylem) การสังเคราะห์ไซโตไคนินเกิดขึ้นจากการลดลงของ isopentenyl group และ amino group ของ adenosine monophosphate ซึ่งมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ Isoprenoid และ Aromatic (ภาพที่ 2) โดยการ hydroxylate ต่อมาพบว่ากลุ่มของไซโตไคนินเกิดขึ้นบน t-RNA ได้ และเมื่อใช้เมวาโลเนต (mevalonate, MVA) ที่มีสารกัมมันตรังสีจะสามารถไปรวมกับกลุ่มอะดีนีนของ t-RNA เกิดเป็นไดเมทธิลอัลลิล (dimethylally side chain) เกาะด้านข้าง ในเชื้อรา *Rhizopus* นั้น dimethylallyl adenine สามารถเปลี่ยนไปเป็น zeatin ได้ จึงคาดกันว่า Zeatin อาจจะเกิดจากการออกซิไดซ์ dimethylallyl adenine (Hopkins and Huner, 2004)

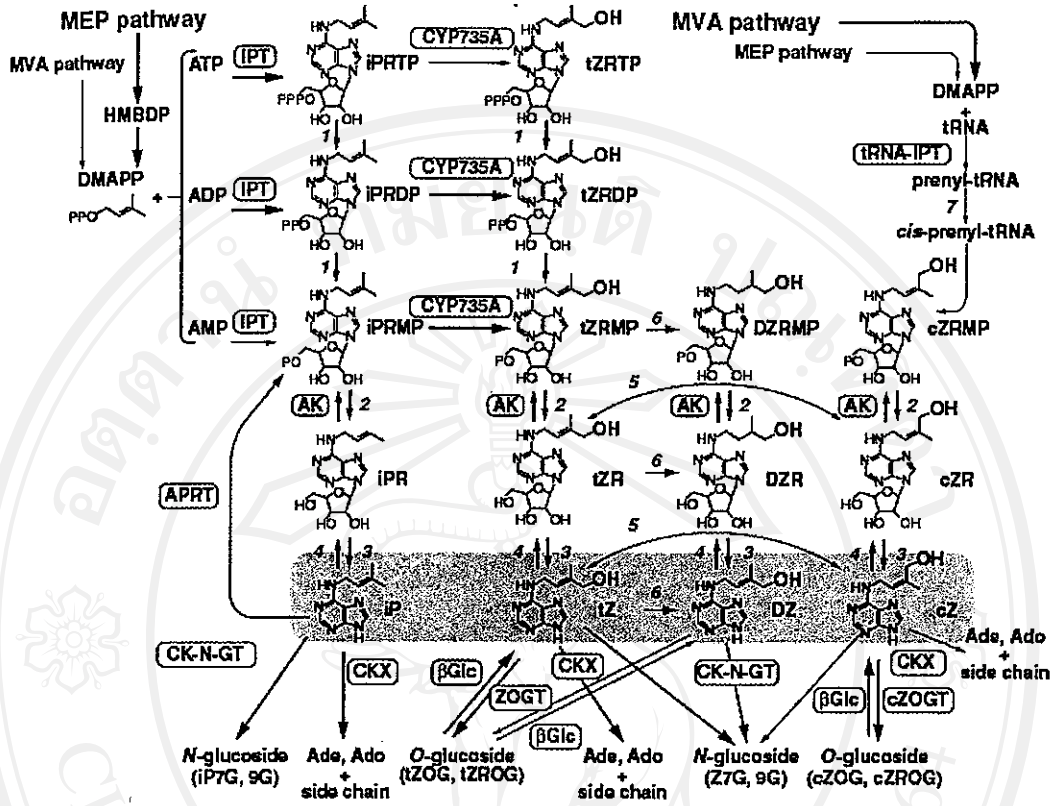
นอกจากนั้น Sakakibara (2006) ยังพบเส้นทางการสังเคราะห์ไซโตไคนินใน *Arabidopsis* ที่เกิดขึ้นในวิถี methylerythritol phosphate (MEP) และ mevalonate (MVA) (ภาพที่ 3)

Hwang and Sakakibara (2006) กล่าวว่าไซโตไคนินสามารถสังเคราะห์ได้ทั้งในพืชและ Acrobacterium แต่สารตั้งต้นในการสังเคราะห์แตกต่างกัน



ภาพที่ 2 โครงสร้างของไซโตไคนินที่อยู่ในรูปของ Isoprenoid และ Aromatic (Sakakibara, 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 รูปแบบจำลองวิถีของการสังเคราะห์ไซโตไคนิน ในต้น *Arabidopsis* โดยผ่านวิถี methylerythritol phosphate (MEP) และ mevalonate (MVA) (Sakakibara, 2006)

การเคลื่อนที่ของไซโตไคนิน

ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดเกี่ยวกับการเคลื่อนย้าย จากการทดลองพบว่าระบบรากเป็นส่วนสำคัญในการส่งไซโตไคนินไปยังใบ และช่วยป้องกันการเสื่อมสลายของใบก่อนระยะอันสมควร เป็นหลักฐานที่สำคัญที่ชี้ให้เห็นว่า ไซโตไคนินมีการเคลื่อนที่ขึ้นสู่ยอด ยิ่งไปกว่านั้นยังพบไซโตไคนินในท่อน้ำ ซึ่งมาจากระบบรากด้วย ในทางตรงกันข้ามไซโตไคนินที่พบในผลที่กำลังเจริญเติบโตไม่เคลื่อนที่ไปส่วนอื่นเลย ในทำนองเดียวกันจากการศึกษาการใช้ไซโตไคนินจากภายนอก เช่น หากให้ไคเนติน พบว่าการเคลื่อนย้ายจะเกิดช้าหรือไม่เกิด แม้ว่าสารอื่นๆ จะเคลื่อนย้ายออกจากจุดนี้ก็ตาม (Neuman *et al.*, 1990) มีหลักฐานจำนวนมากกล่าวว่าไซโตไคนินอาจจะเคลื่อนย้ายในรูปที่รวมกับสารอื่นๆ เช่น น้ำตาล (ribosides หรือ glucosides) ซึ่งไซโตไคนินในรูปที่รวมกับน้ำตาลนั้นพบเสมอในท่อน้ำท่ออาหาร (Hopkins and Huner, 2004) Nooden *et al.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1993) พบว่าการเคลื่อนย้ายของไซโตไคนินในไซเล็มพบอยู่ในรูป zeatin riboside เป็นส่วนใหญ่ เมื่อเคลื่อนย้ายถึงใบจึงเปลี่ยนเป็นรูปไซโตไคนินอิสระหรือ cytokinin glucosides

ฮอร์โมนไซโตไคนินที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของไม้ผล

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับบทบาทไซโตไคนินภายในพืช พบว่า ลิ้นจี่ที่อยู่ในช่วงการพักตัวจะพบการสะสมไซโตไคนินในรูปของ zeatin และ zeatin riboside ภายในตายอดและท่อลำเลียงน้ำ (Menzel and Waite, 2005 ; Liang *et al.*, 1983) จากการศึกษาพบว่าไซโตไคนินมีปริมาณต่ำในระยะที่พืชมีการแตกใบอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับระยะออกดอก (Chen *et al.*, 1997; Hegele *et al.*, 2004) แต่ในระยะการพัฒนาทางด้านการสืบพันธุ์ สารในกลุ่มไซโตไคนินมีผลในการกระตุ้นการสร้างตาดอก (Bangerth and Gruber, 2000) ไซโตไคนินสามารถชักนำการเกิดตาดอก โดยทดแทนวันยาวให้กับพืช ในขณะที่อยู่ในช่วงวันสั้น โดยประสิทธิภาพของ 6-benzylaminopurine > zeatin > kinetin > 6-(3-methylbut-2-enylamino) purine > SD 8333 ซึ่งปริมาณที่ทำให้มีการออกดอกมากที่สุดคือการใช้ในปริมาณ 0.01-0.1 ppm. (Zeevaart, 1978)

จากรายงานของ Chen (1997) พบว่าไซโตไคนินในยอดลำไยมีปริมาณมากในช่วง flower bud initiation (มกราคม) ในลำไยที่ออกดอกด้วยการชักนำแบบธรรมชาติ โดยอุณหภูมิต่ำ แต่ยังไม่สามารถระบุที่มาของแหล่งของไซโตไคนินที่เพิ่มขึ้นในยอดลำไย ซึ่งได้ตั้งสมมุติฐานว่าอาจมาจากรากแล้วเปลี่ยนแปลงรูปที่ใบแล้วจึงเคลื่อนที่ไปสู่ยอด หรือปริมาณไซโตไคนินนั้นได้มาจากการไฮโดรไลท์จากโมเลกุลของไซโตไคนินที่จับกับโมเลกุลอื่น (Conjugated form) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่แอกทีฟ (Inactive molecule) โดยเฉพาะในรูปของ O-glucoside O' Hare (2002) พบว่าระดับ zeatin riboside จะสูงในช่วงที่ยอดลิ้นจี่มีการพักตัว อาจเป็นไปได้ว่าการเจริญของรากช่วยสนับสนุนทำลายการพักตัวผ่านการสังเคราะห์ cytokinin นอกจากนั้นดรุณี (2539) พบว่าปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินเพิ่มขึ้นในช่วงก่อนการออกดอกและแตกใบอ่อนมีปริมาณที่ต่ำในสัปดาห์ที่ 9 ก่อนการออกดอกและแตกใบอ่อน และปริมาณเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 7 และจะคงที่ไปถึงสัปดาห์ที่ 5 ของการออกดอกของต้นลิ้นจี่ เช่นเดียวกับ Chen (1987) พบว่า ปริมาณไซโตไคนินในท่อลำเลียงน้ำของมะม่วงสูง ในระยะที่ตาดอกเริ่มมีการพัฒนา ไปจนสูงที่สุดในระยะที่มีการบานของดอกทั้งหมด (full bloom) หลักฐานล่าสุดที่ชัดเจนของการเพิ่มปริมาณไซโตไคนินในยอดของลำไยที่ชักนำโดยอุณหภูมิต่ำ และการชักนำโดยโพแทสเซียมคลอเรต ($KClO_3$) (Hegele *et al.*, 2004; Potchanasin *et al.*, 2009) โดยเฉพาะอย่างยิ่งทั้งรูป Zeatin, Zeatin riboside เพิ่มขึ้นมากหลังจากต้นลำไยได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรต หากไม่มีการเพิ่มของปริมาณไซโตไคนิน ต้นลำไยจะไม่ออกดอก (Sringarm *et al.*, 2009; Potchanasin *et al.*, 2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การกระตุ้นให้ออกดอกชักนำทางธรรมชาติโดยอุณหภูมิต่ำ พบว่า ปริมาณไซโตไคนินในยอดที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มการเคลื่อนที่ของไอโซเพนทีนิล อะดีนีน และไอโซเพนทีนิล อะดีโนซีนออกจากใบโดยทางท่อลำเลียงอาหาร ซึ่งคาดว่าเคลื่อนที่ไปสู่ยอดลำไย เพื่อส่งสัญญาณการชักนำให้ออกดอก แต่ในกรณีการชักนำให้ออกดอกด้วยโพแทสเซียมคลอเรต ซึ่งชักนำให้เกิดการออกดอกนอกฤดูยังไม่สามารถระบุได้ว่าปริมาณไซโตไคนินที่เพิ่มขึ้นในยอดมากจากแหล่งใด เนื่องจากไม่พบการเคลื่อนที่ออกจากใบของทั้ง Zeatin, Zeatin riboside, isopentenyl adenine และ isopentenyl adenosine (Sringarm *et al.*, 2009)

