

การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวในงานเภสัชเวท ทวีศักดิ์ จีงวัฒนตระกูล*

บทคัดย่อ

การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีและชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวในงานเภสัชเวท
ทวีศักดิ์ จีงวัฒนตระกูล*

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2554;7(3) : 1-13

Received : 19 July 2011

Accepted : 31 December 2011

โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีความจำเพาะเหมือนกันผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยวเป็นอนุพันธ์ของแอนติบอดีที่ประกอบด้วยส่วนแปรผันสายยาวและสายสั้นที่เชื่อมต่อกันด้วยเปปไทด์สายสั้นในปัจจุบันโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอนุพันธ์ชนิดชิ้นส่วนแปรผันแบบสายเดี่ยวที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในธรรมชาติถูกผลิตและนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางเภสัชเวทหลายแขนงได้แก่การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรโดยใช้เทคนิคไอโซชาและอีเสเทิร์นบลอตติงการตรวจตำแหน่งสารสำคัญในเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชและสัตว์การแยกบริสุทธิ์สารสำคัญในขั้นตอนเดียวโดยใช้เทคนิคอิมมูโนแอฟฟินิตีโครมาโทกราฟีการเพิ่มการผลิตสารสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการทำพันธุวิศวกรรมของชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยว

คำสำคัญ : โมโนโคลนอลแอนติบอดี, ชิ้นส่วนแปรผันสายเดี่ยว, อิมมูโนแอสเส, การเพาะพันธุ์แบบมุ่งเป้า

Abstract

Applications of monoclonal antibodies and single chain variable fragments in pharmacognosy

Thaweesak Juengwatanatrakul^{1*}

IJPS, 2011; 7(3) :1-13

Monoclonal antibody (MAb) is a monospecific immunoglobulin produced by hybridomas. Single chain variable fragment (scFv), a MAb derivative, is a fusion protein of the variable regions of the heavy (VH) and light chains (VL) of immunoglobulins, connected with a short linker peptide. MAbs and scFvs against naturally occurring pharmacological active compounds were prepared and applied to pharmacognosical works, including quality control of medicinal plants by ELISA and Eastern blotting, immunohistochemistry and immunocytochemistry localization of bioactive compounds in plants and cell lines, one-step purification by immunoaffinity chromatography, enhancement of medicinal constituents by the new technique named "missile type molecular breeding".

Keywords: Monoclonal antibody, Single chain variable fragment, Immunoassay, Missile type molecular breeding

¹ Ph.D, อาจารย์ประจำกลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

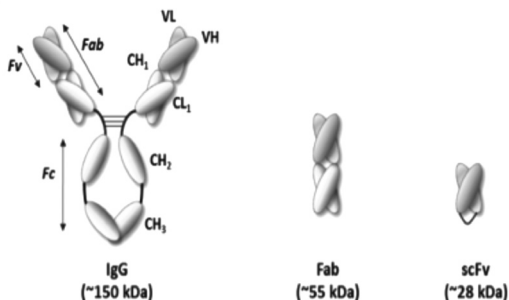
* ติดต่อผู้พิมพ์: ดร.ทวีศักดิ์ จีงวัฒนตระกูล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190 Tel: 045-353630, Fax: 045-288384, E-mail: thaweesakj@gmail.com

¹ Ph.D, Lecturer, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190

* Corresponding author: Dr.Thaweesak Juengwatanatrakul, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani 34190 Tel: 045-353630, Fax: 045-288384, E-mail: thaweesakj@gmail.com

บทนำ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies; MAbs) เป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG (รูปที่ 1) ที่เหมือนกัน (homogeneous immunoglobulin) เนื่องจากถูกสร้างมาจากเซลล์หรือ clone ชนิดเดียวกันคุณสมบัติที่ดีของ MAbs คือมีความจำเพาะสูง (high specificity) โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับ antigenic determinant เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน (antigen; Ag) และมีความชอบจับสูง (high affinity) จึงสามารถนำไปใช้ได้ในความเข้มข้นต่ำ (ไม่ก่อให้เกิดพิษ) ขึ้นส่วนแปรผันแบบสายเดี่ยว (Single chain variable fragments; scFvs) เป็นอนุพันธ์ของ MAbs ประกอบด้วยแปรผัน (variable fragment; Fv) ที่เป็นชนิด variable heavy chain (VH) และ variable light chain (VL) ที่เชื่อมต่อกันด้วยสายเปปไทด์ (peptide) สายสั้นๆ ที่ประกอบด้วย 10-25 กรดอะมิโน (Holliger and Hudson, 2005; Nelson, 2010)



รูปที่ 1 โครงสร้าง Immunoglobulin G (IgG), Antigen binding fragment (Fab) และ Single chain variable fragment (scFv) (Juengwatanatrakul *et al.*, 2004)

โดยส่วนใหญ่ MAbs และอนุพันธ์ถูกผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการทางการแพทย์หลายด้าน เช่น การรักษามะเร็งเต้านมขั้นสุดท้าย (Petráková, 2011) การตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H5N1 (Linke *et al.*, 2011) การตรวจ tumor marker ในซีรัมหรือตรวจหาตำแหน่งของก้อนมะเร็ง (Mattos-Arruda *et al.*, 2011) เป็นต้น นอกจากนี้ MAbs และอนุพันธ์ยังถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือเพื่อช่วยนำส่งยาหรือสารกัมมันตรังสีไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมาย เพื่อใช้ในการ

รักษามะเร็ง และช่วยในการนำส่งยาเข้าสู่สมอง (Kobatake *et al.*, 2011; Manjappa *et al.*, 2011; Afshar *et al.*, 2009)

ปัจจุบันได้มีการนำเอา MAbs และอนุพันธ์ชนิด scFvs มาประยุกต์ใช้ในงานเภสัชเวทหลายแขนง ไม่ว่าจะเป็นการตรวจเอกลักษณ์ การตรวจวัดสารสำคัญในสมุนไพร การแยกบริสุทธิ์สารธรรมชาติ รวมไปถึงเพิ่มการผลิตสารสำคัญที่ใช้เป็นยาในบทความนี้ได้รวบรวมชนิดและประโยชน์ของ MAbs และ scFvs ที่สามารถนำมาใช้ในงานด้านเภสัชเวทแขนงต่างๆ รวมไปถึงแนวทางการประยุกต์ใช้ MAbs และ scFvs ในงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพืชสมุนไพร

การผลิต MAbs และ scFvs

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นสารเคมีนั้น จัดเป็น แอสเพน (hapten) ที่ไม่สามารถก่อภูมิคุ้มกันได้ จึงต้องนำไปเชื่อมติดกับโปรตีนโมเลกุลใหญ่ (carrier protein) โดยสารกลุ่ม glycosides หรือสารที่มีหมู่ carboxyl มักเชื่อมต่อโดยวิธี periodate oxidation หากไม่มีหมู่ดังกล่าวจำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันก่อนจึงจะสามารถเกิดปฏิกิริยาจับโปรตีนได้ การก่อภูมิคุ้มกันจะทำให้หนูสายพันธุ์ BALB/c เพศเมียโดยเตรียม conjugated antigen ในรูปสารละลายอิมัลชันร่วมกับ adjuvant แล้วนำมาฉีดทางช่องท้อง (intraperitoneal) และฉีดกระตุ้นทุก 2 สัปดาห์มากกว่า 2 ครั้งเมื่อได้ระดับ serum antibody titer สูงจึงฉีดกระตุ้นด้วย antigen conjugate เพียงอย่างเดียว แล้วจึงผ่าหนูและนำม้ามมาทำการสกัดแยกเอา splenocytes แล้วนำไปหลอมรวมกับเซลล์ myelomas ด้วยวิธี polyethylene glycol (PEG) method จากนั้นจึงทำการคัดแยกเซลล์ hybridomas ที่สร้าง MAb ด้วยวิธี limiting dilution method แล้วจึงทำให้ MAb บริสุทธิ์โดย Protein A หรือ Protein G column

การผลิต scFv เริ่มด้วยการตัดลอกยีน VH และ VL จากเซลล์ไฮบริโดมาหรือเซลล์ม้ามหนูที่สร้าง MAb และทำการเชื่อมต่อยีนทั้งสองด้วยยีนเปปไทด์ (Gly Ser)₃ และมักจะเชื่อมต่อกับโปรตีนฉลาก (tag label) เพื่อใช้ในการตรวจวัดและการแยกบริสุทธิ์ ที่นิยมใช้ได้แก่ T7-tag และ His-tag หลังจากนั้นนำยีน scFv ใส่เข้าไปในคลิ่งพาหะแสดง (expression vector plasmid) สำหรับการแสดงโปรตีน (protein expression) scFv นั้น มีรายละเอียดแตกต่างกันไปตามชนิดของเจ้าบ้าน (host) ซึ่งอาจจะเป็น

E. coli, ยีสต์, เซลล์แมลง (*Spodoptera frugiperda*), หนอนไหม (silkworm larvae) หรือพืช เป็นต้น ในปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage expression) โดยใช้คลังของแอนติบอดีจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (nonimmune library หรือ naïve library) (Marks *et al.*, 1991) สำหรับการแยกบริสุทธิ์ scFv นั้นขึ้นอยู่กับชนิดโปรตีนผลึก

MAbs หรือ scFvs ที่ดีต้องมีความจำเพาะสูง คือ ไม่มี cross-reactivity (CR) กับสารที่มีโมเลกุลใกล้เคียงหรือสารอนุพันธ์ เช่น ในกรณีของ MAb ต่อ sennoside A (SA) มี CR ต่อ sennoside B (SB) เพียง 0.28% (Morinaga *et al.*, 2000) แม้ว่าสาร SA และ SB จะมีความแตกต่างกันเพียง stereochemistry ที่ตำแหน่ง C-10 และ C-10' เท่านั้น

การประยุกต์ใช้ MAb และ scFv ในงานเภสัชเวทการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพรด้วยวิธีทาง Immunoassay

โดยทั่วไปการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญจากพืชมักนิยมวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเช่น Thin Layer Chromatography (TLC), Gas Chromatography (GC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ต้องเตรียมสารสกัดก่อนวิเคราะห์ (pretreatment) นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความไว (sensitivity) ของเครื่องมือ และการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างจะใช้เวลาานาน จึงมีการพัฒนาเทคนิคทาง immunoassay โดยใช้ MAbs และ scFvs มาช่วยในการวิเคราะห์ เนื่องจากมีความแม่นยำและจำเพาะสูง อีกทั้งวิธีเตรียมสารตัวอย่างไม่ยุ่งยาก สามารถนำสารสกัดหยาบมาทำการวิเคราะห์ได้ จึงเหมาะกับการวิเคราะห์สารปริมาณต่ำและมีจำนวนตัวอย่างมากได้ เทคนิคทาง Immunoassay ที่ใช้ได้แก่ ELISA และ Eastern blotting

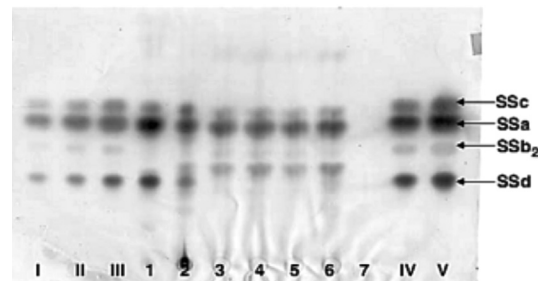
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การหาปริมาณสารสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค competitive ELISA โดยในขั้นตอนการเติม MAb หรือ scFv ร่วมกับ hapten นั้น จะไม่ใช่ hapten เป้าหมาย แต่จะเติมสารสกัดจากพืช เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสำคัญในสารสกัดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารสำคัญนั้น วิธีนี้สามารถ

วิเคราะห์สารสกัดได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกันทำให้ลดเวลาในการวิเคราะห์หลังใช้สารสกัดหยาบในปริมาณน้อย การวิเคราะห์หาปริมาณสารจากพืชด้วยวิธี ELISA แสดงในตารางที่ 1

Eastern blotting

เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดย Shoyama และคณะ โดยทำการแยกสารสกัดด้วย TLC ก่อน แล้วจึงทำการย้าย (blot) สารจากแผ่น TLC ลงไปบนแผ่นเมมเบรน polyvinylidene difluoride (PVDF) จากนั้นเชื่อมต่อสารกับ BSA ด้วย NaIO_4 แล้วจึงทำการทดลองต่อเหมือนกับวิธี Western blotting ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยแยกสารบนแผ่นเมมเบรน polyether sulphone (PES) ซึ่งลดขั้นตอนการย้ายสารจาก TLC ลงไปใน PVDF (Morinaga and Shoyama, 2011) วิธีนี้เหมาะกับ MAb ชนิดที่มี CR ต่อสารอื่น โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็น Ag และสารที่เกิด CR ในสารสกัดพืชได้ (รูปที่ 2) วิธีนี้สามารถหาทั้งปริมาณและรูปแบบของสารองค์ประกอบในสารสกัดได้คล้ายกับวิธี TLC fingerprint แต่สามารถตรวจวัดได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า ข้อจำกัดคือสารที่จะวิเคราะห์ต้องเป็นสารกลุ่ม glycosides หรือมีหมู่ carboxyl เท่านั้น



