Bull Chiang Mai AMS 1990; 23: 161-163

รายงานพิเศษ

# เทคนิคการวิจัยชั้นสูงทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา : CATALYTIC MONOCLONAL ANTIBODY

ณ The Weizman Institute of Sciences ประเทศอิสราเอล*
สิชล สงค์ศิริ**

==========

ในการทำให้แอนติบอดี้จาก ascites มีความบริสุทธิ์ พบว่าวิธี Protein A Affinity chromatography มีประสิทธิภาพดีกว่าในด้านปริมาณ คือสามารถ load sample ได้ครั้งละ 3 มล. เมื่อเทียบกับวิธี HPLC ซึ่ง load ได้ครั้งละ 0.25 มล. เมื่อนำเอาแอนติบอดี้ที่แยกได้โดยวิธีทั้งสอง มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าวิธี Protein A Affinity chromatography ให้ความบริสุทธิ์ดีกว่า คือ ให้เพียง 3 lines เท่านั้น ในขณะที่วิธี HPLC ให้ถึง 5 lines ด้วยกัน จากการทดสอบการจับกับแอนติเจน และ catalytic assay พบว่าไม่แตกต่างกัน

Catalytic monoclonal antibody (CMA) เป็นแอนติบอดี้ที่มีการทำงานคล้ายเอนไซม์ โดยอาศัยส่วน Fab ซึ่งมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่เหมาะสม ที่สามารถย่อย (Catalyze) สับสเตรทได้ ในการสร้าง CMA ต่อ hapten หรืออีกนัยหนึ่ง คือสับสเตรทที่ต้องการให้แอนติบอดี้ทำปฏิกิริยา catalyze โดยอาจจะต้องมีการดัดแปลงตัว hapten เองให้มีความเหมาะสมที่จะกระตุ้นให้เกิด CMA จากนั้นจึงรวมตัวกับตัวพา (carrier) มักนิยมใช้ Bovine serum albumin หรือ keyhole limpet hemocyanin ประกอบกับการใช้เทคนิค Hybridoma และการเลือก clone ที่เหมาะสม โดยวิธี Short analog competitive ELISA ทำให้เกิด ascites หลังจากที่ได้ ascites จำนวนมากแล้ว ขั้นตอนต่อไปที่สำคัญคือ การแยกแอนติบอดี้ออกจากโปรตีนหรือสารอื่นๆ ใน ascites ที่อาจจะให้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ CMA ได้ ซึ่งขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เพราะมิเช่นนั้น ปฏิกิริยา catalyze ที่เกิดจะไม่ได้มาจากแอนติบอดี้ ในการฝึกอบรมครั้งนี้ ผู้รายงานได้รับการฝึกอบรม โดยปฏิบัติด้วยตนเองในการแยกแอนติบอดี้ให้บริสุทธิ์ โดยวิธี High

---

* รายงานการฝึกอบรม ณ ต่างประเทศโดยทุน AID/CDF Project C5-187 (No. 936-5544-G-00-6034-00) ระหว่างวันที่ 10 ตุลาคม ถึงวันที่ 1 ธันวาคม 2533

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ column DESE-TKS-5PW เปรียบเทียบกับวิธี Protein A Affinity chromatography และทำการทดสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดี้ที่แยกได้ ทดสอบความสามารถของแอนติบอดี้ในการจับกับสับสเตรทและสามารถ catalyze สับสเตรทได้หรือไม่ โดยการฝึกอบรมและการปฏิบัติทั้งหมด อยู่ภายใต้การดูแลและการให้คำแนะนำจาก Prof. Bernard S. Green และ Prof. Zelig Eshhar

**การแยกแอนติบอดี้จากน้ำในช่องท้อง (ascites) โดยวิธี HPLC**

นำ ascites มาปั่นที่ 10,000 g นาน 5 นาที เจือจางเป็น 1:4 ด้วย 20 mM Tris buffer pH 8.5 กรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมครอน ฉีดเข้าสู่ column (DEAE-TKS -5PW, 70 mm x 750 mm) ทำการ elution ดังนี้คือ

Solution A (20 mM Tris buffer pH 8.5) 90% + Solution B (3 M sodium citrate ใน 20 mM Tris buffer pH 8.5) 10% คงอัตราส่วนนี้ไว้นาน 2.5 นาที จึงค่อยๆ ลด solution A ลงเหลือ 70% และเพิ่ม Solution B ขึ้นเป็น 30% โดยใช้เวลาในการเปลี่ยนอัตราส่วน (gradient) นาน 17.5 นาที คงอัตราส่วนนี้ไว้นาน 10 นาที การทำ gradient นี้ทำโดยเครื่อง LDC Analytical-Multiple Solvent Delivery System BIO.CM 4000 ทำการตรวจหาสารที่ผ่านออกมา โดยตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยเครื่อง LDC Analytical Programmable Wavelength Detector SM 4000 ทำการเก็บ fraction ทั้งหมด 50 หลอดๆ ละ 20 นาที อัตราการไหลของ eluent เท่ากับ 1 มล.ต่อนาที จะได้ peak ของแอนติบอดี้เป็น peak ที่ 2 จาก peak ใหญ่ๆ ทั้งหมด 3 peak

**การแยกแอนติบอดี้จากน้ำในช่องท้อง (ascites) โดยวิธี Protein A Affinity chromatography**

นำ 3 มล.ของ ascites ปั่นที่ 10,000 g นาน 5 นาที กรองผ่านแผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้น ผ่านลงใน Protein A column (bed volume 5 ml. equilibrate ด้วย 30 mM Tris buffer pH 7.5) ทำการล้างสารที่ไม่จับกับ Protein A ออกด้วยบัฟเฟอร์ตัวเดิมอย่างน้อย 10 เท่าของ bed volume ทำการ elute เอาแอนติบอดี้ออกโดย 0.2 M glycine buffer pH 2.8 เก็บ fraction หลอดละ 2.5 มล. ทำให้ eluate ที่ได้เป็นกลางด้วย 2M Tris buffer pH 8.2

**การทดสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีที่ได้**

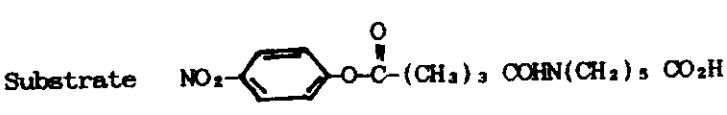
นำแอนติบอดีที่แยกได้มาทำ SDS-PAGE

**การทดสอบคุณสมบัติในการจับกับ hapten**

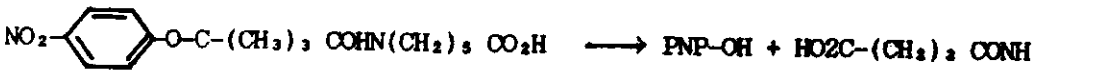
นำเอาแอนติบอดีที่แยกได้มาทำ ELISA โดยใช้ hapten ที่ conjugate กับ BSA

**การทดสอบ Catalytic activity**

นำเอาแอนติบอดีที่แยกได้ มาปรับให้ได้ความเข้มข้น 1.8 มก./มล. และนำมา 70 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท 20 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตรของ 30 mM Tris buffer pH 8.0 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดยวัดแบบ kinetic คือวัดทุกๆ นาที ตลอดเวลา 15 นาที

Substrate 

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังนี้



**ข้อเสนอแนะ**

แนวความคิดเรื่อง Catalytic antibody มีมานานแล้ว แต่ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากยังไม่มี hybridoma technology แต่ในปัจจุบัน แนวคิดนี้ กำลังได้รับความสนใจค้นคว้าศึกษากันอย่างจริงจัง และประสบความสำเร็จมากขึ้นตามลำดับ อนาคตของ CMA ยังเป็นที่น่าสนใจต่อบุคลากรทางการแพทย์ และทางอุตสาหกรรม ซึ่งต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ ถาทิ เช่น การผลิตยาบางชนิด หรือสารบางชนิดที่เตรียมขึ้น โดยอาศัยเอนไซม์ที่เตรียมได้ยากหรือมีราคาแพง ตลอดจนปฏิกิริยาที่ยากที่จะเกิดขึ้นก็อาจจะใช้ CMA เป็นตัวเหนี่ยวนำทำให้เกิดปฏิกิริยานั้นๆ ได้ ซึ่งความรู้ที่ได้จากการฝึกอบรมจนครั้งนี้ เป็นประโยชน์โดยตรงต่อการเรียนการสอนวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาขั้นสูง ในระดับปริญญาตรีและปริญญาโท ตลอดจนการวิจัยที่อาจเกี่ยวข้องกับ catalytic monoclonal antibody เป็นอย่างมาก

**สิทธ สงค์ศิริ** วท.ม.(จุลชีววิทยา)
ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่