จากสมมติฐานที่กล่าวว่า ไซโตไคนินมีส่วนเกี่ยวข้องกับการออกดอกทำให้นักวิจัยหลายท่านได้นำเอาสารสังเคราะห์ไซโตไคนินมาทดสอบกับพืชชนิดต่างๆ ดังเช่น Chen and Ku (1988) ได้พ่นไคเนตินทางใบที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับเอทธิฟอน 200 มิลลิกรัมต่อลิตรให้กับต้นลิ้นจี่พันธุ์ Hrak Yip ที่มีอายุ 5 เดือน พบว่าสามารถกระตุ้นการแตกตาดอกก่อนต้นที่ไม่ได้รับสารหนึ่งเดือน ส่วนต้นควบคุมไม่มีการออกดอก Chen (1991) พบว่าเมื่อผสมไคเนติน 100 ไมโครลิตร ในกรดซิตริก 1 โมล 5 ไมโครลิตร นำไปหยดใส่บนตาของลิ้นจี่นาน 1 สัปดาห์ ช่วง 6 สัปดาห์ก่อนการออกดอก พบว่าตาพัฒนาเป็นตาดอก และแตกตาเร็วกว่าต้นควบคุม 1 สัปดาห์ และเพิ่มการเกิดดอกมากกว่าต้นควบคุม Das *et al.* (1999) ได้ศึกษาในต้นลิ้นจี่ที่ได้รับสภาพอากาศเย็น พบว่า ต้นลิ้นจี่ที่ได้รับ benzyladenine (BA) จะมีการแตกตาและเกิดช่อดอกมากกว่าต้นควบคุม ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ไซโตไคนินเป็นฮอร์โมนที่อาจเกี่ยวข้องกับการชักนำการเกิดดอกในไม้ผล

การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินในพืช

การพัฒนาวิธีการสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินในเนื้อเยื่อพืชเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการอธิบายบทบาทของไซโตไคนินในเชิงวิทยาศาสตร์ เมื่อสิบปีที่ผ่านมามีการพัฒนาระบบการวิเคราะห์สำหรับการวิเคราะห์ที่รวดเร็วของปริมาณฮอร์โมนไซโตไคนินซึ่งเครื่องมือในการวิเคราะห์ที่พบจะประกอบไปด้วย (Petr *et al.*, 2009)

1. GC (Gas Chromatography) เป็นวิธีพื้นฐานที่มีความแม่นยำสูง และสามารถตรวจวัดได้แม้มีประมาณสารน้อย แต่เป็นวิธีที่มีความละเอียดต่ำและราคาแพง โดยพบว่า GC ใช้วิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนินตั้งแต่ปี 1970 ไซโตไคนินไม่ใช่สารระเหยแต่มีอนุพันธ์ที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการระเหยและช่วยให้เสถียรในความร้อนก่อนที่จะถูกวิเคราะห์ด้วย GC แต่วิธีการสร้างอนุพันธ์ดังกล่าวมักพบปัญหาอยู่เสมอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบัน GC-MS จะมีความจำเพาะในการจำแนกและหาปริมาณสารไซโตไคนินได้ดีขึ้น จนกระทั่งในปัจจุบันมีการใช้งานร่วมกันของ HPLC และ ระบบ MS เข้าด้วยกัน โดยโครงสร้างธรรมชาติของไซโตไคนินที่ค้นพบและถูกอธิบายอย่างชัดเจนด้วย GC-MS มีมาตั้งแต่ก่อนปี 1990

2. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ไซโตไคนิน ซึ่งไซโตไคนินจะถูกแยกตามลำดับความมีขั้วและตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว และตรวจวัดด้วย UV detector HPLC มีความสามารถในการทำให้ได้ไซโตไคนิน บริสุทธิ์จากตัวอย่างพืชที่ถูกสกัดมา ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยระบบ MS วิธี Immunoassay หรือ Bioassay การวิเคราะห์ด้วย HPLC เพียงอย่างเดียวสามารถระบุชนิดของไซโตไคนินในตัวอย่างพืชที่สกัดมาแล้วได้ อย่างไรก็ตาม การใช้ UV detector เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการหาปริมาณของไซโตไคนิน ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ MS หรือ LC-ELectrospray Ionization-MS (LC-ESI-MS) ด้วย

3. UPLC (Ultra-performance liquid chromatography) เครื่อง UPLC สามารถทำให้อัตราการไหลของของเหลวภายใต้ความดันเพิ่มขึ้นได้ถึง 1000 บาร์ และลักษณะการแพ็คคอลัมน์ประกอบด้วยอนุภาคสารหนา 1.7 μm ดังนั้น UPLC จะมีความสามารถในการแยกสารได้ค่าที่ดีกว่าคอลัมน์ของ HPLC ใช้อัตราการตอบสนองของเครื่องในระดับต่ำและแยกสารได้รวดเร็วกว่า

UPLC-MS จะมีความสำคัญเกี่ยวกับความสามารถในการคัดเลือก ความไว ความเร็วและความแน่นอน เหมาะสมของไซโตไคนิน

4. CE (Capillary electrophoresis) เป็นวิธีที่เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับวิเคราะห์ไซโตไคนิน ความเร็วเหมาะสม พลังในการแยกสูงและใช้ตัวอย่างและ buffer ในปริมาณที่น้อย ถึงแม้ว่าจะเคยมีตัวอย่างรายงานว่าประสบความสำเร็จ ค่าปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถวัดได้ของ CE ค่อนข้างสูงกว่าค่าที่ได้จาก HPLC และ GC ซึ่งผลที่ตามมาของการวิเคราะห์ที่ใช้ปริมาณน้อยและมักจะใช้ความยาวคลื่นสั้น ดังนั้นการใช้ CE ในการวิเคราะห์ไซโตไคนินต้องใช้ระดับความไวของเครื่องสูงโดยใช้ระบบตัวตรวจวัดที่มีความจำเพาะมากขึ้น เช่น ระบบ MS และต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้น

5. Immunoassays เป็นวิธีการหนึ่งสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน ซึ่งวัดได้ในระดับต่ำ วิธี immunoassay ถูกพัฒนาเพื่อวิเคราะห์ไซโตไคนิน ถึงอย่างไรก็ตาม ก็ยังมีปัญหาเกิดขึ้น มีรายงานว่า แอนติบอดีเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการตรวจวัดไซโตไคนินในเนื้อเยื่อพืช และโครงสร้างของเซลล์ต้องสม่ำเสมอ การทำปฏิกิริยาของวิธี immunoassay ต่อการตรวจวัดไซโตไคนิน เกิดขึ้นในระดับเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิค Immunoassay, RIA (Radioimunoassay) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) และ SPA (Scintillation proximity assay) มีความไว (sensitivity) ความแม่นยำสูง สามารถตรวจวัดในหน่วย nmol หรือ pmol วิเคราะห์ปริมาณสารได้จำนวนมากในเวลาเดียวกัน เป็นการประหยัดเวลา ซึ่งใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนิน RIA เป็นวิธีที่มีความไวมากที่สุด เทคนิคที่กล่าวของต้นต้องมีการจำกัดสารปนเปื้อนชนิดอื่น เช่น phenolic compound ซึ่งมีผลต่อการตรวจวัดด้วยเทคนิคดังกล่าว ดังนั้น ต้องมีเทคนิคการสกัดตัวอย่างที่ดีควบคู่กันไปอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค RIA ซึ่งมีปัญหาเกี่ยวกับต้องมีกระบวนการกำจัดสารเกี่ยวกับกัมมันตภาพรังสี กับ เทคนิค ELISA พบว่า เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่ประหยัดค่าใช้จ่ายและมีการติดตั้งที่ง่ายกว่า สำหรับการตรวจวัดไซโตไคนินวิธี ELISA สามารถตรวจวัดได้ในหน่วยของ fmol (10^{-15})

ข้อบกพร่องของเทคนิค immunoassay เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค LC-MS ในการตรวจวัดไซโตไคนิน พบว่า หากเลือกใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ เช่น โพลีโคลนอลแอนติบอดี มีค่าการเกาะเกี่ยวระหว่างโมเลกุลที่มีโครงสร้างคล้ายกันมาก จะทำให้ค่าที่ที่คำนวณออกมาจะรวมค่าของกลุ่มที่คล้ายกับไซโตไคนินด้วย เช่น free bases, ribosides, 9-glucosides และ nucleotides แต่อย่างไรก็ตาม ผลของการตรวจวัดและความไวที่ได้จากเทคนิค immunoassay ให้ผลที่ใกล้เคียงกับการใช้เทคนิค LC-MS ทำให้ปัจจุบันเทคนิค ELISA ถูกใช้ในการวิเคราะห์หาไซโตไคนินกันอย่างกว้างขวาง

เทคนิค Immunoassay กับสารควบคุมการเติบโตของพืช (Plant Growth Regulator, PGR)

ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคทางด้าน immunoassay มาใช้วิเคราะห์ในเชิงปริมาณภายในพืชที่มีสาร (metabolites) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Weiler, 1983) Fuch and Gertman (1974) ได้พยายามใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจวัดหาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยการใช้แอนติบอดี โดยวิธี ELISA แต่วิธีการ RIA และ ELISA มีการพัฒนาเพียงเล็กน้อยสำหรับการตรวจสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช แต่ในขณะนี้ผู้วิจัยเริ่มที่จะประยุกต์วิธีการตรวจวัดสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยวิธี immunoassay ในหลาย ๆ ที่ รวมถึงตามวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน

โดยเทคนิค immunoasaay จะสามารถตรวจวัดปริมาณสาร metabolites ที่มีอยู่ในปริมาณเล็กน้อยได้ แม้ว่าในสารละลายจะไม่บริสุทธิ์หรือมีจำนวนตัวอย่างไม่มากก็ตาม ซึ่งวิธีการนี้สามารถที่จะนำมาทดแทนวิธีการ bioassay ของการวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Yalow and Berson (1960) กล่าวไว้ว่า พื้นฐานของเทคนิค immunoassay เป็นการแข่งขันของแอนติเจนซึ่งติดฉลาก (label) ไว้ ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และแอนติเจนหรือตัวอย่างที่ไม่ทราบปริมาณที่แน่นอน ที่บริเวณตำแหน่ง binding site ของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงและมีจำนวนจำกัด ปัจจัยที่จะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการดังกล่าว คือ ก) ต้องมี specific antiserum โดยการนำเอา antigen protein conjugate ไปกระตุ้นในกระต่าย ข) ต้องมีแอนติเจนที่ติดฉลากหรือมีแอนติเจนที่มี การทำงานคล้ายคลึงกัน ค) ต้องมีประสิทธิภาพที่จะแยก antibody-bound จากแอนติเจนอิสระโดยไม่รบกวนการเกิดปฏิกิริยา

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์สำหรับวิธีการตรวจวัดแบบวิธี immunoassay เนื่องจากมีความสามารถจับกัน (affinity) ระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีได้สูง โดยจับกันได้อย่างเฉพาะเจาะจง

สำหรับโครงสร้างของแอนติเจนที่มีความสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immunogen) และคุณสมบัติของ antiserum นั้น เนื่องจากสารควบคุมการเจริญเติบโตจะมีน้ำหนักมวลโมเลกุลค่อนข้างต่ำ จึงทำให้ต้องมีการสังเคราะห์ protein conjugate ของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนี้ เพื่อนำไปใช้ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ซึ่งวิธีการสังเคราะห์นี้จะเปลี่ยนลักษณะโครงสร้างของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชด้วยการเลือกตำแหน่ง coupling site โดยส่วนใหญ่จะดูคุณสมบัติของ antisera ที่บริเวณตำแหน่ง coupling site หรือตำแหน่งใกล้เคียงกัน

วิธีการเลือกเทคนิคการติดฉลาก จะใช้ H^3 , I^{125} และเอนไซม์ (เช่น alkaline phosphatase, aP) มาใช้ในการติดฉลากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งวิธีการเลือกจะขึ้นอยู่กับลักษณะของงานที่ต้องการวิเคราะห์ โดยวิธีการ RIA จะมีความแม่นยำกว่าวิธี ELISA แต่ ELISA จะมีความตอบสนองที่ดีกว่า ที่ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ในปริมาณที่มาก (Atzon and Weiler, 1983) แต่อย่างไรก็ตาม ก็พบว่าวิธีการ ELISA นี้ มีความน่าเชื่อถือที่น้อยกว่าซึ่งการติดฉลากเอนไซม์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนที่มีความสัมพันธ์กับแอนติเจนที่ไม่ได้ติดฉลากเอาไว้ ซึ่งลักษณะดังกล่าว ต้องทำอย่างระมัดระวังในการวิเคราะห์แบบ ELISA ส่วนวิธีการ RIA อาจเป็นวิธีการแรกที่จะใช้เป็นตัวเลือกในการวิเคราะห์ immunoassay

การเลือกสภาพที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ เพื่อที่จะได้วิธีการตรวจวัดที่เหมาะสม มีความจำเป็นที่ต้องเปลี่ยนลักษณะแอนติเจนโดยการใช้สารเคมีก่อนที่จะทำการตรวจวิเคราะห์ เช่น ถ้ามีการใช้ carboxyl group มาสังเคราะห์ทำเป็น immunogen เช่น IAA และ GA ดังนั้นต้องมี antisera ที่จะทำปฏิกิริยากับ antigen carboxylates โดยอาจจะมีการเติมกรดหรือการทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

methylation เพื่อกำจัดประจุออกไป นอกจากนี้ IAA ที่มีแอนติเจนขนาดเล็กนั้น อาจจะไม่สามารถใช้ประโยชน์ที่ตำแหน่ง binding site ของแอนติบอดีอย่างเต็มที่ ซึ่งลักษณะดังกล่าว จะพบว่าตำแหน่ง coupling site ของแอนติเจนของ immunogen และ ความเชื่อมโยงของโปรตีนกับแอนติเจนอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของพื้นที่ในการ binding ของแอนติบอดี การเปลี่ยนอนุพันธ์ของแอนติเจนที่เหมาะสมอาจถูกนำมาใช้ในการเพิ่มลักษณะ affinity กับแอนติบอดีเหล่านี้ และเพื่อเป็นการพัฒนาลักษณะความจำเพาะเจาะจงและความไวต่อการตอบสนองต่อการตรวจวิเคราะห์

เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

เทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา ซึ่งกระทำโดยนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีติดบนพื้นผิวตัวกลาง (solid-phase) ที่สามารถดูดแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้ เช่น polystyline และ polyvinyl เทคนิคนี้ใช้หลักการของปฏิกิริยา 2 ชนิด คือ ปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี และเอนไซม์กับสับสเตรท (substrate) เทคนิค ELISA มีหลายชนิดแต่ละเทคนิคขึ้นอยู่กับการเลือกใช้งานว่าผู้ใช้ต้องการตรวจสอบแอนติเจนหรือแอนติบอดี เทคนิคที่นิยมใช้งาน ได้แก่ Indirect method มักใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่าง ๆ Double antibody sandwich method ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน และ Compettitive binding method วิธีการนี้ตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี โดยเป็นการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่มีเอนไซม์ติดฉลากอยู่กับแอนติเจนที่มาจากสารละลายมาตรฐานหรือจากตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ เพื่อจะแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่มีปริมาณจำกัด หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกแล้วจะวัดการทำงานของเอนไซม์โดยการเติม substrate ลงไป แล้วเก็บไว้ในสภาพที่เหมาะสม จึงนำมาวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะได้สัดส่วนที่ผกผันกันกับปริมาณแอนติเจนเมื่อต้องการทราบปริมาณสารก็นำค่าความเข้มข้นของสีของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

องค์ประกอบต่าง ๆ ในระบบของ ELISA (รัชนีวรรณ, 2550)

Solid-phase เป็นพลาสติก microplate ที่เตรียมมาสำหรับการทำ ELISA ปกติจะมีทั้งหมด 8x12 หลุม ออกแบบมาให้ใช้งานได้เหมาะสมกับ multichannel pipets

Antibody sorption เป็นขั้นตอนการเติมแอนติเจนหรือแอนติบอดี ที่ละลายอยู่ใน buffer ลงไปใน solid phase เพื่อให้เกิดการเกาะติดที่ solid phase

Washing คือ การล้างเอาแอนติเจน หรือแอนติบอดี ที่ไม่ทำปฏิกิริยากันออกจากระบบ เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อผลการวัดที่จะออกมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Antigen เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ร่างกายสัตว์หรือสิ่งแปลกปลอมที่สามารถกระตุ้นระบบสร้างภูมิคุ้มในตัวสัตว์ให้ตอบสนองโดยการสร้างภูมิคุ้มกัน ที่เรียกว่าแอนติบอดี

Antibody เป็นโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นมา เพื่อมาจับกับแอนติเจน ที่เป็นสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูง เป็นองค์ประกอบที่สำคัญเพื่อช่วยให้การวัดในระบบ ELISA เป็นไปได้อย่างแม่นยำ และถูกต้องมากที่สุด

Enzyme ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยากับ substrate เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีในระบบขึ้นมา

Substrate เป็นสารที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา

Stopping เป็นสารเคมีที่ใช้หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate ทำให้หยุดการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อต้องการอ่านผล

Reading การอ่านผลโดยใช้ spectrophotometer หรือใช้เครื่อง microplate reader เมื่อต้องการวัดออกมาเป็นค่าของตัวเลขหรืออ่านโดยใช้ตาเปล่าเมื่อต้องการดูผลว่ามีหรือไม่มีแอนติเจนหรือแอนติบอดี ที่ต้องการหา

ระบบในการทำ ELISA แบ่งออกเป็น 3 ระบบ ดังนี้ (รัชนีวรรณ, 2550)

1. Direct ELISA

เป็นการทำ ELISA ที่ง่ายที่สุดแบบตรงไปตรงมา โดยละลายตัวอย่างที่มี แอนติเจนที่ต้องการหาใน buffer แล้วเติมลงใน solid phase หลังจากบ่มไว้ให้แอนติเจน จับกับ Solid-phase แล้วจึงล้างเอาส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer เพื่อปิดพื้นที่ว่างของ solid-phase เพื่อไม่ให้ protein ชนิดอื่น ๆ มาจับ solid phase ได้ จากนั้นจึงบ่ม แล้วล้างออก เติมแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ (Ab-Enz) ที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน ที่ต้องการหาบ่มไว้ จากนั้นล้าง Ab-Enz ส่วนเกินที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก เติม substrate และบ่มไว้ เติม stopping และอ่านผลการทำ ELISA วิธีนี้จะใช้ได้เมื่อแอนติเจน ที่ต้องการหาสามารถยึดเกาะกับ solid-phase ได้ และมี Ab-Enz ที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน

2. Indirect ELISA

เป็นการทำ ELISA อีกแบบหนึ่งที่ใช้กันมากสำหรับวัดปริมาณแอนติบอดี โดยละลายแอนติเจน ใน buffer แล้วเติมลงใน solid phase หลังจากบ่มไว้ให้แอนติเจนจับกับ solid-phase แล้วจึงล้างเอาส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer บ่มไว้ แล้วล้างออก เติมตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่เป็น serum ที่มี แอนติบอดี ที่ต้องการวัด บ่มไว้ ล้างเอาแอนติบอดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนเกิน รวมทั้งสารชนิดอื่นๆ ออก เติม Anti-Ab-Enz ที่จับได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับ แอนติบอดี ที่ต้องการวัด บ่มไว้ ล้างเอา Anti-Ab-Enz ส่วนเกินออก เติม substrate และบ่มไว้ เติม stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากสามารถวัด แอนติบอดี ใน serum ได้ ซึ่งใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้อย่างแม่นยำ และมีการผลิต Anti-Ab-Enz ออกมาขายมากมาย ทำให้สะดวกในการเลือกใช้ รวมทั้งสามารถเลือกวัด แอนติบอดี ชนิดต่างๆ ได้ เช่น Anti-IgM, Anti-IgG1, Anti-IgG2 เป็นต้น