รูปที่ 2 การวิเคราะห์สารกลุ่ม saikosaponins โดยใช้ PES membrane: I-V; สารมาตรฐานผสม saikosaponin a (SSa), saikosaponin b2 (SSb₂), saikosaponin c (SSc) และ saikosaponin d (SSd) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ, 1-2; Bupleuri radix จากประเทศญี่ปุ่นและออสเตรเลีย ตามลำดับ, 3-6; ยาแผนโบราณ 4 ชนิดที่มี Bupleuri radix เป็นส่วนประกอบ, 7; ยาแผนโบราณที่ไม่มี Bupleuri radix เป็นส่วนประกอบ (Morinaga *et al.*, 2006b)

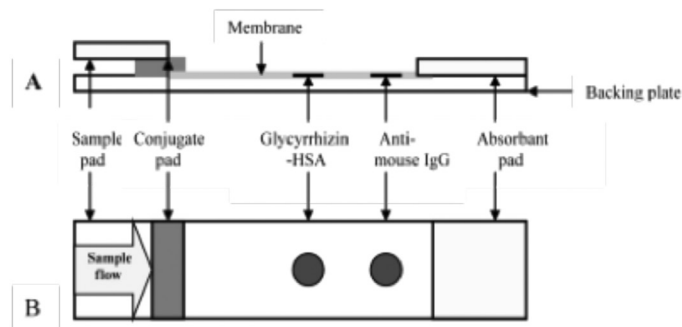
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพสารสำคัญในพืชสมุนไพรด้วยวิธี Immunochromatographic strip

ชุดตรวจสอบสาร (strip test) ใช้หลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดีโดยอาศัยการเคลื่อนที่ที่คล้ายกับวิธี TLC วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาสารสำคัญที่เป็น Ag ในพืชโดยเมื่อสารสกัดพืชที่มี Ag อยู่ เคลื่อนที่ผ่านบริเวณ conjugated pad ซึ่งจะมี MAb ที่ต่อกับ detector reagent สารที่เป็น Ag จะจับกับ MAb เมื่อเคลื่อนที่ต่อไปยัง capture zone ซึ่งมี Ag ที่ต่อกับโปรตีนอยู่ ในบริเวณนี้จะไม่เกิดการจับกันของ MAb กับ Ag เนื่องจากไม่มี MAb อิสระ

จาก conjugated pad เหลือพอที่จะจับ ทำให้ที่ capture zone ไม่เห็นสี และเมื่อสารเคลื่อนที่ไปยัง control zone จะเห็นแถบสี เนื่องจาก MAb จะถูกจับด้วย anti-mouse IgG กล่าวคือหากสารสกัดมี Ag อยู่จะปรากฏสีเพียงบริเวณ control zone เท่านั้น และหากสารสกัดไม่มี Ag อยู่จะปรากฏสีทั้งบริเวณ capture zone และ control zone (รูปที่ 3) วิธีนี้เป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพที่แสดงผลอย่างรวดเร็วภายใน 10 นาที ใช้สารสกัดพืชในปริมาณน้อย (200 µL) และมี detection limit ในระดับนาโนถึงไมโครกรัม ทำให้ตรวจสารในปริมาณน้อยได้

ตารางที่ 1 สารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค ELISA

สารสำคัญ	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้	ชนิดของแอนติบอดี	แหล่งอ้างอิง
Aconitine	0.1-1.5 µg/mL	MAb	Kido <i>et al.</i> , 2008a
Aristolochic acid-II	0.19-13 µg/mL	MAb	Tian <i>et al.</i> , 2008
Artemisinin	2-20 µg/mL	MAb	Tanaka <i>et al.</i> , 2007b
Asiaticoside	0.78-25 µg/mL	MAb	Juengwatanatrakul <i>et al.</i> , 2011
Bacopaside I	1.95-62.5 ng/mL	MAb	Phrompittayarat <i>et al.</i> , 2007
Bacoside A(3)	3.05-97.7 ng/mL	MAb	Tothiam <i>et al.</i> , 2011
Baicalin	0.2-2 µg/mL	MAb	Kido <i>et al.</i> , 2008b
Berberine	1.56-50 µg/mL	MAb	Kim <i>et al.</i> , 2004a
Codeine	1-100 ng/mL	MAb	Shoyama <i>et al.</i> , 1996
Coptisine	1.56-25 µg/mL	MAb	Kim <i>et al.</i> , 2004b
Crocin	0.01-0.2 µg/mL	MAb	Xuan <i>et al.</i> , 1999
Forskolin	5 ng/mL - 5 µg/mL	MAb	Yanagihara <i>et al.</i> , 1996b
Ginkgolic acid	10-40 µg/mL	MAb	Lounggratana <i>et al.</i> , 2004
Ginsenoside Rb1	3-8 µg/mL	MAb	Fukuda <i>et al.</i> , 2000a
Ginsenoside Re	0.08-0.7 µg/mL	MAb	Sritularak <i>et al.</i> , 2009
	0.02-10 µg/mL	scFv	Pongkitwittoon <i>et al.</i> , 2011
Ginsenoside Rf	0.01-10 ng/mL	MAb	Nah <i>et al.</i> , 2000
Ginsenoside Rg1	5-15 µg/mL	MAb	Fukuda <i>et al.</i> , 2000b
Glycyrrhizin	20-200 µg/mL	MAb	Shan <i>et al.</i> , 2001
Paeoniflorin	0.02-0.6 µg/mL	MAb	Lu <i>et al.</i> , 2003
	0.78-25 µg/mL	scFv	Lu <i>et al.</i> , 2006
Plumbagin	0.2-25 µg/mL	MAb	Sakamoto <i>et al.</i> , 2008
	0.2-25 µg/mL	scFv	Sakamoto <i>et al.</i> , 2009, 2010
Saikosaponin A	0.6-2.3 µg/mL	MAb	Zhu <i>et al.</i> , 2004
Sennoside A	0.02-0.2 µg/mL	MAb	Morinaga <i>et al.</i> , 2000, 2009b
	1.56-12.5 µg/mL	scFv	Juengwatanatrakul <i>et al.</i> , 2004
Sennoside B	0.5-15 ng/mL	MAb	Morinaga <i>et al.</i> , 2001, 2009b
Solasodine glycosides	0.078-2.5 µg/mL	MAb	Putalun <i>et al.</i> , 2000
Tetrahydrocannabinolic acid	10-200 µg/mL	MAb	Tanaka and Shoyama, 1999
Thebaine	0.06 - 1 ng/mL	MAb	Shoyama <i>et al.</i> , 1996

