

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต โมโนโคลนัล Anti-A₁ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

อุดม ดึงต้อย, ทศนีย์ สกุลดำรงคัพานิช และ รัชณี แก้วมงคล

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร.10330

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อทำการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A₁ การใช้เทคนิคการเชื่อมเซลล์ (fusion technique) ระหว่างเซลล์ spleen ของหนู Balb/c ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย 20% เซลล์หมู่โลหิต A₁ กับเซลล์มะเร็งของหนูสายพันธุ์เดียวกัน (x653.8Ag) ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่คงทน ที่สร้าง anti-A₁ ได้เป็นผลสำเร็จ น้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากโคลน (6C₁₀) ที่สร้างแอนติบอดี ได้นำมาทดลองผสมเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-A₁ ผลการทดสอบความแรง ความเร็ว และความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์หมู่โลหิตต่างๆ เปรียบเทียบกับ lectin anti-A₁ ที่ศูนย์ฯ ผลิตและน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ จากต่างประเทศ พบว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ ที่ผลิตขึ้นใหม่ มีความแรงดีกว่า lectin anti-A₁ ถึง 8 dilutions และดีกว่าโมโนโคลนัล anti-A₁ (ต่างประเทศ) 2 dilutions มีความเร็วในการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ A₁ และ A₁B บนสไลด์ไม่แตกต่างกัน และมีความจำเพาะสูงโดยจะให้ผลบวกกับเซลล์หมู่โลหิต A₁, A₁B และให้ผลลบกับเซลล์หมู่โลหิต B, O รวมทั้งหมู่ย่อยต่างๆ ของหมู่โลหิต A ดังนั้นแอนติบอดีนี้จึงเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัล anti-A₁ เพื่อใช้ในทางธนาคารเลือดต่อไป

Key Words : ● Monoclonal anti-A₁

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2544;11:21-8.

หมู่โลหิต A สามารถแยกเป็นหมู่หลักได้ 2 หมู่ คือ หมู่โลหิต A₁ และ A₂ ประมาณ 80% จะเป็นหมู่โลหิต A₁ ที่เหลือจะเป็นหมู่ย่อยต่างๆของหมู่โลหิต A เช่นหมู่โลหิต A₂, A₃, A_x เป็นต้น โดยจะพบหมู่ A₂ มากที่สุด¹ ในทางธนาคารเลือดโดยทั่วไปไม่มีความจำเป็นต้องตรวจแยกหมู่โลหิต A₁ และ A₂ ในเลือดผู้บริจาคโลหิตหรือ

เลือดผู้ป่วย ยกเว้นในกรณีที่ต้องตรวจพบ anti-A₁ ในซีรัมของบุคคลที่มีหมู่ A₂ หรือ A₂B โดยจะพบ anti-A₁ ประมาณ 1-8% ในคนหมู่ A₂ และ 22-35% ในคนหมู่ A₂B และถึงแม้ว่า anti-A₁ ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิไม่เกิน 25°C และไม่มีผลทางคลินิก แต่อาจก่อให้เกิดปัญหาในตรวจหมู่ ABO จะได้ผลการตรวจเซลล์และซีรัมไม่ตรงกัน (discrepancies) อีกทั้งถ้า anti-A₁ นี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 37°C ก็สามารทำให้เกิดปัญหาเม็ดเลือดแดงแตกจากการรับเลือด (hemolytic transfusion

ได้รับต้นฉบับ 1 มีนาคม 2544 และให้ตีพิมพ์ 24 มีนาคม 2544

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นายอุดม ดึงต้อย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

reaction) ได้² ดังนั้นในบางกรณี จึงมีความจำเป็นต้องตรวจแยกหมู่โลหิต A_1 และ A_2

น้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti- A_1 ที่ใช้สำหรับตรวจแยกหมู่โลหิต A_1 และ A_2 สามารถเตรียมได้จากการใช้เซลล์ A_2 ดูดซับซีรัมหมู่โลหิต B (absorbed anti- A_1) หรือสามารถเตรียม lectin anti- A_1 โดยการสกัดเมล็ด Dolichos biflorus ซึ่ง anti- A_1 ที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธี จะทำปฏิกิริยากับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 แต่ไม่จับกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงหมู่ A_2 อย่างไรก็ตาม lectin anti- A_1 ไม่ได้มีความจำเพาะกับเซลล์ A_1 เท่านั้น แต่สามารถจับกลุ่มกับเซลล์หมู่ B หรือ O ที่มี Cad แอนติเจนอยู่ด้วย³ ศูนย์บริการโลหิตฯ ได้ทำการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti- A_1 จากเมล็ด Dolichos biflorus ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2517 แต่เนื่องจากปัจจุบันบริเวณพื้นที่ที่ใช้ปลูกเมล็ดพืชลดน้อยลง เนื่องจากการสร้างอาคารใหม่เพิ่มขึ้นและขบวนการผลิตก็สามารถเจือจางน้ำสกัดจากเมล็ดพืชได้เล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเมล็ดพืชไปบ้าง กอปรกับฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ได้พัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti- A , anti-B, anti-AB และ anti-D เป็นโมโนโคลนัลแอนติบอดีได้สำเร็จแล้ว⁴⁷ จึงได้นำความรู้และประสบการณ์ที่ผ่านมา มาทำการทดลองผลิตโมโนโคลนัล anti- A_1 โดยการฉีดกระตุ้นหนู Balb/c ด้วยเม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 แล้วนำ immunized spleen cells ของหนูมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งของหนู (x653.8Ag) ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่คงทนสร้าง anti- A_1 ได้เป็นผลสำเร็จ ในการทดลองครั้งนี้ ยังได้ทดสอบความเหมาะสมของโมโนโคลนัล anti- A_1 ในการที่จะนำมาผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti- A_1 เพื่อใช้ตรวจแยกหมู่ A_1 และ A_2 แทนน้ำยา lectin anti- A_1 ที่เตรียมจากเมล็ด Dolichos biflorus

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. หนู Balb/c

2. เซลล์มะเร็ง (x653.8 Ag)
3. Polyethyleneglycol 4000 (MERCK)
4. Tissue culture plastic ware (NUNE)
5. Hypoxanthin Aminopterin Thymidine (HAT) (SAGMA CHEMICAL CO)
6. Monoclonal anti- A_1 (Mono. anti- A_1) (Biotest) Lot.1110500
7. Lectine anti- A_1 ศูนย์บริการโลหิตฯ (NBC) Lot.42030
8. เม็ดโลหิตแดงหมู่ A_1 , A_2 , A_1B , A_2B , B และ O

วิธีการ

การผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti- A_1 (production of anti- A_1 hybridoma cell lines)^{4,5} ฉีดกระตุ้นหนู Balb/c ด้วย 0.2 มล.เม็ดเลือดแดงหมู่ A_1 (20% ในน้ำเกลือ) เข้าทาง intraperitoneum จำนวน 4 ครั้ง ห่างกันทุก 1 สัปดาห์ ภายหลังฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย 3 วันทำการเชื่อมเซลล์ (fusion) โดยนำ immunized spleen cells จากหนูมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็ง (x653.8Ag) ในอัตราส่วน 5:1 ใช้ 50% polyethyleneglycol เป็น fusogen เลี้ยงเซลล์ภายหลัง fusion ในอาหารหลุม 96 wells ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Hypoxanthin Aminopterin Thymidine โดยมี macrophage จากหนู Balb/c เป็น feeder cells ภายหลัง เชื่อมเซลล์ 10-14 วัน เมื่อมีเซลล์ลูกผสม (hybridoma) เกิด และโคลนโต 1 ใน 3 ของหลุม เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture supernate) มาทดสอบการสร้างแอนติบอดี (screening test) ด้วยวิธีตกตะกอนในอาหารหลุม V-plate กับ 1% เซลล์ A_1 , A_2B , B และ O คัดเลือกหลุมที่สร้าง anti- A_1 ที่ต้องการ นำเซลล์ hybridoma มาทำ limiting dilution 2 ครั้ง โดยการเจือจางหลุมที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการเพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวที่จะเจริญเป็นโคลนเดี่ยวที่มีความคงทนและสร้าง anti- A_1 (เซลล์สายพันธุ์) ตามต้องการ ทำการแช่แข็งเซลล์สายพันธุ์ของโคลน

เดี๋ยวนี้ไว้ เพื่อนำมาเลี้ยงขยายให้ผลิตแอนติบอดีต่อไป

การผลิตน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁

นำเซลล์สายพันธุ์ hybridoma ที่สร้าง anti-A₁ มาเลี้ยงขยายใน tissue culture flasks จนได้ประมาณ 5 ลิตร ปล่อยให้เซลล์ตาย นำไปปั่นแยกเซลล์ debrisทิ้งไป เก็บน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์มาเติม NaN₃ ทำให้เป็น 0.1% เติมน้ำ NaCl 8 กรัม/ลิตร Na₂EDTA 7.4 กรัม/ลิตร ปรับ pH ด้วย NaOH จนได้ pH 7.0±0.1 นำไปกรองให้ปราศจากเชื้อ เก็บในตู้เย็น 4°C

การศึกษาคุณภาพของโมโนโคลนัล anti-A₁ ที่ผลิตขึ้น

ทำการศึกษาร่วมเปรียบเทียบน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ กับ lectin anti-A₁ (Dolichos biflorus) ซึ่งผลิตโดยฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ และ commercial โมโนโคลนัล anti-A₁ (Biotest)

1. ความแรง (potency)⁸ ทำการศึกษาหาไตเตอร์ของน้ำยา antiserum ต่างๆ โดยการเจือจางแอนติซีรัมแบบ two-fold dilution และให้ทำปฏิกิริยากับเซลล์ A₁ และ A₁B อ่านส่วนกลับของ dilution สุดท้ายที่ให้ผลบวกด้วยตาเปล่า

2. ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (avidity)⁹ โดยให้ทำปฏิกิริยากับเซลล์ A₁, A₁B, A₂, A₂B, B และ O ที่มี ความเข้มข้น 30-40% บนแผ่น slide อ่านเวลาที่เริ่มเห็นปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และรออ่านความแรงที่มองเห็นเมื่อครบ 2 นาที

3. ความจำเพาะ (specificity) ในการเกิดปฏิกิริยา

3.1 โดยใช้แอนติบอดีที่จะทดสอบ 2 หยด ทดสอบกับ 1 หยดของ 2% เซลล์โลหิตผู้บริจาคที่ได้ตรวจพิสูจน์หมู่โลหิต A₁, A₁B, B และ O รวมทั้งหมู่ย่อยต่างๆ ของหมู่โลหิต A แล้วจำนวน 2,388 ราย

3.2 ทดสอบกับ papainized cells¹⁰ หมู่ A₁, A₁B, B, O, A₂, A₂B โดย treat cells ต่างๆ ด้วย papain เตรียมเป็น 2% เซลล์ ในน้ำเกลือแล้วจึงนำมา

ทดสอบกับแอนติบอดีที่จะทดสอบเช่นเดียวกับ ข้อ 3.1

ผลการทดลอง

การผลิตเซลล์สายพันธุ์ที่สร้าง anti-A₁

จากการเชื่อมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ของม้าม (spleen cells) ของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วยเซลล์ A₁ กับเซลล์มะเร็งของหนูในครั้งนั้น มีโคลนเกิดขึ้นทั้งหมด 185 โคลน ผลการทดสอบการสร้างแอนติบอดีด้วย เซลล์ A₁, A₂B, B และ O พบว่ามี 163 โคลนที่ไม่สร้างแอนติบอดี มี 8 โคลน สร้าง non-specific antibody โดยให้ผลบวกกับทุกเซลล์ มี 9 โคลนสร้าง anti-A โดยให้ผลบวกเฉพาะกับเซลล์ A₁ และ A₂B แต่มีความแรงของ anti-A ต่ำ โดยให้ความแรงกับเซลล์ A₁ ตั้งแต่ 1:2 ถึง 1:16 เท่านั้น และมี 5 โคลนที่สร้าง anti-A₁ โดยให้ผลบวกเฉพาะกับเซลล์ A₁ เท่านั้น แต่เมื่อนำมาเลี้ยงขยายต่อพบว่า 4 โคลน เซลล์ไม่สลายคือเซลล์มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอและเซลล์ที่เยียว บางโคลนหยุดสร้างแอนติบอดี มีเพียงโคลนเดียวคือโคลน 6C₁₀ ที่สามารถเลี้ยงขยายทำ limiting dilution อีก 2 ครั้งทำให้ได้โคลนที่เจริญมาจากเซลล์เดียวเป็นโมโนโคลนและยังคงสร้าง anti-A₁ อยู่ จึงได้นำมาเลี้ยงขยาย และเก็บน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดลองผสมทำเป็นน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁

ผลการศึกษา น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ ของศูนย์บริการโลหิตฯ

เมื่อนำโมโนโคลน anti-A₁ มาทดลองผสมเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตและนำมาทดสอบความแรงพบว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) ที่ผลิตจาก clone 6C₁₀ ให้ความแรงเฉลี่ยกับเซลล์ A₁ 3 ราย คือ 64 ซึ่งแรงกว่าโมโนโคลนัล anti-A₁ (Biotest) คือ 32 และแรงกว่า lectin anti-A₁ (NBC) คือ 8 เมื่อทดสอบกับเซลล์ A₁B น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) ก็มีความแรงมากกว่าโมโนโคลนัล anti-A₁ (Biotest) และ lectin anti-A₁ (NBC) โดยให้ความแรง 32, 16 และ 4 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Titer of Mono. anti-A₁ (NBC) as compared with Mono. anti-A₁ (Biotest) and lectin. anti-A₁ (NBC)

2% red cells in saline	Mono. anti-A ₁ (NBC)	Mono. anti-A ₁ (Biotest)	Lectin anti-A ₁ (NBC)
A ₁	64 (32-64)*	32 (16-64)	8 (4-8)
A ₁ B	32*	16	4
A ₂	-	-	-
A ₂ B	-	-	-
B	-	-	-
O	-	-	-

*Average of titers from 3 blood samples. In bracket indicated the range of titers.

ตารางที่ 2 Avidity test (sec) of Mono. anti-A₁ (NBC) as compared with anti-A₁ (Biotest) and lectin anti-A₁ (NBC)

30-50% red cells in own serum	Mono. anti-A ₁ (NBC)	Mono. anti-A ₁ (Biotest)	Lectin anti-A ₁ (NBC)
A ₁	3.2 (2.8-4.0)*	3.2 (2.8-4.0)	3.3 (2.8-4.0)
A ₁ B	3.5 (3.2-3.8)**	3.2 (3.0-3.6)	3.3 (3.0-3.6)
A ₂	-	-	-
A ₂ B	-	-	-
B	-	-	-
O	-	-	-

*Average of reaction time (sec) from 24 blood samples; **Average of reaction time (sec) from 5 blood samples;

In bracket indicated the range of reaction times.

เมื่อศึกษาความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา พบว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (Biotest) และ lectin anti-A₁ (NBC) เกิดปฏิกิริยากับเซลล์ A₁ จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเฉลี่ยได้ความเร็วไม่แตกต่างกัน คือ 3.2, 3.2 และ 3.3 วินาที ตามลำดับ และความเร็วโดยเฉลี่ยในการเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ A₁B จำนวน 5 ตัวอย่าง ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือ 3.5, 3.2 และ 3.3 วินาที ตามลำดับโดยให้ผลลบกับเซลล์ A₂, A₂B, B และ O เหมือนกันทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 2

การทดสอบความจำเพาะเมื่อทดสอบกับเซลล์หมู่โลหิตต่างๆ ที่ treat ด้วยเอนไซม์พบว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) ให้ผลไม่แตกต่างจาก anti-A₁ (Biotest) และ lectin anti-A₁ คือจะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะ โดยให้ผลบวกกับเซลล์ที่เป็น A₁ และ A₁B เท่านั้น และให้ผลลบกับเซลล์ B, O, A₂ และ A₂B ดังแสดงในตารางที่ 3 และเมื่อนำมาทดลองใช้ในการตรวจหมู่โลหิตผู้บริจาคโลหิต รวมทั้งทดสอบกับหมู่ย่อยต่างๆ ของหมู่โลหิต A พบว่าน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) ให้ปฏิกิริยาจำเพาะถูกต้อง โดยให้ผลบวกกับเซลล์ A₁ และ A₁B

ตารางที่ 3 Reactivities of Mono. anti-A₁ (NBC), Mono. anti-A₁ (Biotest) and lectin anti-A₁ (NBC) test with enzyme treated cells.

2% enzyme treated RBC	Mono. anti-A ₁ (NBC)		Mono. anti-A ₁ (Biotest)		Lectin anti-A ₁ (NBC)	
	Macro	Micro	Macro	Micro	Macro	Micro
A*	4+	NT	4+	NT	4+	NT
A ₁ B*	4+	NT	4+	NT	4+	NT
B*	0	0	0	0	0	0
O*	0	0	0	0	0	0
A ₂ **	W	W	W	W	2+	NT
A ₂ B*	0	0	0	0	0	0

*5 cells were tested; **2 cells were tested; Macro = Macroscopic reading; Micro = Microscopic reading; NT = Not tested

ตารางที่ 4 Specificity of Mono. anti-A₁ (NBC) as compared with lectin anti-A₁ (NBC)

Antigen	No. of total cells tested	No. of positive		No. of negative	
		Mono. anti-A ₁	Lectin. anti-A ₁	Mono. anti-A ₁	Lectin. anti-A ₁
A ₁	510	510	510	0	0
A ₁ B	180	180	180	0	0
A ₂	7	0	1	7	6
A ₂ B	27	0	0	27	27
A ₃	12	2	3	10	9
A ₃ B	9	0	0	9	9
A _x	3	0	0	3	3
B	750	0	0	750	750
O	890	0	0	890	890
Total	2,388	692	694	1,696	1,694

1 = One of A₂ cells gave negative reaction with Mono. anti-A₁ and gave 1* (mixed field) reaction with lectin anti-A₁.

2 = Three of A₃ cells gave weak (mixed field) positive reaction with lectin anti-A₁ and two of these cells gave weak positive reaction with Mono. anti-A₁.

เท่านั้น และให้ผลลบกับเซลล์ B, O, A₂, A₂B, A₃, A₃B, A_x ที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นเซลล์ A₂ เพียง 1 รายที่ โมโนโคลนัล anti-A₁ ให้ผลลบ แต่ lectin anti-A₁ ให้ผลบวก และเมื่อนำมาทดสอบกับโมโนโคลนัล anti-A₁ (Biotest) ก็ให้ผลลบเช่นเดียวกัน นอกจากนี้มีเซลล์ A₃

3 รายให้ผลบวกกับ lectin anti-A₁ (NBC) แต่มีเพียง 2 รายใน 3 รายนี้ที่ให้ผลบวกกับโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) และของ Biotest ซึ่งลักษณะของปฏิกิริยาเป็นแบบ mixed field และมีปฏิกิริยาบวกละเอียด เห็นในกล้องจุลทรรศน์เท่านั้นดังแสดงในตารางที่ 4

การทดสอบความคงที่ (stability) ของน้ำยา

เมื่อเก็บโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) ที่อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิห้อง (20-25°C) และ 37°C ในระยะเวลาพอสมควร จากนั้นนำมาทดสอบความแรงและความเร็ว พบว่าน้ำยามีความคงที่ที่ 4°C ได้นานถึง 9 เดือน โดยที่ความแรงไม่เปลี่ยนแปลงแต่ความเร็วลดลงเล็กน้อย แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 1 เดือน ความแรงและความเร็วเปลี่ยนแปลง โดยไต่เตอร์ ลดลงเหลือ 16 และ 4 กับเซลล์ A₁ และ A₁B ส่วนที่อุณหภูมิ 37°C ทำการทดสอบโดยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเท่านั้นพบว่าความแรงไม่เปลี่ยนแปลงแต่ความเร็วลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 5

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาเทคนิคไฮบริโดมาในครั้งนี้ ได้โคลน 6C₁₀ ซึ่งได้นำมาทำ limiting dilution 2 ครั้ง ทำให้ได้เซลล์สายพันธุ์ที่คงทนสามารถสร้าง anti-A₁ ได้ และจากการเลี้ยงขยายให้สร้างแอนติบอดีจำนวนมาก แล้วนำมาทดลองผลิตเป็นน้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) พบว่า น้ำยานี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้แทน lectin anti-A₁

(NBC) ได้อย่างดียิ่ง เนื่องจาก

1. น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) มีความจำเพาะสูง โดยจะให้ปฏิกิริยาบวกกับเซลล์ A₁ และ A₁B เท่านั้น และจะให้ปฏิกิริยาลบกับเซลล์ B, O, A₂, A₂B รวมทั้งหมู่ย่อยต่างๆ ของ หมู่โลหิต A (ตารางที่ 4) ซึ่งในการศึกษานี้มีเซลล์ A₂ 1 ราย ที่ lectin anti-A₁ ให้ผลบวก โดยปฏิกิริยาเกิด 1⁺ และเป็นแบบ mixed field แต่เซลล์ A₂ รายนี้ให้ผลลบกับโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC and Biotest) ซึ่งเซลล์ A₂ นี้ น่าจะเป็น A₂ cad บวก เนื่องจาก anti-A₁ ที่สกัดจากเมล็ด Dolichos biflorus นั้น จะมี activity ของ anti-A₁ และ anti-cad ร่วมด้วย³ ซึ่ง anti-cad จะให้ผลบวกแบบ mixed field กับเซลล์ที่แสดงแอนติเจน cad จึงเกิดปฏิกิริยาบวกกับเซลล์ A₂ รายนี้ นอกจากนี้ในการทดสอบกับเซลล์ A₃ จำนวน 12 ราย พบว่า lectin anti-A₁ ให้ผลบวก 3 ราย ส่วนโมโนโคลนัล anti-A₁ ทั้งของศูนย์และ Biotest ให้ผลบวกเพียง 2 ราย ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบ mixed field และเห็นปฏิกิริยาบวกอ่อนในกล้องจุลทรรศน์ ถึงแม้ว่าโดยปกติเซลล์ A₃ ควรให้ผลลบกับ