3. Sandwich ELISA

เป็นการทำ ELISA ที่ใช้สำหรับวัด แอนติเจน ที่ไม่สามารถยึดเกาะกับ solid-phase ได้ โดยแบ่งย่อยออกได้อีก 2 ชนิด ดังต่อไปนี้

3.1 Direct sandwich ELISA

เติม แอนติบอดี ตัวที่ 1 ที่ละลายใน buffer ลงใน solid-phase บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารตัวอย่างที่มี แอนติเจน ที่ต้องการวัด บ่มไว้แล้วล้างออก เติม Ab-Enz ลงไป บ่มไว้ แล้วล้างเอาส่วนเกินออก เติม substrate บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติม stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้ใช้แอนติบอดี 2 ตัวในระบบ ซึ่งทำให้เกิดข้อจำกัดบางประการได้แก่ แอนติเจน หรือตัวอย่างที่ต้องการวัดจำเป็นต้องมีบริเวณที่ แอนติบอดี เข้าจับ หรือที่เรียกว่า antigenic site มากกว่า 2 บริเวณ เพื่อให้แอนติบอดีเข้าจับได้หรืออีกกรณีหนึ่ง คือ แอนติบอดี ทั้ง 2 ตัวที่ใช้ มีบริเวณจับหรือ epitope site บนแอนติเจน นั้นแตกต่างกัน รวมทั้ง แอนติเจน ต้องมีขนาดใหญ่พอสมควร เพื่อให้ แอนติบอดี 2 ตัวเข้าจับได้

3.2 Indirect sandwich ELISA

เป็นการทำ ELISA ที่มีขั้นตอนคล้ายกับ direct sandwich ELISA แต่ต่างกันที่ แอนติบอดี ตัวที่ 2 ไม่ได้ จับกับ Enz ทำให้ระบบต้องมี Anti-Ab ตัวที่ 2 – Enz เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ตัว โดยเติม แอนติบอดี ตัวที่ 1 ที่ละลายใน buffer ลงใน solid-phase บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารตัวอย่างที่มี แอนติเจน ที่ต้องการวัด บ่มไว้แล้วล้างออก เติม แอนติบอดี ตัวที่ 2 ลงไป บ่มไว้ แล้วล้างเอาส่วนเกินออก เติม Anti-Ab ตัวที่ 2 – Enz ลงไป บ่มไว้ แล้วล้างออก เติม substrate บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติม stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้นอกจากข้อจำกัดที่คล้ายกับ direct sandwich ELISA แล้ว ยังมีข้อจำกัดอีกประการคือ Anti-Ab-Enz ต้องไม่จับกับ แอนติบอดี ตัวที่ 1 ที่ใช้ในระบบ ดังนั้น ส่วนใหญ่แล้ว แอนติบอดี ตัวที่ 1 และ แอนติบอดี ตัวที่ 2 ต้องมาจากสัตว์ต่าง species กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Competition ELISA

เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ แอนติบอดี หรือ แอนติเจน 2 ตัวแย่งกันจับกับ แอนติเจน หรือ แอนติบอดี โดยวิธีนี้รวมถึงการวิเคราะห์ ELISA แบบ inhibition หรือ blocking assay ต่างกันเล็กน้อยตรงที่ competition ELISA จะเติมแอนติบอดีหรือแอนติเจนพร้อมกัน 2 ตัว แล้วจึงบ่มให้แย่งกันจับแต่ inhibition หรือ blocking assay จะเติมแอนติบอดีหรือแอนติเจน ทีละตัวเป็นลำดับ (Crowther, 1995)

ตามปกติแล้ว Competitive ELISA เป็นวิธีการทดสอบที่มักจะใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดยอาศัยหลักการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (antigen-enzyme conjugate) หรือใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ (antibody-enzyme conjugate) เป็นตัวกระทำ (reagent) ในการทดสอบก็ได้ (นภาธร, 2536)

ก. Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ วิธีการทดสอบนี้มีหลักการ ดังนี้ คือ เคลือบ solid-phase ด้วยแอนติบอดีปริมาณจำกัดคงที่ปริมาณหนึ่ง เติมแอนติเจนที่จำเพาะกับแอนติบอดีนี้และได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์แล้วลงในหลอดทดลองนั้นแต่เพียงอย่างเดียว หรือเติมพร้อมกับสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งทราบว่า จำเพาะกับแอนติบอดีนั้นเช่นเดียวกันแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และใช้แอนติเจนมาตรฐานนี้ในปริมาณต่าง ๆ เมื่อทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจนถึงสภาพคงที่ (equilibrium) แล้ว ล้างแอนติเจนส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีออก วัดการทำหน้าที่ของเอนไซม์ที่ยังคงติดอยู่กับพื้นผิวหลอดทดลองนั้นโดยการเติม substrate ลงไปและดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จะพบว่า ในหลอดทดลองที่มีแอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาปริมาณ มีการเปลี่ยนแปลง substrate น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวแย่งจับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิวด้านในของหลอดทดลอง ทำให้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีนั้นได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อเติม substrate ลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate จึงเกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนมาตรฐานหรือแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาปริมาณที่เติมลงไปในหลอดทดลองนั้น วิธี Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติเจนติดฉากด้วยเอนไซม์ เป็นตัวกระทำในการทดสอบนี้ มีที่ใช้ในการวัดปริมาณของยา ฮอร์โมนและไขมันในสารน้ำต่าง ๆ ของร่างกาย แต่ในการหาปริมาณของแอนติเจนบางอย่าง ซึ่งเป็นแอนติเจนชนิดที่จะเตรียมให้บริสุทธิ์ในปริมาณมาก เพื่อจะนำมาติดฉลากด้วยเอนไซม์นั้นทำได้ลำบาก เช่น ในกรณีแอนติเจนของเชื้อจุลชีพ (นภาธร, 2536)

ข. Competitive ELISA ซึ่งใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ วิธีการทดสอบนี้มีหลักการ คือ เคลือบ solid-phase ด้วยแอนติเจน เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงไปในปริมาณจำกัดและคงที่แต่เพียงอย่างเดียว หรือเติมสิ่งส่งตรวจที่ต้องการตรวจหาปริมาณแอนติเจน หรือแอนติเจนมาตรฐานปริมาณต่าง ๆ ลงไปด้วยพร้อมกับแอนติบอดีนั้น ในหลอดทดลองที่เติมแอนติเจนลงไปด้วย แอนติเจนจะแย่งจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ทำให้แอนติบอดีนั้นจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่บน solid-phase ได้น้อยลง ดังนั้น เมื่อล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจากหลอดทดลองนั้นแล้วและเติม substrate ลงไป การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจหรือแอนติเจนมาตรฐานที่เติมลงไปนั้น การทดสอบนี้มีข้อที่ควรคำนึง คือ ในกรณีที่สิ่งส่งตรวจมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้เคลือบ solid phase อยู่ด้วย แอนติบอดีนี้สามารถจับกับแอนติเจนดังกล่าว และจะขัดขวางมิให้แอนติเจนจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นผลบวกเท็จขึ้นได้ ปัญหาที่สำคัญเมื่อเลือกใช้วิธี competitive ELISA คือ การที่จำเป็นต้องเติมสิ่งส่งตรวจ เช่น ปัสสาวะ เซรุ่ม ลงไปในหลอดทดลองพร้อม ๆ กับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (conjugate) ในสิ่งส่งตรวจเหล่านี้มี protease และอาจมีตัวยับยั้งการทำหน้าที่ของเอนไซม์ (non-competitive enzyme inhibitor) อยู่ด้วย สารเหล่านี้อาจทำให้การทำหน้าที่ของเอนไซม์ที่ใช้ติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีมีการเปลี่ยนแปลงไปได้ แต่จะไม่พบปัญหานี้เมื่อใช้วิธี non-competitive ELISA เนื่องจากการเติม conjugate ลงไปในหลอดทดลองจะกระทำหลังจากแยกเอาสิ่งส่งตรวจออกแล้ว (นภาธร, 2536)

ปัจจัยที่มีผลต่อ ELISA ตามปกติ เมื่อจะใช้การทดสอบใดจะต้องคำนึงถึงสมบัติของการทดสอบนั้นในเรื่องของความไว (sentivity) ความจำเพาะ (specificity) และ ความสามารถในการประเมินซ้ำ (reproducibility) โดยหลักการแล้วสมบัติเหล่านี้ของ ELISA ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ คือ solid-phase ที่ใช้สำหรับยึด (immobilize) แอนติเจนหรือแอนติบอดี, เอนไซม์ที่ใช้ในการติดฉลาก และประสิทธิภาพของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับเอนไซม์ที่ติดฉลากซึ่งใช้ในการทดสอบนั้น

วัสดุสำหรับยึดแอนติเจนหรือแอนติบอดี (solid phase)