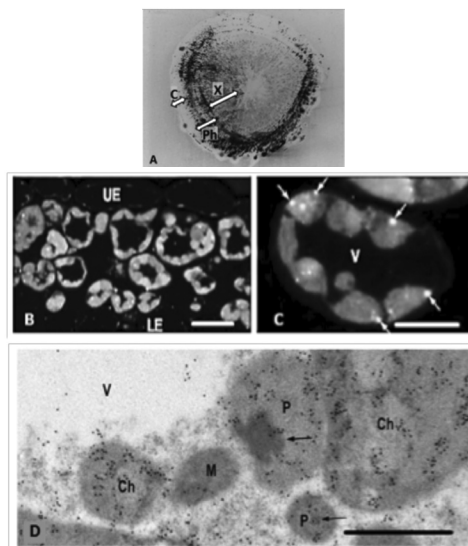


รูปที่ 3 แผนภาพแสดงชุดตรวจสอบด้วยวิธี Immunochromatographic strip ของสาร Glycyrrhizin; A; ด้านข้าง, B; ด้านบน (Putalun *et al.*, 2005)

การตรวจตำแหน่งของสารภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช (Immunohisto-, cytochemical localization)

การทราบตำแหน่งของสารภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชทำให้ทราบแหล่งที่สารสำคัญกระจายตัวอยู่ในเนื้อเยื่อหรือเซลล์พืช ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการคัดเลือกส่วนพืชเพื่อนำมาใช้ในการรักษาและการแยกสกัดสารสำคัญ หรือการ

ศึกษาตำแหน่งวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร การตรวจตำแหน่งของสารภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถทำได้หลายเทคนิค ได้แก่ เทคนิค Eastern blotting (Morinaga and Shoyama, 2011), เทคนิค immunofluorescence (Yokota *et al.*, 2011) และเทคนิค immunoelectron-microscopy (Yokota *et al.*, 2011)



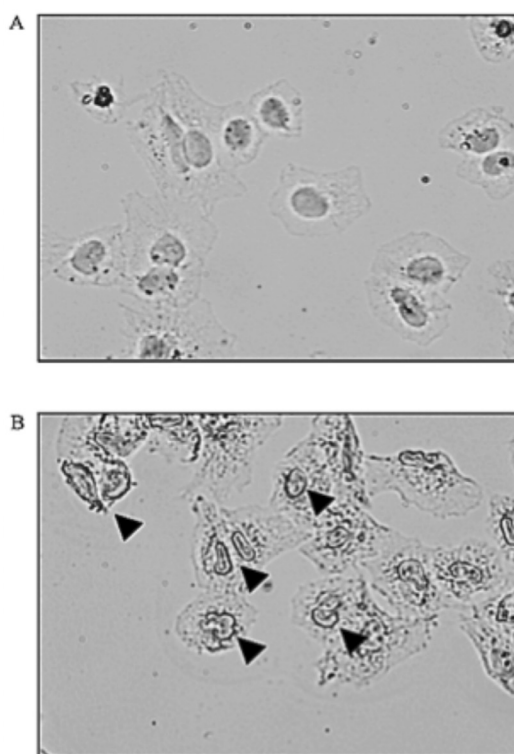
รูปที่ 4 A; การตรวจตำแหน่งของ G-Rb1 ในรากโสมด้วยวิธี Eastern blotting พบสารมากใน phloem (Ph) และ xylem (X) ตามลำดับ ไม่พบใน cork (C) (Tanaka *et al.*, 2007a), B;พบสารมากใน chloroplasts และ cytoplasm ของเซลล์ parenchyma แต่ไม่พบใน vacuoles (V), upper epidermis (UE) และ lower epidermis (LE) ของโสมด้วยวิธี IF, C;สีเข้มที่สุดใน cytoplasmic granules (ลูกศร) ของเซลล์ parenchyma, D;ตรวจด้วยวิธี IEM พบอนุภาคทองใน chloroplasts (Ch) และ peroxisomes (P) ของเซลล์ parenchyma และ พบน้อยใน vacuoles (V) และ mitochondria (M) (Yokota *et al.*, 2011)

การตรวจตำแหน่งด้วยเทคนิค Eastern blotting ทำได้โดยย้ายสารจากชิ้นส่วนพีซีไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF วิธีนี้สามารถบอกตำแหน่งของสารบนเนื้อเยื่อพีซีได้ แต่ไม่สามารถบอกตำแหน่งในเซลล์พีซีได้เนื่องจากการตรวจวัดการเกิดสีด้วยตาเปล่า และเป็นวิธีตรวจวัดทางอ้อม คือ ตรวจสารที่ติดบนเมมเบรน ไม่ได้ตรวจวัดที่เนื้อเยื่อพีซีโดยตรง ตัวอย่างการตรวจตำแหน่งของสาร ginsenoside Rb1 (G-Rb1) ในรากโสมแสดงในรูปที่ 4A โดยจะพบสาร G-Rb1 มากในบริเวณ phloem (Tanaka *et al.*, 2007a) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาตำแหน่งของสาร glycyrrhizin ในรากชะเอมเทศ (Shan *et al.*, 2000), สาร solasodine glycosides ในผลมะเขือ *Solanum khasianum* (Tanaka *et al.*, 1997) และสาร SA และ SB ในโกฐจุฬาลำเฒ่า (Morinaga *et al.*, 2009a)

