

นิพนธ์ต้นฉบับ

การสร้างเซลล์สายพันธุ์ไฮบริโดมาด้วยวิธี Murine Monoclonal Hybridoma Technology เพื่อผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต Anti-M และ Anti-N

กัลยา เกิดแก้วงาม ศิริพร พลเสน สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร อุดม ตั้งต้อย และ สร้อยสอาด พิกุลสด

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ ปัจจุบันการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M และ anti-N ของฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ยังคงใช้วิธีผลิตจากน้ำเหลืองกระต่าย (rabbit polyclonal) ซึ่งความแรงของแอนติบอดีที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งไม่คงที่ เพราะต้องทำการดูดซับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ (antibodies adsorption) การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธี murine monoclonal hybridoma technology จะได้แอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าและสามารถผลิตแอนติบอดีชนิดนั้นๆ ได้ในปริมาณมากตามความต้องการ รวมทั้งมีความแรงและความจำเพาะมากกว่า **วัตถุประสงค์** เพื่อสร้างเซลล์สายพันธุ์ไฮบริโดมา (hybridoma cell line) ที่สามารถนำผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M และ anti-N ด้วยวิธี murine monoclonal hybridoma technology **วัสดุและวิธีการ** ใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามหนู BAL B/c ที่ถูกฉีดกระตุ้นด้วย 20% เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ O phenotype M+N+ รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง ทำการเชื่อมเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้จากม้ามของหนูที่ถูกฉีดกระตุ้นแล้วกับเซลล์มะเร็งของหนูสายพันธุ์เดียวกัน (SP2/O) เมื่อเกิดไฮบริโดมาจึงนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทดสอบกับ screening cells O_1 (M+N-) และ O_2 (M-N+) เพื่อคัดเลือก hybridoma ที่ให้ผลบวกกับ screening cells O_1 (M+N-) หรือ O_2 (M-N+) เพียงเซลล์เดียวเท่านั้นมาเลี้ยงขยายต่อ ทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์อีกครั้งด้วย identification panel cells และ papainized identification panel cells เพื่อคัดเลือกโคลนที่สร้าง anti-M หรือ anti-N แล้วนำมาทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) เพื่อแยกโมโนโคลนและเลี้ยงขยายโมโนโคลนที่ได้ให้โตเต็มที่ เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้เป็นต้นโคลน ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์เก็บไว้เพื่อทดสอบทาง serology อย่างละเอียดต่อไป **ผลการศึกษา** งานวิจัยนี้สามารถสร้างไฮบริโดมาที่ผลิต anti-M จำนวน 1 โคลน คือ NBC-M2 ($7H_2B_7$) และไฮบริโดมาที่ผลิต anti-N จำนวน 4 โคลน คือ NBC-N1($139G_3G_2$), NBC-N2 ($9A_3D_9$), NBC-N3($9A_5B_7$) และ NBC-N4($9D_1D_9$) **วิจารณ์และสรุป** จากการทดสอบทาง serology เบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าไฮบริโดมาที่สร้างขึ้นใหม่ทุกโคลนสามารถนำไปผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M และ anti-N ได้ อย่างไรก็ตามไฮบริโดมาทุกโคลนเป็นโคลนที่สร้างขึ้นใหม่ยังต้องทดสอบทาง serology อีกมาก เพื่อให้เชื่อมั่นว่า anti-M และ anti-N ที่ผลิตได้ใหม่นี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อทดแทนการผลิตจากน้ำเหลืองกระต่าย

Keywords : ● Anti-M ● Anti-N ● Murine monoclonal ● Hybridoma

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2557;24:361-9.

บทนำ

แอนติบอดีในระบบ MNS เช่น anti-M anti-N และ anti-Mi¹ เป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก มีทั้งชนิดที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ (natural occurring antibody) หรือเกิดจากการถูกกระตุ้นจากการรับเลือดและการตั้งครรภ์ กรณีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นแอนติบอดีชนิด IgM ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิห้องและไม่ค่อยเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่

เกิดขึ้นเนื่องจากถูกกระตุ้นจากการรับเลือดหรือการตั้งครรภ์จะเป็นแอนติบอดีชนิด IgG สามารถทำให้เกิด hemolytic transfusion reaction และ hemolytic disease of the fetus and newborn anti-M และ anti-N ค้นพบโดย Landsteiner และ Levine ในปี ค.ศ. 1927 โดยการฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยเลือดของคนเพื่อศึกษาหมู่เลือดในระบบ ABO แต่หลังจากดูดซับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ (antibodies adsorption) จึงพบแอนติบอดีชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะกับแอนติเจน M หรือ N ต่อมาีรายงานอีกหลายครั้งที่แสดงให้เห็นว่า anti-M และ anti-N เป็นแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก¹ สำหรับงานธนาคารเลือด anti-M และ anti-N เป็น blood group phenotyping reagents ที่จำเป็นจะต้องมีไว้ใช้ใน