ในวิธี ELISA วัสดุที่ใช้สำหรับยึดแอนติเจนหรือแอนติบอดีมีความสำคัญมากต่อผลของการทดสอบ ถ้าแอนติเจนหรือแอนติบอดีจับกับวัสดุนั้นได้ไม่ดีพอ จะมีผลทำให้การทดสอบมีความไวลดลง และพบได้บ่อย ๆ ว่าเป็นเหตุให้การทดสอบนั้นมี background สูงขึ้นด้วย ในกรณีที่การจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับวัสดุนั้นเกิดขึ้นอย่างไม่สม่ำเสมอ จะเป็นเหตุให้ reproducibility ของการทดสอบลดลง ซึ่งจะทำให้ความน่าเชื่อถือของการทดสอบนั้นลดลงด้วย ความสามารถของวัสดุต่าง ๆ ในการยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีเกี่ยวข้องกับลักษณะทั้งทางเคมีและฟิสิกส์ของวัสดุนั้น ความสามารถนี้จึงเปลี่ยนแปลงไปได้ในระหว่างขั้นตอนของการผลิตจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรงงานและการเก็บรักษาก่อนที่จะนำมาใช้ ในปัจจุบันนี้มีวัสดุหลายชนิดที่ใช้สำหรับการยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยไม่ได้ใช้ covalent bond ในการจับนั้น ได้แก่ polyvinyl, polypropylene, polystyrene, polycarbonate, แก้ว, nylon silicone rubber สำหรับพวกที่เป็นพลาสติกนั้นมีการประดิษฐ์ให้อยู่ในรูปต่าง ๆ เช่น เป็น tube, cuvette, beads, microplate ซึ่งทำให้ง่ายต่อ การล้างในระหว่างขั้นตอนของการทดสอบ เพราะไม่ต้องปั่นก่อนล้างซึ่งต่างจากวัสดุที่อยู่ในรูปของ particle วัสดุที่ใช้ยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่นิยมใช้กันแพร่หลาย คือ พวกที่อยู่ในรูป microplate การจับของแอนติเจนหรือของแอนติบอดีกับผิววัสดุนี้มีความผันแปรแตกต่างกันไปได้นับตั้งแต่ระหว่างเพลทที่ทำด้วยวัสดุต่างชนิดกัน เพลทที่ทำด้วยวัสดุชนิดเดียวกันแต่ผลิตจากต่างโรงงานกัน เพลทที่ผลิตออกมาจากโรงงานเดียวกันแต่ต่างรุ่นกันหรือแม้กระทั่งเพลท ในรุ่นเดียวกันหรือภายในเพลทเดียวกันแต่ต่างหลุมกันก็พบความแตกต่างดังกล่าวนี้ได้ ดังนั้นการจะเลือกใช้เพลทชนิดใดก็แล้วแต่ระบบของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จะทำการทดสอบ แต่ควรจะคงใช้เพลทชนิดเดียวไปตลอดสำหรับระบบนั้น ๆ เพื่อให้การทดสอบนั้นมีมาตรฐานที่ดี (Shekarchi *et al.*, 1984)

การยึดติดของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับผิววัสดุที่เป็นพลาสติก ปริมาณของโปรตีนที่ติดกับพื้นผิวพลาสติกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ แต่เมื่อเทียบอัตราส่วนของโปรตีนที่ติดกับโปรตีนที่ใช้ พบว่า เมื่อใช้โปรตีนความเข้มข้นสูง อัตราส่วนของโปรตีนที่ติดกับผิวพลาสติกต่อโปรตีนที่ใช้มีค่าต่ำลง ดังนั้น ในกรณีที่ต้องการประหยัดก็ไม่จำเป็นต้องใช้แอนติเจน หรือแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูงมากเกินไป เพราะทำให้สิ้นเปลือง (Engvall, 1980)

โดยทั่วไปแล้ว การเคลือบผิวพลาสติกด้วยโปรตีนได้ผลดีพอเมื่อทำที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส (ประมาณเท่ากับอุณหภูมิห้องที่ติดเครื่องปรับอากาศ) โดยใช้เวลานาน 2 ชั่วโมงหรืออาจทิ้งไว้จนถึงข้ามคืน หรืออาจจะใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานข้ามคืน หรือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนถึง 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถใช้เวลาสั้นเพียง 30 นาที โดยการอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก็ทำให้ได้ผลการทดลองที่ดีได้ (Subba, 1983)

ขั้นตอนของการล้างในระหว่างการทดลอง ในการทำ ELISA จำเป็นต้องมีการล้างเอาตัวกระทำส่วนเกินออกในระหว่างการทดลองแต่ละขั้นตอน ตั้งแต่หลังจากเคลือบผิววัสดุด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดี หลังจากบ่มกับสิ่งส่งตรวจและ conjugate ในการล้างจะต้องระวังอย่าให้มีการปนปื้อนจากขั้นตอนหนึ่งไปยังอีกขั้นตอนหนึ่ง ถ้าวัสดุที่ใช้อยู่ในรูป plate การล้างจะทำได้ง่ายมาก ในการทดสอบบางระบบจำเป็นจะต้องล้างหลายครั้งมากกว่า เช่น อาจจะต้องล้าง 6 ครั้ง จึงจะสามารถทำให้การทดลองมี background ต่ำ และได้ผลการทดสอบที่ดีได้ ดังที่พบในการทดสอบเพื่อการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออินซูลิน การล้างผิวพลาสติกที่มีโปรตีนติดอยู่นี้มีผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำให้โปรตีนนั้นหลุดออกมาได้ Lehtonen and Vilifanen (1980) รายงานว่าในการล้างแต่ละครั้งจะมีผลทำให้โปรตีนหลุดออกมาทุก ๆ ครั้งในปริมาณที่มาก ถ้าล้างผิวพลาสติกนั้นเหมาะสมจะทำให้เหลือโปรตีนคงติดอยู่บนผิวพลาสติกนั้น

การล้างผิววัสดุที่เคลือบด้วยแอนติเจนหรือแอนติบอดีใน ELISA นั้น โดยทั่วไปใช้ phosphate buffered saline ซึ่งมี Tween 20 อยู่ด้วย หรืออาจใช้ saline ซึ่งมี Tween 20 ผสมก็ได้ ความเข้มข้นของ Tween 20 ที่ผสมในสารละลายดังกล่าวอาจใช้ได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) จนถึงร้อยละ 0.5 (Koertge and Butler, 1985)

Tween 20 เป็น nonionic detergent ซึ่งไม่รบกวนปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี แต่เป็นตัวป้องกันมิให้เกิดปฏิกิริยา hydrophobic ระหว่างโปรตีนที่เติมลงไปใหม่กับผิวพลาสติกที่ใช้ยึดจับแอนติเจนหรือแอนติบอดีอยู่ก่อนแล้ว โดยไม่ทำลายการยึดจับแบบ hydrophobic ระหว่างแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีอยู่แล้ว ดังนั้นจึงเป็นการช่วยป้องกันมิให้เกิดการยึดจับของโปรตีนอื่น ๆ กับผิวพลาสติกอย่างไม่จำเพาะในขั้นตอนต่อไปด้วย (Engvall, 1980)

ได้มีผู้ทดลองทำ indirect ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ ELISA plate และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการล้าง plate 4 ครั้งด้วย phosphate buffered saline ที่ผสม Tween 20 โดยแต่ละครั้งทิ้ง buffer ไว้ใน plate นาน 5 นาทีกับกรณีที่ล้าง plate ด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง โดยไม่แช่ทิ้งไว้เลยในแต่ละครั้ง พบว่า ถ้าแอนติบอดีที่ตรวจมีความเข้มข้นต่ำมาก ๆ (100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) การใช้ buffer ล้าง plate ดังกล่าวนั้นทำให้การทดสอบมีความไวกว่าการล้างด้วยน้ำประปาเล็กน้อย แต่ถ้ามีแอนติบอดีอยู่ในความเข้มข้นสูง ๆ การล้างด้วยน้ำประปาจะไม่มีผลเสียที่มีความสำคัญต่อการทดสอบเลย (Ashorn and Krohn, 1986)

แอนติบอดีและสิ่งส่งตรวจ (ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์) ในการใช้ ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจก็ตาม ขั้นตอนที่สำคัญของการทดลองอย่างหนึ่ง คือ ขั้นตอนของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะ เมื่อใช้ non-competitive ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจน ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody complex) ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองและ affinity constant ของแอนติบอดีนั้น ปริมาณของแอนติเจนที่สามารถวัดได้จากการใช้การทดสอบนี้ คือ ส่วนที่จับอยู่กับแอนติบอดีจำเพาะ ดังนั้นโดยส่วนใหญ่แล้วความไวของการทดสอบจึงขึ้นกับความเข้มข้นและความสามารถของแอนติบอดีที่จะรวมตัวกับแอนติเจนทั้งโมเลกุล (avidity) ของแอนติบอดีที่ใช้ โดยเฉพาะใน non-competitive ELISA จำเป็นต้องมีการล้างหลายขั้นตอน การเลือกใช้แต่ละแอนติบอดีที่มี avidity สูงจะช่วยให้การจับแอนติเจนเป็นไปได้ดีกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งจะทำให้การทดสอบมีความไวสูง นอกจากนี้แอนติบอดีจำเพาะที่นำมาใช้ควรจะมีความเข้มข้นพอสมควรและมีความจำเพาะมากพอด้วย มิเช่นนั้นจะพบปฏิกิริยาข้าม (cross-reaction) เกิดกับแอนติเจนชนิดอื่นได้ ดังที่พบบ่อย ๆ ว่าไม่สามารถนำเอาแอนติบอดีที่ใช้ได้กับการทดสอบที่มีความไวน้อยกว่า ELISA มาใช้ในวิธี ELISA ได้ เพราะแอนติบอดีเหล่านั้นมีความจำเพาะไม่สูงพอ โดยทั่วไปแล้วแอนติบอดีที่นำมาใช้ใน ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะนี้ ได้มาจากการฉีดสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์มาก ๆ เมื่อในเซรุ่มของสัตว์ทดลองนั้นมีแอนติบอดีตามต้องการแล้ว สามารถจะนำเซรุ่มนั้นมาใช้ในการทดสอบได้ที่ความเจือจางสูง ๆ เช่น อาจเจือจางได้ถึง 1:100,000 (Yolken *et al.*, 1978)

ในกรณีที่ใช้ indirect ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดีที่ใช้สำหรับยึดติดกับ solid-phase ควรจะเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง ส่วนแอนติบอดีตัวที่สองของระบบอาจใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะน้อยกว่าได้ ส่วนใหญ่แล้วสามารถใช้เซรุ่มที่มีแอนติบอดีในการยึดติดกับ solid-phase และใช้เป็นแอนติบอดีตัวที่สองของระบบได้เลยโดยที่ไม่ต้องแยกเอาแต่ส่วนแอนติบอดีมาใช้ โดยทั่ว ๆ ไปเซรุ่มที่มีแอนติบอดีจำเพาะเนื่องจากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองซ้ำ ๆ จะมีความเจือจางที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบอยู่ระหว่าง 1:4,000 ถึง 1:100,000 อย่างไรก็ตาม ในบางกรณีการใช้เซรุ่มในการทดลองอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ สำหรับระบบที่ต้องการทดสอบนั้น เนื่องมาจากปฏิกิริยาของอิมมูโนโกลบุลินในส่วน IgM ของเซรุ่ม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องแยกเอาเฉพาะ IgG ของเซรุ่มนั้นมาใช้ และหาความเข้มข้นของ IgG ที่เหมาะสำหรับใช้ในการทดลองนั้น ส่วนใหญ่แล้วความเข้มข้นที่พอเหมาะของ IgG อยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Yolken, 1980)