เทคนิค immunofluorescence (IF) เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยดูการเรืองแสง (fluorescence) ของสี fluorescent dyes ที่ติดฉลาก (label) อยู่บนแอนติบอดีตัวที่ 2 และสังเกตการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสำคัญและ MAb เท่านั้น ที่เกิดการเรืองแสง โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจตำแหน่งของสารสำคัญทั้งในระดับเนื้อเยื่อและเซลล์ได้ Yokota และคณะ (2011) ได้ศึกษาตำแหน่งของ G-Rb1 ในส่วนต่างๆ ของต้นโสม *P. ginseng* ด้วยเทคนิค IF โดยใช้ anti-G-Rb1Mab (รูปที่ 4B, 4C)

เทคนิค immunoelectron-microscopy (IEM) เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยดูสีของอนุภาคทอง (gold particle) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รูปที่ 4D แสดงการตรวจตำแหน่ง G-Rb1 ด้วยเทคนิค IEM (Yokota *et al.*, 2011)

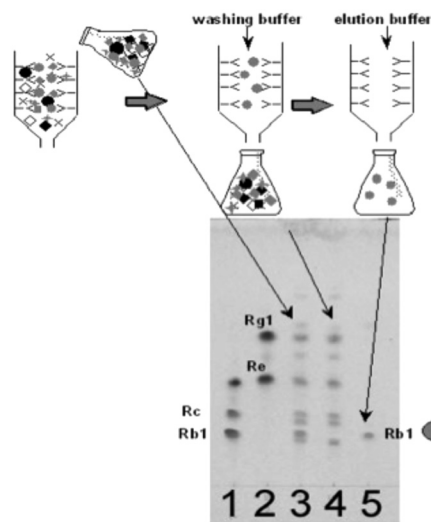
นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ MAb ในการตรวจหาตำแหน่งออกฤทธิ์ของสารธรรมชาติภายในเซลล์ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ โดย Joo และคณะ (2009) ได้ศึกษาการตรวจตำแหน่งของ ginsenoside Rg3 (G-Rg3) ในเซลล์มะเร็ง A549 human lung adenocarcinomas จากรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าสาร G-Rg3 ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะปรากฏอยู่บริเวณรอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส



รูปที่ 5 การตรวจตำแหน่งของ G-Rg3 ในเซลล์ A549 human lung adenocarcinomas (Joo *et al.*, 2009) :A; เซลล์ที่ไม่ได้รับสาร G-Rg3, B; เซลล์ที่ได้รับสาร G-Rg3

การแยกบริสุทธิ์โดยวิธี Immunoaffinity column chromatography

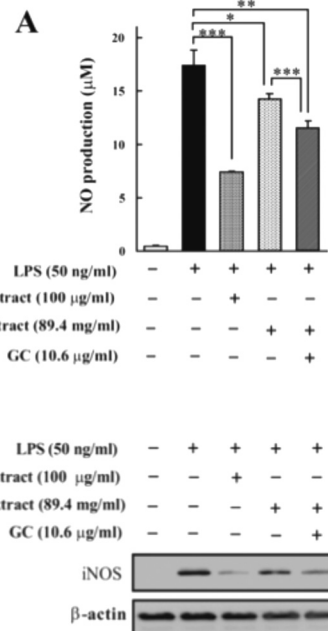
Immunoaffinity เป็นวิธีการแยกบริสุทธิ์สารที่อาศัยหลักการความชอบจับระหว่าง Ab กับ Ag จับกันแบบ reversible สารที่ไม่มีความจำเพาะกับ Ab จะถูกชะออกไปจากคอลัมน์ ส่วนสารที่ต้องการจะถูกชะออกโดยใช้ specific (affinity) elution หรือโดยการเปลี่ยนแปลง pH หรือ ionic strength ของบัฟเฟอร์หรือใช้ methanol 10-20% สารธรรมชาติที่มีการแยกโดยใช้ immunoaffinity column แสดงในตารางที่ 2 การแยกชนิดนี้เป็นการแยกที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ภายในขั้นตอนเดียว (one step) จึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่มีปริมาณน้อยในธรรมชาติ หรือมีกระบวนการแยกบริสุทธิ์ที่ซับซ้อนหรือหลายขั้นตอน



รูปที่ 6 การแยกสาร G-Rb1 ด้วยวิธี Immunoaffinity column โดยใช้ anti-G-Rg1 MAb (Tanaka *et al.*, 2007a): 1-2; สารมาตรฐาน G-Rb1, Rc, Re และ Rg1, 3; สารสกัดรากโสม, 4; washed fraction หลังจากผ่าน affinity column (knockout extract), 5; eluted fraction (G-Rb1)

จากกระบวนการแยกด้วยวิธี immunoaffinity column นั้นสารสกัดที่ถูกชะออกมาในช่วงแรกจะไม่มีสารออกฤทธิ์อยู่ (รูปที่ 6) เรียกสารสกัดนี้ว่าสารสกัดปราศจากสารออกฤทธิ์ (Knockout extract, KO) (Shoyama, 2007b, 2011; Shoyama *et al.*, 2007a) สารสกัดนี้สามารถนำมาตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อดูว่ามีสารชนิดอื่นๆ ที่สามารถออกฤทธิ์ได้หรือไม่ หรือยืนยันว่าสารที่แยกออกมาเป็นสารออกฤทธิ์ในสารสกัดนั้นจริงหรือไม่ ในกรณีที่สารที่แยกออกมาเป็นสารพิษ KO ก็จะเป็นสารสกัดที่สามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัย Uto และคณะ (2011) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิด nitric oxide (NO) และการแสดงของเอนไซม์ nitric oxide synthase (iNOS) ของสารสกัด KO ของรากชะเอมเทศ (licorice) พบว่าสารสกัด KO ที่ได้ยังมี glycyrrhizin (GC) ปนอยู่ 0.27% และสารสกัดจากรากชะเอมเทศสามารถยับยั้งการเกิด NO และ iNOS ได้ 57.7% ขณะที่สาร GC ไม่สามารถยับยั้งได้ เมื่อนำ KO และ KO ที่ใส่ GC มาทดสอบพบการยับยั้ง 17.8% และ .5% ตามลำดับ (รูปที่ 7) แสดงว่าความสามารถในการยับยั้ง NO และ

iNOS จำเป็นต้องอาศัยการออกฤทธิ์ร่วมระหว่าง GC และสารประกอบอื่นในรากชะเอมเทศ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษา ยีนยีนฤทธิ์การลดน้ำตาลในเลือดหนูทดลองของสารสกัด KO ของผลโสม พบว่าสารสกัด KO ของผลโสมไม่มีผลต่อการลดระดับน้ำตาล แสดงว่าสารออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในสารสกัดผลโสมคือ ginsenoside Re (Yuan and Tanaka, 2011)