ตารางที่ 5 Stability test of Mono. anti-A₁ (NBC) at various storage times.

Temperature and time of storage	Saline titer with		Avidity test (Sec)	
	A ₁ cells	A ₁ B cells	A ₁ cells	A ₁ B cells
4°C				
2 weeks	32	16	NT	NT
2 months	32	16	NT	NT
5 months	32	16	NT	NT
9 months	32	16	7.5	8.5
RT (20-25°C)				
1 week	32	8	NT	NT
1 month	16	4	8	9
37°C				
24 hours	32	16	7.56	8.4

NT = Not Tested

lectin anti-A₁¹¹ ซึ่งเซลล์ A₃ ทั้ง 3 รายให้ผลบวกอ่อนๆ แบบ mixed field กับ lectin anti-A₁ แต่ปฏิกิริยากับ โพลีโคลนัล anti-A ให้ผลบวก 1+2⁺ แบบ mixed field จึงจัดเป็นเซลล์ A₃ และจากประสบการณ์ของผู้ทำการทดลอง พบว่ามีเซลล์ A₃ จำนวนหนึ่ง สามารถให้ผลบวกกับ lectin anti-A₁ ได้โดยปฏิกิริยาจะเป็นแบบ mixed field ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าการทดสอบกับ เซลล์ papainized lectin anti-A₁ สามารถให้ปฏิกิริยาบวกกับเซลล์ A₂ และ A₂B บางเซลล์ได้ ซึ่งโมโนโคลนัล anti-A₁ ก็สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับเซลล์เหล่านี้ แต่ปฏิกิริยาจะอ่อนกว่ามาก (ตารางที่ 3) เข้าใจว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ ทำให้ประจุรอบเซลล์ลดน้อยลง จึงเกิดปฏิกิริยาขึ้น ดังนั้น น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ จะใช้ในการตรวจแยกหมู่โลหิต A₁, A₁B, จาก A₂, A₂B ได้ดีกว่าการใช้ lectin anti-A₁ เนื่องจากจะให้ปฏิกิริยาความจำเพาะมากกว่า

2. ด้านความแรง anti-A₁ ที่ผลิตจากโคลน 6C₁₀ ให้ผลความแรงในการเกิดปฏิกิริยาดี โดยทำปฏิกิริยากับ เซลล์ A₁, A₁B ให้เห็นด้วยตาเปล่าและพบว่ามีผลความแรงกับเซลล์ A₁ และ A₁B ดีกว่า lectin anti-A₁ ถึง 8 dilution และดีกว่าโมโนโคลนัล anti-A₁ (Biotest) 2 dilutions (ตารางที่ 1)

3. ด้านความไวในการเกิดปฏิกิริยา เมื่อทำการทดสอบบนสไลด์น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (ศูนย์) ได้ผลไม่แตกต่างจาก lectin anti-A₁ และ anti-A₁ (Biotest)

4 ด้านความคงทน น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ (NBC) เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่เหมาะสม คือ 4°C สามารถเก็บได้นานกว่า 10 เดือน โดยไม่เสื่อมคุณภาพด้านความแรง และความไวในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งจะต้องทดลองศึกษาต่อไปว่าจะเก็บคงทนได้นานเท่าใด

จากคุณสมบัติต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น น้ำยาโมโนโคลนัล anti-A₁ ที่ผลิตจากโคลน 6C₁₀ นี้ สามารถนำมาใช้แทน lectin anti-A₁ (NBC) ได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยัง

สามารถผลิตได้ปริมาณมากๆ โดยที่คุณสมบัติไม่เปลี่ยนแปลง และยังมีราคาถูกกว่าและสะดวกกว่าการผลิตจากเมล็ด Dolichos biflorus เนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาและหาสถานที่ปลูกเมล็ดพืช อีกทั้งขบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีก็เป็นขบวนการเดียวกันกับการผลิตโมโนโคลนัล anti-A, anti-B ที่ศูนย์บริการโลหิตผลิอยู่เดิมแล้ว

เอกสารอ้างอิง

11. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th ed. Oxford, England: Black well Science, 1997:116.
12. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th ed. Oxford, England: Black well Science. 1997:127-8.
13. Turgeon ML. *Fundamentals of Immunohematology. Theory and Technique*. 2nd ed. William & Wilkins 1995:93.
14. สร้อยสวางค์ พิภูลสด, รัชณี พลเตียร, กัญญ์ชลา อุทิศ, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, อุดม ตั้งด้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยใช้ไฮบริโดมาเทคนิค: II การศึกษาประสิทธิภาพน้ำยาตรวจหมู่โลหิตแอนติ-บี ชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดีเปรียบเทียบกับน้ำยาชนิดโมโนโคลนัลของต่างประเทศและน้ำยาชนิดโพลีโคลนัลของศูนย์บริการโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1992;2:295-302.
15. สร้อยสวางค์ พิภูลสด, รัชณี พลเตียร, ประภาศรี แก้วกิติโรจน์, กัญญ์ชลา อุทิศ, อุดม ตั้งด้อย, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตโมโนโคลนัลแอนติ-เอโดยใช้เทคนิคไฮบริโดมาของศูนย์บริการโลหิตฯ วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1992;2:373-81
16. สร้อยสวางค์ พิภูลสด, รัชณี พลเตียร, กัญญ์ชลา อุทิศ, จินตนา ทับรอด. การผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยใช้ไฮบริโดมาเทคนิค: I การเปรียบเทียบการกระตุ้นหนูทดลองในการผลิตแอนติ-บี ด้วยปริมาณและชนิดของแอนติเจนต่างๆ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1991;1:299-307.
17. ทศนีย์ สกุลดำรงคพันธ์, จินตนา ทับรอด, สารีกา แสงกล้า, อุดม ตั้งด้อย. การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา anti-D ในการตรวจหมู่โลหิต RhD. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการ

โลหิต 2542;9:39-48

18. Virginia Vengelen-Tyler, et al; eds. Method 3.7 Anti-body titration. Technical Manual. 13th ed. Am Assoc Blood Bank, 1999:678-9.
19. Oriol R, Samuelsson BE, Messeter L. ABO Antibodies-serological behaviour and Immuno-chemical characterization. *J Immunogenetics*, 1990;17:279-99.
10. Virginia Vengelen-Tyler, et al; eds. Method 3.5.6. Two-stage Enzyme Technique. Technical Manual. 13th edition. Am Assoc Blood Bank, 1999:676-7.
11. Virginia Vengelen-Tyler, et al; eds. ABO genes at the molecular level. Technical Manual. 13th ed. Am Assoc Blood Bank, 1999:273-5.

Production of Monoclonal Anti-A₁ Blood Group Reagent by National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Udom Tingtoy, Tasanee Sakuldamrongpanich and Rachanee Kaewmongkol

Antiserum and Standard Cells Preparation Section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society,
Henri Dunant Road. Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand.

Abstract: The objective of this study is to produce monoclonal anti-A₁ blood grouping reagent. Stable cloned lines of anti-A₁ secreting cells have been derived by fusion spleen cells of a mouse immunized by 20% group A₁ cells with a mouse myeloma line (x653.8Ag). The tissue culture supernate of clone 6C₁₀ containing secreted monoclonal anti-A₁ antibody is used as anti-A₁ blood grouping reagent. The efficacy of this reagent was tested for its' potency, avidity and specificity in comparison with lectin anti-A₁ of National Blood Centre (NBC) and monoclonal anti-A₁ (commercial). Potency studied of monoclonal anti-A₁ (NBC) were 2 and 8 dilutions higher than commercial monoclonal anti-A₁ and lectin anti-A₁ respectively, where as the result of avidity studied were comparable. This reagent also has high specificity by giving positive reaction with cell groups A₁, A₁B and giving negative reaction with cell groups B, O and all subgroups of A. Thus, this monoclonal anti-A₁ is suitable for use in blood bank.

Key Words : ● Monoclonal anti-A₁

Thai J Hematol Transf Med 2001;11:21-8.