Conjugate และ Substrate ที่ใช้ใน ELISA อาจเป็นแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ซึ่งเป็น conjugate ที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์มาติดฉลากกับแอนติเจนเพื่อใช้เป็น conjugate อีกด้วย เอนไซม์ที่ดีเหมาะสำหรับใช้ติดฉลาก ควรเป็นเอนไซม์ที่มีความคงทนและมีความไวในการทำปฏิกิริยาสูง (highly reactive) สามารถนำมาใช้ในการติดฉลากได้โดยที่เอนไซม์นั้นและแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้จะมีการสูญเสียหน้าที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด conjugate ที่เตรียมขึ้นจากเอนไซม์นั้นจะต้องมีความคงทน นอกจากนี้เอนไซม์ที่จะนำมาใช้ควรเป็นชนิดที่ไม่มีอยู่ในสารประกอบต่าง ๆ ของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ราคาถูก หาง่าย การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ substrate ทำได้ง่าย อีกประการหนึ่งก็คือ ทั้งเอนไซม์, substrate ของเอนไซม์นั้น รวมทั้ง cofactor ที่ใช้ในปฏิกิริยา จะต้องไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพด้วย (O'Sullivan and Marks, 1981)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง conjugate ที่ใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase และที่ใช้ alkaline phosphatase มีหลายรายงานกล่าวว่าได้ผลดีพอ ๆ กัน อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ทั้งสองต่างก็มีข้อได้เปรียบและเสียเปรียบกันอยู่บางประการ horseradish peroxidase มีข้อได้เปรียบที่มีความคงทนมาก สามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่ต้องมีข้อระมัดระวังเป็นการเฉพาะแม้แต่เมื่อจับกับโปรตีนแล้วก็ตาม ดังนั้น จึงสามารถที่จะเก็บ และส่ง conjugate ที่ใช้เอนไซม์นี้ไปยังห้องปฏิบัติการหลาย ๆ แห่งได้โดยไม่สูญเสียการทำหน้าที่ นอกจากนี้ horseradish perosidase ที่บริสุทธิ์ยังมีราคาถูกกว่า alkaline phosphatase และมี substrate ซึ่งให้สีที่ดูง่ายเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้ว ดังนั้น จึงเหมาะที่จะใช้ในการทำการทดสอบที่ต้องอ่านผลด้วยตาเปล่า แม้แต่การอ่านด้วย spectrophotometer การมีสีเข้มนี้ก็จะทำให้การวัดผลมีความไวขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ horseradish peroxidase ก็มีข้อเสียเปรียบที่ substrate ของเอนไซม์นี้ส่วนมากจะตกตะกอนหลังจากเกิดปฏิกิริยา สำหรับ 5-aminosalicylic acid เป็น substrate ที่มีมีปัญหาดังกล่าว แต่ก็มีปัญหาเรื่องสีที่เปลี่ยนแปลงไปได้เองเรื่อย ๆ แม้จะเติม sodium hydroxide ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์แล้วก็ตาม ปัญหาต่าง ๆ เกี่ยวกับเรื่องของ substrate ดังที่กล่าวมานี้ไม่พบในกรณีของการใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase ในการเปรียบเทียบความสามารถของ conjugate ซึ่งเตรียมโดยใช้เอนไซม์ ß-galactosidase และ horseradish peroxidase ติดฉลากกับแอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบุลิน เพื่อการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อ human growth hormone พบว่า conjugate ที่เตรียมจากเอนไซม์ horseradish peroxidase ช่วยให้สามารถตรวจพบแอนติบอดีที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่าการใช้ ß-galactosidase ในการเตรียม conjugate เมื่อเปรียบเทียบเรื่องของการทำปฏิกิริยากับ substrate ที่จำเพาะในระหว่าง conjugate ซึ่งเตรียมโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ horseradish peroxidase (HRP), alkaline phosphatase (AP) และ ß-galactosidase (ß-Gal) ติดฉลากกับ IgG พบว่าเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้น HRP จะสามารถทำให้ปริมาณ substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเกิดได้มากที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเลย 1 ชั่วโมงไปแล้ว การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเกิดขึ้นน้อยลง โดยการเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเกิดน้อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส HRP ทำให้ substrate เปลี่ยนแปลงมากที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ส่วนปฏิกิริยาของ AP พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง substrate จะเปลี่ยนแปลงไปมากที่สุด และมีค่าน้อยลงตามลำดับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและ 10 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณ substrate ที่เปลี่ยนแปลงโดย AP นี้ มีมากที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกรณีของ ß-Gal ปริมาณของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงมีมากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้เวลา 22 ชั่วโมง นอกจากนี้ปริมาณของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมินี้ยังมีมากกว่าที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

25 องศาเซลเซียส และ 10 องศาเซลเซียส (Porstmann *et al.*, 1985) ในทุก ๆ ช่วงเวลาที่ทำการทดสอบด้วย substrate ที่จะช่วยให้สามารถตรวจเอนไซม์ใน conjugate ได้ไว ส่วนใหญ่จะใช้ chromogenic substrate ซึ่งเดิมไม่มีสีและเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วจะให้มีสีเข้ม substrate ที่ดีจะต้องให้ผลิตผลที่ละลายได้หมดและมี extincition coefficient สูง คือ แต่ละหน่วยของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงนั้นจะเกิดสีเข้มชัดเจน นอกจากนี้ควรมีราคาถูก ปลอดภัย และใช้ง่าย (Voller *et al.*, 1979)

Chromogenic substrate ของเอนไซม์ alkaline phosphatase คือ p-nitrophenyl-phosphate สามารถนำมาใช้ได้สะดวกเพราะมีจำหน่ายในลักษณะเป็นเม็ด เมื่อใช้ในการทดสอบก็จะนำมาละลายใน buffer ไม่จำเป็นต้องมีการชั่งวัดปริมาณ ผลิตผลที่เกิดขึ้นหลังจากการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้วละลายได้หมด การหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับ substrate นี้ใช้ sodium hydroxide เข้มข้น สีม่วงที่เกิดขึ้นจะมีความคงที่มากทีเดียวหลังจากหยุดปฏิกิริยาแล้ว สามารถดูความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าได้ หรือใช้วัดความเข้มของสีด้วย spectrophotometer ก็ได้ (Porstmann *et al.*, 1985)

แอนติบอดีที่ใช้ในระบบ ELISA (antibody, Ab)

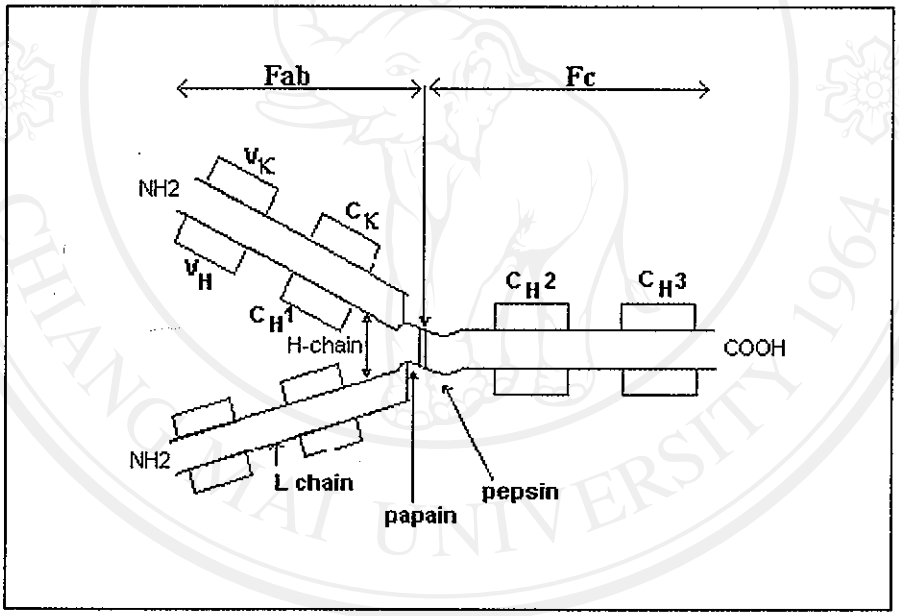
แอนติบอดี หรือ อิมมิวโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่น ๆ สร้างขึ้น ที่มีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรียและไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันคือ แอนติเจน การเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่สนใจสามารถทำได้โดยฉีด protein หรือเส้น peptide ซึ่งเราเรียกว่า "แอนติเจน" เข้าไปในสิ่งมีชีวิต เช่น หนู กระต่าย แพะ หรือแกะ เป็นต้น แอนติเจนเป็นสิ่งแปลกปลอมที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้และตำแหน่งบนแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นเรียกว่า เอปิโทป (epitope) ต่อมาระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immune system) ของสัตว์เหล่านี้จะสร้างแอนติบอดีตอบสนองอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน พบได้ในซีรั่ม ส่วนน้ำอื่น ๆ ของร่างกายและเนื้อเยื่อ เช่น น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อมน้ำเหลือง ม้ามและบนผิวของลิมโฟซัยท์บางชนิด แอนติบอดีเป็นสารพวก glycoprotein ประกอบด้วย polypeptide 82-96 % และcarbohydrate 4-18 % ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนติบอดีที่ยอมรับกันในปัจจุบัน คือ "clonal selection theory" ของ Sir Macfarlane Burnet ชาวออสเตรเลีย ซึ่งกล่าวไว้ว่า B lymphocyte ทุกเซลล์จะมียีนสำหรับกำหนด การทำหน้าที่ของมันอยู่แล้วตั้งแต่ยังไม่ได้พบแอนติเจน ยีนส์ดังกล่าวจะเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตัวกำหนดว่า B lymphocyte นั้น ๆ จะทำหน้าที่ตอบสนองต่อแอนติเจนใด เมื่อมีแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย เฉพาะ B lymphocyte ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น ๆ เท่านั้นที่จะมีปฏิกิริยาตอบสนองโดยการแบ่งตัว (proliferation) และเปลี่ยนแปลง (differentiation) เกิดเป็นกลุ่ม (clone) ของเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้น (สุวิน, มปป.)

แอนติบอดีมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย polypeptide 4 สาย (ภาพที่ 4) คือสายที่ยาวและมีน้ำหนักโมเลกุลมาก เรียกว่า Heavy chain (H) ซึ่งมี 2 สายที่เหมือนกัน ส่วนอีก 2 สายที่สั้นและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า เรียกว่า Light chain (L) ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันทั้ง 2 สาย เช่นเดียวกัน Heavy chain และ Light chain ทั้ง 4 สายจะเชื่อมต่อกันด้วย interchain disulfide bonds ซึ่งสามารถแยกแรงยึดนี้ออกจากกันได้ด้วย mercaptoethanol



ภาพที่ 4 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี (สุวิน, มปป.)