รูปที่ 7 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด KO ของรากชะเอมเทศ (Uto *et al.*, 2011): A; ผลการยับยั้งการเกิด NO โดยตัวกระตุ้น LPS, B; การแสดงของเอนไซม์ iNOS โดย ตัวกระตุ้น LPS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

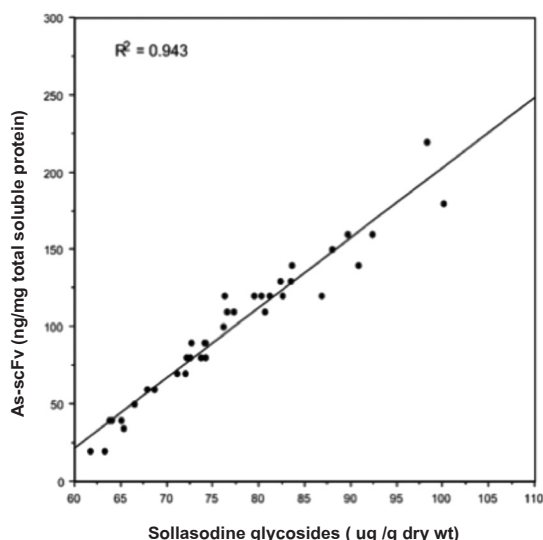
2 สารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีการวิเคราะห์ด้วยวิธี Eastern blotting, การตรวจด้วยชุดทดสอบ Immuno chromatographic strip และการแยกบริสุทธิ์ด้วยวิธี Immunoaffinity column

สารสำคัญ	Eastern blotting		Immuno chromatographic strip		Immunoaffinity column	
	Detection limit	แหล่งอ้างอิง	Detection limit	แหล่งอ้างอิง	Column capacity (µg/mL gel)	แหล่งอ้างอิง
Asiaticoside			12.5 µg/mL	Sritularuk et al., 2011		
Baicalin			0.6 µg/mL	Paudel et al., 2011		
Forskolin					9.41	Yanagihara et al., 1996a
Ginsenosides	125 ng	Fukuda et al., 2000a; Morinaga et al., 2005b				
Ginsenoside Rb1	n.r.	Fukuda et al., 2001	125 ng/mL	Putalun et al., 2004a	20	Fukuda et al., 2000c
Ginsenoside Re	0.25 µg	Morinaga et al., 2006a, 2010				
Ginsenoside Rg1	n.r.	Fukuda et al., 2001	125 ng/mL	Putalun et al., 2004a		
Glycyrrhizin	1.0 µg	Morinaga et al., 2005a	250 ng/mL	Putalun et al., 2005	33.5	Xu et al., 2007
Pseudogujubogenin			125 ng/mL	Imsungnoen et al., 2009		
Saikosaponins	62.5 ng µg	Morinaga et al., 2006b				
Sennoside A, B	62.5 ng	Morinaga et al., 2009a	2 µg/mL	Putalun et al., 2004b		
Solasodine glycosides	1.6 ng	Tanaka et al., 1997				
Solamargine					6.19	Putalun et al., 1999
Solasodine					12.92	Putalun et al., 1999
Solasonine					3.92	Putalun et al., 1999

n.r.; data not report

การเพิ่มการผลิตสารสำคัญในพืชแบบมุ่งเป้า (Missile type molecular breeding)

โดยปกติการเพิ่มการผลิตสารในพืชอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเทคนิคพิเศษอื่นเช่น การใส่สารตั้งต้น การใช้ตัวกระตุ้น การใช้ตัวดูดซับ เป็นต้น หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยการส่งถ่ายยีนของเอนไซม์ในวิถีชีวสังเคราะห์ของสารสำคัญนอกจากนั้นสามารถเพิ่มการผลิตสารสำคัญโดยส่งถ่ายยีน scFv ที่จำเพาะต่อสารสำคัญในพืชลงไปในพืช โดยสมมติฐานคือ scFv ที่พืชสร้างขึ้นจะเข้าไปจับกับสารสำคัญในเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชไม่สามารถตรวจพบสารสำคัญที่สร้างได้ ส่งผลให้เซลล์พืชสร้างสารชนิดนั้นขึ้นมาอีก เนื่องจากการเพิ่มการผลิตโดยไม่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์จึงเรียกรวมกันว่า Missile type molecular breeding (Putalun, 2011) ตัวอย่างเช่น การส่งถ่ายยีน scFv ต่อ solamargine ลงไปในรากลอยมะเขือ (*S. khasianum*) ส่งผลให้ปริมาณสารกลุ่ม solasodine glycosides ในรากลอยดัดแปลงพันธุกรรมเพิ่มขึ้น 2.3 เท่า โดยปริมาณโปรตีน scFv ที่วัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณสารกลุ่ม solasodine glycosides ที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 8) (Putalun et al., 2003)



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ anti-solamarginescFv ในรากลอยมะเขือ *S. khasianum* ดัดแปลงพันธุกรรมกับปริมาณสารกลุ่ม solasodine glycosides ที่ตรวจวัดได้ (Putalun et al., 2003)

บทสรุป

MAbs และ scFvs ที่จำเพาะต่อสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ถูกผลิตขึ้นและนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเภสัชเวทหลายแขนง โดยมีข้อดีคือมีไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธีอื่น สามารถวิเคราะห์สารปริมาณน้อยได้ สามารถวิเคราะห์ปริมาณจากสารสกัดได้โดยตรง ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณมากพร้อมกันได้ งานทางด้านเภสัชเวทที่ได้มีการนำ MAbs และ scFvs มาประยุกต์ใช้ได้แก่ การควบคุมคุณภาพสมุนไพรหรือยาแผนโบราณ ทั้งในการวิเคราะห์เชิงปริมาณสารสำคัญโดยใช้เทคนิค ELISA และ Eastern blotting และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค Eastern blotting และ immunochromatographic strip นอกจากนี้ยังสามารถใช้ศึกษาตำแหน่งของสารสำคัญภายในเนื้อเยื่อหรือเซลล์พืชโดยใช้เทคนิค Eastern blotting, immunofluorescence และ immunoelectron-microscopy และสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวศึกษาตำแหน่งที่สารออกฤทธิ์ภายในเนื้อเยื่อหรือเซลล์สัตว์ได้ รวมไปถึงใช้แยกบริสุทธิ์สารสำคัญในขั้นตอนเดียวโดยใช้เทคนิค immuno-affinity chromatography และสารสกัดที่ถูกแยกสารสำคัญออกด้วยวิธี immunoaffinity chromatography ยังสามารถใช้ในการศึกษาเพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ การประยุกต์ใช้ scFvs ร่วมกับเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ช่วยเพิ่มการผลิตสารสำคัญในพืชหรือเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชได้ จากข้อได้เปรียบและประโยชน์ดังกล่าว MAbs และ scFvs จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านเภสัชเวทได้ และสามารถพัฒนาต่อไปในอนาคตเพื่อให้เป็นวิธีมาตรฐานและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

References

Afshar S, Asai T, Morrison SL. Humanized ADEPT comprised of an engineered human purine nucleoside phosphorylase and a tumor targeting peptide for treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(1): 185-93.

Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. Application of ELISA, Western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of *Panax* species and traditional Chinese herbal medicines. *Analyst* 2000a; 125: 1425-1429.

Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. Double staining of ginsenosides by Western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24(10): 1157-60.

Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. *Cytotechnology* 2000b; 34(3): 197-204.

Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *J Nat Prod* 2000c; 63(2): 283-5.

Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005; 23(9): 1126-1136.

Imsungnoen N, Phrompittayarat W, Ingkaninan K, Tanaka H, Putalun W. Immunochromatographic assay for the detection of pseudojubilogenin glycosides. *Phytochem Anal* 2009; 20(1): 64-67.

Joo EJ, Ha YW, Shin H, Son SH, Kim YS. Generation and Characterization of Monoclonal Antibody to Ginsenoside Rg3. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(4): 548—552.

Juengwatanatrakul T, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Production of single chain Fv fragment against sennoside A. Proceeding of the 51th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy. 9th September 2004, p203.

Juengwatanatrakul T, Sritularak B, Amornnopparatanakul P, et al. Preparation of a specific monoclonal antibody to asiaticoside for the development of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Analyst* 2011; 136(5): 1013-1017.

- Kido K, Edakuni K, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. An enzyme-linked immunosorbent assay for aconitine-type alkaloids using an anti-aconitine monoclonal antibody. *Anal Chim Acta* 2008a; 616(1):109-114.
- Kido K, Morinaga O, Shoyama Y, Tanaka H. Quick analysis of baicalin in *Scutellariae Radix* by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. *Talanta* 2008b; 77(1): 346-350.
- Kim J, Tanaka H, Shoyama Y. Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines. *Analyst* 2004a; 129(1): 87-91.
- Kim J, Tanaka H, Yuan C, Shoyama Y. Development of monoclonal antibody against isoquinoline alkaloid coptisine and its application for the screening of medicinal plants. *Cytotechnology* 2004b; 44(3):115-123.
- Kobatake E, Yamano R, Mie M. Targeted delivery using immunoliposomes with a lipid-modified antibody-binding protein. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 163(2):296-303.
- Linke S, Neubauer K, Dörner MB, Dörner BG, Pauli G, Schweiger B. Generation and characterisation of monoclonal antibodies against influenza virus A, subtype H5N1. *J Virol Methods* 2011; 175(1): 85-94.
- Loungtrana P, Tanaka H, Shoyama Y. Production of monoclonal antibody against ginkgolic acids in *Ginkgo biloba* Linn. *Am J Chin Med* 2004; 32(1): 33-48.
- Lu Z, Masaki T, Shoyama Y, Tanaka H. Construction and expression of a single chain Fv fragment against pharmacologically active paeoniflorin in *Escherichia coli*, and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Planta Med* 2006; 72(2): 151-155.
- Lu Z, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(6): 862-866.
- Manjappa AS, Chaudhari KR, Venkataraju MP, et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Release* 2011; 150(1):2-22.
- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonner TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization; Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991; 222:581-597.
- Mattos-Arruda LD, Dienstmann R, Tabernero J. Development of Molecular Biomarkers in Individualized Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011; [In press]
- Morinaga O, Fujino A, Tanaka H, Shoyama Y. An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines. *Anal Bioanal Chem* 2005a; 383(4):668-672.
- Morinaga O, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. Chromatographic resolution of glucosidic compounds, ginsenosides on polyether sulphone membrane, and its application to the quantitative immunoassay for ginseng saponins. *Glycobiology* 2005; 15(10): 1061-1066.
- Morinaga O, Nakajima S, Tanaka H, Shoyama Y. Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside A, their characterization and use in ELISA. *Analyst* 2000; 125: 1109-13.

- Morinaga O, Shoyama Y. Development of new staining technology "Eastern blotting" using monoclonal antibody. *Current Drug Discovery Technologies* 2011; 8:42-50.
- Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006a; 830(1): 100-104.
- Morinaga O, Uto T, Sakamoto S, et al. Development of eastern blotting technique for sennoside A and sennoside B using anti-sennoside A and anti-sennoside B monoclonal antibodies. *Phytochem Anal* 2009a; 20(2):154-8.
- Morinaga O, Uto T, Sakamoto S, Tanaka H, Shoyama Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for total sennosides using anti-sennoside A and anti-sennoside B monoclonal antibodies. *Fitoterapia* 2009b; 80(1): 28-31.
- Morinaga O, Uto T, Yuan CS, Tanaka H, Shoyama Y. Evaluation of a new eastern blotting technique for the analysis of ginsenoside Re in American ginseng berry pulp extracts. *Fitoterapia* 2010; 81(4): 284-288.
- Morinaga O, Zhu S, Tanaka H, Shoyama Y. Visual detection of saikosaponins by on-membrane immunoassay and estimation of traditional Chinese medicines containing *Bupleuri radix*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006b; 346(3): 687-692.
- Morinaga O, Nakajima S, Tanaka H, Shoyama Y. Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA, *Analyst* 2001; 126(8): 1372-6.
- Nah JJ, Song JY, Choi S, et al. Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* 2000; 23(5):523-6.
- Nelson AL. Antibody fragments; Hope and hype. *mAbs* 2010; 2:77-83.
- Paudel MK, Putalun W, Sritularak B, Morinaga O, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. Development of a combined technique using a rapid one-step immunochromatographic assay and indirect competitive ELISA for the rapid detection of baicalin. *Anal Chim Acta* 2011;701(2):189-93.
- Petráková K. Avastin in the treatment of breast cancer. *Klin Onkol* 2011; 24(2):101-5.
- Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Jetiyanon K, Wittaya-Areekul S, Ingkaninan K. Determination of pseudojubenogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochem Anal* 2007; 18(5):411-418.
- Pongkitwittoon B, Sakamoto S, Morinaga O, et al. Single-chain variable fragment antibody against ginsenoside Re as an effective tool for the determination of ginsenosides in various ginsengs. *J Nat Med* 2011; 65(1): 24-30.
- Putalun W, Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y. A one-step immunochromatographic assay for detecting ginsenosides Rb1 and Rg1. *Anal Bioanal Chem* 2004a; 378(5):1338-1341.
- Putalun W, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides A and B. *Phytochem Anal* 2004; 15(2):112-116.
- Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y. Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay. *Phytochem Anal* 2005; 16(5):370-4.

- Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y. Rapid separation of solasodine glycosides by an immunoaffinity column using anti-solamargine monoclonal antibody. *Cytotechnology* 1999; 31(1-2):153-158.
- Putalun W, Tanaka H, Yahara S, Lhieochaiphon S, Shoyama Y. Survey of solasodine-type glycoalkaloids by western blotting and ELISA using anti-solamargine monoclonal antibody. *Biol Pharm Bull* 2000; 23(1):72-5.
- Putalun W, Taura F, Qing W, Matsushita H, Tanaka H, Shoyama Y. Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants. *Plant Cell Rep* 2003; 22(5):344-349.
- Putalun W. Technology of compact MAb and its application for medicinal plant breeding named as missile type molecular breeding. *Current Drug Discovery Technologies* 2011; 8:24-31.
- Sakamoto S, Putalun W, Tsuchihashi R, Morimoto S, Kinjo J, Tanaka H. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using highly-specific monoclonal antibodies against plumbagin. *Anal Chim Acta* 2008; 607(1):100-105.
- Sakamoto S, Taura F, Putalun W, et al. Construction and expression of specificity-improved single - chain variable fragments against the bioactive naphthoquinone, plumbagin. *Biol Pharm Bull* 2009; 32 (3): 434-439.
- Sakamoto S, Taura F, Tsuchihashi R, et al. Expression, purification, and characterization of anti-plumbagin single-chain variable fragment antibody in Sf9 insect cell. *Hybridomas* 2010; 29(6):481-488.
- Shan SJ, Tanaka H, Shoyama Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. *Anal Chem* 2001; 73(24):5784-5790.
- Shan SJ, Putalun W, Fukuda N, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. ELISA, Western blotting, immunocytochemical localization and immunoaffinity column for naturally occurring bioactive compounds using monoclonal antibodies. *J Food and Drugs Analysis* 2000; 8(4): 258-269.
- Shoyama Y, Fukada T, Murakami H. Production of monoclonal antibodies and ELISA for thebaine and codeine. *Cytotechnology* 1996; 19: 55-61.
- Shoyama Y, Morinaga O, Putalun W, Juengwatanatrakul T, Tanaka H. New strategy for the analysis of traditional Chinese medicine using monoclonal antibodies. *Proceeding of The 2nd Sino-Thai International Conference 2007a*. 2-6th December 2007; 2: 35-39.
- Shoyama Y. Monoclonal antibodies against small molecule natural products and their applications, Eastern blotting and knockout extract. *Pharmaceuticals* 2011; 4: 950-963.
- Shoyama Y. Pharmacognosical study during 40 years. *Yakugakuzasshi* 2007; 127(10):1593-1620.
- Sritularak B, Morinaga O, Yuan CS, Shoyama Y, Tanaka H. Quantitative analysis of ginsenosides Rb1, Rg1, and Re in American ginseng berry and flower samples by ELISA using monoclonal antibodies. *J Nat Med* 2009; 63(3):360-3.
- Sritularuk B, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Tanaka H, Morimoto S. A rapid one-step immunochromatographic assay for the detection of asiaticoside. *J Nat Med* 2011; DOI 10.1007/s11418-011-0582-2. [In press]
- Tanaka H, Fukuda N, Shoyama Y. Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginseng saponins in the field of traditional Chinese medicines. *J Agric Food Chem* 2007a; 55(10):3783-7.

- Tanaka H, Putalun W, De-Eknamkul W, Matangkasombut O, Shoyama Y. Preparation of a novel monoclonal antibody against the antimalarial drugs, artemisinin and artesunate. *Planta Med* 2007b; 73(10):1127-1132.
- Tanaka H, Putalun W, Tsuzaki C, Shoyama Y. A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine. *FEBS Lett* 1997; 404(2-3): 279-82.
- Tanaka H, Shoyama Y. Monoclonal antibody against tetrahydrocannabinolic acid distinguishes Cannabis sativa samples from different plant species. *Forensic Sci Int* 1999; 106(3):135-46.
- Tian M, Tanaka H, Shang M, et al. Production, characterization of a monoclonal antibody against aristolochic acid-II and development of its assay system. *Am J Chin Med* 2008; 36(2):425-36.
- Tothiam C, Phrompittayarat W, Putalun W, et al. An enzyme-linked immunosorbant assay using monoclonal antibody against bacoside A(3) for determination of jujubogenin glycosides in Bacopamonnieri (L.) Wettst. *Phytochem Anal* 2011; DOI 10.1002/pca.1293. [In Press]
- Uto T, Tuvshintogtokh I, Shoyama Y. Preparation of knockout extract for determination of really active compound using MAb. *Current Drug Discovery Technologies* 2011; 8:16-23.
- Xu J, Tanaka H, Shoyama Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 850(1-2):53-8.
- Xuan L, Tanaka H, Xu Y, Shoyama Y. Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization. *Cytotechnology* 1999; 29(1):65-70.
- Yanagihara H, Sakata R, Minami H, Tanaka H, Shoyama Y, Murakami H. Immunoaffinity column chromatography against forskolin using an anti-forskolin monoclonal antibody and its applications. *Anal Chim Acta* 1996 ; 335: 63 70.
- Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y, Murakami H. Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies. *Planta Med* 1996 b; 62:169-172.
- Yokota S, Onohara Y, Shoyama Y. Immunofluorescence and Immunoelectron Microscopic Localization of Medicinal Substance, Rb1, in Several Plant Parts of Panax ginseng. *Current Drug Discovery Technologies* 2011; 8:51-59.
- Yuan CS, Tanaka H. Bioactivity of american ginseng by knockout extract preparation using monoclonal antibody. *Current Drug Discovery Technologies* 2011; 8:32-41.
- Zhu S, Shimokawa S, Tanaka H, Shoyama Y. Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(1):66-71.