ได้รับต้นฉบับ 16 มกราคม 2557 รับลงตีพิมพ์ 24 กรกฎาคม 2557

ต้องการสำเนาต้นฉบับ ติดต่อ กัลยา เกิดแก้วงาม ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 E-mail: kallayak@yahoo.com

การตรวจหาเลือดที่ไม่มีแอนติเจน M หรือ N สำหรับให้แก่ผู้ป่วยที่มี anti-M หรือ anti-N อีกทั้งในงานการผลิตเซลล์มาตรฐานต่างๆ เช่น screening cells และ panel cells จำเป็นต้องใช้ anti-M และ anti-N เพื่อตรวจแอนติเจน M และ N ของผู้บริจาคโลหิตที่จะนำมาใช้ในการผลิตเซลล์มาตรฐานด้วยเช่นเดียวกัน ปัจจุบันวิธีการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M และ anti-N ของฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ยังคงใช้วิธีฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วยเม็ดเลือดแดงของคนที่มีแอนติเจน M หรือ N แล้วเจาะเก็บน้ำเหลืองของกระต่ายนำมาผลิตเป็น anti-M และ anti-N ชนิด rabbit polyclonal antibodies ซึ่งมีความแรงของแอนติบอดีไม่คงที่ในแต่ละครั้งที่ผลิต อีกทั้งวิธีการผลิตมีความยากลำบากเพราะมีขั้นตอนการดูดซับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ (antibodies adsorption) ดังนั้นฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์จึงได้ทำการทดลองเพื่อพัฒนาวิธีการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M และ anti-N ด้วยวิธี murine monoclonal hybridoma technology เพื่อให้สามารถผลิต monoclonal anti-M และ anti-N ได้ในปริมาณมาก มีความแรงคงที่ในแต่ละครั้งที่ผลิตและมีความจำเพาะกับแอนติเจน M หรือ N มากกว่าวิธีผลิตจากน้ำเหลืองกระต่าย โดยทดลองใช้วิธีการสร้างเซลล์สายพันธุ์ hybridoma ตามวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยสภากาชาดญี่ปุ่น (Japanese Red Cross) ตามโครงการฝึกอบรมงานสร้างเซลล์สายพันธุ์ monoclonal hybridoma ซึ่งเป็นความร่วมมือระหว่างสภากาชาดไทย (Thai Red Cross) และสภากาชาดญี่ปุ่น (Japanese Red Cross)

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. หนูทดลอง BAL B/c เพศเมีย อายุ 4-5 สัปดาห์ จำนวน 21 ตัว
2. เซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่โลหิต O phenotype M+N+
3. Murine myeloma cell line (SP2/O)
4. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดไม่เติม bovine serum อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดเติม bovine serum และ HAT (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine) จาก HyClone™ Thermo Scientific, USA
5. จานแก้วหนึ่งฝาเชื้อ 3 จาน
6. จานพลาสติก sterile ขนาด 96 หลุม และขนาด 24 หลุม หลอดพลาสติก sterile ขนาด 10 และขนาด 50 มิลลิลิตร และขวดพลาสติก sterile ขนาด 25 มิลลิลิตร จาก NUNC™ Denmark
7. สารเชื่อมเซลล์ (fusogen) หนึ่งฝาเชื้อ PEG molecular weight 4000 (Merck, Germany) จำนวน 1 กรัม แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI ชนิดไม่เติม bovine serum 1 มิลลิลิตร ทำให้มีความเข้มข้นเป็น 50% PEG ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI
8. Identification panel cells และ papainized identification panel cells ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย Lot. 56060 Exp. 13 JUL 2013
9. Anti-M (rabbit polyclonal) Lot. 56010 Exp. 7 JAN 2015 และ anti-N (rabbit polyclonal) Lot. 55010 Exp. 20 MAR 2014

วิธีการ

การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง²⁻⁴

ใช้หนูทดลอง BAL B/c เพศเมีย อายุ 4-5 สัปดาห์ จำนวน 21 ตัว และเม็ดเลือดแดงของคนหมู่โลหิต O มีแอนติเจน M และแอนติเจน N ล้างในน้ำเกลือ (0.9% NSS) 3 ครั้ง แล้วเตรียมให้เป็นสารละลายเซลล์ (cell suspension) มีความเข้มข้น 20% ในน้ำเกลือ จากนั้นใช้สารละลายเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ฉีดกระตุ้นหนูที่หน้าท้องในชั้น peritoneum (intraperitoneal injections) ฉีดกระตุ้นซ้ำทุกสองสัปดาห์ รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง เมื่อฉีดกระตุ้นครั้งที่สามแล้วเว้นระยะสามวันจึงทำการเชื่อมเซลล์ (cell fusion) โดยตัดม้ามหนูเพื่อใช้ในการเชื่อมเซลล์

การเชื่อมเซลล์ม้ามหนูกับเซลล์มะเร็งหนู SP2/O (murine myeloma cell line)

การเชื่อมเซลล์ทำทั้งหมด 7 ครั้ง ใน 1 ครั้งใช้ม้ามหนู 3 ตัว มีวิธีทำดังนี้ เลี้ยงเซลล์มะเร็งหนู SP2/O ประมาณหนึ่งสัปดาห์ก่อนทำการเชื่อมเซลล์ ทำให้หนูตายและผ่าท้องหนูตัดเอาม้ามออก ล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดไม่เติม bovine serum 2 ครั้ง บดม้ามให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดไม่เติม bovine serum จำนวน 10 มิลลิลิตร ขั้นตอนนี้ทำในจานแก้วหนึ่งฝาเชื้อ ดูดของเหลวที่ได้ใส่หลอดพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ปั่นล้างเซลล์ม้ามหนูด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดไม่เติม bovine serum 3 ครั้ง นำเซลล์มะเร็งหนู SP2/O มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดไม่เติม bovine serum 3 ครั้ง แล้วนับเซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามหนูและเซลล์มะเร็งหนู SP2/O เพื่อหาปริมาตรและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเชื่อมเซลล์โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามหนู 5 ส่วนต่อเซลล์มะเร็งหนู SP2/O 1 ส่วน รวมเซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้ามหนูทั้งหมดกับเซลล์ SP2/O ลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตรสำหรับเชื่อมเซลล์ ปั่นความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ใส่สารเชื่อมเซลล์ (fusogen) จำนวน 1 มิลลิลิตร ค่อยๆ ใส่ครั้งละ 1-2 หยด

แล้วผสมเซลล์กับสารเชื่อมเซลล์โดยเอียงหลอดเบา ๆ จนเซลล์กับสารเชื่อมเซลล์ผสมเข้ากันดี ขั้นตอนนี้ควรทำอย่างรวดเร็วใช้เวลาประมาณ 5 นาทีหรือต่ำกว่าเสร็จแล้วอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ชนิดไม่เติม bovine serum จำนวน 10 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ เพื่อละลายก้อนเซลล์ ปั่นความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูน้ำใสส่วนบนทิ้ง ละลายก้อนเซลล์โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ชนิดเติม bovine serum ที่มี HAT (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine) ซึ่งเป็น selective medium จะมีแต่เซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ได้ คำนวณให้มีความเข้มข้นของเซลล์มีมาหนู 5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่สารละลายเซลล์ลงในจานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเกิดเซลล์ไฮบริโดมาใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจกรอง anti-M และ anti-N ด้วย screening cells O_1 (M+N-) และ O_2 (M-N+) ย้ายหลุมที่ให้ผลบวกกับ O_1 (M+N-) หรือ O_2 (M-N+) เพียงเซลล์เดียวไปเลี้ยงในจานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม เลี้ยงเซลล์ต่ออีกประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นตรวจแยกชนิดแอนติบอดีด้วย identification panel cells

การเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) เพื่อคัดเลือกโมโนโคลน (monoclonal)

ผสมเซลล์ไฮบริโดมากับน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วดูดออกมา 50 ไมโครลิตร นับเซลล์เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ในหลุมที่ต้องการทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) ทำการคำนวณให้มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือประมาณ 1 เซลล์ต่อหลุม ตัวอย่างการคำนวณ เช่น นับเซลล์ในสไลด์ Petroff-Hausser counting chamber ได้ 29 เซลล์ ความเข้มข้นของเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมจะเท่ากับ $29 \times 2 \times 1/4 \times 10^4$ เท่ากับ 1.45×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ต้องการเจือจางเซลล์ในหลุมให้มีความเข้มข้น 7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เท่ากับ $1.45 \times 10^5 / 7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจะต้องเจือจางเซลล์ในหลุม 20,714 เท่า หรือประมาณ 20,000 เท่า ซึ่งปริมาตรมากขนาดนี้ไม่สามารถเลี้ยงเซลล์ได้หมด เพราะสิ้นเปลืองอาหารเลี้ยงเซลล์มาก จึงต้องทำการเจือจางสองขั้นตอน ขั้นแรกเจือจาง 100 เท่า ขั้นที่สองเจือจาง 2,000 เท่า เมื่อนำมาคูณกันก็จะเท่ากับว่าเจือจางเซลล์ได้ 20,000 เท่าตามต้องการ ขั้นแรกดูดไฮบริโดมาจากหลุมที่ต้องการทำ limiting dilution ตามปริมาตรที่คำนวณได้ ประมาณ 25-200 ไมโครลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ไฮบริโดมาในหลุมที่ต้องการทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) แล้วเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ชนิดเติม bovine serum จำนวน 5 มิลลิลิตร

ผสมจนเข้ากันดี จากนั้นเจือจางขั้นที่ 2 ดูดเซลล์ไฮบริโดมาจากสารละลายเซลล์ที่เจือจางครั้งแรกตามปริมาตรที่คำนวณได้ประมาณ 100-500 ไมโครลิตร เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ชนิดเติม bovine serum จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันดี นำเซลล์ที่เจือจางแล้วเลี้ยงในจานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยใส่สารละลายเซลล์หลุมละ 150 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์ประมาณ 1 ถึง 2 สัปดาห์หรือจนกว่าจะเกิดโมโนโคลนไฮบริโดมา

การคัดเลือกโมโนโคลนไฮบริโดมาที่สร้าง anti-M หรือ anti-N

หลังจากทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) เพื่อแยกเซลล์ให้เหลือเซลล์ไฮบริโดมา 1 เซลล์ต่อหลุม เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1-2 สัปดาห์ จนเกิดโมโนโคลน เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อิมมูโนไทป์ O phenotype M+N+ จาก identification panel cells Lot. 56060 Exp. 13 JUL 2013 เพื่อทำการคัดเลือกโมโนโคลนที่ให้ผลบวกแล้วย้ายไปเลี้ยงต่อในจานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม จนเซลล์ไฮบริโดมาโตและแข็งแรงดี เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อหาความแรง (titer) กับเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนหมู่อิมมูโนไทป์ O phenotype M+N+ เลือกไฮบริโดมาที่มีความแรงมากที่สุด ขยายไปเลี้ยงในขวดพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตร เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาโตจนเกือบเต็มพื้นขวดเลี้ยงเซลล์ นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้เป็นต้นโคลน ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้เก็บไว้เพื่อทดสอบทาง serology อย่างละเอียดต่อไป

การทดสอบทาง Serology

1. การตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนใหม่
 - 1.1 เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลนใหม่ ได้แก่ ไฮบริโดมาที่สร้าง anti-N จำนวน 4 โคลน คือ NBC-N1(13G₃G₂), NBC-N2(9A₃D₉), NBC-N3(9A₅B₇) และ NBC-N4(7D₃D₅) ไฮบริโดมาที่สร้าง anti-M จำนวน 1 โคลน คือ NBC-M2(7H₃B₇) โคลนละ 5 มิลลิลิตร
 - 1.2 นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทดสอบกับ identification panel cells Lot.56060 Exp.13 JUL 2013 ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ โดยใส่น้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มิลลิเมตร จำนวน 11 หลอด หยด identification panel cells 1 หยด ลงในแต่ละหลอดจนครบ 11 เซลล์ ประมาณเซลล์ละ 50 ไมโครลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่นอ่านและแปลผลที่ได้
 - 1.3 ทำการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาอีกครั้งโดย

- ใช้ papainized identification panel cells Lot 56060 Exp. 13 JUL 2013 ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ตามข้อ 1.1 และ ข้อ 1.2 แล้ว แปลผลที่ได้
2. การทำ phenotyping หมู่เลือด M และ N เพื่อเปรียบเทียบ monoclonal anti-M [NBC-M2(7H₃2B₇)] และ anti-N [NBC-N1(139G₃G₂)] กับ polyclonal anti-M Lot. 56010 Exp. 7 JAN 2015 และ anti-N Lot. 55010 Exp. 20 MAR 2014 จากกระต่าย
 - 2.1 คัดเลือกโลหิตจากผู้บริจาคโลหิตที่รู้ phenotype ของแอนติเจน M และแอนติเจน N แล้ว หมูโลหิต A จำนวน 13 ราย หมูโลหิต B จำนวน 13 ราย และ หมูโลหิต AB จำนวน 4 ราย
 - 2.2 หยดแอนติบอดี 4 ชนิดคือ monoclonal anti-M และ anti-N กับ polyclonal anti-M และ anti-N จากกระต่าย ลงในหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มิลลิเมตร จำนวน 4 หลอด หลอดละ 2 หยด ประมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่เซลล์เม็ดเลือดแดงความเข้มข้นร้อยละ 2-5 ลงในหลอดทั้งสี่ หลอดละ 1 หยด ประมาณ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านและแปลผลที่ได้
 3. การหาความแรงของ monoclonal anti-M [NBC-M2(7H₃2B₇)] และ anti-N [NBC-N1(139G₃G₂)] (antibody titration)
 - 3.1 เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา anti-M [NBC-M2(7H₃2B₇)] และ anti-N [NBC-N1(139G₃G₂)] โคลนละ 3 มิลลิตร
 - 3.2 ทำการเจือจางลดสัดส่วน (two-flow dilution) 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 และ 256 เท่า ตามลำดับ
 - 3.3 Transfer น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางลดสัดส่วนแล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มิลลิเมตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร
 - 3.4 หยดร้อยละ 2-5 หมูโลหิต O phenotype M+N+ หลอดละ 50 ไมโครลิตร
 - 3.5 ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นอ่านและแปลผล

ผลการศึกษา

งานวิจัยนี้สามารถสร้างเซลล์สายพันธุ์ไฮบริโดมาได้ทั้งสิ้น 1,513 โคลน เป็นโคลนที่ให้ผลบวกกับ screening cell O₁(M+N-) หรือ O₂(M-N+) เพียงเซลล์เดียวจำนวน 361 โคลน แต่เมื่อย้ายเซลล์จากจานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ไปเลี้ยงในจานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม โคลนที่อ่อนแอจะตาย

ไป ส่วนโคลนที่เหลือส่วนใหญ่สูญเสียความสามารถในการสร้างแอนติบอดี แต่อย่างไรก็ตามหลังทำการตรวจแยกชนิดของแอนติบอดีพบว่า เป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้าง anti-N จำนวน 4 โคลน คือ NBC-N1(139G₃G₂), NBC-N2(9A₃D₉), NBC-N3(9A₅B₇) และ NBC-N4(7D₃D₅) เป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้าง anti-M จำนวน 2 โคลนคือ NBC-M1(4D₁₁) และ NBC-M2(7H₃B₇) แต่โคลนที่สร้าง anti-M NBC-M1(4D₁₁) ได้ตายไปก่อนทำเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) จึงทำให้สูญเสียโคลนนี้ไป

ผลการตรวจแยกชนิดแอนติบอดีจากน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างได้ใหม่ ได้แก่ NBC-N1(139G₃G₂), NBC-N2(9A₃D₉), NBC-N3(9A₅B₇), NBC-N4(7D₃D₅) สรุปได้ว่าเป็น anti-N และ NBC-M2(7H₃B₇) สรุปได้ว่าเป็น anti-M ดังแสดงใน Table 1 น้ำเลี้ยงเซลล์จากโคลน NBC-N1(139G₃G₂), NBC-N2(9A₃D₉), NBC-N3(9A₅B₇), NBC-N4(7D₃D₅) และ NBC-M2(7H₃B₇) ทดสอบกับ papainized identification panel cells ได้ผลลบทั้งหมด ดังแสดงใน Table 2

ผลการตรวจแอนติเจน M และ N ในผู้บริจาคโลหิตจำนวน 30 ราย หมู่ A, B และ AB ที่มี phenotype M+N-, M-N+ และ M+N+ โดยใช้ monoclonal anti-M โคลน NBC-M2(7H₃2B₇) และ anti-N โคลน NBC-N1(139G₃G₂) เปรียบเทียบกับ polyclonal anti-M และ anti-N จากกระต่ายได้ผลตรงกันทั้งหมด ดังแสดงใน Table 3

ความแรง (potency) ของแอนติบอดีเมื่อเซลล์ตายหมดของ anti-N โคลน NBC-N1(139G₃G₂) และ anti-M โคลน NBC-M2(7H₃2B₇) ดังแสดงใน Table 4

วิจารณ์

จาก Table 1 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างได้ใหม่ เป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้าง anti-M 1 โคลน และ anti-N 4 โคลน เพราะให้ผลตรงกับตาราง antigen profile ของ identification panel cells Lot. 56060 ดังแสดงใน Figure 1 และจาก Table 2 ทุกโคลนยังให้ผลลบกับ papainized identification panel cells Lot. 56060 อีกด้วยเนื่องจากเอนไซม์ papain ได้ทำลายแอนติเจน M และ N บนผิวเม็ดเลือดแดงใน papainized identification panel cells ไปแล้ว⁵ ดังนั้นจึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ monoclonal anti-M และ anti-N

หลังการทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) ครั้งแรก ได้โมโนโคลนที่เป็นลูกของโคลนตั้งต้น ดังนี้ anti-N NBC-N1(139G₃) ได้ลูกโคลนคือ 139 G₃G₂, 139 G₃C₆ และ 139 G₃E₁₁ anti-N NBC-N2 (9A₃) ได้ลูกโคลนคือ 9A₃D₉ anti-N NBC-

Table 1 Anti-M and anti-N identification using identification panel cells of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Clone	Identification panel cells phenotypes Lot.56060 Exp.13 JUL 2013											Conclusion
	M-N+	M+N-	M+N+	M+N-	M+N+	M+N+	M-N+	M+N-	M+N-	M+N+	M+N-	
	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉	O ₁₀	O ₁₁	
Anti-N NBC-N1 (139 G ₃ G ₂)	4+	0	4+	0	4+	4+	4+	0	0	4+	0	Anti-N
Anti-N NBC-N2 (9A ₃ D ₉)	4+	0	4+	0	4+	4+	4+	0	0	4+	0	Anti-N
Anti-N NBC-N3 (9A ₆ B ₇)	4+	0	4+	0	4+	4+	4+	0	0	4+	0	Anti-N
Anti-N NBC-N4 (9D ₃ D ₅)	4+	0	4+	0	4+	4+	4+	0	0	4+	0	Anti-N
Anti-M NBC-M2 (7H ₃ 2B ₇)	0	4+	4+	4+	4+	4+	0	4+	4+	4+	4+	Anti-M

Remark: culture supernatants that used for identify harvesting while the hybridoma cells are still alive, 4+ = one solid agglutination and 0 = no agglutination

National Blood Centre , Thai Red Cross Society

Panel Cells for antibody identification

LotNo : 56060 Expiry Date : 13 JUL 2013

No	Donor No.	Rh	Rh					MNSs				P	Lewis		Mi*	Kidd		Duffy		Kell		Diego		Xg*	Test Results		
			D	C	E	c	e	M	N	S	s		Pl	Le ^a		Le ^b	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	K	k	Di ^a			Di ^b	
1	1001500433	R1R1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+			
2	1004669431	R1R1	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0					
3	1005203071	R1R1	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+					
4	1001801170	R1R1	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0					
5	1002635054	R1r	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+			
6	1003565476	R2R2	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0		
7	1002100194	R2R2	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0		
8	1002101473	R2R2	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0			
9	1002210851	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0		0			
10	1002108250	r'r	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0		+			
11	1004260770	r'r	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+			

Auto control

Cord cells

A1 cells

A2 cells

B cells

Remarks.....

Tested by

Patient	Direct Antiglobulin Test		
	Polyspecific	Anti-IgG	Anti-C3d

Antiserum & Standard cells preparation section Tel. 0-2251-3111 ext 153

19-12-2556 9:54:50

Figure 1 The antigen profile of identification panel cells Lot. 56060 Exp. 13 JUL 2013 of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Table 2 Anti-M and anti-N identification using papainized identification panel cells of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Clone	Papainized identification panel cells Lot 56060 Exp. 13 JUL 2013										
	M-N+	M+N-	M+N+	M+N-	M+N+	M+N+	M-N+	M+N-	M+N-	M+N+	M+N-
	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉	O ₁₀	O ₁₁
Anti-N NBC-N1(139G ₃ G ₂)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-N NBC-N2(9A ₃ D ₉)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-N NBC-N3(9A ₅ B ₇)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-N NBC-N4(9D ₃ D ₅)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anti-M NBC-M2(7H ₃ 2B ₇)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Remark: 0 = no agglutination

Table 3 Results of M and N antigens phenotyping using monoclonal anti-M and anti-N compared with rabbit polyclonal anti-M and anti-N

Donor	Group	Phenotype	Anti-M	Anti-M	Anti-N	Anti-N
			(Monoclonal)	(Polyclonal Rabbit)	(Monoclonal)	(Polyclonal Rabbit)
			NBC-M2(7H ₃ 2B ₇)	Lot. 56010 Exp. 7 JAN 2015	NBC-N1(139G ₃ G ₂)	Lot. 55010 Exp. 20 MAR 2014
1	A	M+N-	4+	4+	0	0
2	A	M+N-	4+	4+	0	0
3	A	M+N-	4+	4+	0	0
4	A	M-N+	0	0	4+	4+
5	A	M-N+	0	0	4+	4+
6	A	M-N+	0	0	4+	4+
7	A	M-N+	0	0	4+	4+
8	A	M-N+	0	0	4+	4+
9	A	M-N+	0	0	4+	4+
10	A	M+N+	4+	4+	4+	4+
11	A	M+N+	4+	4	4+	4+
12	A	M+N+	4+	4+	4+	4+
13	A	M+N+	4+	4+	4+	4+
14	B	M+N-	4+	4+	0	0
15	B	M+N-	4+	4+	0	0
16	B	M+N-	4+	4+	0	0
17	B	M+N-	4+	4+	0	0
18	B	M-N+	0	0	4+	4+
19	B	M-N+	0	0	4+	4+
20	B	M-N+	0	0	4+	4+
21	B	M-N+	0	0	4+	4+
22	B	M-N+	0	0	4+	4+
23	B	M+N+	4+	4+	4+	4+
24	B	M+N+	4+	4+	4+	4+
25	B	M+N+	4+	4+	4+	4+
26	B	M+N+	4+	4+	4+	4+
27	AB	M-N+	0	0	4+	4+
28	AB	M+N-	4+	4+	0	0
29	AB	M+N+	4+	4+	4+	4+
30	AB	M+N+	4+	4+	4+	4+

Remark: 4+ = one solid agglutination and 0 = no agglutination

Table 4 Potency of anti-M and anti-N titers produced by murine hybridoma

Clone	Phenotype	Reciprocal of murine hybridoma culture supernatant dilution									Titers
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	
anti-M NBC-M2	M+N-	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	0	128
(7H ₃ 2B ₇)	M+N+	4+	4+	4+	4+	4+	1+	1 ^w	0	0	64
anti-N NBC-N1	M-N+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	1+	0	128
(139G ₃ G ₂)	M+N+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	1+	0	0	64

Remark: 4+ = one solid agglutination; 3+ = several large agglutination; 2+ = medium-size agglutination, clear background; 1+ = small agglutination, turbid background; 1+^w = very small agglutination, turbid background and 0 = no agglutination

N3(9A₅) ได้ลูกโคลนคือ 9A₅B₇ anti-N NBC-N4(9D₃) ได้ลูกโคลนคือ 9D₃D₅ anti-M NBC-M2(7H₃) ได้ลูกโคลนคือ 7H₃1F₄ และ 7H₃2B₇ โมโนโคลนไฮบริโดมาทั้งหมดนี้จะต้องทำการเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) ซ้ำอีกสองถึงสามครั้งเพื่อให้ได้โคลนที่มีความเสถียรในการสร้างแอนติบอดี การทดสอบเบื้องต้นกับ identification panel cells แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างขึ้นใหม่เป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้าง anti-M และ anti-N จริง แต่เซลล์ใน screening cells และ identification panel cells เป็นเซลล์หมู่ O ทั้งหมด จึงจำเป็นต้องหาเซลล์หมู่โลหิต A หมู่โลหิต B และหมู่โลหิต AB มาทดสอบแอนติบอดี monoclonal anti-M และ anti-N ที่สร้างขึ้นใหม่นี้ ว่าสามารถใช้ได้กับหมู่โลหิตระบบ ABO ทุกหมู่ได้ โดยใช้ polyclonal anti-M และ anti-N จากกระต่ายเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบโดยการทำการ phenotyping ความคู่กันด้วยแอนติบอดีทั้งสองชนิด ปรากฏว่าได้ผลตรงกันทั้งหมด ดังแสดงใน Table 3

การหาความแรง (potency) ของแอนติบอดีเมื่อเซลล์ตายหมดของ anti-N NBC-N1(139G₃G₂) และ anti-M NBC-M2(7H₃2B₇) พบว่า ทั้ง anti-N และ anti-M มีความแรงกับหมู่ O phenotype M+N+ ซึ่งเป็นเซลล์ heterozygous เท่ากันคือ 64 เท่า ดังแสดงใน Table 4 ซึ่งถือว่ามีความแรงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ anti-N และ anti-M ของบริษัทต่างๆ ที่จำหน่ายในท้องตลาดจะมีความแรงประมาณ 4 ถึง 8 เท่า

วิธีการทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้มาจากการฝึกอบรมงานการสร้างเซลล์สายพันธุ์ monoclonal hybridoma เพื่อผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตด้วยวิธี murine/human monoclonal hybridoma technology ระหว่างวันที่ 4 ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึงวันที่ 20 ธันวาคม พ.ศ. 2555 ณ Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย วิธี การเชื่อมเซลล์ในงานวิจัยนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยการสร้าง

เซลล์สายพันธุ์ไฮบริโดมาอื่นๆ เนื่องจากไม่ได้ใช้ macrophage จากหนู BAL B/c เป็น Feeder cells²⁻⁴ ตามวิธีการของสภากาชาดญี่ปุ่น แต่ปรากฏว่าสามารถสร้างเซลล์ไฮบริโดมาได้ผลดี เกิดเซลล์ไฮบริโดมาเป็นจำนวนมากและยังได้โคลนที่สร้าง anti-M และ anti-N อีกด้วย ดังนั้น Feeder cells อาจไม่จำเป็นสำหรับการเชื่อมเซลล์ ส่วนวิธีเจือจางลดสัดส่วน (limiting dilution) ก็แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ แต่วิธีการฉีดกระตุ้นหนูไม่มีความแตกต่างกันมากนัก²⁻⁴ อีกทั้ง anti-M และ anti-N ที่ผลิตขึ้นมาได้ยังต้องรอผ่านการทดสอบทาง serology อีกมาก รวมถึงการทดลองผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จและทดสอบความคงทน (stability) ของผลิตภัณฑ์ อาจต้องใช้เวลานานในการศึกษาเป็นเวลานาน ผลการวิจัยส่วนหลังนี้ยังมีรายละเอียดอีกมาก ซึ่งจะทำให้การตีพิมพ์เผยแพร่เพื่อรับรองคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่อไป

สรุป

จากการทดสอบทาง serology เบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างได้ใหม่ทั้งหมดนี้ สามารถนำไปผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต anti-M และ anti-N ได้ แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ไฮบริโดมาทั้งหมดเป็นเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างขึ้นใหม่ ยังต้องทำการทดสอบทาง serology อีกมาก เช่น การทดสอบความคงทนของแอนติบอดี (stability) เป็นต้น เพื่อให้เชื่อมั่นว่า anti-M และ anti-N ที่สร้างจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนใหม่ทั้งหมดนี้ มีความเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อทดแทนการผลิตจากน้ำเหลืองกระต่าย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. Makoto Uchikawa หัวหน้าฝ่าย Blood Group, Ms. Chizu Toyoda นักวิทยาศาสตร์ และทีมงานของ Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Japanese Red Cross ที่ให้การฝึกอบรมการสร้างเซลล์สายพันธุ์ hybridoma

เอกสารอ้างอิง

1. Reid ME. MNS blood group system: a review. *Immunohematology* 2009;25:95-101.
2. Phikulsod S, Poltlen R, Uthid K, et al. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: I mouse response to immunization with different quantity and sources of B antigens. *Thai J Hematol Transf Med* 1991;1:299-307.
3. Phikulsod S, Poltlen R, Kaewkitiroj P, et al. Monoclonal anti-A reagent using hybridoma technique prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. *Thai J Hematol Transf Med* 1992;2:373-81.
4. Tingtoy U, Phonimit S, Siripongsanusit A, et al. Development of monoclonal anti-A production of National Blood Centre, Thai Red Cross Society. *Thai J Hematol Transf Med* 2008;18:11-9.
5. Reid ME, Lomas-Francis C. *The blood group antigen : factsbook*. 2nd ed. Amsterdam : Elsevier, 2004:47-50.

Generating the Hybridoma Cell Line by Murine Monoclonal Hybridoma Technology for Producing Anti-M and Anti-N Blood Group Phenotyping Reagents

Kallaya Kerdkaewngam, Siriporn Ponsen, Suvit Phonimit, Udom Tingtoy and Soisaang Phikulsod

Antiserum and Standard cell Preparation Section, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand.

Abstract: National Blood Centre, Thai Red Cross Society has presently produced polyclonal anti-M and anti-N blood group phenotyping reagents from rabbit immunized serum. The murine monoclonal hybridoma technology has shown to be better efficiency than those of the rabbit polyclonal antibody in terms of productivity, quality and specificity. **Objective:** To develop a method to produce the hybridoma cell line by murine monoclonal hybridoma technology for producing anti-M and anti-N blood group phenotyping reagents. **Materials and Methods:** The white blood cells from BAL B/c mice spleen which were immunized three times with 20% group O human red blood cells phenotype M+N+, were further fused with mice myeloma cells (SP2/O) of the same species. The hybridoma growth culture supernatants were then tested with the screening cells O_1 (M+N-) and O_2 (M-N+). Only the hybridoma which gave positive reaction with O_1 or O_2 was selected to further culture. These hybridomas were identified using identification panel cells and papainized identification panel cells. Hybridomas secreting anti-M or anti-N were selected for limiting dilution to pick out monoclones. The monoclones were frozen in liquid nitrogen. The culture supernatant was kept and tested in details using the serology test. **Results:** This research was able to produce one hybridoma of anti-M secreting as NBC-M2 ($7H_3B_7$) and four hybridomas of anti-N secreting as NBC-N1 ($139G_3G_2$), NBC-N2 ($9A_3D_9$), NBC-N3 ($9A_5B_7$) and NBC-N4 ($7D_3D_8$). **Conclusions:** Preliminary serology tests showed that the five hybridomas were able to produce anti-M and anti-N blood group phenotyping reagents. These five hybridomas are newly produced. Therefore, further serology tests are needed to confirm that anti-M and anti-N produced from these hybridomas cell lines could replace the polyclonal anti-M and anti-N blood group phenotyping reagents produced from rabbit immunized serum.

Keywords : ● Anti-M ● Anti-N ● Murine monoclonal ● Hybridoma

J Hematol Transfus Med 2014;24:361-9.