ปลายข้างหนึ่งของแต่ละสายจะเป็น –N หรือ -NH_2 หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะเป็น -C หรือ -COOH หรือ carboxy terminal ทั้ง 4 สายจะหันปลายข้าง -NH_2 หรือ -COOH ไปทางเดียวกัน โมเลกุลของอิมมูโนโกลบูลินมีรูปร่างคล้าย ๆ กับตัว T หรือ Y โดยมี hinge region อยู่ตรงกลางของ H-chain ซึ่ง hinge region จะเป็นบริเวณที่มีการยืดหยุ่น (flexible) ได้มาก ทำให้แขนทั้ง 2 ข้าง ยืดห่างออกจากกันเพื่อจับกับแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น อิมมูโนโกลบูลินสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 classes ตามความแตกต่างของ H-chain คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งมี H-chain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็น γ, α, μ, δ และ ε ตามลำดับ H-chain แต่ละ class มีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล การเรียงตัวของกรดอะมิโน ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรท antigenic determinant และคุณสมบัติทางชีวภาพ (สุวิน, มปป.)

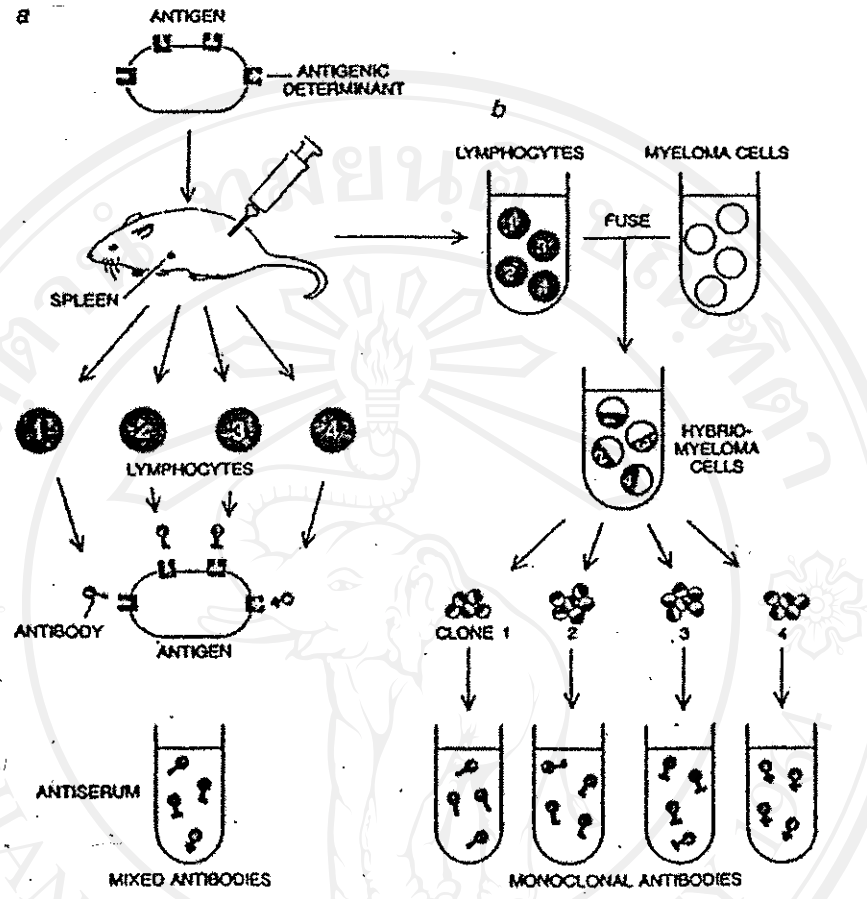
โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies, Mabs)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน ที่รู้จักกันทั่วไปนั่นเอง แต่ลักษณะที่สำคัญของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ก็คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิดจะเป็นกลุ่มของ immunoglobulin ที่มีความเหมือนกัน (homogeneous) เพราะถูกสร้างมาจากเซลล์หรือ clone ชนิดเดียวกันและมีความจำเพาะสูงต่อ antigenic determinant เดียวของโมเลกุลที่เป็นแอนติเจน

โครงสร้างของแอนติเจน จะมีส่วนย่อยเล็ก ๆ ซึ่งเป็นบริเวณที่จะจับกับแขนของแอนติบอดีได้อย่างจำเพาะเจาะจง (ภาพที่ 5a) บริเวณเล็ก ๆ นี้ เรียกว่า Antigenic determinant หรือ Epitope ดังภาพที่ 4 แอนติเจนในรูปมี 4 Epitope ดังนั้นถ้านำแอนติเจนนี้มากระตุ้นในร่างกาย เซลล์ต้นตระกูล 4 ชนิดซึ่งมีความจำเพาะจะตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยการเจริญเติบโต และแบ่งตัวไปเป็น plasma cell 4 ชนิด สร้างแอนติบอดีออกมา 4 ชนิด ที่มีความจำเพาะต่อ Epitope ชนิดนั้น แอนติบอดีทั้งสี่ชนิดถูกปล่อยออกมาอยู่ในส่วนน้ำเหลือง ถ้าแอนติเจนนั้นมีโครงสร้างซับซ้อนขึ้นและมี Epitope เพิ่มมากขึ้น ชนิดของแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นจะมีมากชนิดขึ้นตามลำดับเช่นกัน และจะอยู่รวมปนกันในส่วนน้ำเหลืองของร่างกาย จะเห็นได้ว่าแอนติเซรุ่มที่มีใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ได้มาจากเซรุ่มของสัตว์ทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ต้องการ (Micheal and Fabre, 1982)

ถ้าต้องการแอนติบอดีต่อ Epitope ชนิดเดียว จะต้องหาเซลล์ต้นตระกูลที่มีความสามารถสร้างแอนติบอดีชนิดที่ต้องการนั้น นำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (ภาพที่ 5b) เซลล์นั้นก็จะผลิตและปล่อยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามต้องการได้ ขณะเดียวกัน ถ้ากระตุ้นให้เซลล์ต้นตระกูลนั้นเป็นมะเร็ง หรือหลอมรวมกันกับเซลล์มะเร็งให้เป็นเซลล์เดียวกันแล้ว คุณสมบัติของเซลล์มะเร็งจะช่วยให้เซลล์นั้นมีชีวิตรอดอยู่ได้ในหลอดทดลองตลอดไปโดยไม่มีอายุขัย แต่ยังคงมีความสามารถสร้างแอนติบอดีได้ และแอนติบอดีที่ได้จากส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์นั้นจะมีความจำเพาะต่อ Epitope ของแอนติเจนชนิดเดียวเท่านั้น และจะสร้างขึ้นมาได้ตลอดไปอย่างไม่มีวันหมดสิ้น แอนติบอดีที่ได้นี้ก็คือ "โมโนโคลนอลแอนติบอดี" นั่นเอง (Micheal and Fabre, 1982)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 5 (a) เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี เปรียบเทียบกับ (b) เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ประพันธ์ และคณะ, 2532)

เซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถเพาะเลี้ยงในภาชนะให้เจริญเติบโต แบ่งตัวและหลั่งแอนติบอดีออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สามารถเก็บเซลล์นี้แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และนำกลับออกมาเพาะเลี้ยงได้อีกเพื่อให้เซลล์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกในปริมาณและในเวลาที่ต้องการ โดยเป็นชนิดเดิมหรือไม่เปลี่ยนแปลง

ซึ่งต่างกับเซลล์โพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อแอนติเจนหลายตำแหน่ง มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนหลายแบบ และมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทำการผลิตซ้ำอีกเพื่อให้ได้แอนติบอดีชนิดเดิมได้ อาจจะเปรียบเทียบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้ดังตารางที่ 1 (Micheal and Fabre, 1982)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Goding, 1983)

คุณสมบัติ	โพลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
ความจำเพาะ (Specificity)	- พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้ - ไม่ค่อยพบแอนติบอดีที่จำเพาะมากเกินไป	- คงที่ สามารถเลือกได้เป็นมาตรฐาน (standard) - อาจพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มได้
Affinity	ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เจาะเลือดสัตว์ทดลอง	คงที่โดยสามารถคัดเลือกได้สูงหรือต่ำตามต้องการในระหว่างทำ cloning
ปริมาณแอนติบอดีที่เป็นประโยชน์	ประมาณ 1 mg/ml	- ประมาณ 100 μg/ml ในเซลล์เพาะเลี้ยง - ประมาณ 20 mg/ml ใน ascetic fluid
ปริมาณ Immunoglobulin ที่ปนเปื้อน	อาจสูงถึง 100 %	ไม่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงและประมาณ 10 % ใน ascetic fluid
ความบริสุทธิ์ของแอนติเจน	ต้องใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์มากหรือต้องทำ serum แอนติบอดี sorption	ใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์พอสมควร
ราคาในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในเวลาเริ่มต้น

ข้อดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Goding, 1983)

1. ใช้แอนติเจนน้อยและไม่ต้องบริสุทธิ์มากในการฉีดกระตุ้นโดยในการ immunize หนู (mice) อาจใช้แอนติเจนประมาณ 100 ไมโครกรัมหรือน้อยกว่าก็ได้ โดยที่แอนติเจนนั้นมีความบริสุทธิ์พอประมาณ เนื่องจากสามารถเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต้องแอนติเจนที่ต้องการได้ในระหว่างการทำ cell cloning

2. มีความเป็นมาตรฐาน (Standardization) สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีลักษณะเหมือนกัน (homogeneous) เป็นมาตรฐานซึ่งสามารถแจกจ่ายไปในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ซึ่งเดิมการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี มักมีปัญหาเนื่องจากคุณสมบัติไม่ค่อยคงที่ในแต่ละครั้งที่ผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และเนื่องจากสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ในปริมาณที่ต้องการไม่จำกัด ดังนั้นความเป็นมาตรฐานของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงมีสูงมาก

3. มีความจำเพาะสูง (High specificity) โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะเข้าทำปฏิกิริยากับ antigenic determinant เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้น จึงมีความจำเพาะสูงมาก สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์หรือศึกษาลักษณะของโมเลกุลของแอนติเจนได้

4. มี affinity สูง ในวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูงต่อแอนติเจนได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูงนี้จะสามารถนำไปใช้ได้ในความเจือจางสูง (high dilutions) ทำให้ลดปฏิกิริยารบกวน (background) ในการทดลองลงได้ และสามารถนำไปใช้ในการทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์ได้อีกด้วย

5. การเก็บเซลล์ (store of cells) สามารถเก็บเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้เป็นเวลานานหลายปี ในไนโตรเจนเหลว และนำกลับมาเลี้ยงเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกเมื่อต้องการ

ข้อเสียของโมโนโคลนอลแอนตบอดี (Goding, 1983)

1. การผลิต การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีกรรมวิธีที่ค่อนข้างง่าย แต่ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องใช้กำลังแรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายแพงกว่าการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

2. ความ specificity โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้ในบางกรณีมีความจำเพาะสูงเกินไปจนไม่สามารถจับกันได้

3. ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจนเนื่องจาก โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงมากจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจนซึ่งเกิดขึ้นระหว่างที่แอนติเจนเกาะกับพื้นผิว (solid phase) หรือ สภาวะที่ใช้ในการทำการทดลอง

4. คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงได้ง่ายระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในบางกรณีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH, ionic strength และปัจจัยอื่น ๆ ซึ่ง โพลีโคลนอลแอนติบอดีมักมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้น้อยกว่าเนื่องจากแอนติบอดีบางกลุ่มยังคงทำงานได้

5. ไม่สามารถทำปฏิกิริยาบางอย่างได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมากไม่สามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอน (Precipitation) ได้ซึ่งต่างจากโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลักในการสร้างแอนติบอดี ดังภาพที่ 6 จะมีการใช้แอนติเจนชนิดที่ต้องการ ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง เช่น หนูถีบจักร (Mice) เพื่อให้หนู mice สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการ ซึ่งสามารถทดสอบหาระดับของแอนติเจนได้ด้วย test ที่มีความไวสูง เช่น ELISA หรือ RIA test เป็นต้น ขณะเดียวกันจัดเตรียมสายพันธ์ของเซลล์มะเร็งที่มีต้นกำเนิดมากจาก B-lymphocyte เรียกว่า Plasmaytoma cells หรือ Myeloma cells เลือกสายพันธุ์ที่ไม่มีเอนไซม์ HGPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase) นำมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในหลอดทดลอง (in vitro culture) จากนั้นจึงฆ่าหนูเพื่อใช้เซลล์จากม้าม (Spleen cell) ซึ่งมีเซลล์ต้นตระกูล (Clone cells) ที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการปนอยู่ด้วยนั้นมาหลอม (fusion) รวมกับ Plasmacytoma cells โดยใช้สารเคมี polyethyleneglycol (PEG) ช่วยเพื่อให้เซลล์ทั้งสองชนิดเป็นเซลล์เดียวกัน เซลล์ลูกผสมที่ได้จากวิธีการนี้เรียกว่า Hybridoma cells แล้วจึงนำ Hybridoma cells ที่ได้ไปเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดพิเศษ คือ HAT medium (Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น selective medium ซึ่งจะยอมให้ hybridoma cells เท่านั้นที่มีชีวิตรอดอยู่ได้ ส่วนเซลล์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเจริญได้ใน HAT medium ก็จะตายไปในที่สุด กลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของ HAT medium เกิดจาก HAT medium มี Aminopterin เป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ตามปกติ (Classical pathway of DNA synthesis) แต่เนื่องจาก Spleen cells มีเอนไซม์ $HGPRT^{+}$ อยู่แล้ว จึงสามารถใช้เอนไซม์นี้ สังเคราะห์ DNA ได้ โดยทางอ้อม (Salvage pathway) โดยใช้ Hypoxanthine และ Thymidine ที่มีอยู่แล้วใน HAT medium ถึงแม้ spleen cell จะสามารถอยู่รอดได้ใน HAT medium ได้ แต่เซลล์นี้เป็นเซลล์ชนิดปกติจึงมีอายุขัยตามธรรมชาติ ดังนั้น spleen cell ใน HAT medium ได้ นั้นก็จะตายไปเอง ในระยะ 7-10 วัน ภายหลังการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองส่วน Plasmacytoma cell ที่ไม่มีเอนไซม์ $HGPRT^{+}$ จะเจริญเติบโตใน HAT medium จึงต้องเป็น Hybridoma cell ซึ่งจะอาศัยคุณสมบัติของเซลล์บรรพบุรุษทั้ง 2 ชนิด คือ สามารถใช้เอนไซม์ HGPRT จาก spleen cells และความเป็นอมตะของเซลล์มะเร็ง ทำให้สามารถสร้างแอนติบอดีปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture supernatant) นั้น (Kohler and Milstein, 1975)

ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว 7-10 วัน เซลล์ที่เหลือรอดและเจริญเติบโตใน HAT medium จะเป็น Hybridoma cells เท่านั้น จากนั้นจึงตรวจหาโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ จาก culture supernatant นั้น ด้วยวิธีที่มีความไวสูง เช่น ELISA หรือ RIA เนื่องจากปริมาณของแอนติบอดีนั้นมีน้อยมาก ถ้าพบว่าหลุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์หลุมใดให้ผลบวกก็ต้องนำเซลล์หลุมนั้นมาเพาะเลี้ยงต่อ เพื่อเพิ่มปริมาณมากขึ้น (Subcloning) จากนั้นจึงทำการ

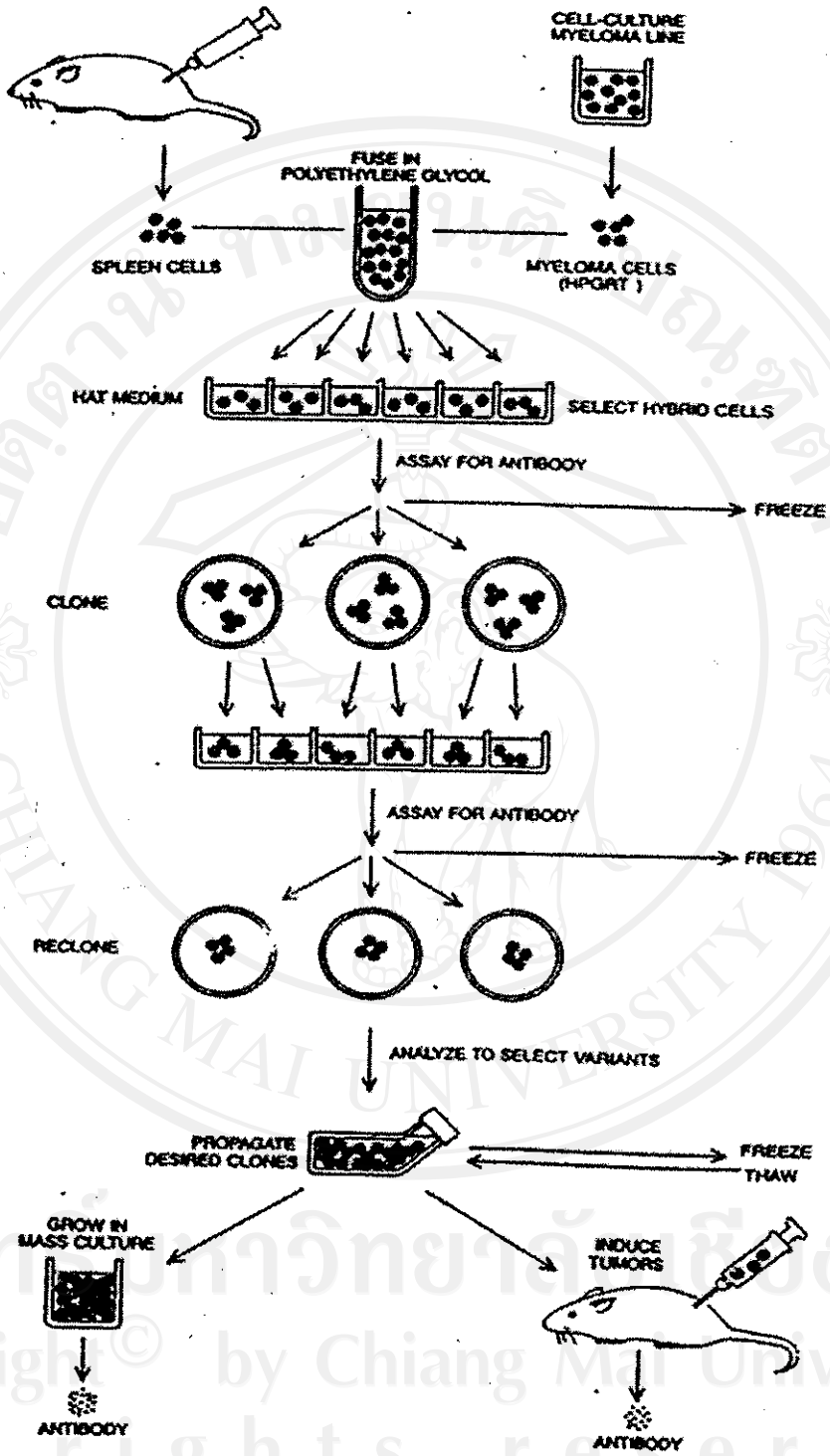
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คัดเลือกให้ได้สายพันธ์บริสุทธิ์ โดยการทำ Limiting Dilution Techique เพื่อให้เหลือ Hybridoma clone เดียวที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการเพียงชนิดเดียวเท่านั้น แล้วจึงทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดี แบบ Mass production ใน In vitro culture ซึ่งจะมีความเข้มข้นต่ำ (ในระดับวัดได้เป็นหน่วย µg/ml) ถ้าต้องการความเข้มข้นสูงขึ้นอีกก็ต้องนำ Hybridoma นั้น ไปฉีดเข้าช่องท้องหนู เพื่อกระตุ้นให้เป็นมะเร็ง (Kohler and Milstein, 1975)

น้ำในช่องท้อง (Ascites fluid) ของหนู จะมีความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีสูงขึ้นในระดับวัดได้ในหน่วย mg/ml นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้ มาทดสอบหาความจำเพาะและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ส่วน Hybridoma clone ที่เพาะเลี้ยงไว้ก็สามารถเก็บรักษาไว้ โดยการแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -121 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งสามารถละลายเซลล์นั้นมาเพาะเลี้ยงต่อไปได้อีก จะเห็นได้ว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี มีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูง และสามารถผลิตขึ้นในหลอดทดลองได้ตลอดไปไม่มีวันหมดสิ้น (Kohler and Milstein, 1975)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ห้องสมุดคณะเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 หลักการสร้าง Monoclonal antibody (ประพันธ์ และคณะ, 2532)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved