



การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ  
ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15  
เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช

โดย

นางสาวปริยานุช สายบุญเรือน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ  
ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15  
เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช

โดย

นางสาวปรียานุช สายบุญเรือน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

PURIFIED MONOCLONAL ANTIBODY OF  
ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 FOR  
USING IN THE DEVELOPMENT OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS  
SURFACE PROTEINS IN PLANTS

BY

MISS PREEYANUCH SAYBOONRUAN



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS  
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2016

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวปรียานูช สายบุญเรือน

เรื่อง

การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ  
ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15  
เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ ๑๖ กรกฎาคม พ.ศ. 2560

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

สุธี ยุกสันต์

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สุธี ยุกสันต์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ด —

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา ตั้งคนานนท์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

บุษยา ไทยสมบุญรส

(ดร. บุษยา ไทยสมบุญรส)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ชนิต ไซต

(อาจารย์ ดร. ชนิตไซต ปิยพิทยานันต์)

คณบดี

ปกรณ เสริมสุข

(รองศาสตราจารย์ ปกรณ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของ ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช
ชื่อผู้เขียน	นางสาวปรียานุช สายบุญเรือน
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา ตั้งคนานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. บุษยา ไทยสมบุญสุข
ปีการศึกษา	2559

### บทคัดย่อ

การศึกษาคุณสมบัติโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืชจำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสเจอี ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ จีโนส *Flavivirus* และทำบริสุทธิ์ของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์หลังจากตกตะกอนด้วย 50% แอมโมเนียมซัลเฟต โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ ทำให้ได้ปริมาณ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium โดยวิธี Direct adaptation และ Sequential adaptation เท่ากับ  $36.47 \pm 6.22$  และ  $38.68 \pm 6.32$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium เท่ากับ  $41.82 \pm 5.93$  และ  $68.88 \pm 8.18$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับแอนติเจน ให้ผลทดสอบเป็นบวกกับ *Dengue virus type 1* และ *Japaneses encephalitis vaccines* ดังนั้น anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืชเพื่อพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืชต่อไป

**คำสำคัญ:** ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี, D1-4G2-4-15, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม, การทำบริสุทธิ์

Thesis Title	PURIFIED MONOCLONAL ANTIBODY OF ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 FOR USING IN THE DEVELOPMENT OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS SURFACE PROTEINS IN PLANTS
Author	Miss Preeyanuch Sayboonruan
Degree	Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Major Field/Faculty/University	Biotechnology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Wipa Tangkananond, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Butsaya Thaisomboonsuk, Ph.D.
Academic Year	2016

### ABSTRACT

The study of the *Japanese encephalitis virus* (JEV) surface protein in plants require monoclonal antibodies specific to its antigen. Aim of this research development of D1-4G2-4-15 cell culture in serum-free media to produce monoclonal antibodies specific to the antigen of the genus *flavivirus* and purification of cell culture supernatant after precipitation with 50% ammonium sulfate by affinity chromatography. The amount of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 in CD Hybridoma medium by Direct adaptation and Sequential adaptation were  $36.47 \pm 6.22$  and  $38.68 \pm 6.32$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively. While using Hybridoma-SFM were  $41.82 \pm 5.93$  and  $68.88 \pm 8.18$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The specific activities of this purified monoclonal antibody were tested by using various flavivirus antigens. The results were positive with *Dengue virus* type1 and several Japanese encephalitis vaccines. It was concluded that anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 from this research can be used in studying the properties of the surface protein of the *Japanese encephalitis virus* in plant.

**Keywords:** *Japanese encephalitis virus*, D1-4G2-4-15, serum-free media, purification

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์เป็นอย่างดีด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจากคณาจารย์ นักวิชาการ นักวิจัย รวมทั้งภาครัฐและเอกชนที่สนับสนุนทุนการศึกษาให้คำแนะนำช่วยเหลือ รวมทั้งสนับสนุนอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัยเป็นอย่างดีเสมอตลอด กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิภา ตั้งคนานนท์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความกรุณาอย่างสูงในการให้โอกาสทางการศึกษาด้านความช่วยเหลือในการหาทุนวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ทั้งรายวิชาเรียนและงานวิจัยในทุก ๆ ด้านด้วยดีเสมอมา กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิชาความรู้รวมถึงงานด้านเอกสารต่าง ๆ มาโดยตลอดจนข้าพเจ้าประสบความสำเร็จทางการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ร่วมกับ บริษัท ไปโอเนท-เอเชีย จำกัด เลขที่ 19 ซอยอุดมสุข 37 ถนนสุขุมวิท 103 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพมหานคร สัญญาเลขที่ MSD5 7 I 0 1 1 9 ที่สนับสนุนทุนวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ ญ.ดร. วาสนา วิจักขณาลัญญ์ ผู้จัดการฝ่ายวิชาการและขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ บริษัท ไปโอเนท-เอเชีย จำกัด ที่ให้เกียรติให้คำปรึกษารวมทั้งให้การสนับสนุนด้วยดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ แผนกไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ (Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) และกราบขอบพระคุณ ดร. บุชยา ไทยสมบูรณ์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คุณชุตติธ ทวีเลิศ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ พี ๆ นักวิจัยทุกท่าน รวมถึงท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามในที่นี้ที่ช่วยสอนการทำงานวิจัย ให้คำปรึกษา และวางแผนงานวิจัย รวมทั้งแก้ไขปัญหาการทำวิจัย ดูแลช่วยเหลือในทุกด้าน และอนุญาตให้ใช้อุปกรณ์ สารเคมี สถานที่ในการทำวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่ช่วยให้กำลังใจรวมทั้งรับฟัง และให้คำปรึกษาในการดำเนินชีวิต และแนะนำให้กระทำในสิ่งที่ดีและถูกต้องตลอดมารวมทั้งสนับสนุนการเงินแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา ตลอดจนผู้เขียนหนังสือ วิทยานิพนธ์ งานวิจัย และบทความต่าง ๆ ที่ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้าจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

นางสาว ปรียานุช สายบุญเรือน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 โรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis)	4
2.1.1 จีโนมของไวรัส	5
2.1.1.1 โปรตีนโครงสร้าง (structural protein)	6
2.1.1.2 โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein)	7
2.1.1.3 วงจรชีวิตของ <i>flavivirus</i>	9
2.1.2 การติดต่อของโรค	11
2.1.2.1 การติดเชื้อ <i>Japanese encephalitis virus</i>	11



2.1.3	ระบาดวิทยา	12
2.1.3.1	ระบาดวิทยาในประเทศไทย	13
2.1.4	การเกิดโรคไข้สมองอักเสบเจอี	14
2.1.5	อาการทางคลินิก	15
2.1.6	การวินิจฉัยโรค	16
2.1.7	การรักษา การป้องกัน และการควบคุมโรค	18
2.1.7.1	การรักษาโรคไข้สมองอักเสบเจอี	18
2.1.7.2	การป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอี	18
2.1.7.3	วัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอี	19
2.2	แอนติบอดี (Antibody)	22
2.2.1	การศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดี	23
2.2.2	ชนิดและโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน	23
2.2.2.1	Immunoglobulin G (IgG)	23
2.2.2.2	Immunoglobulin A (IgA)	25
2.2.2.3	Immunoglobulin M (IgM)	26
2.2.2.4	Immunoglobulin D (IgD)	26
2.2.2.5	Immunoglobulin E (IgE)	26
2.3	โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody)	27
2.3.1	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	27
2.3.2	ข้อดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	29
2.3.3	ข้อเสียของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	30
2.3.4	การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี	30
2.3.4.1	ด้านจุลชีววิทยา	30
2.3.4.2	ด้านการวินิจฉัยโรค	31
2.3.4.3	ด้านการรักษา	31
2.3.4.4	ด้านการป้องกัน	31
2.4	การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal Cell Culture)	32
2.4.1	คุณลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยง	32
2.4.1.1	ชนิดของโฮสต์เซลล์	33
2.4.2	คุณสมบัติและความสามารถในการแบ่งตัว	33

2.4.2.1. Primary cell culture	33
2.4.2.2 Semi - continuous cell line	33
2.4.2.3 Continuous cell line	33
2.4.3 อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์สัตว์	34
2.4.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ	34
2.4.3.2 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	34
2.4.3.3 ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์	34
2.4.4 ประเภทและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	35
2.4.4.1 ประเภทของอาหารเลี้ยงเซลล์	35
2.4.4.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	36
2.4.5 ชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์	38
2.4.5.1 Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)	38
2.4.5.2 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	38
2.4.5.3 Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640)	38
2.4.6 ซีรัม (Serum)	38
2.4.6.1 องค์ประกอบของซีรัม	38
2.4.6.2 การเลือกใช้ชนิดของซีรัมขึ้นอยู่กับเซลล์ที่เพาะเลี้ยง	40
2.4.6.3 ข้อดีของการเสริมด้วยซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์	41
2.4.6.4 วิธีการปรับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม	44
2.4.6.5 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม	44
2.5 กระบวนการแยกทางเคมี	46
2.5.1 การแยกโดยการตกตะกอน (Separation by Precipitation)	46
2.5.1.1 วิธีควบคุม pH	47
2.5.1.2 วิธีการเลือกตัวตกตะกอนที่เฉพาะเจาะจง	47
2.5.1.3 การศึกษาการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	49
2.5.2 การแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี (Separation by Chromatography)	50
2.5.2.1 การแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี	50
2.5.3 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ	51
2.5.3.1 หลักการของโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ	51

2.5.3.2 เมทริกซ์ (Matrix)	52
2.5.3.3 ลิแกนด์	54
2.5.3.4 Spacer arm	54
2.5.3.5 การเชื่อมลิแกนด์เข้ากับเมทริกซ์	54
2.5.3.6 การประยุกต์ใช้งาน	55
2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	56
2.6.1 หลักการของวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	56
2.6.2 ชนิดของ ELISA	56
2.6.2.1 Direct method	56
2.6.2.2 Indirect method	57
2.6.2.3 Competitive method	57
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC <sup>®</sup> HB-112 <sup>™</sup> ) และการเพิ่มจำนวนเซลล์	58
3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC <sup>®</sup> HB-112 <sup>™</sup> )	58
3.1.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC <sup>®</sup> HB-112 <sup>™</sup> )	58
3.1.3 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Neubauer hemocytometer	59
3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม	60
3.2.1 วิธี Direct adaptation	60
3.2.2 วิธี Sequential adaptation	60
3.3 การเก็บเซลล์ D1-4G2-4-15 ในไนโตรเจนเหลว	61
3.3.1 การเก็บเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัวในไนโตรเจนเหลว	61
3.3.2 การเก็บเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ปราศจากซีรัมของตัวอ่อนลูกวัวในไนโตรเจนเหลว	61
3.4 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน	62
3.5 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว	62
3.6 การทำบริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟี	63

3.6.1 Econo-Pac Serum IgG Purification Kit (Bio-Rad)	63
3.6.2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Econo-Pac Serum IgG Purification Kit	63
3.7 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด	64
3.8 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน	64
3.8.1 การทดสอบการเลือกบัพเฟอร์ (blocking) สำหรับ นำมาใช้วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA	64
3.8.2 การทดสอบความเข้มข้นของ Goat anti-mouse IgG-HRP สำหรับนำมาใช้วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA	65
3.8.3 วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA	66
3.9 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน	66
3.9.1 ทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอนติเจน	66
3.9.2 ทดสอบความจำเพาะของ ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน	67
3.10 ทดสอบความคงทน	68
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 และการเพิ่มจำนวนเซลล์	69
4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม	72
4.2.1 CD Hybridoma medium	71
4.2.2 Hybridoma-SFM medium	78
4.3 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี	84
4.4 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน	87
4.5 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน	95
4.6 ทดสอบความคงทนของแอนติบอดี (ในรูปแบบน้ำ)	97
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	99
รายการอ้างอิง	101

## ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15	121
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	123
ภาคผนวก ค ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของจำนวนเซลล์และ เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตที่สภาวะต่าง ๆ	127
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานและค่าดูดกลืนแสง	129
ภาคผนวก จ ประมวลภาพการดำเนินงานวิจัย	138
ภาคผนวก ฉ บทความวิจัยที่กำลังส่งตีพิมพ์ในวารสารของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร	145
ประวัติผู้เขียนและผลงานทางวิชาการ	157

## สารบัญตาราง

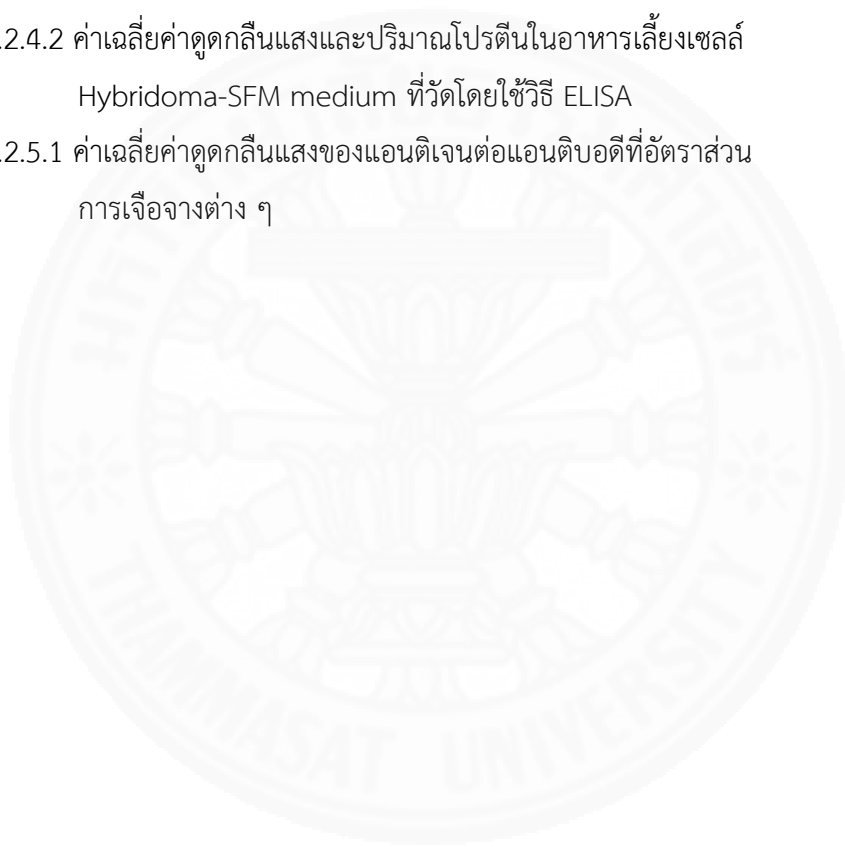
ตารางที่	หน้า
2.1 การแบ่งเทคนิคและวิธีการแยกตามชนิดของเฟส	48
4.1 ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร ของบัพเฟอร์ที่นำมาทดสอบ สำหรับการวัดปริมาณ IgG	88
4.2 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณ IgG ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ( $\mu\text{g/ml}$ ) หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15	89
4.3 ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณ IgG ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ( $\mu\text{g/ml}$ ) หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15	90
4.4 สรุปปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณ IgG ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ( $\mu\text{g/ml}$ ) หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 (แสดงผลโดยค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย)	91
4.5 สรุปค่าการทดสอบทางสถิติของอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma และ Hybridoma-SFM ที่วิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกัน	91
4.6 สรุปค่าการทดสอบทางสถิติของวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ Direct adaptation และ Sequential adaptation ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกัน	93
4.7 ผลการทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน (positive $\geq 0.200$ > negative)	96
4.8 ผลการทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 (positive $\geq 0.200$ > negative)	97
 ตารางภาคผนวกที่	
ก.2.1.1 องค์ประกอบของการเตรียม OPI ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	121
ก.2.2.1 สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัวสำหรับการ การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC <sup>®</sup> HB-112 <sup>™</sup> )	122

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ค.1 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ที่สภาวะต่าง ๆ	127
ค.2 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ที่สภาวะต่าง ๆ	127
ค.3 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่สภาวะต่าง ๆ	128
ค.4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่สภาวะต่าง ๆ	128
ง.1.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเนื้อตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Direct adaptation ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์	129
ง.1.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเนื้อตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Sequential adaptation ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์	130
ง.1.3 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเนื้อตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ โดยวิธี Sequential adaptation ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์	131
ง.2.1 ค่าดูดกลืนแสงของบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดที่ค่าความเจือจางของ Goat anti-mouse IgG-HRP 1:1000 และ 1:2000	132
ง.2.2.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของ Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจางต่าง ๆ	133
ง.2.2.2 ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของ Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจางต่าง ๆ	133
ง.2.3.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium โดยใช้วิธี Bradford assay	134

**สารบัญตาราง (ต่อ)**

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ง.2.3.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma โดยใช้วิธี Bradford assay	135
ง.2.4.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma ที่วัดโดยใช้วิธี ELISA	136
ง.2.4.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่วัดโดยใช้วิธี ELISA	136
ง.2.5.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของแอนติเจนต่อแอนติบอดีที่อัตราส่วน การเจือจางต่าง ๆ	137





## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ยุงรำคาญ ( <i>Culex tritaeniorhynchus</i> ) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบเจอี	4
2.2 โครงสร้างจีโนมของ <i>flavivirus</i> แผนภาพแสดงรูปแบบของ <i>flavivirus polyprotein</i> ที่เป็นโปรตีนโครงสร้างและไม่เป็นโปรตีนโครงสร้าง	5
2.3 วงจรชีวิตของ <i>flavivirus</i>	11
2.4 แผนผังของแหล่งเพาะยุงและการติดเชื้อของสัตว์และมนุษย์ของโรคไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี	12
2.5 อาการทางคลินิกจากการติดเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี	16
2.6 Japanese Encephalitis IgM ELISA kit	17
2.7 น้ำเหลืองของกระด่ายที่นำไปทำ eletrophoresis พบ protein fraction ต่าง ๆ	24
2.8 โครงสร้างของแอนติบอดี	25
2.9 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG, IgM, IgA, IgD และ IgE	26
2.10 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	28
2.11 รูปร่างและลักษณะการเจริญเติบโตของ Vero cells	34
2.12 วิธีการปรับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (FBS: อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมและ SFM: อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม)	43
2.13 การจับกันระหว่างลิแกนด์ (L) และแอนไซม์ที่สนใจ (E) โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ	52
2.14 หลักการของโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ แสดงการจับกันระหว่างสารที่สนใจ (S) กับลิแกนด์ (L) ในขณะที่อยู่ในคอลัมน์	53
2.15 โครงสร้างของ agarose gel	53
2.16 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อระหว่างลิแกนด์และเมทริกซ์	55
2.17 ชนิดของ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	57
3.1 รูปแบบของการเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานลงใน 96 well plate	64
3.2 แอนติเจนสำหรับทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15	67

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.1 ลักษณะของเซลล์ D1-4G2-4-15 ภายหลังจากละลายเซลล์ที่ถูกเก็บไว้ใน ไนโตรเจนเหลวลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม	70
4.2 ลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 หลังการ subculture ครั้งที่ 1 ที่กำลังขยายต่าง ๆ	71
4.3 ลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่กำลังขยาย 40X หลังการ subculture ครั้งที่ 3 ที่แข็งแรงสมบูรณ์พร้อมที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม	71
4.4 การเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ D1-4G2-4-15 ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium)	74
4.5 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% FBS และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium)	75
4.6 การเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% FBS และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium)	76
4.7 เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวิธี Direct adaptation หลังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ที่กำลังขยายต่าง ๆ	77
4.8 เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวิธี Sequential adaptation ที่อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมต่อ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ที่กำลังขยายต่าง ๆ	77
4.9 การเปรียบเทียบความหนาแน่น D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium)	80
4.10 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium)	81

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.11 การเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium)	82
4.12 เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) โดยวิธี Direct adaptation หลังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ที่กำลังขยายต่าง ๆ	83
4.13 เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) โดยวิธี Sequential adaptation ที่อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ที่กำลังขยายต่าง ๆ	83
4.14 Nessler's reagent ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนีย	85
4.15 ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย Nessler's reagent	85
4.16 โคโรมาโทแกรมการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตรของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium	86
4.17 โคโรมาโทแกรมการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตรของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium	86
 ภาพผนวกที่	
ง.2.3.1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	134
ง.2.4.1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ Mouse IgG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	135
จ.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม	138
จ.2 เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากละลายเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม	139
จ.3 เซลล์ D1-4G2-4-15 ก่อนการเปลี่ยนอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม	139

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
จ.4 การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์	139
จ.5 เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากการ subculture ครั้งที่ 1	140
จ.6 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ OLYMPUS รุ่น CKX41 สำหรับดูการเจริญของเซลล์	140
จ.7 สีของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ก่อน subculture	140
จ.8 เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากการ subculture ครั้งที่ 3	141
จ.9 อาหารเลี้ยงเซลล์แบบปราศจากซีรัมโดยมีชื่อทางการค้า คือ CD Hybridoma medium	141
จ.10 อาหารเลี้ยงเซลล์แบบปราศจากซีรัมโดยมีชื่อทางการค้า คือ Hybridoma-SFM medium	141
จ.11 การเก็บของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ก่อนการ subculture	142
จ.12 เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium	142
จ.13 เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium	142
จ.14 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนเบื้องต้นก่อนการทำบริสุทธิ์	143
จ.15 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA ขั้นตอนหลังการใส่สับสเตรท	143
จ.16 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA ขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M sulfuric acid	143
จ.17 การตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	144
จ.18 การทดสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี bradford assay	144
จ.19 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยวิธี ELISA	144
ฉ.1 จดหมายตอบรับจากผู้วิจารณ์ (reviewer) ให้สามารถลงตีพิมพ์บทความวิจัย ในวารสารของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร	145
ฉ.2 บทความวิจัยส่งตีพิมพ์ในวารสารของคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร	146

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

โรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis) เกิดจากการติดเชื้อ *Japanese encephalitis virus* (JEV) ไวรัสเจอีจัดอยู่ในตระกูล *Flaviviridae* สกุล *Flavivirus* อยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัสเด็งกี (*Dengue virus*) ไวรัสไข้เหลือง (*Yellow fever virus*) ไวรัสเวสต์ไนล์ (West Nile virus) ไวรัสโรคไข้สมองอักเสบจากเห็บ (*Tick-borne encephalitis virus*) และไวรัสซิกา (*Zika virus*) ซึ่งไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ ฟลาวีไวรัสตัวอื่น ๆ ซึ่งเป็นไวรัสที่มีแมลงกินเลือด (เห็บหรือยุง) เป็นพาหะนำโรค (carrier) จะติดต่อในวงจรจากสัตว์สู่คน แต่ในทางภูมิศาสตร์จะถูกจำกัดการกระจาย และการระบาดของไวรัสขึ้นอยู่กับที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ของตัวพาหะนำเชื้อโรค (เห็บและยุง) และมีสัตว์มีกระดูกสันหลังเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ (amplifying host) เช่น นก และหมู เป็นต้น (Rastogi *et al.*, 2016) จากงานวิจัย เรื่อง “Molecular Evolution of *Japanese encephalitis virus* in nature” พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี (JEV) ในรูปแบบของการเกิด genetic recombination ทั้งในธรรมชาติ และในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Tangkananond, 2008) จากนั้นทำการตัดต่อ Envelope gene หรือ E gene ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดผิว (Envelope protein) ของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี โปรตีนชนิดผิวนี้นี้สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันไข้สมองอักเสบเจอี โดยทำการศึกษา E gene ของสายพันธุ์วัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอีชื่อ SA14-14-2 (Ku *et al.*, 1994; Chambers & Thomas, 2003) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีสูง โดยมีกลุ่มนักวิจัยชาวจีนได้ศึกษาถึงระดับอณูวิทยาทราบว่า มี 8 epitope ที่มีความสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบของเหลวและแบบเซลล์ โดยที่ 6 epitope ณ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 75-92, 149-163, 258-285, 356-362, 373-399 และ 397-403 จะตอบสนองต่อ B cell ส่วนอีก 2 epitope ณ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 60-68 และ 436-445 จะตอบสนองต่อ T cell และตำแหน่งดังกล่าวของสายพันธุ์ SA14-14-2 โดยใช้โปรแกรม Vector NTI ตัดต่อ epitope ทั้ง 8 และเพิ่ม glycine และ serine (GS) linker ทำให้ได้ยีนที่สำคัญของ Envelope gene หรือเรียกว่า Polyepitope Peptide จำนวน 439 เบส แปลรหัสได้เป็น 137 อะมิโนแอซิด (Wei *et al.*, 2010) Polyepitope protein ที่กล่าวข้างต้นได้จากการสังเคราะห์ของบริษัท GeneArt<sup>®</sup>, Invitrogen โดยอาศัย vector และอื่น ๆ ช่วยในการแสดงออก

(express) ของยีนในเซลล์ของพืชใบยาสูบชนิด *Nicotiana benthamiana* ทำให้ใบยาสูบมีการสร้างโปรตีนชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอักเสบเจอี ตามวิธีของ Professor George Lomonossoff ณ Biological Chemistry, John Innes Centre, Colney lane, Norwich สหราชอาณาจักร Professor Lomonossoff มีความชำนาญด้านการผลิต vector ชื่อ pEAQ vector ซึ่งดัดแปลงมาจาก *Cowpea mosaic virus* (CPMV) RNA-2 (CPMV-HT) ไวรัสชนิด CPMV จัดเป็นพวก (+) sense ssRNA virus อยู่ใน Class *Comovirus*, Family *Comoviridae* ซึ่งเป็นไวรัสของพืชที่เพาะเลี้ยงได้ในใบยาสูบ (Sainsbury & Lomonossoff, 2008; Sainsbury *et al.*, 2009)

การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอักเสบเจอีในใบยาสูบ จำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของจีโนม *flavivirus* ที่สามารถผลิตได้ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC<sup>®</sup> HB-112<sup>TM</sup>) ซึ่งเป็น hybridoma cells การเลี้ยง hybridoma cells นั้นนิยมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ basal cell culture media ได้แก่ RPMI 1640, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Ham's F12 และ DMEM/F12 เป็นต้น ซึ่งสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์เหล่านี้จะมีส่วนประกอบต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ และแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส แต่ส่วนประกอบเหล่านี้ ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตที่ดีของเซลล์ ดังนั้นการเติมซีรัม (serum) ของสัตว์ ซึ่งถือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญมากที่สุดส่วนหนึ่งในการเลี้ยงเซลล์จะช่วยให้เซลล์เติบโตได้ดียิ่งขึ้น แม้ซีรัมจะช่วยในการเจริญเติบโต และเปลี่ยนสภาพของเซลล์ แต่การเสริมซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็มีข้อด้อยในหลายประการ เช่น ความปรวนแปรขององค์ประกอบในซีรัมมีผลต่อการเจริญของเซลล์ ซีรัมมีอายุการใช้งานที่จำกัด และมีราคาสูงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ ซีรัมยังเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนไวรัสที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ซีรัมยังทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารชีวเภสัชภัณฑ์ (biopharmaceuticals) จากเซลล์เพาะเลี้ยงมีความยุ่งยาก เนื่องจากซีรัมมีการปนเปื้อนจากโปรตีนของสัตว์ที่อาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นการทำอาหารเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ปราศจากซีรัม จึงช่วยลดขั้นตอนในการกำจัดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของซีรัม ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยปราศจากซีรัม เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่าย ลดการปนเปื้อนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และลดขั้นตอนในการกำจัดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของซีรัมในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ รวมทั้งทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอักเสบเจอีในใบยาสูบต่อไป โดยสามารถจะพัฒนาโปรตีนชนิดผิวนี้นี้เป็นวัคซีนทดแทนวัคซีนที่ผลิตจากสมองหนูหรือเซลล์สัตว์ซึ่งมักจะมีการปนเปื้อนจากโปรตีนของสมองหนู หรือจากไวรัสที่ปนเปื้อนมาในซีรัมหรือเซลล์สัตว์

## 1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่บริสุทธิ์ และจำเพาะต่อแอนติเจนของจีโนม *flavivirus* เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพีชโดยมุ่งเน้นการทำวิจัยดังนี้

(1) เพื่อพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ในการเพาะเลี้ยงซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของจีโนม *flavivirus* ได้

(2) ทำบริสุทธิ์ของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม เพื่อให้ได้ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่บริสุทธิ์ และนำไปใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพีช

## 1.3 ขอบเขตการศึกษา

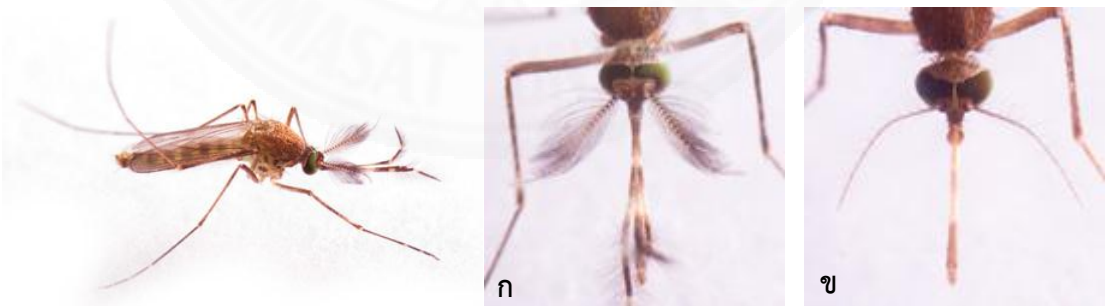
ทำการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยเปรียบเทียบวิธีที่สามารถเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 จากวิธีดั้งเดิมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเปลี่ยนเป็นวิธีที่สามารถเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม และเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ จีโนม *flavivirus* ได้ จากนั้นทำบริสุทธิ์ของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ภายหลังจากการตกตะกอนด้วย 50% แอมโมเนียมซัลเฟต ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography) และทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน ปริมาณของโมโนโคลนอลแอนติบอดี และความคงทนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (stability) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 โรคไข้สมองอักเสบเจอี (Japanese encephalitis)

โรคไข้สมองอักเสบเจอี เป็นโรคที่มีความร้ายแรงชนิดหนึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *Japanese encephalitis virus* (JEV) จัดอยู่ในตระกูลฟลาวิไวรัส (Family *Flaviviridae*) สกุลฟลาวิไวรัส (Genus *Flavivirus*) สามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศที่อยู่ในทวีปเอเชีย แปซิฟิก ตะวันตก และตอนเหนือของออสเตรเลีย เป็นต้น โรคไข้สมองอักเสบเจอีมีพาหะนำเชื้อโรคคือ ยุงรำคาญ (*Culex*) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Culex tritaeniorhynchus* (ภาพที่ 2.1) และมีสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น นกน้ำ (นกกระยาง นกกระสา ฯลฯ) หรือหมู ซึ่งเป็นรังโรคเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ (Wang & Liang, 2015) ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ สภาพอากาศ ฝน วงจรชีวิตของยุง รวมทั้งปริมาณความหนาแน่นของยุงในพื้นที่นั้น ๆ ซึ่งแหล่งที่อยู่อาศัยของยุงที่เป็นพาหะนำเชื้อโรคของโรคไข้สมองอักเสบเจอีนี้ ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับพื้นที่การเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่ง นาข้าว นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้นสามารถทำให้มีอัตราการเพิ่มของการจำลองตัวของไวรัส (Nukdee, 2003) และการแพร่กระจายของไวรัสสู่มนุษย์ โดยอาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของมนุษย์ และเพิ่มโอกาสในการติดโรคไข้สมองอักเสบเจอี มากขึ้น ดังนั้นปัจจัยทางด้านสภาพภูมิอากาศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการแพร่กระจายของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบเจอี (Tian *et al.*, 2015)



ภาพที่ 2.1 ยุงรำคาญ (*Culex tritaeniorhynchus*) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้สมองอักเสบเจอี

ก. *Culex tritaeniorhynchus* เพศผู้ antenna จะมีขนมากกว่ายุงตัวเมีย

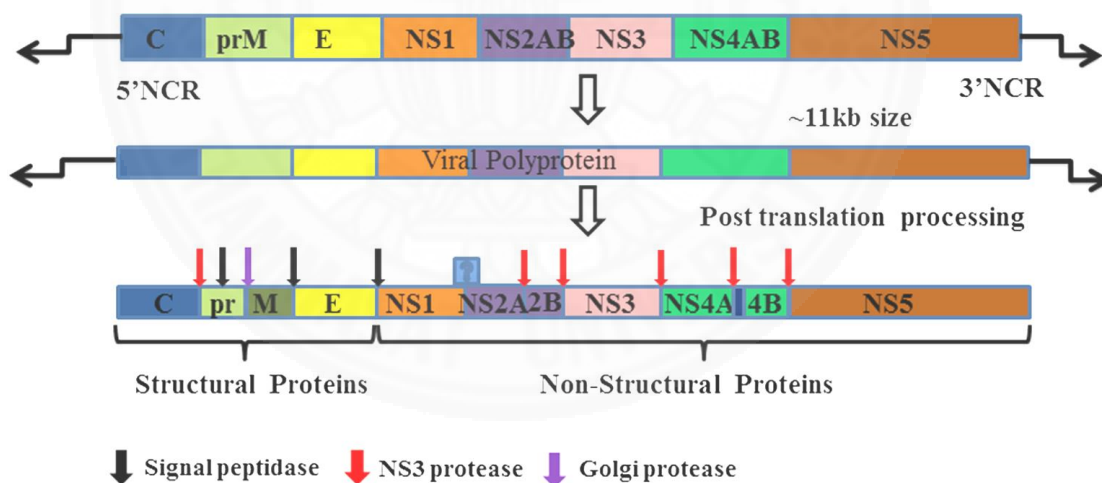
ข. *Culex tritaeniorhynchus* เพศเมีย palpus จะสั้นกว่ายุงตัวผู้

ที่มา : <http://www.inadays.com.tr/en/about/mosquito-museum>



### 2.1.1 จีโนมของไวรัส

*Japanese encephalitis virus* (JEV) เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 50 นาโนเมตร มีกรดนิวคลีอิกของไวรัสเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (+) ซึ่งมีความยาวประมาณ 11 กิโลเบส (kb) โดยที่จีโนมประกอบไปด้วย capsid (C) protein ซึ่งครอบคลุมโดยการขนส่ง lipid bilayer ของโฮสต์ และมีหนึ่ง open reading frame (ORF) สำหรับการสร้าง polyprotein ซึ่งแบ่งออกเป็นโปรตีนโครงสร้างสามชนิด ได้แก่ capsid (C), premembrane (prM), envelope (E) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างอีกเจ็ดชนิด ได้แก่ NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B และ NS5 (ภาพที่ 2.2) โดยใช้เอนไซม์ viral proteases และ host signalases หลังจากกระบวนการแปลรหัส (translation) โดยที่ปลายด้านข้างของ ORF เป็น 5' และ 3' non-coding regions (NCRs) (Unni *et al.*, 2011) ซึ่งจีโนมที่เป็นอาร์เอ็นเอนี้มี cap ชนิดที่ 1 คือมีปลาย 5' (m7GpppAmp) และไม่มีบริเวณที่เป็นปลาย 3'-terminal poly (A) โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C, prM, E genes และการวิเคราะห์ห้วงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic) สามารถแบ่ง JEV ออกเป็น 5 จีโนไทป์ (genotype) ซึ่ง ได้แก่ จีโนไทป์ 1 (I), 2 (II), 3 (III), 4 (IV) และ 5 (V) (Uchil & Satchidanandam, 2001)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างจีโนมของ *flavivirus* แผนภาพแสดงรูปแบบของ flavivirus polyprotein ที่เป็นโปรตีนโครงสร้างและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Rastogi *et al.*, 2016)

### 2.1.1.1 โปรตีนโครงสร้าง (structural protein)

(1) Capsid (C) protein เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กและมีประจุบวกสูง ขนาดประมาณ 12-14 กิโลดาลตัน (kDa) โดยมีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 120 กรดอะมิโน และกรดอะมิโนนั้นอยู่ในรูปแบบ homodimer ซึ่งจะสามารถรวมตัวกันเป็นจีโนมของไวรัส และสร้างโครงสร้างไวรัสที่เรียกว่านิวคลีโอแคพซิด (nucleocapsid) ซึ่งมีลำดับของโปรตีนที่คล้ายคลึงกันกับของไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในจีนัส *flavivirus* แต่ในส่วนบริเวณของ hydrophobic และ hydrophilic จะมีกรดอะมิโนที่เป็นแบบอนุรักษ์ ซึ่งมีส่วนร่วมในการกำหนดอาร์เอ็นเอ และ โปรตีน (Wang *et al.*, 2015) โดยที่นิวคลีโอแคพซิด เป็นไกลโคโปรตีน (glycoproteins) ที่มีสอง transmembrane helices ที่ถูกปล่อยออกมาจาก nascent polyprotein รวมทั้งยังร่วมกันแปลรหัส (co-translation) ซึ่งมีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ signal peptidases โดย capsid protein ทำหน้าที่ป้องกันกรดนิวคลีอิกของไวรัสจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ รวมถึงช่วยให้เชื้อไวรัสสามารถเกาะติดที่ผิวของเซลล์ในขั้นตอนการติดเชื้อ เป็นต้น (Mori *et al.*, 2007)

(2) prM และ M protein โดยที่ prM protein มีขนาด 18-19 กิโลดาลตัน และมีจำนวนกรดอะมิโน 165 กรดอะมิโนอาจทำหน้าที่เป็นแชเพอโรนโปรตีน (chaperone protein) ที่ควบคุมการจัดรูปร่างของโปรตีนอื่น ๆ (protein folding) และการประกอบรูปร่างของ E protein ส่วน M protein มีขนาดประมาณ 8 กิโลดาลตัน และมีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 75 กรดอะมิโน โดยที่ M protein เป็นโปรตีนเพปไทด์ (protein peptide) ที่ทำให้ไวรัสที่อยู่ในจีนัส *flavivirus* มีความสมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งในกอลจิคอมเพล็กซ์ (Golgi complex) นั้นมี prM protein เป็นสารตั้งต้นที่เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein precursor) ของโครงสร้าง M protein โดยที่ M protein จะถูกย่อยเอาชิ้นส่วนที่เป็น N-terminal (pr) ออกโดยจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ cellular furin-like protease และถูกหุ้ม (ปล่อยออก) ไปยัง extracellular medium การย่อยใช้เวลาเกิดขึ้นไม่นาน อาจเกิดก่อนหรือพร้อมกับการปล่อยของไวรัส เพราะทั้ง prM protein และ M protein สามารถพบได้ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้สันนิษฐานว่าอาจจะเชื่อมโยงกับการเกิดการกลายพันธุ์ของ envelope glycoprotein รวมถึงการพัฒนาการติดเชื้อของไวรัส (De Wispelaere *et al.*, 2016)

(3) E protein โดยทั่วไปแล้วมักประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน โดยที่ส่วนของคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นส่วนที่ได้มาจากโฮสต์ และส่วนโปรตีนนั้นเป็นแอนติเจนของไวรัส ซึ่ง E protein มีจำนวนกรดอะมิโน 495 กรดอะมิโน เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่ในรูปแบบของโครงสร้างโปรตีนที่อยู่ภายนอกของไวรัสโดยมีขนาด 53-54 กิโลดาลตัน โดยที่ 90 homodimer ที่สามารถแสดงออกได้ในโฮสต์ (host) และถูกส่งไปยัง lipid bilayer จาก major mature virion component ซึ่ง E protein นั้นเป็นเป้าหมายหลักที่สำคัญสำหรับ neutralizing

antibodies ประกอบด้วย receptor-binding site (s) ของเซลล์ และการรวมกันของเพปไทด์ (fusion peptide) ซึ่งเชื่อกันว่า E protein มีหน้าที่ที่สำคัญ ได้แก่ ปฏิกริยาการล้างฤทธิ์ (neutralization) ปฏิกริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงเรียกว่า ฮีมแอกกลูตินเนชัน (Hemagglutination) การประกอบรูปร่างของไวรัส การหลอมรวมเยื่อหุ้มเซลล์ และการจับของไวรัสกับ receptor ของเซลล์ (Luca *et al.*, 2012)

### 2.1.1.2 โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein)

(1) NS1 มีขนาดประมาณ 48 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนที่จัดเป็น homodimer ทั้งรูปแบบที่เป็นเซลล์และในรูปแบบที่ถูกหลั่งออกมา ซึ่ง NS1 นั้นมีความสามารถในการป้องกัน การตอบสนองต่อแอนติบอดีในโฮสต์ เป็นต้น โดยที่ NS1' หรือที่เรียกกันว่า NS1 มีขนาด 53 กิโลดาลตัน (Melian *et al.*, 2010) โดยมีรายงานว่าพบ NS1 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโรคไข้สมองอักเสบเจอี โดยการย่อย ORF ในส่วนของ N-terminal ด้วยเอนไซม์ signalase และ ย่อยในส่วนของ C-terminal ด้วยเอนไซม์ protease ทำให้ได้ NS1 ที่มีขนาดประมาณ 39-41 กิโลดาลตัน โดยที่ NS1 นี้จะเกี่ยวข้องในการประกอบรูปร่าง และปล่อยของไวรัสเพื่อทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อ ซึ่ง NS1 ประกอบด้วย 12 cysteine residues ที่เป็นแบบอนุรักษ์ที่สมบูรณ์ ในตำแหน่ง 1-3 N-linked glycosylation sites เป็นตำแหน่งที่ประกอบด้วยลำดับเบสจำเพาะ และมีความอนุรักษ์สูง ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่า NS1 นั้นสามารถหลั่งจากเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้อย่างซ้ำ ๆ แต่จะไม่สามารถหลั่งออกจากเซลล์ยุง ส่วนการกลายพันธุ์ของ NS1 นั้นจะมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส โดยธรรมชาติ แล้วการติดเชื้อไวรัสที่อยู่ในจีโนม *flavivirus* นั้นจะทำให้แอนติบอดี (antibody) เกิดปฏิกริยาการตรึงคอมพลีเมนต์ และหลังจากโปรตีนที่เรียกว่า soluble complement-fixing (SCF) antigen ซึ่งมีความจำเพาะของแต่ละประเภท รวมถึงความจำเพาะของความซับซ้อน และกลุ่มปฏิกริยาของ epitope ที่กำหนดไว้ ดังนั้น NS1 จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันระบบภูมิคุ้มกัน (Hua *et al.*, 2013)

(2) NS2A และ NS2B เป็นโปรตีนไม่ชอบน้ำที่มีขนาดเล็กและมีความเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ซึ่งมีส่วนร่วมในการจำลองอาร์เอ็นเอ (RNA replication) โดยทำหน้าที่ใน *cis* fashion ที่สามารถย่อย NS1-NS2A junction ภายหลังกระบวนการแปลรหัส และทำหน้าที่ทำให้ฟังก์ชันทำงานในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัส การประกอบรูปร่างของไวรัส รวมถึงการปลดปล่อยอนุภาคของไวรัส และยังสามารถทำให้การตอบสนองการต้านไวรัสของโฮสต์โดยการยับยั้ง interferon (IFN) ซึ่งทำให้สัญญาณของ pathway ลดลง โดยที่ NS2A และ NS2B เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยและเกี่ยวข้องกับกระบวนการของโปรตีน NS อื่น ๆ (Junaid *et al.*, 2012) โดยที่ในกรณีของไวรัสไข้เหลือง (*Yellow fever virus*) นั้น ได้มีการย่อยโปรตีน NS2 ด้วย

เอนไซม์ โดยมีการย่อยที่ตำแหน่ง C-terminal ซึ่งมีขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน และยังสามารถยับยั้งการย่อยที่ตำแหน่ง NS1/2A นอกจากนี้ยังมีอย่างน้อยหนึ่งตำแหน่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease อาทิเช่น NS2B-3 ในตำแหน่ง NS2A ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นโดยการบล็อกการย่อยของเอนไซม์ที่ตำแหน่ง NS2A ทำให้มีผลต่อการจำลองตัวเอง (replication) ของไวรัสอย่างมาก ส่วนโปรตีน NS2B มีขนาด 27 กิโลดาลตัน ที่ประกอบด้วย ความมีประจุสูง และตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์สูง โดยมีส่วนด้านข้างด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ โดยที่โปรตีน NS2B จำเป็นต้องใช้ NS3-mediated ในการย่อย โปรตีน NS2A/B กับ NS3 serine protease domain เพื่อใช้ในสำหรับกระบวนการสร้างของโปรตีนโครงสร้างและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง รวมถึงความซับซ้อนของเสถียรภาพระหว่างโปรตีน NS2B และ NS3 ส่วนปฏิกิริยาระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 บางส่วนอาจจะมีหน้าที่ในการแปลรหัสของกลไกการจำลองตัวเองของอาร์เอ็นเอไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ (Jan *et al.*, 1995; Ye *et al.*, 2012)

(3) NS3 เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเป็นอันดับสองโดยมีขนาดประมาณ 68-70 กิโลดาลตัน และมีความอนุรักษ์สูง ซึ่งโปรตีน NS3 นี้ประกอบไปด้วย โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นส่วนใหญ่ โดยเชื่อว่าเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ของกลไกการจำลองอาร์เอ็นเอ โดยที่ NS3 อาจประกอบไปด้วยการทำหน้าที่สองหน้าที่ ได้แก่ การทำงานของ protease activities และ nucleotide triphosphates/helicase activities เป็นต้น โดยหน้าที่เหล่านี้เกิดขึ้นใน cytoplasmic เท่านั้น นอกจากนี้โปรตีน NS3 สามารถพบเป็นส่วนประกอบของ viral RNA replicase ในการจำลองอาร์เอ็นเอ ในส่วนของ N-terminal หนึ่งในสามของโปรตีน NS3 ที่ซึ่งประกอบไปด้วย catalytic domain ของ NS2B-3 protease สามารถจำแนกโดยวิธี sequence alignment ซึ่ง sequence นี้ล้อมรอบด้วย serine protease nucleophilic serine ที่มีลำดับของกรดอะมิโนเป็นแบบอนุรักษ์ (Takegami *et al.*, 1995)

(4) NS4 และ NS4B เป็นโปรตีนขนาดเล็ก และโปรตีน NS4B มีขนาด 27 กิโลดาลตัน และบางส่วนอาจจะมีส่วนร่วมในการจำกัดเยื่อหุ้มของ NS3 และ NS5 ผ่านกลไก protein-protein interaction โดยที่ NS4A เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการถูกย่อยที่มีการย่อย  $\frac{3}{4}$  ของพื้นที่ทั้งหมด ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของ NS3-4A polyprotein จำนวนน้อย ๆ ซึ่งทำให้เห็นว่า NS3 และ NS3-4A มีหน้าที่ที่ชัดเจนในการจำลองตัวของไวรัส ส่วนโปรตีน NS4B นั้นมีการเปลี่ยนแปลงหลังกระบวนการการแปลรหัส เพราะหลังกระบวนการการแปลรหัสเสร็จสิ้นโปรตีน NS4B มีขนาดเริ่มต้นที่ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของโปรตีน NS4B จากขนาด 28 กิโลดาลตัน โดยยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับลักษณะของการเปลี่ยนแปลงนี้ (Kim *et al.*, 1997)

(5) NS5 เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ และเป็นโปรตีนที่มีความอนุรักษ์มากที่สุดของไวรัสในจีนัส *flavivirus* โดยสามารถทำนายน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 103-104 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนที่มีลักษณะโปรตีนที่มีความเป็นพื้นฐานสูงและถือว่าเป็น viral RNA polymerase ซึ่งในจำนวนโดเมนที่เป็นแบบอนุรักษ์ของโปรตีน NS5 หนึ่งในลำดับกรดอะมิโนเป็น Gly-Asp-Asp ซึ่งมีการจำแนกในหลาย ๆ RNA virus ว่าเป็นสายบวก และเชื่อว่าเข้ามาจับบทบาทใน RNA dependent RNA synthesis โดยที่ N-terminal domain ของ NS5 (ระหว่าง residues 60 และ 145) ที่เป็นโฮโมโลกัส (homologous) ที่จุดของ methyltransferases ที่เกี่ยวข้องใน S-adenosylmethionine binding และโดเมนนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการกระบวนการ methylation ของโครงสร้าง 5' cap โดยที่โปรตีน NS5 มีการทำงานสองกระบวนการคือ methyltransferase และ RNA polymerase activities ดังนั้นโปรตีน NS5 ที่พบนั้นเป็นส่วนประกอบของการจำลองตัวอาร์เอ็นเอของไวรัสที่เกี่ยวข้องในกระบวนการจำลองอาร์เอ็นเอ (Lu & Gong, 2013)

### 2.1.1.3 วงจรชีวิตของไวรัสในจีนัส *Flavivirus*

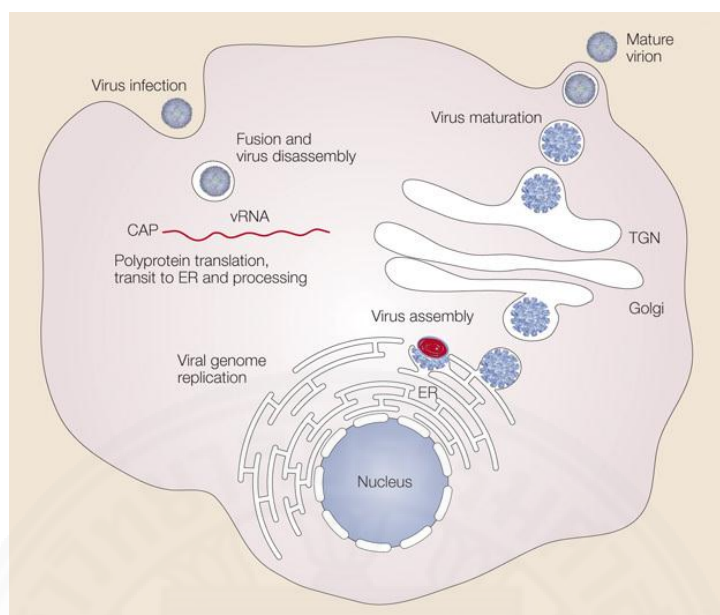
วงจรชีวิตของไวรัสในจีนัส *flavivirus* (ภาพที่ 2.3) ไวรัสจะเกาะที่ผิวเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) และเข้าสู่เซลล์โดยวิธีการนำสารเข้าสู่เซลล์โดยตัวรับ (receptor-mediated endocytosis) หลังจากนั้นไวรัสจะหลอมรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้แล้วไวรัสจะแยกส่วนประกอบต่าง ๆ โดยที่จีโนมของไวรัสจะถูกลดปล่อยออกไปยังไซโทพลาซึม (cytoplasm) จากนั้นอาร์เอ็นเอสายบวกจะถูกแปลรหัสไปเป็น single polyprotein ทำให้เกิดการจำลองตัวของไวรัสเกิดขึ้นภายในเซลล์ ต่อจากนั้นไวรัสจะประกอบรูปร่างที่บริเวณผิวของ endoplasmic reticulum (ER) เมื่อโครงสร้างโปรตีนและการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอใหม่หลุดออกไปยัง lumen ของ ER ไวรัสที่ยังไม่สมบูรณ์เต็มวัย และอนุภาคที่ปราศจากสารพันธุกรรม (subviral particles) จะถูกส่งผ่านไปยัง trans-Golgi network (TGN) อนุภาคของไวรัสที่ยังไม่สมบูรณ์จะถูกตัดโดย host protease furin ไวรัสที่สมบูรณ์จะถูกปล่อยออกไปโดยวิธี exocytosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2005)

(1) Translation strategy ลำดับของรหัสโปรตีน ใน ORF ที่ 5'-C-prM (M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4B-NS5-3' และมีอินโคตรึงทั้งสามโครงสร้างเป็นส่วนประกอบของ encoding ของไวรัส ได้แก่ ยีน C, M และ E โดยที่ยีน C คือ coding สำหรับ capsid protein (C) ส่วนยีน M เป็น coding ของ membrane protein (M) และ E คือ coding สำหรับ envelope protein (E) โดยที่ precursor ของ C protein เรียกว่า anchored C โดยที่รหัสโปรตีนหลักสำหรับ envelope glycoprotein มีอยู่ประมาณ 25% ใน 5' ประมาณหนึ่งในสี่ของ ORF ส่วนยีนที่เหลือเป็นโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง ซึ่งในการติดเชื้อของเซลล์นั้นจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างทั้ง

เจ็ดโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่และมีความอนุรักษ์สูง ได้แก่ NS1, NS3 และ NS5 และยังมีโปรตีนขนาดเล็ก ได้แก่ NSA2, NS2B, NS4A และ NS4B ดังที่กล่าวถึงในหัวข้อ 2.1.1.2 (Svitkin *et al.*, 1978)

(2) การจำลองอาร์เอ็นเอ การจำลองอาร์เอ็นเอเริ่มต้นสังเคราะห์ของสายคู่สมกับสายลบ mRNA คู่สมที่เป็นสายลบนี้ใช้เป็นต้นแบบสำหรับการผลิตโปรตีน ซึ่งสายบวกสามารถแปลรหัสเป็นโพลีเพปไทด์ (polypeptides) ได้เป็นโปรตีนโครงสร้างทั้งสามโปรตีนและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างทั้งเจ็ดโปรตีน เช่น การสังเคราะห์ actinomycin D-resistant ของไวรัสที่อยู่ในจีโนม *flavivirus* ที่มีความจำเพาะต่ออาร์เอ็นเอ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของเซลล์ในสัตว์มีกระดูกสันหลังได้ภายในหกชั่วโมง เป็นต้น โมเลกุลอาร์เอ็นเอสายบวกที่สังเคราะห์จากต้นแบบที่เป็นสายลบโดยกลไก semiconservative ที่เกี่ยวข้องกับ replicative intermediates (RIs) และ replicative forms (RFs) โดยที่ RFs เป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอคู่ ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบ RIs และ RFs เมื่อเกิดการติดเชื้อของเซลล์ได้ (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009)

(3) การประกอบรูปร่างและการปล่อยอนุภาคจาก *flavivirus* ที่ติดเชื้อเซลล์ (assembly and release of particles from flavivirus infected cells) อนุภาคของ *flavivirus* ประกอบด้วย nucleocapsid ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20-30 นาโนเมตร รอบ ๆ เป็นลิพิดสองชั้นที่ได้มาจากเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ที่ประกอบด้วย envelope protein (E) และ M (หรือ prM) เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 40 นาโนเมตร พื้นผิวที่ยื่นออกมา 5-10 นาโนเมตร อนุภาคที่อยู่ภายนอกเซลล์เป็นอนุภาคที่ถูกปล่อยไปยังน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture fluid) การศึกษาโครงสร้างโปรตีนที่เป็นชีวสังเคราะห์ในรูปแบบโอลิโกเมอร์ (oligomer) และหน้าที่ภายในเซลล์ของโปรตีน รวมถึงการปล่อยของอนุภาค พบว่าเยื่อหุ้มของ C protein เกิดจากปฏิกิริยาจีโนมของไวรัสที่เป็นอาร์เอ็นเอต่อรูปแบบของ nucleocapsid precursor ซึ่งการปรับเปลี่ยน C, prM และ E protein ที่ร่วมกับ ER membrane นั้น nucleocapsid ที่ร่วมกับ envelope โดยการแตกหน่อ (budding) ไปยัง ER lumen หลังจากขั้นตอนในอนุภาคที่โตสมบูรณ์ประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน E และ prM glycan ที่ได้รับการตัดและการเติมส่วนปลายโดยสามารถเปรียบเทียบกับ การเอาอนุภาคออกผ่าน exocytosis pathway ที่เหมือนกับการสังเคราะห์ของโฮสต์ plasma membrane glycoprotein (Apte-Sengupta *et al.*, 2014)



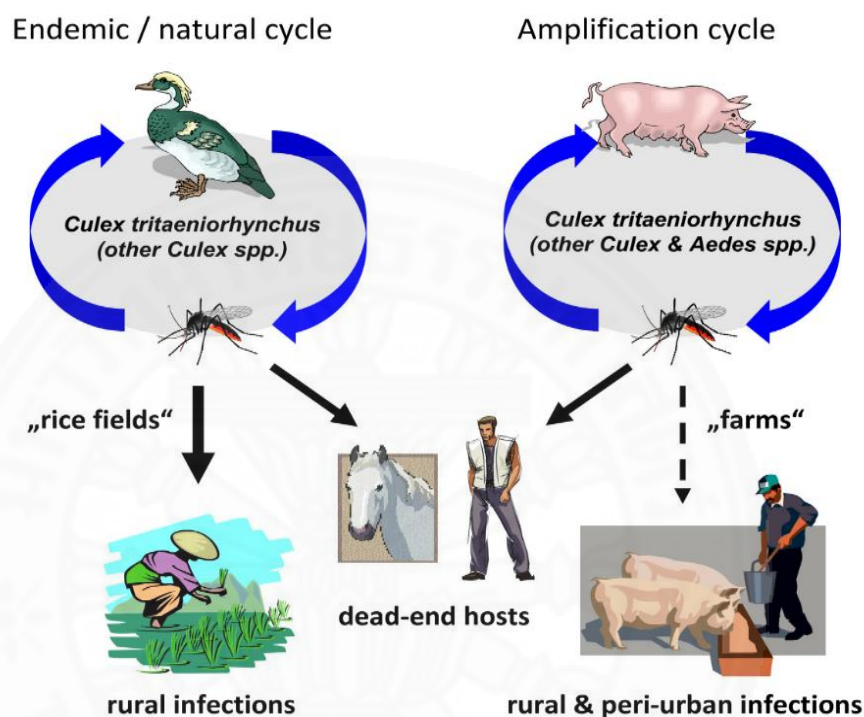
ภาพที่ 2.3 วงจรชีวิตของไวรัสในจีโนม *flavivirus* (Mukhopadhyay *et al.*, 2005)

## 2.1.2 การติดต่อของโรคไข้สมองอักเสบเจอี

### 2.1.2.1 การติดเชื้อ *Japanese encephalitis virus* (JEV)

*Japanese encephalitis virus* เป็นไวรัสที่มีแมลงกินเลือด (ยุงรำคาญ) เป็นพาหะนำโรคโดยจะติดต่อในวงจรจากสัตว์สู่คน และมีสัตว์มีกระดูกสันหลังสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อ โดยเฉพาะหมูถือว่าเป็นรังโรคที่สำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อ ซึ่งหมูที่ติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีจะไม่แสดงอาการป่วยของโรคไข้สมองอักเสบเจอี แต่มีเชื้อไข้สมองอักเสบเจอีในกระแสเลือด เมื่อยุงไปกัดหมูในระยะนี้เชื้อจะสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนในยุง เมื่อยุงมากัดคนจะสามารถแพร่เชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีเข้าสู่คน สัตว์อื่น ๆ ได้ โดยสัตว์อื่น ๆ ที่จะติดเชื้อไข้สมองอักเสบเจอี ได้แก่ ม้า วัว ควาย นก เป็นต้น แต่สัตว์เหล่านี้จะไม่มีอาการ จะแสดงอาการแต่ม้าและคนเท่านั้น (Van den Hurk *et al.*, 2009) เมื่อได้รับเชื้อแล้วประมาณ 1 ใน 300-500 ของผู้ติดเชื้อจะมีอาการสมองอักเสบ โดยหมามีความสำคัญอย่างมากในวงจรการแพร่กระจายของโรคไข้สมองอักเสบเจอี เพราะจะมีเชื้ออยู่ในกระแสเลือดได้นานกว่าสัตว์อื่น ๆ จึงจัดว่าเป็น amplifier ที่เป็นรังโรคที่สำคัญ โดยยุงที่เป็นพาหะเป็นชนิด *Culex tritaeniorhynchus* ยุงนี้เพาะพันธุ์ได้ในท้องนาที่มีน้ำขัง ซึ่งจำนวนยุงจะเพิ่มมากในฤดูฝน โดยยุงตัวเมียสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านรังไข่ไปสู่ลูกยุงได้ ยุงเหล่านี้จะออกมากัดกินเลือดในช่วงเย็น หรือช่วงค่ำซึ่งมักจะกัดสัตว์ใหญ่ หรือนกมากกว่าที่จะกัดคน (Tyagi *et al.*, 2016) นอกจากนี้กุน้ำ เช่น นกกระสา นกกระยาง เป็นต้น ยังเป็นรังโรคที่สำคัญเช่นกัน เนื่องจากจะมีเชื้อไวรัสไข้สมอง

อักษะเบเจอีในกระแสเล็ดดไต้งน่าน และมืการเพิ่มจำนวนเชือไต้สูง ซึ่งในทวีปเอเชียรวมถึงประเทศไทย นั้นมีประชากรส่วนใหญ่อประกอบออาชีพเกษตรกรรม และมีจำนวนของการเลียงหมุเป็นปริมาณมาก โดยการเลียงหมุั้นนิยมเลียงบริเวณที่อยู่อาศัย ดังนั้นในบริเวณที่มีการประกอบออาชีพเกษตรกรรม และเลียงหมุจึงมีจำนวนผู้ป่วยโรคใช้สมองอักษะเบเจอีไต้สูงกว่าบริเวณอื่น ๆ (Morita *et al.*, 2015)



ภาพที่ 2.4 แผนผังของแหล่งเพาะยุงและการติดเชือของสัตว์และมนุษย์ของโรคไวรัสใช้สมองอักษะเบเจอี (Pfeffer & Dobler, 2010)

### 2.1.3 ระบาดวิทยา

โรคใช้สมองอักษะเบเจอีเป็นโรคหนึ่งที่เกิดการอักษะเบรุนแรงที่มีผลต่อบุคคลที่อยู่ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แก่ ญี่ปุ่น โซเวียตตะวันออกเฉียง เกาหลี จีน ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย สิงคโปร์ มาเลเซีย ฮองกง เวียดนาม ลาว บังคลาเทศ เนปาล ประเทศไทย พม่า ศรีลังกา อินเดีย และหมู่เกาะแปซิฟิก เป็นต้น โดยมีรายงานในปี 2011 (พ.ศ. 2554) มีการแพร่ระบาดของโรคใช้สมองอักษะเบเจอีใน 24 ประเทศ และมีผู้ป่วยประมาณ 67,900 ราย (Wang & Liang, 2015)



### 2.1.3.1 ระบาดวิทยาในประเทศไทย

สำหรับในประเทศไทยนั้น พบการระบาดของโรคไข้สมองอักเสบเจอีครั้งแรกในปี พ.ศ. 2512 ที่จังหวัดเชียงใหม่ หลังจากนั้นจึงมีการพบผู้ป่วยเรื่อย ๆ มา โดยมีการระบาดใหญ่เป็นครั้งคราวในภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย ซึ่งอาจจะพบผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบเจอีได้เช่นกัน โดยส่วนมากมักพบว่าเป็นผู้ที่อาศัยอยู่บริเวณชานเมืองใกล้ทุ่งนาและมีการเลี้ยงหมู (Su *et al.*, 2016) ในอดีตการระบาดมีอัตราสูงถึง 2,000 คนต่อปี คิดเป็นอัตราตายร้อยละ 25 ในปัจจุบัน จึงพบผู้ป่วยที่เป็นโรคไข้สมองอักเสบเจอีน้อยลง เนื่องจากเริ่มมีการฉีดวัคซีนป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอีในเด็กทั่วประเทศ ตั้งแต่ พ.ศ. 2543 เป็นต้นมา

ในปีพ.ศ. 2552 (ค.ศ. 2009) พบผู้ป่วยเดือนละประมาณ 25 – 42 ราย ถือว่าเป็นจำนวนผู้ป่วยที่ต่ำสุดในเดือนกุมภาพันธ์และสูงสุดในเดือนพฤษภาคมของปี พ.ศ. 2552 ซึ่งในประเทศไทยนั้นมักจะพบในผู้ป่วยที่มีช่วงอายุ 5 – 10 ปี นอกจากนี้ยังสามารถพบผู้ป่วยได้ตลอดทั้งปี ตั้งแต่เดือนมกราคมตลอดจนถึงเดือนธันวาคม (เฉลิมเกียรติ สุวรรณเทน, 2554) และยังคงพบผู้ป่วยรวมทั้งสิ้น 408 ราย ในจำนวนนี้สามารถจำแนกเป็นผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบที่ไม่ได้ระบุสาเหตุ (Encephalitis unspecified) จำนวน 372 ราย และ ผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบเจอีจำนวน 36 ราย (คิดเป็นร้อยละ 8.82) คิดเป็นอัตราป่วย 0.06 ต่อ 100,000 ประชากร ไม่มีรายงานผู้ป่วยเสียชีวิตในรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบเจอี (Khemakanok *et al.*, 2010)

ในปี พ.ศ. 2555 (ค.ศ. 2012) อัตราผู้ป่วยประมาณ 1.06 ต่อแสนประชากร อัตราป่วยตาย คิดเป็นร้อยละ 2.35 โดยที่อัตราผู้ป่วยมีแนวโน้มสูงขึ้น การกระจายของโรคไข้สมองอักเสบเจอีสามารถพบผู้ป่วยได้ตลอดปี ซึ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีอัตราป่วยสูงสุด 1.49 ต่อประชากรแสนคน โดยอยู่ในกลุ่มอายุ 5 - 9 ปี มีอัตราป่วยสูงสุด 1.99 ต่อประชากรแสนคน อาชีพที่พบผู้ป่วยสูงสุดคือ นักเรียน ร้อยละ 28.53 เมื่อพิจารณาตามเชื้อสาเหตุ พบว่าส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบเจอีที่ไม่ได้ระบุสาเหตุ 620 ราย (91.17%) อัตราป่วย 0.97 ต่อประชากรแสนคน อัตราป่วยตาย ร้อยละ 2.40 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัตราป่วยสูงสุด 1.37 ต่อแสนประชากร ในกลุ่มอายุ 5 - 9 ปี มีอัตราป่วยสูงสุด 1.77 ต่อประชากรแสนคน และเป็นผู้ป่วยโรคไข้สมองอักเสบเจอี 60 ราย (8.83%) อัตราป่วย 0.09 ต่อประชากรแสนคน อัตราป่วยตาย ร้อยละ 1.66 ภาคเหนือมีอัตราป่วยสูงสุด (นิรันดร ยิ้มจ้อหอ, 2555)

#### 2.1.4 การเกิดโรคไขสมองอักเสบ

ไวรัสเจีฟกตัวและเจริญในเซลล์ประสาท จากนั้นจึงมีการเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอย่างรุนแรงในเพศชาย จากนั้นไวรัสเจีฟจะย้ายจากที่อยู่ในกระแสเลือดโดยวิธีการกระจาย และเพิ่มจำนวนทางหลอดเลือดส่วนปลายไปยังเซลล์ประสาท ทำให้เกิดภาวะเลือดมีเชื้อไวรัสชั่วคราว ซึ่งก่อนจะแพร่ไปยังระบบการขนส่งเลือดสู่สมองหรือผ่านเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular endothelium) หรือผ่านทางเส้นประสาทคู่ที่ 1 สำหรับรับความรู้สึกเกี่ยวกับการรับกลิ่น (olfactory nerve) โดยที่ไวรัสจะหลีกเลี่ยงการเผชิญกับระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ตามธรรมชาติของร่างกาย ซึ่งการเกิดโรคที่สมองและการเกิด neurotrophic effects ที่ทำให้เกิดอาการอักเสบของสมองหรือเกิดความอ่อนแออย่างรุนแรงของ central nervous system (CNS) (Wang *et al.*, 2016)

การบุกรุกและทำลายระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้โดยกระบวนการ cytolytic โดยมีเป้าหมายหลักคือ neural progenitor cells (NCPs) รวมถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยวิธีการบล็อกกระบวนการ cell cycle (Ariff *et al.*, 2013) นอกจากนี้ยังมีเป้าหมายอื่น ๆ คือ cerebellar Purkinje cells และทำให้เกิดอาการทางประสาท เช่น อาการเซหรือภาวะกล้ามเนื้อเสียสหการ (Ataxia) นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์ประสาทมีการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น ในส่วนของเซลล์สมองที่ไม่มีการติดเชื้อจะสามารถกระตุ้น macrophages ให้มีการผลิต IFN- $\beta$  และส่งเสริมให้ T cell มีการผลิต IFN- $\gamma$  ซึ่งเป็นสื่อกลางในการทำลาย noncytolytic viral ต่อมาไวรัสมีการหลั่งโปรตีน/แพคเตอร์ และสร้าง cytokine ที่ไม่สมดุลและทำลาย MHC I ที่แสดงบนผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ ไวรัสเจีฟจะบุกรุกเซลล์ทั่วไปของร่างกาย จากนั้นร่างกายจะมีการสร้างการตอบสนองต่อการต้านไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไขสมองอักเสบที่มีการเปลี่ยนแปลงในโฮสต์ ในกรณีที่เซลล์ประสาทมีการตายจำนวนมากและ microglial cells ถูกกระตุ้นทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงขึ้น ซึ่ง microglial cells จะอยู่ในเซลล์ภูมิคุ้มกันของ central nervous system (CNS) และมีหน้าที่ที่สำคัญในการป้องกันโฮสต์จากการบุกรุกของจุลินทรีย์ (Larena *et al.*, 2013) เมื่อถูกกระตุ้นจะเกิดการหลั่ง cytokines เช่น interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) ซึ่งจะสามารถส่งผลที่เป็นพิษต่อสมอง โดยเซลล์เหล่านี้จะหลั่งสารต่าง ๆ เช่น neurotoxins, excitatory neurotransmitters, prostaglandin, reactive oxygen และ nitrogen species ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคเพิ่มขึ้นได้ การเกิดโรคสมองอักเสบร่วมกับการตายของเซลล์ และการตอบสนองของโฮสต์โดยการอักเสบสามารถทำให้เกิดการลดลงของจำนวนเซลล์ NCPs และเซลล์ประสาทเสียหายมากมาย เนื่องมาจากการเกิด neuronal apoptosis ในผู้ป่วยต่อจากนั้นไวรัสจะหนีจากหลอดเลือดโดยการหลีกเลี่ยงการเผชิญกับระบบภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติของร่างกาย ในกรณีที่เกิดโรคทางสมองอย่างรุนแรงขึ้น ไวรัสจะสร้าง neurotropism ที่

เหมือนกับ cytomegalovirus ซึ่งเป็นเป้าหมายในการเข้าสู่ embryonic NPCs โดยการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากมาย และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตรวมถึงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ซึ่งมีผลโดยตรงเกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ รวมถึงมีความบกพร่องหรือผิดปกติเกี่ยวกับความรู้ความเข้าใจในระยะยาว นอกจากนี้เด็กอ่อนหรือทารกที่รอดชีวิตจากการป่วยจะมีพฤติกรรมของการอ่อนแรงเหมือนกับการติดเชื้อ HIV ที่มีการบุกรุก NPCs และนำไปสู่การหยุดการทำงานของเซลล์ (Upadhyay & Ahmad, 2011)

### 2.1.5 อาการทางคลินิก

การติดเชื้อไวรัสไข้มองอักเสบเฉียบพลันส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ (inapparent infection) หรืออาจเป็น aseptic meningitis ในรายที่รุนแรงจะมีการแสดงอาการในลักษณะของอาการสมองอักเสบ (encephalitis) โดยมีลักษณะอาการแบ่งเป็น 3 ระยะดังนี้

(1) Prodromal stage ระยะนี้ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงร่วมกับอาการอ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ โดยระยะนี้ผู้ป่วยจะมีอาการประมาณ 1-6 วัน (Li *et al.*, 2015)

(2) Acute encephalitic stage ระยะนี้ผู้ป่วยยังคงมีไข้ และเริ่มมีอาการระคายเคืองของเยื่อหุ้มสมอง โดยมีการเปลี่ยนแปลงของระดับความรู้สึกตัว อาจมีอาการชักเกร็ง เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจพบ pyramidal tract signs, flaccid paralysis และพบ deep tendon reflex ลดลงได้ร้อยละ 10 หรืออาจพบอาการเป็นอัมพาตครึ่งซีกและความผิดปกติของเส้นประสาทสมองได้ ดังนั้นระยะที่ 1 และ 2 ของโรคผู้ป่วยจะมีอาการในระยะนี้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ โดยผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมักเสียชีวิตในระยะนี้ (Singh *et al.*, 2016)

(3) Late stage and sequelae ระยะนี้ผู้ป่วยที่มีอาการไข้จะลดลง อาการทางสมองจะคงที่หรือดีขึ้น ส่วนผู้ป่วยที่เสียชีวิตในระยะนี้ มักเกิดมาจากโรคแทรกซ้อนที่ตามมา โดยลักษณะของโรคดังกล่าวไม่สามารถแยกจากการติดเชื้อไวรัสอื่น ๆ ในสมองได้ และต้องมีการวินิจฉัยแยกโรคจากเชื้อสาเหตุอื่น ๆ ที่มาด้วยอาการทางสมอง เช่น เชื้อแบคทีเรีย ริกเกตเซีย เชื้อรา และพยาธิ เนื่องจากเชื้อเหล่านี้มีวิธีการรักษาแบบจำเพาะ (Thisyakorn & Nimmannitya, 1985)



ภาพที่ 2.5 อาการทางคลินิกจากการติดเชื้อไวรัสไซ้สมองอักเสบเจอี

ก. Opisthotonus คือ อาการที่กล้ามเนื้อหลังหดตัวและแข็งเกร็ง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการหงายตัวออก กล้ามเนื้อขาเหยียดตึงไปด้านหลัง (คล้ายท่าท่าสะพานโค้ง) และกล้ามเนื้อแขนงอและบิดออกพร้อมกับกำหมัด

ข. Dystonia คือ อาการแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อ ส่งผลให้อวัยวะส่วนนั้น บิด เกร็ง และ ผิดรูป ตำแหน่ง

ค. Hemiparesis คือภาวะที่มีการอ่อนแรงของร่างกายซีกใดซีกหนึ่ง เป็นภาวะที่คล้ายคลึงกับอัมพาตครึ่งซีก

ง. Right gaze palsy คือ ปัญหาเรื่องการมองขวา

ที่มา : <http://www.antimicrobe.org/v43tabs.htm>

## 2.1.6 การวินิจฉัยโรค

### 2.1.6.1 องค์การอนามัยโลกได้กำหนดเกณฑ์การให้การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสไซ้สมองอักเสบเจอี

การตรวจนับเม็ดเลือดมักพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวและค่าร้อยละของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นในระดับปานกลางถึงสูงมาก ซึ่งการตรวจน้ำไขสันหลังส่วนใหญ่จะพบว่าน้ำไขสันหลังใส ไม่มีสี ความดันของน้ำไขสันหลังอยู่ในเกณฑ์ปกติและมีเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ตั้งแต่ 10-1000 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งส่วนใหญ่เป็นลิมโฟไซต์ โดยในระยะแรกของโรคไซ้สมองอักเสบเจอีอาจไม่พบเซลล์ในน้ำไขสันหลังหรืออาจจะตรวจพบนิวโทรฟิลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งโปรตีนมักสูงกว่าปกติเล็กน้อย ระดับน้ำตาล

มักปกติ (Organization, 2016) สำหรับการตรวจวินิจฉัยทางซีโรโลยี (serology) นั้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2522 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ทหาร (AFRIMS) ได้ค้นพบวิธีการตรวจ anti-JE IgM และ IgG ในน้ำไขสันหลังและในซีรัมด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ทำให้สามารถการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยได้จากการตรวจ anti-JE IgM ในน้ำไขสันหลังเมื่อแรกจับได้ถึงร้อยละ 80 และสามารถทราบผลการตรวจวินิจฉัยได้ภายใน 5 ชั่วโมง ซึ่งวิธีการตรวจวินิจฉัยทำได้ง่าย และสามารถทำได้ในโรงพยาบาลชุมชน โดยเกณฑ์การให้การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเจมีดังนี้ (Thisyakorn & Nimmannitya, 1985)

(1) JE virus-specific IgM antibody ให้ผลบวกในน้ำไขสันหลังหรือในซีรัมที่เก็บตรวจวินิจฉัยหลังจาก เริ่มมีไข้ 7 วันไปแล้ว

(2) JE virus antigens ให้ผลบวกจากการตรวจวินิจฉัยเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry

(3) JE virus genome ให้ผลบวกจากการตรวจวินิจฉัยซีรัม พลาสมา เลือด น้ำไขสันหลังหรือเนื้อเยื่อด้วยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) หรือโดยวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลอื่น ๆ

(4) สามารถแยกเชื้อไวรัสเจได้จากซีรัม พลาสมา เลือด น้ำไขสันหลัง หรือเนื้อเยื่อ

(5) มีการเพิ่มขึ้น 4 เท่าหรือมากกว่าของ JE virus-specific IgG antibody ในซีรัมที่ตรวจด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI) หรือตรวจด้วยวิธี plaque reduction neutralization assay (PRNT) โดยจะต้องเก็บซีรัมสองครั้งห่างกันอย่างน้อย 14 วัน (acute และ convalescent sera) การแปลผลจากการตรวจด้วยวิธี HI และ PRNT จะต้องแปลผลรวมกับการตรวจยืนยันด้วยวิธีอื่น ๆ เนื่องจากอาจมี cross reactivity จากไวรัสตัวอื่นที่อยู่ในกลุ่ม *Flavivirus* ซึ่งทำให้การแปลผลเกิดข้อผิดพลาดขึ้นได้ การวินิจฉัยด้วยวิธีนี้อาจมีประโยชน์น้อยในแง่ของความเร็วและความแม่นยำในการวินิจฉัย (Daniels *et al.*, 2002)



ภาพที่ 2.6 Japanese Encephalitis IgM ELISA kit

ที่มา : <http://www.rapidtest.com/index.php?i=Parasitology-ELISA-kits&id=619&cat=17>

## 2.1.7 การรักษา การป้องกัน และการควบคุมโรค

### 2.1.7.1 การรักษาโรคใช้สมองอักเสบเฉียบพลัน

การรักษาเป็นเพียงการรักษาตามอาการ ที่สำคัญคือ การลดอาการบวมของสมอง ดูแลระบบทางเดินหายใจ การให้ยาระงับชัก บางรายอาจจำเป็นต้องให้ mannitol เพื่อควบคุมความดันในกะโหลกศีรษะ การใช้ dexamethasone ในขนาดสูงเพื่อลดการบวมของสมองในผู้ป่วยใช้สมองอักเสบเฉียบพลัน พบว่าไม่สามารถลดอัตราการตายและอัตราการฟื้นจากโรคได้ ซึ่งมีรายงานจากการศึกษาแบบ controlled clinical trials ที่มีขนาดเล็กซึ่งเกี่ยวกับ Neutralizing murine monoclonal antibodies ที่ผลิตในประเทศจีน (Goncalvez *et al.*, 2016) นำมาใช้รักษาผู้ป่วยใช้สมองอักเสบเฉียบพลัน พบว่าการรักษาดังกล่าวให้ผลการรักษาที่ดีขึ้น จากการศึกษาผลการทดลองในลิงพบว่า interferon ใช้รักษาการติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันได้ผลดี และจากการศึกษาแบบ uncontrolled series เกี่ยวกับผลการรักษาผู้ป่วยใช้สมองอักเสบเฉียบพลันจำนวน 14 ราย ด้วย recombinant interferon-alpha พบว่ามีผู้ป่วย 13 ราย รอดชีวิต แต่จากการศึกษาแบบ randomized double-blind placebo-controlled trial ของเด็กที่ป่วยเป็นโรคใช้สมองอักเสบเฉียบพลันในประเทศเวียดนามพบว่า การรักษาด้วย interferon alpha ไม่เปลี่ยนแปลงผลของการรักษา สำหรับยาอื่น ๆ เช่น ribavirin และ salicylates นั้นมีข้อมูลเฉพาะในหลอดทดลองแต่ยังไม่มีการใช้จริงในทางคลินิก (Solomon, 2003)

### 2.1.7.2 การป้องกันโรคใช้สมองอักเสบเฉียบพลัน

ถึงแม้ว่าอัตราป่วยของผู้ป่วยใช้สมองอักเสบเฉียบพลันจะต่ำกว่าโรคติดต่อที่สำคัญอื่น ๆ ที่นำโดยยุง เช่น มาลาเรีย ไข้เลือดออก เป็นต้น แต่อัตราการตายและอัตราความพิการนั้นสูงมาก ซึ่งสามารถบอกถึงความสำคัญที่จะต้องให้ความสนใจในเรื่องของการควบคุมป้องกันโรคซึ่งทำได้โดย

- (1) ควบคุมพาหะนำโรค ได้แก่ ทำลายแหล่งเพาะพันธุ์ยุง ปรับปรุงวิธีการทำนาเพื่อไม่ให้น้ำขังเป็นแหล่งที่เหมาะสมแก่การเพาะพันธุ์ยุง เป็นต้น
- (2) ควบคุม amplifying host เช่น คอกหมู ควรอยู่ห่างจากบริเวณที่อยู่อาศัยของคน และถ้าเป็นไปได้ควรจะป้องกันไม่ให้หมูถูกยุงกัด หรือฉีดวัคซีนป้องกันโรคแก่หมู
- (3) ระวังไม่ให้ถูกยุงกัด ให้การสุขศึกษาแก่ประชาชนเพื่อให้รู้จักการป้องกันตนเอง โดยมากยุงที่เป็นพาหะนำโรคมักมีนิสัยชอบกินเลือดสัตว์เลี้ยงตั้งแต่พลบค่ำจนถึงกลางคืน
- (4) ฉีดวัคซีนป้องกันโรคใช้สมองอักเสบเฉียบพลันในคน เป็นวิธีป้องกันโรคใช้สมองอักเสบเฉียบพลันที่ได้ผลดีที่สุดในประเทศญี่ปุ่นและประเทศไทย สำหรับวัคซีนเชื้อตายที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันนั้น ได้แก่ วัคซีนชนิดเชื้อตายที่ผลิตมาจากการเพาะเลี้ยงไวรัสในสมองหนู วัคซีนเชื้อตายที่ผลิตมาจากการเพาะเลี้ยงไวรัสใน hamster kidney cells และ วัคซีนเชื้อเป็น การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคใช้สมองอักเสบเฉียบพลันรุ่นใหม่อาศัยเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัยหลายแบบขึ้นมาทดแทน เช่น

การเพาะเลี้ยงในเซลล์และตัดต่อยีนเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยเพิ่มมากขึ้น ตลอดจนมีขั้นตอนการผลิตที่สะดวกรวดเร็วเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Hoke *et al.*, 1988; Thisyakorn & Nimmannitya, 1985)

### 2.1.7.3 วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเจอี

วัคซีนไข้มองอักเสบเจอีเริ่มมีการพัฒนามาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2473 (ค.ศ. 1930) ในประเทศรัสเซียและญี่ปุ่น วัคซีนรุ่นแรก ได้แก่ วัคซีนชนิดเชื้อตายที่เพาะเลี้ยงไวรัสในสมองหนูและฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินในระหว่างสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งวัคซีนชนิดนี้ถูกผลิตขึ้นและพัฒนาต่อในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ฉีดให้กับทหารในกองทัพเรื่อย ๆ มา แต่วัคซีนดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไม่ดีเท่าที่ควร จึงได้หยุดใช้วัคซีนชนิดนี้ในปี พ.ศ. 2495 (ค.ศ. 1952) ต่อมาได้มีการเพิ่มกระบวนการทำให้วัคซีนมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นเพื่อป้องกันผลแทรกซ้อนจากการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อของสมองหนู และได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเรื่อยมาจนกระทั่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (Halstead & Jacobson, 2003) ซึ่งวัคซีนในรุ่นถัดมานั้นผลิตโดยเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อให้วัคซีนมีความปลอดภัยเพิ่มมากขึ้น และวัคซีนชนิดเชื้อเป็นก็นำมาทำให้อ่อนฤทธิ์ลงแต่ยังมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งเริ่มพัฒนาและมีการใช้ในประเศจีน ต่อมาจึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ ปัจจุบันจึงมีการผลิตวัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเจอีโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและอยู่ระหว่างการศึกษาวិจัย

#### (1) วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเจอีในประเทศไทยและวัคซีนที่กำลังพัฒนา

วัคซีนป้องกันโรคไข้มองอักเสบเจอีที่ใช้ในประเทศไทยในปัจจุบันมีด้วยกัน 2 แบบ คือ วัคซีนเชื้อตายและวัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลง (Tsai, 2000)

##### (1.1) วัคซีนชนิดเชื้อตาย (Inactivated vaccine)

(1.1.1) วัคซีนที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในสมองหนู (Inactivated mouse brain JEV) เป็นวัคซีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันและอยู่ในแผนสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคของประเทศไทย ซึ่งวัคซีนชนิดนี้ฆ่าเชื้อไวรัสด้วยฟอร์มาลินและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ มีทั้งชนิดน้ำและชนิดผงแห้ง ได้แก่

สายพันธุ์ Nakayama เป็นวัคซีนชนิดฉีดผลิตโดย Cosma medical ปริมาณ 0.5 มล./โดส สำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี และ 1 มล./โดส สำหรับเด็กอายุมากกว่า 3 ปี มีชื่อการค้าคือ DS Japanese Encephalitis vaccine

สายพันธุ์ Beijing เป็นวัคซีนที่ถูกผลิตขึ้นโดยองค์การเภสัชกรรม ปริมาณ 0.25 มล./โดส สำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี และ 0.5 มล./โดส สำหรับเด็กอายุมากกว่า 3 ปี มีชื่อการค้าคือ JE (Beijing)-GPO vaccine ซึ่งในปัจจุบันวัคซีนชนิดนี้ได้หยุดผลิต เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อสมองหนูในวัคซีน (Chokephaibulkit *et al.*, 2016)

## (1.1.2) วัคซีนที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

(Inactivated cell culture-derived JEV)

วัคซีนที่ได้จากสายพันธุ์ SA14-14-2 เตรียมจาก Primary hamster kidney cell โดยใช้ฟอร์มาลินฆ่าเชื้อ ผลิตในประเทศจีน

วัคซีนที่ได้จากสายพันธุ์ SA14-14-2 เตรียมจาก vero cell ผลิตโดยบริษัท Intercell ขึ้นทะเบียนในประเทศสหรัฐอเมริกาและอีกหลายประเทศในยุโรปมีชื่อทางการคือ IXIARO คาดว่าวัคซีนชนิดนี้จะถูกนำมาจำหน่ายในประเทศไทยในไม่ช้า (Monath, 2002)

## (1.2) วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลง (Live-attenuated vaccine)

(1.2.1) วัคซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง ขึ้นทะเบียนครั้งแรกในประเทศจีน ผลิตจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ SA14-14-2 เพาะเลี้ยงใน Primary hamster kidney cell (PHK) จำหน่ายในประเทศไทย โดยบริษัท Biogenetech ใช้ชื่อทางการค้าว่า CD.JE VAX (Halstead & Thomas, 2011)

(1.2.2) วัคซีนที่ได้จากการผลิตโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เป็นวัคซีนที่พัฒนาโดยบริษัท Acambis โดยทำการตัดยีนส่วน PrM และ E ของไวรัสโรคไข้สมองอักเสบเจอี สายพันธุ์ SA14-14-2 ใส่เข้าไปแทนที่ยีน PrM และ E ของไวรัสไข้เหลือง สายพันธุ์ 17D เพื่อให้ได้ไวรัสที่มี structural protein เหมือนกับไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี และมี non-structural protein เหมือนกับไวรัสไข้เหลือง วัคซีนชนิดนี้เป็นวัคซีนต้นแบบให้กับวัคซีนในกลุ่ม *flavivirus* อื่น ๆ เช่น วัคซีนไข้เลือดออก Tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) หรือ Chimeric yellow fever-dengue virus (CYD) และ Tetravalent dengue vaccine (TDV) ครอบคลุม 4 เชื้อของไข้เลือดออก ซึ่งเป็น recombinant, live-attenuated ของบริษัท Sanofi Pasteur (Appiahgari & Vratil, 2010)

## (2) ประสิทธิภาพของวัคซีน

วัคซีนเชื้อตายที่เพาะเลี้ยงเชื้อในสมองหนู ฤทธิ์ที่ฉีด 2 โดส จะมีภูมิคุ้มกันร้อยละ 94 และมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคร้อยละ 80-91 หลังจากฉีดเข็มกระตุ้นจะมีภูมิคุ้มกันร้อยละ 90 - 100 จากการศึกษาในประเทศไทย พบว่าวัคซีนทั้ง Nakayama และ Beijing ให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคไม่แตกต่างกัน (Lee *et al.*, 2016)



วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลง จากการศึกษาในเด็กไทยจำนวน 150 คน พบว่ามีอัตรา seroconversion ร้อยละ 89.3 และ 95.0 ที่เวลา 30 และ 90 วัน หลังจากที่มีการฉีดโดสแรก และร้อยละ 100 หลังจากที่ได้รับโดสที่สอง เมื่อติดตามปีที่ 2 พบว่า อาสาสมัครยังคงมีระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีร้อยละ 99 จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพร้อยละ 99.3 และ 96.5 ที่เวลา 12-15 เดือน และ 5 ปี ภายหลังจากการฉีดวัคซีน 1 โดส และมีประสิทธิภาพร้อยละ 95-100 ภายหลังจากการฉีดวัคซีน 2 โดส (Chokephaibulkit *et al.*, 2016)

วัคซีน IXIARO เป็นวัคซีนที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยแนะนำให้ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในวันที่ 0 และ 28 ฉีดกระตุ้นอีกครั้ง 1 ปี จากการศึกษาใน phase III พบว่าในอาสาสมัครผู้ใหญ่จะมีภูมิคุ้มกันในระดับที่สามารถป้องกันโรคได้ร้อยละ 83, 53, และ 48 ภายหลังจากการฉีดวัคซีนโดสที่สองเป็นเวลา 6 เดือน 1 ปี และ 2 ปี ตามลำดับ และเมื่อฉีดวัคซีนเข็มกระตุ้น พบว่ามีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นในระดับที่สามารถป้องกันโรคได้ร้อยละ 100 ซึ่งในกรณีที่ได้รับวัคซีนชนิดนี้เพียงเข็มเดียว จะมีภูมิคุ้มกันเพียงพอที่จะสามารถป้องกันโรคได้ร้อยละ 9 ภายหลังจากได้รับวัคซีนไปแล้วนาน 6 เดือน แต่เมื่อได้รับวัคซีนเข็มกระตุ้นห่างจากเข็มแรก 11 เดือน ระดับภูมิคุ้มกันจะสูงขึ้นเป็นร้อยละ 99 ดังนั้นในรายที่ได้รับวัคซีนชุดแรกไม่ครบตามกำหนดของการฉีดวัคซีน แนะนำให้ฉีดเข็มกระตุ้นอย่างน้อยไม่เกิน 11 เดือน นับจากเข็มแรก จากการศึกษาพบว่ามีความปลอดภัยต่อผู้ใหญ่ ส่วนข้อมูลในเด็กยังอยู่ระหว่างการศึกษ (Cramer *et al.*, 2016)

วัคซีนชนิด ChimerivaxJE (IMOJEV<sup>®</sup>) มีข้อมูลการศึกษาทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ พบว่าวัคซีนนั้นมีความปลอดภัยและก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ดีในทุกกลุ่มอายุ โดยพบว่าอาสาสมัครผู้ใหญ่ได้รับวัคซีนเพียง 1 เข็ม สามารถมีภูมิคุ้มกันในระดับที่สามารถป้องกันโรคได้ร้อยละ 99.1 และภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่ด้อยไปกว่าที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดเชื้อตายที่ผลิตด้วยสมองหนูจำนวน 3 เข็ม (ร้อยละ 95.1) (Chokephaibulkit *et al.*, 2016) วัคซีนชนิดนี้จึงสามารถกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันได้อย่างรวดเร็ว พบว่าร้อยละ 93.6 ของอาสาสมัครจะมีภูมิคุ้มกันในระดับที่สามารถป้องกันโรคได้ภายใน 14 วันหลังจากฉีดวัคซีน ดังนั้นการฉีดวัคซีนชนิดนี้เพียง 1 ครั้ง อาจเพียงพอต่อการป้องกันโรคสำหรับผู้ที่ย้ายอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี แต่ยังคงพบว่ามีอาสาสมัครเด็กบางรายไม่มีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นหลังการฉีดวัคซีน 1 เข็ม ดังนั้นยังคงต้องติดตามผลการศึกษาต่อไปว่าการฉีดวัคซีนนี้เพียง 1 เข็ม เพียงพอหรือไม่ต่อการป้องกันโรคไข้สมองอักเสบเจอีในพื้นที่ที่มีการระบาดและพื้นที่ที่ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรคไข้สมองอักเสบเจอี

### (3) ปฏิกริยาหลังจากได้รับวัคซีน

วัคซีนเชื้อตายที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในสมองหนูนั้น มีรายงานว่าปฏิกริยาเฉพาะที่ได้แก่ ปวด บวม แดงบริเวณที่ฉีดวัคซีน เป็นต้น พบร้อยละ 23 ส่วนปฏิกริยาทั่วไป เช่น ไข้ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว คลื่นไส้ อาเจียน พบร้อยละ 13 ซึ่งในผู้ป่วยบางรายอาจมีผื่นลมพิษหรือ angioedema ในเวลาเป็นนาทีถึง 2 สัปดาห์ หลังจากฉีดวัคซีน พบประมาณร้อยละ 0.2-0.6 ซึ่งมักเกิดหลังฉีดวัคซีนเข็มที่สอง การเกิดผื่นลมพิษไม่ถือเป็นข้อห้ามในการฉีดวัคซีนได้สัปดาห์ต่อไปหากไม่ใช่ปฏิกริยาชนิดเฉียบพลัน แต่ให้เฝ้าสังเกตอาการหลังการฉีดวัคซีนอย่างใกล้ชิด และมีอัตราการเกิดสมองอักเสบเฉียบพลัน 1:50-75,000 ถึง 1 : 1 ล้าน เพราะฉะนั้นวัคซีนชนิดนี้มีความปลอดภัยค่อนข้างสูงในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง

วัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ลง วัคซีนชนิดนี้มีความปลอดภัยสูงแต่อาจจะทำให้เกิดไข้ได้ ร้อยละ 9.3 และผื่นขึ้น ร้อยละ 6.7 ยังไม่มีรายงานการเกิดภาวะ hypersensitivity หรือผลข้างเคียงทางระบบประสาท (วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, 2548)

## 2.2 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่สร้างมาจาก B lymphocytes โดยจะถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีที่สร้างขึ้นนั้นจะถูกหลั่งออกมาในกระแสเลือดหรือน้ำคัดหลั่งต่าง ๆ ดังนั้นแอนติบอดีจึงสามารถพบได้ในกระแสเลือด น้ำตา น้ำลาย น้ำคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจ และทางเดินอาหารรวมทั้งน้ำนมด้วย โดยทั่วไปในสภาพปกติร่างกายนั้นจะไม่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ของร่างกายได้ โดยแอนติบอดีมีลักษณะพิเศษด้วยกัน 2 ประการด้วยกัน คือ

1. Recognition function คือ ความสามารถในการจดจำแล้วสามารถรวมกับแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีได้

2. Effector function คือ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี จึงสามารถทำให้เกิดผลต่าง ๆ ตามมา เช่น ทำให้เกิดการรวมกับโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งได้ เรียกว่า complement fixation และทำให้เซลล์แตกสลายได้ (lysis) หรือปฏิกริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่เกิดขึ้นทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเกาะกับ mast cell ทำให้เกิดการหลั่งของ histamine ออกมา เป็นต้น (Janeway *et al.*, 1997)

### 2.2.1 การศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดี

Tiselius และ Kabat พบว่า แอนติบอดีที่เป็นโปรตีนในน้ำเหลืองชนิดหนึ่งที่สามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ (electrophoretic mobility) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า gamma ( $\gamma$ ) globulin โดยที่ Tiselius และ Kabat ได้ทำการทดลองฉีด Pneumococcal polysaccharide เข้าไปในกระต่าย จนกระต่ายสามารถสร้างแอนติบอดีในกระแสเลือดจำนวนมาก คือ อยู่ในลักษณะที่เป็น hyperimmunized rabbit จากนั้นจึงเจาะเลือดกระต่ายนำมาแยกเอาน้ำเหลืองไปแยกโดยวิธี eletrophoresis พบว่า protein fraction ต่าง ๆ คือ serum albumin,  $\alpha_1$ -globulin,  $\alpha_2$ -globulin,  $\beta$ -globulin และ  $\gamma$ -globulin (ภาพที่ 2.6) ต่อมา Tiselius และ Kabat ได้นำเอา hyperimmune serum นี้ไปผสมกับแอนติเจนของมันจึงเกิดปฏิกิริยาดกตะกอนของ antigen-antibody complex ซึ่งเมื่อนำไปปั่นเอาตะกอนออก และเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) มาแยกโดยใช้วิธี eletrophoresis ซ้ำใหม่อีกครั้ง พบว่า ส่วนที่มีปริมาณลดลง คือ fraction ของ  $\gamma$ -globulin โดย  $\gamma$ -globulin ที่หายไป คือ ส่วนที่เป็นแอนติบอดีซึ่งไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแล้วตกตะกอน ต่อมาเมื่อพบว่ามีแอนติบอดีซึ่งเป็น  $\gamma$ -globulin นี้ไม่ได้ประกอบด้วยโปรตีนชนิดเดียวแต่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด (heterogeneous) ที่มีลักษณะบางอย่างคล้ายคลึงกัน จึงเรียกชื่อใหม่ว่า Immunoglobulin (Ig) (Tiselius, 1937) โดย Immunoglobulin ที่สร้างขึ้นมานั้นเป็นสารพวก glycoprotein ที่ประกอบด้วย polypeptide 2 แบบ คือ heavy chain และ light chain และมีคาร์โบไฮเดรตเกาะอยู่บน polypeptide โดยปริมาณของคาร์โบไฮเดรตไม่มีส่วนที่เกี่ยวข้องกับการจับของแอนติเจนเพราะคาร์โบไฮเดรตไม่ได้อยู่ตรงส่วนที่แอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่เรียกว่า antigenic binding site (ภาพที่ 2.7)

### 2.2.2 ชนิดและโครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลิน

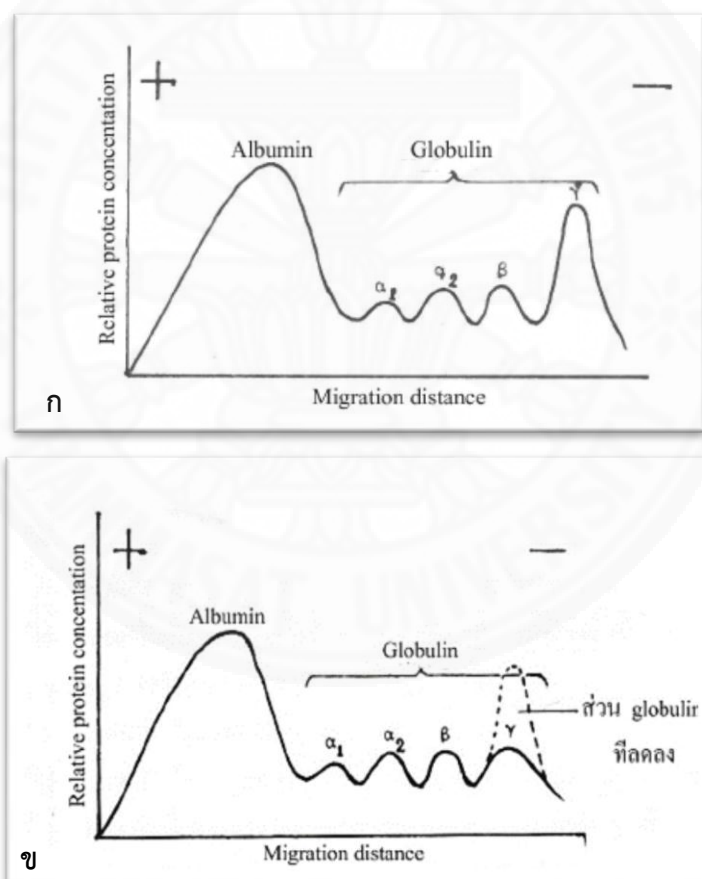
อิมมูโนโกลบูลิน แบ่งออกเป็น 5 คลาส ตามชนิดของ heavy chain ดังนี้

- (1) IgG มี heavy chain เป็นชนิด  $\gamma$ -chain (gamma)
- (2) IgM มี heavy chain เป็นชนิด  $\mu$ -chain (mu)
- (3) IgA มี heavy chain เป็นชนิด  $\alpha$ -chain (alpha)
- (4) IgD มี heavy chain เป็นชนิด  $\delta$ -chain (delta)
- (5) IgE มี heavy chain เป็นชนิด  $\epsilon$ -chain (epsilon)

### 2.2.2.1 Immunoglobulin G (IgG)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีมากที่สุดในซีรัม ประมาณ 80 – 85 % โดย IgG มีน้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดาลตัน ซึ่งมีความสำคัญมากที่สุดในการคุ้มกันร่างกาย สามารถผ่านรกจากแม่ไปสู่ลูกได้ และมีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเทียบกับอิมมูโนโกลบูลินตัวอื่น ๆ ซึ่งประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 4 สาย ส่วนของพอลิเพปไทด์สายหนักนั้นเป็นชนิดแกมมา ( $\gamma$ ) จึงเรียกว่า IgG (Spiegelberg, 1974)

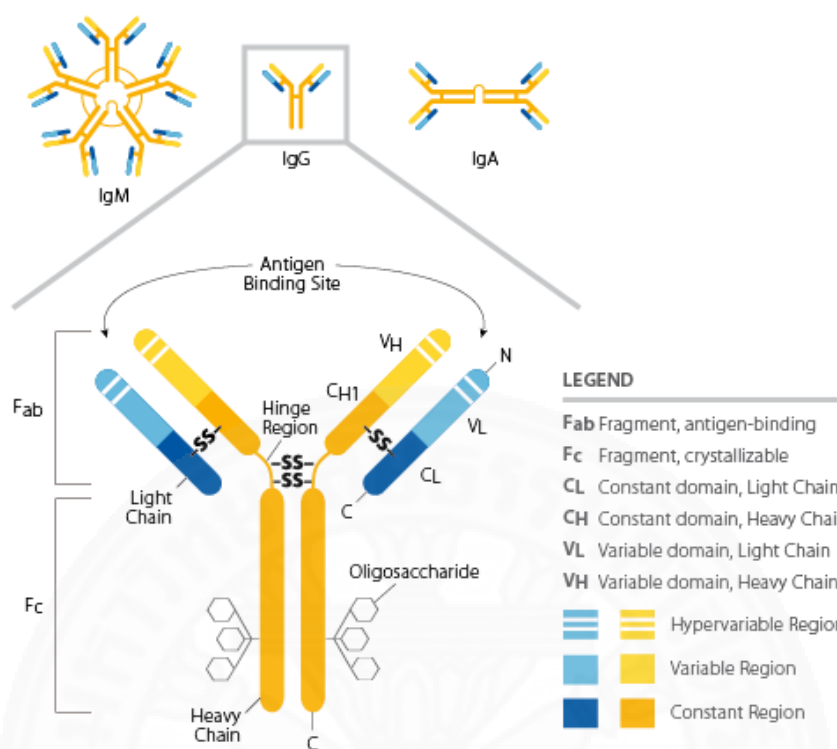
IgG ของคนสามารถแบ่งเป็น 4 คลาสย่อย คือ IgG1, IgG2, IgG3 และ IgG4 โดย IgG1 มีปริมาณมากที่สุด คือ 65 % โดยที่ IgG ทุกชนิดยกเว้น IgG4 สามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ดี IgG1, IgG2 และ IgG4 สามารถจับกับสแตฟิโลคอคคัสโพรตีนเอ (Staphylococcal A) ทำให้สามารถแยกออกจาก IgG3 และ IgM ได้ เพราะ IgG3 และ IgM ไม่สามารถจับได้กับโปรตีนเอ



ภาพที่ 2.7 น้ำเหลืองของกระต่ายที่นำไปแยกโดยวิธี eletrophoresis พบ protein fraction ต่าง ๆ (Roitt *et al.*, 2001)

ก. Protein fractions ต่าง ๆ ของ immuned serum

ข. Protein fractions ต่าง ๆ ภายหลังจากที่นำ immuned serum มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจน



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของแอนติบอดี

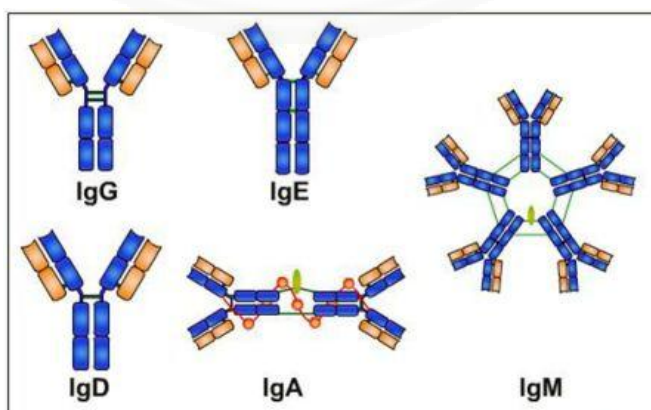
ที่มา: <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/Immunoglobulin/structure.htm>

**2.2.2.2 Immunoglobulin A (IgA)** เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีมากในซีรัม รองจาก IgG คือ มีอยู่ประมาณ 13 % ส่วนของพอลิเพปไทด์สายหนักเป็นชนิดแอลฟา ( $\alpha$ ) ซึ่งส่วนใหญ่สามารถพบในสารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น น้ำตา น้ำลาย น้ำนมเหลือง น้ำปัสสาวะ น้ำจากช่องคลอด ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจเรียกว่า ซีครีทอรีแอนติบอดี (Secretory antibody) ช่วยปกป้องเยื่อเมือกจากการบุกรุกของแบคทีเรียและไวรัส รวมทั้งป้องกันการติดเชื้อที่ช่องว่างในร่างกาย จึงอาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า มิวโคแอนติบอดี (Mucoantibody) หรือ โคโปรแอนติบอดี (Coproantibody) IgA พบได้ทั้งในรูปแบบของมอนอเมอร์, ไดเมอร์พอลิเมอร์ ในซีรัม แต่เมื่ออยู่ในสารคัดหลั่ง จะเป็นรูปแบบไดเมอร์ ซึ่งประกอบด้วย 2H2 L2 สาย J (J chain) และซีครีทอรีคอมโพเนนท์ (Secretory component, SC หรือ ซีครีทอรี พีซ secretory piece = SP) SC เป็นพอลิเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยเซลล์เยื่อผิวที่ช่วยให้ IgA ผ่านผิวชั้นมิวโคซาลออกสู่ภายนอก และช่วยปกป้อง IgA จากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีนเอส (protease) ในทางเดินอาหาร SC จะรวมเข้ากับ IgA ไดเมอร์ และสาย J ในระหว่างที่ IgA ผ่านเซลล์เยื่อผิวออกไปในสารคัดหลั่ง (Woof & Kerr, 2006)

**2.2.2.3 Immunoglobulin M (IgM)** เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 900,000 ดาลตัน ส่วนของพอลิเพปไทด์สายหนักเป็นชนิด มิว ( $\mu$ ,  $\mu$ ) IgM ประกอบไปด้วยหน่วยพื้นฐาน 5 หน่วย มาเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์เป็นรูปดาว ซึ่งเชื่อมกันด้วยสาย J และ SC IgM เป็นอิมมูโนโกลบูลินตัวแรกที่สร้างขึ้นเมื่อร่างกายถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อตรึงคอมพลีเมนต์แล้วจะสามารถถูกทำลายได้ง่ายขึ้น IgM เกิดปฏิกิริยาแอกกลูตินินชัน (Agglutination) และออปโซไนเซชัน (opsonization) ได้ดี จึงสามารถป้องกันการบุกรุกของแบคทีเรียและไวรัส โดยที่ IgM ไม่สามารถผ่านรกได้ แต่ถ้าทารกมีการติดเชื้อจะสร้าง IgM ขึ้นเอง ถือว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิดแรกที่ทารกสร้างขึ้นเอง (Brussow *et al.*, 1992)

**2.2.2.4 Immunoglobulin D (IgD)** Immunoglobulin D (IgD) เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบน้อยมากในเลือด มีอยู่ประมาณ 0.2 % โดยพอลิเพปไทด์สายหนักเป็นชนิดเดลตา ( $\delta$ ) ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับรู้เบื้องต้น (Primary receptor) กับแอนติเจนบนผิวบีลิมโฟไซต์ของทารก และอาจควบคุมการสังเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินอื่น ๆ (Vladutiu, 2000)

**2.2.2.5 Immunoglobulin E (IgE)** เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบน้อยที่สุดในเลือด พบประมาณ 0.002 % มีพอลิเพปไทด์สายหนักเป็นชนิดเอพซิลอน ( $\epsilon$ ) IgE ซึ่งมีคุณสมบัติชอบเกาะกับเบโซฟิล (Basophil) และมาสต์เซลล์ (Mastocyte) ในเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนปลายของ Fc ไปจับ และเมื่อมีแอนติเจนที่กระตุ้นให้สร้าง IgE เข้ามาจับกับ IgE จะทำให้เกิดปฏิกิริยาของแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ช่วยกระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิไวเกินแบบที่ 1 (Immediate hypersensitivity) โดยการกระตุ้นให้เบโซฟิล (basophil) ปล่อยสารที่ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ออกมา เช่น ฮิสตามีน (histamine) ซีโรโทนิน (serotonin) จึงสามารถเรียก IgE ว่า โฮโมไซโตโทรปิกแอนติบอดี (Homocytotropic antibody) นอกจากนี้ในกรณีที่เกิดการติดเชื้อปรสิต จะพบว่าในร่างกายจะมีปริมาณ IgE เพิ่มขึ้น แสดงว่าเกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านกับโรคติดเชื้อปรสิต (Amarasekera, 2011)



ภาพที่ 2.9 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG, IgM, IgA, IgD และ IgE

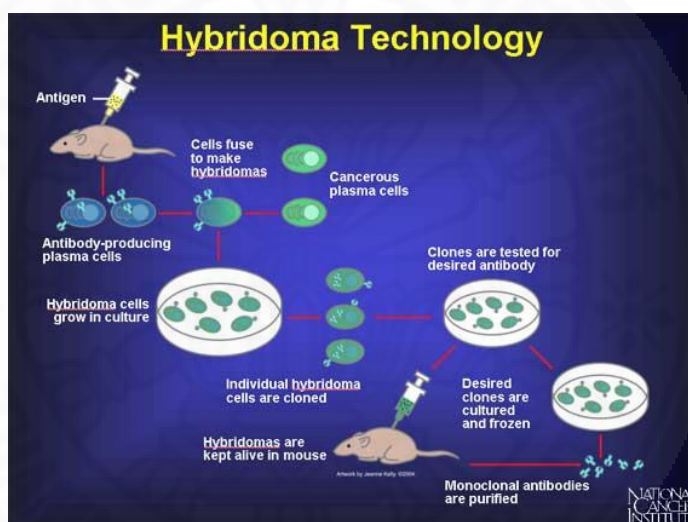
## 2.3 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ไม่ใช่สารที่เกิดจากธรรมชาติ แต่เกิดจากการที่มนุษย์คิดค้นวิธีการสร้างขึ้นมาด้วยเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาในปี พ.ศ. 2518 โดยวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถทำได้โดยการฉีดแอนติเจนเข้าไปในหนูเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนชนิดนั้น ๆ จากนั้นจึงใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (hybridoma technology) ระหว่าง B lymphocyte และ myeloma cell หรือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เพื่อผลิตให้ได้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดที่แตกต่างกัน (Pandey, 2010)

### 2.3.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูด้วยแอนติเจน จากนั้นทำการสกัด B lymphocyte ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างแอนติบอดีออกมา โดยที่ B lymphocyte นี้ไม่สามารถนำมาเลี้ยงต่อได้ จึงต้องมีการนำ B lymphocyte ไปเชื่อมรวมกับ tumor cell ของ B lymphocyte ที่สามารถโตบนจานเลี้ยงเซลล์ได้แบบไม่จำกัด (immortal) เพื่อสร้างเป็น hybridomas ที่มีความสามารถในการหลั่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการได้ หลังจากนั้นจะต้องทำการคัดแยกเอาเฉพาะ hybridomas โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ nucleotides (aminopterin) แบบปกติ ดังนั้นเซลล์ที่จะสามารถเจริญต่อไปได้ต้องมีกระบวนการสังเคราะห์ลัด (bypass pathway) ซึ่งกระบวนการนี้มีเฉพาะใน B lymphocyte ที่ปกติเท่านั้น ทำให้ B lymphocyte ที่เป็น tumor ไม่สามารถโตได้ หลังจากทำการคัดเลือก hybridomas ได้แล้ว จะต้องนำไปคัดแยกหาโคลนเดี่ยวที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้น ๆ ที่เราต้องการได้ (Nelson *et al.*, 2000) (ภาพที่ 2.10) ซึ่งขั้นตอนทั้งหมดนั้นใช้เวลานานหลายเดือน ค่าใช้จ่ายสูง และต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง โดยเซลล์ผสมที่ถูกสร้างขึ้นให้มีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถเก็บรักษาไว้สำหรับให้เป็นแหล่งที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ตลอดไป การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดหนึ่ง ๆ แต่ละครั้งนั้นต้องใช้เวลานาน (4-5 เดือนขึ้นไป) และการลงทุนเป็นจำนวนสูง รวมทั้งยังต้องเกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองคือ หนู อีกด้วย (Albitar, 2007) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่ากระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นค่อนข้างยุ่งยาก บางครั้งนักวิจัยไม่มีเวลาหรือมีบุคลากรไม่เพียงพอ จึงต้องสั่งทำจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง และยังมีอุปสรรคที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการใช้เทคโนโลยี hybridoma ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ hybridoma cell ซึ่งถ้า hybridoma cell ไม่เสถียรจะทำให้สามารถสูญเสียความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีก ทั้งในขั้นตอนของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้เป็นจำนวนมาก (large scale) เพื่อการนำไปใช้ต่อนั้นก็มีความยุ่งยาก และต้องใช้เครื่องมือราคาแพงเช่นกัน วิธีการที่นิยมใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้เป็นจำนวนมากนั้นมี 2 วิธี คือ การนำ hybridomas cell ไปเลี้ยงในลักษณะที่เป็นมะเร็งในช่องท้องของหนู (ascites

tumor) จากนั้นสกัดเอา ascites fluid ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกมา ซึ่งวิธีนี้เป็นที่นิยมเพราะสามารถผลิตได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ในปริมาณที่สูงกว่าการเลี้ยงในห้องทดลองถึง 1,000 – 10,000 เท่า แต่เป็นวิธีการที่สร้างความเจ็บปวดและทรมานให้กับหนูทดลอง นอกจากนี้แล้วโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้ยังมีการปนเปื้อนด้วยอิมมูโนโกลบูลินของหนู ไวรัส หรือสาร cytokine อื่น ๆ จากหนูซึ่งอาจจะไม่เป็นผลดีต่อการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป อีกวิธีหนึ่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นจำนวนมาก คือ การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ standard static หรือ agitated suspension cell cultures, membrane-based หรือ matrix-based culture systems, และ high cell-density bioreactors (Fong & Weng, 1997) แต่ข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้ คือ เป็นเทคโนโลยีที่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงมาก รวมทั้งอาหารและสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ก็มีราคาสูงมากเช่นกัน



ภาพที่ 2.10 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Pandey, 2010)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้วิธีการดั้งเดิมนั้นมีความยุ่งยากมากและค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงแล้ว ยังมีข้อจำกัดที่เกิดจากเทคโนโลยีนี้หลาย ๆ อย่าง เช่น ข้อจำกัดในชนิดของแอนติเจนที่จะใช้ เพราะต้องเป็นแอนติเจนที่ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง นอกจากนั้นแล้วยังต้องไม่เป็นแอนติเจนที่คล้ายกับแอนติเจนของหนู เช่น แอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในชั้นต้นของลำดับการวิวัฒนาการ (conserved antigens) หรือใช้ได้เฉพาะกับแอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนู (immunogenicity) ได้เท่านั้น นอกจากนั้นแล้วผลที่ได้จากการกระตุ้นหนูทดลองยังมีความแปรปรวนสูง โดยขึ้นกับสุขภาพของหนูแต่ละตัว และมีข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือ จำนวนชนิดของแอนติเจนที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งโดยปกติแล้วการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนแต่ละชนิดมักต้องใช้หนูทดลองตั้งแต่ 3-5 ตัวขึ้นไป ในปัจจุบัน



หลังจากการค้นพบลำดับจีโนม (post-genomic era) ของมนุษย์ และสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ความสำคัญในการศึกษาวิจัยจึงมุ่งเน้นไปสู่การศึกษาการทำงานของจีโนมหรือโปรตีน (functional genomics หรือ proteomics) ซึ่งการวิจัยเหล่านี้จำเป็นต้องมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนจำนวนมาก (high throughput) การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของโปรตีนเหล่านี้โดยวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบันจึงเป็นไปได้ หรือการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้องการค่าใช้จ่ายที่สูงมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้เทคโนโลยีอื่น ๆ ที่ช่วยในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อการวิเคราะห์ในระดับ high throughput เหล่านี้ (Costa *et al.*, 2013)

### 2.3.2 ข้อดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

**2.3.2.1 ใช้แอนติเจนปริมาณน้อยและแอนติเจนนั้นไม่ต้องมีความบริสุทธิ์มากในการฉีดกระตุ้น** โดยในการ immunize หนู mice หรือ หนู rats อาจใช้แอนติเจนประมาณ 100 ไมโครกรัมหรือน้อยกว่าก็ได้ โดยที่แอนติเจนนั้นมีความบริสุทธิ์พอประมาณก็ได้ เนื่องจากสามารถเลือกเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้ในระหว่างการทำ cell cloning

**2.3.2.2 มีความเป็นมาตรฐานเดียวกันสูง (Standardization)** ซึ่งสามารถที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีลักษณะเหมือนกัน (homogeneous) เป็นมาตรฐานซึ่งสามารถแจกจ่ายไปในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ โดยแต่เดิมมีการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีซึ่งมักจะมีปัญหา เนื่องจากคุณสมบัติในแต่ละครั้งที่ผลิตไม่ค่อยคงที่ และเนื่องจากสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ในปริมาณที่ต้องการไม่จำกัด ดังนั้นความเป็นมาตรฐานของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงมีสูงมากกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี

**2.3.2.3 มีความจำเพาะสูง (High Specificity)** โมโนโคลนอลแอนติบอดีจะเข้าทำปฏิกิริยากับ antigenic determinant เพียงตำแหน่งเดียวบนโมเลกุลของแอนติเจน ดังนั้นจึงมีความจำเพาะสูงมาก สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ หรือศึกษาลักษณะของโมเลกุลของแอนติเจนได้

**2.3.2.4 มี affinity สูง** ในวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูงต่อแอนติเจนได้ โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี affinity สูงนี้จะสามารถนำไปใช้ได้ในความเจือจางสูง (high dilutions) ทำให้ลดปฏิกิริยาารบกวน (background) ในการทดลองลงได้ และสามารถนำไปใช้ในการทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์ได้อีกด้วย

**2.3.2.5 การเก็บเซลล์ (Storage of Cells)** สามารถเก็บเซลล์ที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้เป็นเวลานานเป็นปี ๆ ในไนโตรเจนเหลว และนำกลับมาเลี้ยงเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อีกเมื่อต้องการ (Albert, 1985)

### 2.3.3 ข้อดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

**2.3.3.1 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีกรรมวิธีที่ค่อนข้างง่าย** ซึ่งแตกต่างจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องใช้กำลัง แรงงาน เวลา และค่าใช้จ่ายสูงกว่าการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีมาก

**2.3.3.2 ความจำเพาะ (Specificity)** โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เตรียมได้ในบางกรณีมีความจำเพาะสูงเกินไปที่จะไปใช้สำหรับการวินิจฉัยโรค

**2.3.3.3 มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของแอนติเจน** เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงมากจึงมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนติเจน ซึ่งสามารถเกิดขึ้นระหว่างแอนติเจนเกาะกับพื้นผิว (solid phase) หรือสถานะที่ใช้ในการทำการทดลอง

**2.3.3.4 คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงได้ง่ายระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์** เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีในบางกรณีมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH, ionic strength และปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งโพลีโคลนอลแอนติบอดีมักมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้น้อยกว่าเนื่องจากแอนติบอดีบางกลุ่มยังคงทำงานได้

**2.3.3.5 ไม่สามารถทำปฏิกิริยาบางอย่างได้** เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวนมากไม่สามารถทำปฏิกิริยาตกตะกอนได้ซึ่งต่างจากโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Nelson *et al.*, 2000)

### 2.3.4 การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี

การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันนี้ ได้แก่ การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูไปปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเป็นเหมือนของมนุษย์ (humanization) เพื่อให้สามารถใช้ในการบำบัดโรคต่าง ๆ (human therapy) ได้

**2.3.4.1 ด้านจุลชีววิทยา** ได้มีการผลิตแอนติบอดีต่อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หลายชนิดทั้งไวรัส แบคทีเรียคลอแอมัยเดีย หรือพาราสิต และนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบหาชนิดหรือคุณสมบัติต่าง ๆ ทางแอนติเจนของจุลินทรีย์ ซึ่งแต่เดิมทำได้ยากหรือไม่สามารถทำได้เลยถ้ามีการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทำให้สามารถตรวจพบสายพันธุ์ใหม่ของจุลินทรีย์ซึ่งมีความแตกต่างของ antigenic determinant จากสายพันธุ์เดิมได้ง่ายยิ่งขึ้น เช่น การตรวจหาไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ใหม่ หรือตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ทำให้เกิดโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) สามารถแยกได้จาก Tubercle bacilli อื่น ๆ ซึ่งเดิมใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีไม่ได้ผล ต่อจากนั้นมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Chlamydia ซึ่งทำให้เกิดโรคหนองในเทียมและนำมาใช้ตรวจหาเชื้อโดยวิธี immunofluorescence อย่างได้ผลดีสำหรับเชื้อพาราสิตมีการ

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรีย, Schistosome, Toxoplasma, Trypanosome เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาและศึกษาถึงแอนติเจนในระยะต่าง ๆ ของพาราสิตและใช้ศึกษาการก่อให้เกิดโรคเพื่อนำไปสู่การพัฒนาการผลิตวัคซีน (Payne *et al.*, 1988)

**2.3.4.2 ด้านการวินิจฉัยโรค** มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ ฮอร์โมน เอ็นไซม์ และ Tumor marker ซึ่งมีระดับต่ำมากในเลือดหรือสิ่งคัดหลั่งเพื่อนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี immunoassays เช่น วิธี radioimmunoassay, วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตัวอย่าง เช่น ใช้ในการตรวจหาฮอร์โมน beta-human chorionic gonadotrophin (B-HGG), thyroxin, estrogen, progesterone ซึ่งบางตัวมีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกันมาก สำหรับเอ็นไซม์ เช่น CK-MB และ tumor marker เช่น alpha-feto protein (AFP), carcino embryonic antigen (CEA) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อผิวของ lymphocyte ชนิดต่าง ๆ ได้ โดยที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถใช้จำแนกชนิดของ lymphocyte ออกเป็นประเภทย่อยต่าง ๆ มากมายโดยเฉพาะใน T-lymphocyte ทำให้แยกได้เป็น subset ต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่เรียกว่า OKT (Ortho Kung T-lymphocyte) ซึ่งสามารถมาใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรคหลายชนิดที่มีสัดส่วนของ lymphocytes ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณแตกต่างกัน เช่น ในการหาสัดส่วนของ helper/suppressor cell (OKT4/OKT8) สามารถบอกสถานะการเป็นโรคเอดส์ และยังมี OKT อื่น ๆ ที่สามารถนำมาใช้ช่วยวินิจฉัยโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็งของระบบน้ำเหลือง โรคภูมิแพ้ โรคภูมิแพ้ตัวเอง (autoimmune) สำหรับโรคมะเร็ง นอกจากนี้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหา tumor marker ในซีรัมแล้ว ยังมีการนำมาใช้ในการหาตำแหน่งของก้อนมะเร็ง โดยใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากกัมมันตภาพรังสีแล้วใช้เครื่องตรวจหาตำแหน่งมะเร็ง (Dienstmann *et al.*, 2012)

**2.3.4.3 ด้านการรักษา** วิธีที่สนใจกันมากในปัจจุบันคือ การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี เป็นตัวพาพวดยา ท็อกซินหรือกัมมันตภาพรังสีไปสู่เซลล์เป้าหมายที่ต้องการ โดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงอย่างสูงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีต่อเซลล์เป้าหมายนั้น ซึ่งจะทำให้เกิดการรักษาที่ได้ผลเต็มที่ อาจเรียกสารที่ทำโดยวิธีนี้ว่าเป็น magic bullet หรือ immunotoxin ซึ่งมีการนำมาใช้รักษาโรคที่หายยาก เช่น โรคมะเร็ง (Syrigos *et al.*, 1999)

**2.3.4.4 ด้านการป้องกัน** คือ นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาช่วยในการแยกให้แอนติเจนบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการทาง immunochemistry เพื่อนำแอนติเจนนั้นมาใช้เตรียมวัคซีน โดยหลักการเดียวกันนี้สามารถนำไปใช้ในการทำให้สารบริสุทธิ์ได้ด้วย เช่น ใช้ในการทำให้ interferon บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงเป็นการดีที่จะใช้เทคโนโลยีอื่น ๆ ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ไม่ยุ่งยาก และรวดเร็วกว่าวิธีการ hybridoma ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน (วัชระ กลสินฤกษ์, 2551)

## 2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal Cell Culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ โดยเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์จากสิ่งมีชีวิตเฉพาะส่วนเท่านั้น ไม่ใช่พืชทั้งต้นหรือสัตว์ทั้งตัว แต่เป็นการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและอยู่ภายใต้การควบคุมของเรา โดยเริ่มต้นจากการแยก (isolate) เซลล์มาจากเนื้อเยื่อตั้งต้นก่อน ซึ่งอาจจะเป็นอวัยวะใด ๆ ก็ได้ จะเป็นจากพืชหรือสัตว์ก็ได้ เช่น วิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในการแพร่กระจายพันธุ์พืช กล่าวคือ ทำให้เกิดต้นอ่อนเป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถนำไปปลูกต่อไปได้ วิธีนี้ใช้กับการกระจายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น กล้วยไม้ เป็นต้น นอกจากนี้เนื้อเยื่อและเซลล์ของพืชแล้ว เรายังสามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ของสัตว์ต่าง ๆ ได้อีกด้วย ซึ่งเทคนิคนี้มีประโยชน์หลายประการ เช่น เราสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งบางชนิดในงานทดลอง เพื่อนำมาใช้ศึกษาผลของยาที่พัฒนาขึ้นใหม่ ๆ สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ของไข่และตัวอ่อนของมนุษย์และสัตว์เพื่อนำมาผสมกันในงานทดลอง เกิดเป็นตัวอ่อนซึ่งสามารถใส่กลับเข้าไปในมดลูกของมนุษย์หรือสัตว์เพื่อให้ตั้งท้องและคลอดลูกอ่อนนั้นออกมาในที่สุด อีกตัวอย่างหนึ่งคือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดี หรือสารสร้างภูมิคุ้มกันซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ได้แอนติบอดีดังกล่าว เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) การทดลองโดยวิธีการที่เกี่ยวกับเซลล์ดังกล่าวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจัดเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (*in vitro* test) ซึ่งสามารถนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาทดสอบแทนการใช้สัตว์ทดลองได้ตัวอย่าง เช่น ในอุตสาหกรรมผลิตวัคซีนบางชนิดหรือในงานวิจัยต่าง ๆ ด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยา ที่จำเป็นต้องอาศัยเฉพาะสัตว์ทดลองเท่านั้น (Fong & Weng, 1997)

### 2.4.1 คุณลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยง

ในงานวิจัยในด้านวัคซีนจากไวรัส เซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์อย่างมากสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส เนื่องจากไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนด้วยตัวเองได้ เพราะไวรัสไม่มีเครื่องมือใด ๆ ในการสร้างหรือสังเคราะห์สารประกอบใหม่ คือ ไม่มีเมแทบอลิซึม (metabolism) ของตัวเอง (Monto *et al.*, 1981) ด้วยเหตุนี้ไวรัสจึงจำเป็นต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตในการเพิ่มจำนวนลูกหลาน ดังนั้นจึงจัดไวรัสเป็นปรสิต obligate intracellular parasite ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ไวรัสสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนได้เรียกว่า โฮสต์ (host)

### 2.4.1.1 ชนิดของโฮสต์เซลล์แบ่งเป็น 3 ชนิด

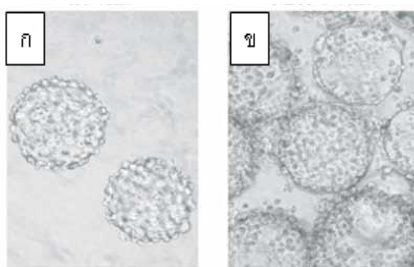
- (1) เซลล์เพาะเลี้ยง อาจแบ่งตามวิธีการเลี้ยงได้เป็น 3 ชนิด คือ
- (1.1) Monolayer cell culture คือ เซลล์ที่เรียงตัวเกาะบนผิวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง
  - (1.2) Suspension cell คือ เซลล์ที่ลอยตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์
  - (1.3) Microcarrier cell คือ เซลล์เกาะติดเรียงตัวบนผิวของเม็ดพลาสติกที่เป็น suspension อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์
- (2) ไข่ฟัก (Embryonated egg)
- (3) สัตว์ทดลอง (Experimental animal)

### 2.4.2 เนื่องจากเซลล์มีคุณสมบัติและความสามารถในการแบ่งตัวไม่เหมือนกันจึงแบ่งเซลล์เพาะเลี้ยงออกเป็น 3 ชนิด

**2.4.2.1. Primary cell culture** คือ เซลล์ที่แยกจากสิ่งมีชีวิตหรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยตรง คุณสมบัติเหมือนเซลล์ที่อยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกประการ สามารถใช้เป็นแบบในการศึกษาสรีรวิทยาปกติในอวัยวะนั้น ๆ ได้ แต่ข้อเสีย คือ เลี้ยงได้จำนวนไม่มากนักซึ่งเซลล์จะมีกระบวนการแก่ชราและตายไปในที่สุด (Ren & Miller, 2003)

**2.4.2.2 Semi - continuous cell line (Cell strain) หรือ Diploid cell line** คือ เซลล์เพาะเลี้ยงบางสายพันธุ์ที่ได้มาจาก primary cell culture และเมื่อนำมาเลี้ยงต่อเนื่องประมาณ 20 – 50 ครั้งเซลล์จะเริ่มหยุดการเพิ่มจำนวน เซลล์พวกนี้ส่วนใหญ่ยังมีคุณสมบัติเป็นเซลล์ปกติ มีจำนวนโครโมโซมเป็นคู่ (Corbin *et al.*, 2016)

**2.4.2.3 Continuous cell line** คือ เซลล์ที่มีคุณสมบัติของการแบ่งตัวได้ไม่สิ้นสุด จึงสามารถเลี้ยงต่อไปได้เรื่อย ๆ ไม่มีวันตาย เช่น เซลล์มะเร็ง เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงอาจกล่าวได้ว่าเซลล์เหล่านั้นเป็นอมตะ ซึ่งจะเพิ่มความสะดวกอย่างมากในการศึกษาวิจัย เนื่องจากสามารถเลี้ยงเซลล์ต่อไปได้เป็นร้อย ๆ รุ่นและไม่ต้องมีกระบวนการยุ่งยากในการแยกเซลล์ออกจากสิ่งมีชีวิตหรือแยกออกจากอวัยวะ แต่ข้อเสียก็คือเซลล์ดังกล่าวมักมีการกลายพันธุ์ไปจากเซลล์ปกติ ดังนั้นการวิจัยจาก continuous cell line จึงมีขอบเขตจำกัดอยู่บ้าง โดยมากมักใช้สำหรับศึกษากระบวนการพื้นฐานทั่วไปของเซลล์ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์ปกติกับ immortal cell เนื่องจากมีโครโมโซมเป็น heteroploid หรือกำเนิดจากเซลล์มะเร็ง จึงไม่นิยมนำมาทำวัคซีน ทั้งนี้ยกเว้น Vero cell ใน passage ซึ่งไม่สูงมากนัก โดยนำมาเตรียมวัคซีนพิษสุนัขบ้า (rabies vaccine) ที่ใช้ในคน (Ammerman *et al.*, 2008)



ภาพที่ 2.11 รูปร่างและลักษณะการเจริญเติบโตของ Vero cells

(ก) และ MRC-5 Cells (ข) ที่เกาะอยู่บน Cytodex 1 microcarriers ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Liu *et al.*, 2008)

### 2.4.3 อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์สัตว์

**2.4.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar-flow Hood)** เพื่อสร้างบริเวณปลอดเชื้อสำหรับการทำงานแบบ horizontal flow มีราคาถูกกว่าและเพียงพอสำหรับงานพื้นฐาน Class II Biohazard Cabinet สำหรับงานที่เกี่ยวข้องกับสิ่งอันตราย เช่น สารกัมมันตภาพรังสี สารก่อมะเร็ง สารมีพิษ การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตไวรัส การเลี้ยงเซลล์ของไพรเมต (รวมทั้ง human cells) เป็นต้น

**2.4.3.2 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub> Incubator)** เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงต้องการสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 5 % สำหรับภาวะเพาะเลี้ยงที่ปิดสนิท สามารถเติมคาร์บอนไดออกไซด์แล้วปิดฝา จากนั้นนำ incubate ใน dry incubator หรือ hot room ได้เลย Petri dish และ multi-well plate ต้องการบรรยากาศที่มีความชื้นสูงสามารถให้ความชื้นได้โดยการใส่ถาดบรรจุน้ำไว้ใน CO<sub>2</sub> incubator ใส่ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในน้ำด้วยและต้องคอยตรวจสอบอย่าให้น้ำแห้ง

**2.4.3.3 ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์** ส่วนใหญ่ต้องมีพื้นผิวให้เซลล์สามารถยึดเกาะและแผ่ตัวออกเซลล์จึงจะสามารถเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ ยกเว้น เซลล์ของระบบเลือด และเซลล์มะเร็งบางชนิด การที่เซลล์ไม่สามารถแผ่ตัวออกได้อาจเนื่องมาจากการยึดเกาะได้ไม่ดีหรืออาจเนื่องมาจากเซลล์มีความหนาแน่นมากเกินไปพื้นผิวเพาะเลี้ยงต้องเหมาะสมแก่การยึดเกาะ (Adhesion)

(1) ภาชนะแก้วผิวแก้ว เป็นภาชนะที่มีประจุทำให้เซลล์ยึดเกาะได้ดีสามารถล้าง และใช้ซ้ำได้โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเกาะกับเซลล์ ข้อเสีย คือ น้ำหนักมาก แดกง่าย การทำความสะอาดด้วยด่างแก่ เช่น NaOH ทำให้พื้นผิวไม่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงเซลล์ ต้องทำการ neutralize ด้วย acid wash หลังจากการล้าง

(2) Disposable Plastics Polystyrene flasks เป็นภาชนะแบบใช้ครั้งเดียว ซึ่งมีความสะดวกและผลการทดลองน่าเชื่อถือ เพราะพื้นผิวเพาะเลี้ยงเหมือนเดิม (reproducible)

(3) Polystyrene เป็นภาชนะที่มีคุณสมบัติ hydrophobic ไม่เหมาะสำหรับการยึดเกาะของเซลล์ การใช้รังสีแกมมาหรือการใช้สารเคมีในการบำรุงรักษา

(4) Disposable Plastics มีหลากหลายขนาด หลายสี ให้เลือก (T-25, T-75, T-125) ผ่านกรรมวิธีปราศจากเชื้อมาแล้วใช้ซ้ำไม่ได้ การล้างด้วย detergent ทำให้พื้นผิวเปลี่ยนคุณสมบัติของการยึดเกาะไปคุณภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับผู้ผลิต

(5) วัสดุอื่น เช่น polyvinylchloride (PVC), polycarbonate, melinex, thermanox (TPX) เป็นต้น

(6) Petri dish & Multi-well Plates มีหลายขนาดให้เลือก เช่น 35mm, 100-mm, 6-well, 12-well, 24-well, 96-well ข้อเสีย คือ ฝาไม่ปิดสนิทอาหารเลี้ยงเซลล์จะระเหยง่าย และปนเปื้อนง่าย (Nema & Khare, 2012)

## 2.4.4 ประเภทและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์

2.4.4.1 ประเภทของอาหารเลี้ยงเซลล์ เราสามารถแบ่งประเภทของอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่

(1) อาหารที่ไม่ทราบองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งมีส่วนผสมของสารจากธรรมชาติเป็นหลัก เช่น สารสกัดจากเอ็มบริโอของไก่ (chicken embryo extract) ไข่แดงของไก่ (chicken egg yolk) พลาสมา และซีรัม เป็นต้น

(2) อาหารที่ทราบความเข้มข้นและองค์ประกอบทางเคมี (chemically defined media) เป็นองค์ประกอบหลัก และมีการเสริมด้วยซีรัม

(3) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีไม่ต้องเสริมด้วยซีรัม (serum-free media) (Ham & McKeehan, 1979)

อาหารเลี้ยงเซลล์โดยทั่วไปมักจะประกอบด้วยน้ำ กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ กลูโคส ฮอร์โมน โกรทแฟกเตอร์ และเมตาบอไลต์ (metabolite) บางชนิด ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องทราบองค์ประกอบแต่ละชนิดเพื่อเลือกอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยง

#### 2.4.4.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์

(1) กรดอะมิโน กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญของเซลล์ในการสังเคราะห์โปรตีน นิวคลีโอไทด์ และลิพิด รวมทั้งยังเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์อีกด้วย กรดอะมิโนโดยทั่วไปที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นประมาณ 10-110 ไมโครกรัมต่อลิตร (0.1-1 มิลลิโมลาร์) ซึ่งความต้องการของกรดอะมิโนของเซลล์แต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์สัตว์มักประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น คือ ทริปโตเฟน (tryptophan) ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) ลิวซีน (leucine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ไลซีน (lysine) อาร์จินีน (arginine) ทรีโอนีน (threonine) เมไทโอนีน (methionine) วาลีน (valine) ฮิสติดีน (histidine) และซิสทีน (cystine) รวมทั้งกรดอะมิโนไม่จำเป็น ซิสเตอีน (cysteine) กลูตามีน (glutamine) และไทโรซีน (tyrosine) มักถูกเติมลงไปด้วย (Genzel *et al.*, 2004) เนื่องจากเซลล์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านี้ได้ หรือเพื่อชดเชยส่วนที่สังเคราะห์ได้แต่สูญเสียออกมาสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของกรดอะมิโนเป็นปัจจัยที่กำหนดปริมาณเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์ส่วนมากต้องการกรดอะมิโนแอล-กลูตามีน (L-glutamine) เพื่อการเจริญเติบโต เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยที่แอล-กลูตามีนเป็นสารที่ไม่ค่อยมีความเสถียร มีเวลาครึ่งชีวิตที่ 37 องศาเซลเซียส เพียง 3-5 วัน (Lane *et al.*, 1987) จึงต้องเติมสารละลายกลูตามีนลงในอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่เสมอ และแอล-กลูตามีนสามารถสลายตัวให้กรดไพโรลิโดน คาร์บอกซิลิก (pyrrolidone carboxylic acid) และแอมโนเนียที่เป็นพิษต่อเซลล์ ในปัจจุบันมีการเติมไดเพปไทด์ แอล-อะลานีน-กลูตามีน แทนกลูตามีน ไดเพปไทด์นี้มีชื่อทางการค้าว่า กลูตาแมก (Glutamax) (Pasiaka & Morgan, 1959) มีความเสถียรในสารละลาย และถูกย่อยโดยเอนไซม์ไดเพปทิเดส (dipeptidase) ที่หลังโดยเซลล์ทำให้ได้ได้กลูตามีน และอะลานีน อย่างช้า ๆ (Hanko & Rohrer, 2004)

(2) กลูโคส กลูโคสเป็นองค์ประกอบ ในปริมาณ 900-4,500 ไมโครกรัมต่อลิตร (5-25 มิลลิโมลาร์) แต่สูตรอาหารบางชนิดอาจมีกลูโคสสูงถึง 10,000 กรัมต่อลิตร (56 มิลลิโมลาร์) กลูโคสทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอนของเซลล์ เมื่อกลูโคสถูกเมแทบอลิต์ (metabolite) โดยกระบวนการหลัก คือ วิถีไกลโคลิซิส (Glycolysis) ที่สลายกลูโคสเป็นไพรูเวท (pyruvate) และไพรูเวทถูกเปลี่ยนเป็นแลคเตต (lactate) หรืออะซิติลโคเอนไซม์ เอ (Acetyl Co A) จากนั้นอะซิติลโคเอนไซม์ เอ ถูกสลายในวัฏจักรเครบส์ (Kreb cycle) กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (Suhaimi *et al.*, 2015) อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยง และเซลล์ที่มีการแปลงพีโนไทป์บางชนิดพบแลคเตตในปริมาณสูง อาจเนื่องมาจากการเกิดวัฏจักรเครบส์ไม่สมบูรณ์ เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีการพบหลักฐานที่แสดงว่าเซลล์บางชนิดใช้กลูตามีนเป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่าใช้กลูโคส ดังนั้นการค้นพบนี้สามารถอธิบายได้ถึงกรณีที่เซลล์บางชนิดต้องการกลูตามีน หรือกลูตาเมตในปริมาณที่สูง เซลล์สัตว์เพาะเลี้ยงส่วนมากใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน (Deorosan & Nauman, 2011)



(3) วิตามิน อาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยกลุ่มวิตามินที่ละลายน้ำได้ เช่น วิตามินบี วิตามินซี โคลีน (choline) กรดโฟลิก (folic acid) ไบโอติน (biotin) รวมทั้งนิโคตินาไมด์ (nicotinamide) และกลุ่มวิตามินที่ไม่ละลายน้ำ เช่น วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค ปริมาณของวิตามินในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเซลล์ที่ใช้ในการพัฒนาอาหารนั้น ๆ ถึงแม้ว่าเซลล์ต้องการวิตามินในปริมาณต่ำ แต่เซลล์มีความจำเป็นต้องใช้วิตามินเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ต่าง ๆ (Büntemeyer & Lehmann, 2001)

(4) เกลือแร่ เกลือแร่เป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญในการรักษาออสโมแลลลิตี (osmometry) ของอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ โซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) โพแทสเซียมไอออน ( $\text{K}^+$ ) แมกนีเซียมไอออน ( $\text{Mg}^+$ ) แคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^+$ ) คลอไรด์ไอออน ( $\text{Cl}^-$ ) ซัลเฟตไอออน ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ฟอสเฟตไอออน ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) และไบคาร์บอเนตไอออน ( $\text{HCO}_3^-$ ) นอกจากนี้เกลือแร่บางชนิดยังทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ อาหารเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ควรมีออสโมแลลลิตี ประมาณ 260-320 โมลต่อกิโลกรัม นอกจากนี้เกลือแร่ยังมีบทบาทต่าง ๆ เช่น แคลเซียมมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยึดติดของเซลล์และ แคลเซียมยังเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal transduction) ปริมาณแคลเซียมในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลต่อการเพิ่มจำนวนหรือการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ เป็นต้น โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ทำหน้าที่ควบคุมศักย์ไฟฟ้าของเยื่อเซลล์ (membrane potential) ในขณะที่ซัลเฟต ฟอสเฟตและไบคาร์บอเนตนั้นเป็นตัวควบคุมประจุภายในเซลล์ และใช้ในการสังเคราะห์สารมโหมเลกุล อาหารของเซลล์ที่เจริญแบบแขวนลอยจึงจำเป็นต้องลดปริมาณแคลเซียมลงเพื่อให้เกิดการเกาะ และการรวมกลุ่มของเซลล์น้อยที่สุด (Aranda-Peres *et al.*, 2009)

(5) ส่วนเสริมอินทรีย์ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ลดปริมาณซีรัมลงจำเป็นต้องได้รับส่วนเสริมอินทรีย์ (organic supplement) บางชนิดที่ทดแทน เช่น โปรตีน เพปไทด์ นิวคลีโอไซด์ (nucleosides) สารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ ไพรูเวต และลิพิด ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีระบบบัฟเฟอร์ที่ช่วยรักษาความเป็นกรดเบสไม่ให้เกิดค่าเกินไป ระบบบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ ระบบไบคาร์บอเนต/คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศของตู้บัพที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ และมีไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงต้องควบคุมอย่างดีเพราะมีผลต่อระบบบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับร้อยละ 5 ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์และไบคาร์บอเนตที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากสารอาหารต่าง ๆ และเกลือแร่แล้ว ยังมีการเติมยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงชนิดของจุลชีพที่ยาปฏิชีวนะแต่ละตัวสามารถกำจัดได้ (Sternberg *et al.*, 1964)

### 2.4.5 ชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์

การเลือกอาหารเลี้ยงเซลล์ ควรเลือกให้มีความเหมาะสมกับความต้องการ และสภาวะแวดล้อมของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง อาหารที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมี 3 ชนิด ได้แก่

**2.4.5.1 Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)** ถูกพัฒนามาจาก Basal Medium Eagle (BME) โดยเพิ่มชนิดและปริมาณของสารองค์ประกอบ อาหารชนิดนี้ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะเซลล์ปฐมภูมิและเซลล์ไลน์บางชนิด (Jayme *et al.*, 1997)

**2.4.5.2 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)** ดัดแปลงมาจาก BME เช่นกัน มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนเป็นสองเท่า และความเข้มข้นของวิตามินเป็นสี่เท่าของ MEM นอกจากนี้ยังใช้ไบคาร์บอเนตและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นสองเท่าของ MEM เพื่อให้มีความเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีกว่า ซึ่งใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ไลน์ที่มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป โดยเฉพาะเซลล์ที่มีการเจริญแบบชั้นเดียว (Ham & McKeehan, 1979)

อาหาร MEM และ DMEM ประกอบด้วยวิตามินที่ละลายน้ำได้ เช่น วิตามินบี โคสไลน์ กรดโฟลิก และนิโคตินาไมด์ แต่ไม่มีวิตามินซีและไบโอติน ปริมาณวิตามินในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสมบัติของเซลล์ที่ใช้ในการพัฒนาอาหารนั้น ๆ

**2.4.5.3 Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640)** มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบที่ต่ำมาก ใช้สำหรับเซลล์ที่เจริญแบบแขวนลอย เช่น เซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic cell) เซลล์ไลน์ของลิมโฟบลาสต์มนุษย์ (human lymphoblastoid cell lines) (Kim *et al.*, 2015)

### 2.4.6 ซีรัม (Serum)

ซีรัม คือ ของเหลวส่วนใสที่ได้มาจากภายหลังการปั่นเหวี่ยงแยกจากเลือดที่เก็บในอุณหภูมิต่ำและปล่อยให้แข็งตัวอย่างช้า ๆ จึงไม่มีองค์ประกอบการแข็งตัวของเลือด สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ทั่วไปจะมีส่วนประกอบต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ และแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส เป็นต้น แต่ส่วนประกอบเหล่านี้ไม่เพียงพอต่อการเจริญที่ดีของเซลล์ ดังนั้นการเติมซีรัม (serum) ของสัตว์ถือว่าเป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดส่วนหนึ่งในการเลี้ยงเซลล์จะสามารถช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น

#### 2.4.6.1 องค์ประกอบของซีรัม

ซีรัมประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด รวมทั้งมีโกรทแฟกเตอร์ที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมทั้งมีสารที่ช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิว นอกจากนี้ซีรัมยังเป็นแหล่งของแร่ธาตุ ลิพิด คาร์โบไฮเดรต เอนไซม์และฮอร์โมนต่าง ๆ ซีรัมที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ คือ fetal bovine serum (FBS) เป็นซีรัมจากฟetusในท้องแม่วัว จะมี

แกมมา-โกลบูลิน ( $\gamma$ -globulin) ในปริมาณที่ต่ำ และมีปริมาณโคทแพคเตอร์ในปริมาณที่สูง จึงนิยมใช้มากที่สุดถึงแม้ว่าจะมีราคาแพง ส่วนซีรัมอื่น ๆ ที่ใช้กับเซลล์ที่เจริญได้ไม่ดีใน FBS เช่น ซีรัมนมลูกวัว (calf serum, CS) เป็นซีรัมจากลูกวัวแรกเกิดอายุไม่เกิน 20 วัน ซีรัมม้า (horse serum) ซีรัมแพะ (goat serum) ซีรัมหมู (pocine serum) ซีรัมกระต่าย (rabbit serum) และซีรัมไก่ (chicken serum) เป็นต้น นอกจากนี้ในเซลล์ไลน์ของมนุษย์บางชนิดต้องใช้ซีรัมของมนุษย์ (human serum) ซีรัมนี้ได้มาจากเลือดที่บริจาค ซึ่งจะต้องมีการตรวจว่าปลอดเชื้อไวรัส HIV และไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B) ก่อนนำมาใช้ (Deorosan & Nauman, 2011)

(1) โปรตีน เป็นองค์ประกอบหลักของซีรัม คือ โปรตีนซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนรวมประมาณ 40-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนหลายชนิดในซีรัมทราบหน้าที่ที่ชัดเจน เช่น อัลบูมิน (albumin) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในซีรัม (20-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำหน้าที่ขนส่งลิพิด เกลือแร่ และฮอร์โมน นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมแรงดันออสโมติกและรักษาพีเอช (pH) ไฟโบรเนกติน (fibronectin) เป็นโปรตีนที่ส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าไฟโบรเนกตินที่หลั่งออกจากเซลล์ โปรตีนแอลฟา 2-แมคโครโกลบูลิน ( $\alpha$ 2-macroglobulin) และแอลฟา1-แอนติทริพซิน ( $\alpha$ 1-antitrypsin) ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริพซิน โปรตีนเฟทูอิน (fetuin) ช่วยเร่งการยึดเกาะของเซลล์ (Burtreau *et al.*, 2003) และโปรตีนแทรนส์เฟอร์ริน (transferrin) ทำหน้าที่ขนส่งอะตอมของเหล็กทำให้ลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากการส่งปฏิกิริยาโดยเหล็ก ส่วนโปรตีนอีกหลายชนิดยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน แต่อาจเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะและการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้โปรตีนยังทำหน้าที่เพิ่มความหนืดของอาหารเลี้ยงเซลล์ ช่วยลดความเค้นเฉือน (shear stress) ระหว่างการบีบอัดและการคนผสมสาร รวมทั้งยังช่วยเพิ่มความจุบัฟเฟอร์ของอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย (Keenan *et al.*, 2006)

(2) โกรทแฟคเตอร์ เป็นอาหารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ โกรทแฟคเตอร์ที่สำคัญในซีรัม ได้แก่ platelet-derived growth factor (PDGF) เป็นสารที่ถูกหลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดในขณะที่มีการแข็งตัวของเลือด เป็นโพลีเพปไทด์ที่มีฤทธิ์เป็นไมโทเจน PDGF เป็นโกรทแฟคเตอร์ที่พบมากที่สุดในการเจริญของไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเซลล์เกลีย (glia) ในขณะที่ platelet derived factor ชนิดอื่น เช่น transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) สามารถยับยั้งการเจริญและส่งเสริมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์เยื่อบุผิว ส่วนของโกรทแฟคเตอร์ชนิดอื่น เช่น fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenin และ insulin like growth factors (IGF-1 และ IGF-2) มีปริมาณน้อยในซีรัม และมีความจำเพาะต่อเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นไมโทเจน (van der Valk *et al.*, 2010)

(3) ฮอร์โมน โดยที่ฮอร์โมนหลายชนิดที่พบในซีรัม เช่น อินซูลิน (insulin) ทำหน้าที่ส่งเสริมการนำกลูโคสและกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์ IGF-2 โดยสามารถเร่งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) พบใน FBS ช่วยส่งเสริมการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฮโดรคอร์ติโซนอาจทำให้เกิดการหยุดเจริญของเซลล์ได้ (Gstraunthaler, 2003)

(4) ส่วนประกอบอื่นๆ ในซีรัมายังพบส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น ลิพิดพวกกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) เอทานอลามีน (ethanolamine) และฟอสโฟเอทานอลามีน (phosphoethanolamine) ลิพิดพวกนี้มีปริมาณเล็กน้อย และจับอยู่กับโปรตีนอัลบูมิน (albumin) (Peehl *et al.*, 1988) นอกจากนี้ในซีรัมายังประกอบด้วยกรดอะมิโน กลูโคส นิวคลีโอไซด์ สารมัธยันตร์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น ทองแดง เหล็ก และสังกะสี

**2.4.6.2 การเลือกใช้ชนิดของซีรัมขึ้นอยู่กับเซลล์ที่เพาะเลี้ยง** ซีรัมที่จำหน่ายมีทั้งในรูปแบบที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนกับซีรัม (heat-inactivation) มาแล้ว (Lesniak *et al.*, 2010) โดยที่ FBS เป็นซีรัมที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั่วไปมีจำหน่ายหลายรูปแบบ เช่น qualified FBS ซึ่งเหมาะสมสำหรับเซลล์ทั่วไปมีปริมาณแอนโดทอกซินน้อยกว่า 50 EU ต่อมิลลิลิตร (EU คือ endotoxin unit) และฮีโมโกลบินน้อยกว่า 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน certified FBS เป็นซีรัมที่ถูกกำจัดแอนโดทอกซินออกให้เหลือน้อยกว่า 5 EU ต่อมิลลิลิตร และฮีโมโกลบินน้อยกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการทดสอบ ปริมาณฮอร์โมนและสารทางชีวเคมีต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับเซลล์ที่ไวต่อสารเหล่านี้ ซึ่งเซลล์โดยทั่วไปมักเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของซีรัมร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซีรัมที่มีจำหน่ายมักจะทำการไร้เชื้อ โดยการกรองด้วยรูกรองขนาด 0.1 ไมครอนแล้ว (Contu *et al.*, 2002) ผู้ปฏิบัติงานนั้นไม่จำเป็นต้องนำซีรัมมากรองซ้ำอีกครั้ง การเก็บรักษาซีรัมควรแบ่งใส่หลอดที่ไร้เชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ควรทำการแช่แข็งและละลายซีรัมบ่อย ๆ เพราะจะทำให้องค์ประกอบในซีรัมสลายตัว ซีรัมที่ผลิตในรุ่นผลิต (batch) ที่ต่างกันอาจจะมีปริมาณโปรตีน ฮอร์โมน โกรทแฟกเตอร์ และสารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน จึงควรทดสอบลักษณะการเจริญของเซลล์ในทุก ๆ ครั้งที่มีการใช้ซีรัมรุ่นที่ผลิตใหม่

**2.4.6.3 ข้อดีของการเสริมด้วยซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์** แม้ซีรัมจะ ช่วยในการเจริญและเปลี่ยนสภาพของเซลล์ แต่การเสริมด้วยซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็มักจะมีข้อดี้อย ในหลาย ๆ ประการ เช่น ความปรวนแปรขององค์ประกอบที่มีอยู่ในซีรัมซึ่งมีผลต่อการเจริญของเซลล์ จึงควรทดสอบลักษณะการเจริญของเซลล์ทุก ๆ ครั้งที่มีการใช้ซีรัมรุ่นที่ผลิตใหม่ โดยทั่วไปซีรัมมีอายุ ของการใช้งานที่จำกัดและมีราคาสูงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ อีกทั้งซีรัมยังเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนของ ไวรัสที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยง (Gstraunthaler, 2003) นอกจากนี้ซีรัมยังทำให้ ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของสารชีวเภสัชภัณฑ์ (biopharmaceuticals) จากเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นมีความ ยุ่งยาก เนื่องจากมีการปนเปื้อนโปรตีนของสัตว์ที่อาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Howat *et al.*, 2002) ดังนั้นถ้าทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมจะสามารถช่วยลดขั้นตอนในการ กำจัดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ของซีรัม ซึ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมนั้น ประกอบด้วย กรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ กลูโคส ฮอร์โมน โกรทแฟกเตอร์ และเมแทบอลิต์ รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่ช่วยให้เซลล์เจริญได้เป็นปกติ (Freshney, 2005) ได้แก่

- (1) ปัจจัยที่ช่วยในการยึดติดของเซลล์ เช่น ไฟโบรเนกติน
- (2) โกรทแฟกเตอร์ เช่น PDGF และ TGF- $\beta$  ที่ควบคุมการ เจริญเติบโตของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์
- (3) ฮอร์โมน เช่น อินซูลิน ไฮโดรคอร์ติโซน ไทรโอไอโดไทโรนิน และเอสโตรเจน (estrogen)

นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ ตามความต้องการของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแต่ละชนิด ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม เช่น Iscove's (Glassy *et al.*, 1988), MCDB110 (Ryan *et al.*, 1987), WAJC404 (Coffey *et al.*, 2001) และ LHC9 (Howat *et al.*, 2002) เป็นต้น ข้อดีอีกประการหนึ่งของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมนั้น คือ มีความจำเพาะในการให้เซลล์ บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ โดยการเลือกชนิดของโกรทแฟกเตอร์ หรือกลุ่มของโกรทแฟกเตอร์ให้ เหมาะสมกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต้องการให้เจริญเติบโต

#### 2.4.6.4 วิธีการปรับเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

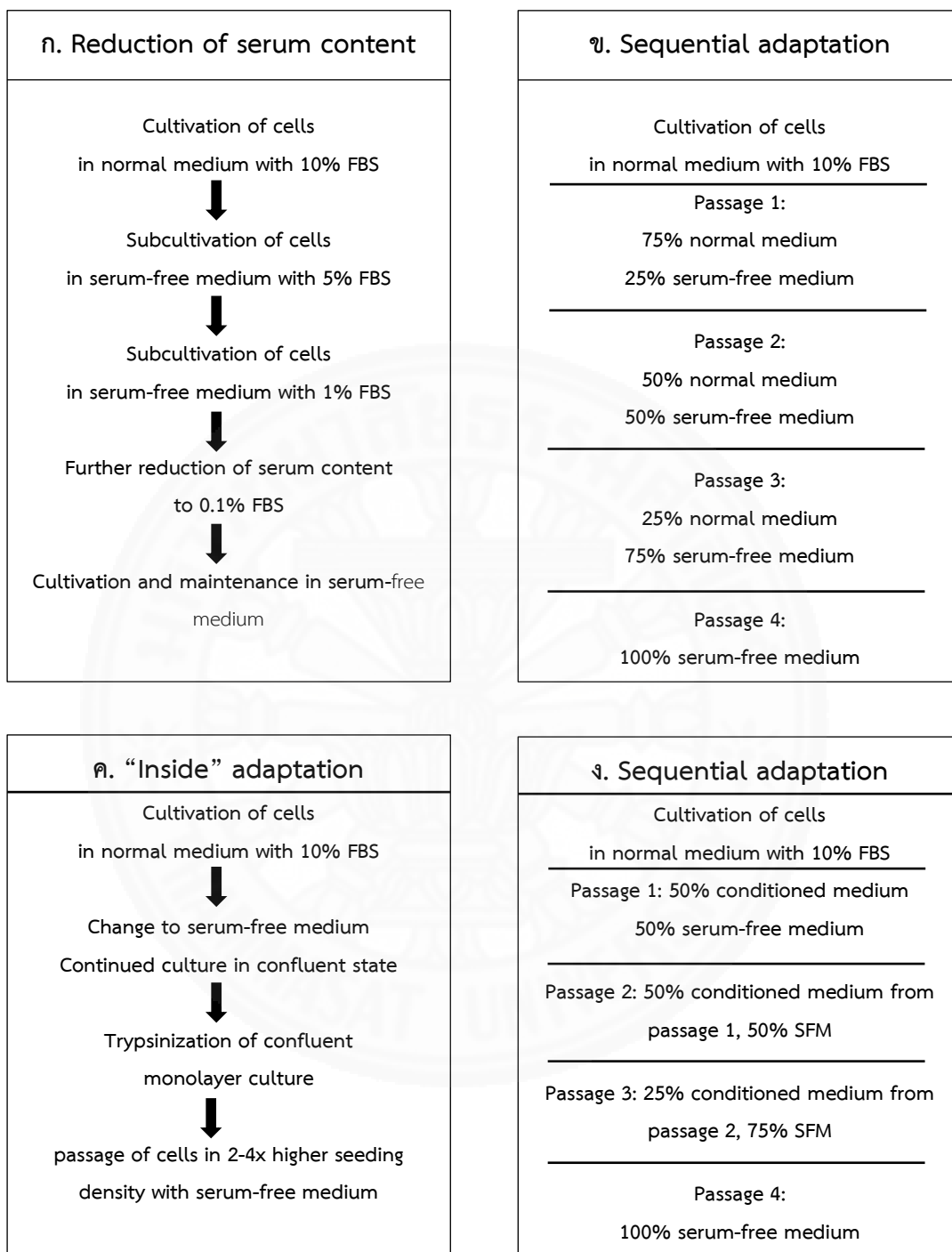
มีหลายวิธีสำหรับปรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการปรับกระบวนการลดความเข้มข้นของซีรัมลงเรื่อย ๆ อย่างช้า ๆ จนถึงปราศจากซีรัมในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่นำมาใช้ควรเป็นวิธีที่สามารถทำให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงนั้นสามารถปรับตัวให้เจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 90% และการเจริญเติบโตเป็นแบบลอการิทึม ดังนั้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพของการทำงานของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเพื่อจะช่วยให้การปรับเปลี่ยนของเซลล์ไปยังอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Van der Valk *et al.*, 2010) ดังวิธีการปรับเปลี่ยนดังต่อไปนี้

(1) Reduction of serum content คือ การลดปริมาณซีรัมลงเรื่อย ๆ ในแต่ละ passage เริ่มต้นจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม จากนั้นลดปริมาณซีรัมลงเรื่อย ๆ เป็น 5% จนถึง 0.1% ซีรัม และเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมในที่สุด

(2) Sequential adaptation คือ การลดอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมลงเรื่อย ๆ ในแต่ละ passage เริ่มต้นจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม จากนั้นลดปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมลงและเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมในอัตราส่วน (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัม : อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม) คือ 75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100 หรือ 75:25, 50:50, 25:75, 10:90 (2-3 passage) และ 0:100 เพื่อไม่ให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเกิดความเครียดมากเกินไป

(3) Adaptation with conditioned medium คือ การลดอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเดิมลงเรื่อย ๆ ในแต่ละ passage เริ่มต้นจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม จากนั้นลดปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมลง และเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยยังคงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเดิมในอัตราส่วนที่เหมาะสมและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมลงไป ตามอัตราส่วน (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเดิม : อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม) ดังนี้ 50:50, 50 (passage 1): 50, 25 (passage 2): 75 และ 0:100

(4) Inside adaptation medium คือ การเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมทันที เริ่มต้นจากการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม จากนั้นเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยใช้เซลล์เริ่มต้นมากกว่าเซลล์ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ปริมาณ 2-4 เท่า (Tan *et al.*, 2015)



ภาพที่ 2.12 วิธีการปรับเปลี่ยนเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัม  
เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Van der Valk *et al.*, 2010)

### 2.4.6.5 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

จากวิธีการปรับเปลี่ยนเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมในหัวข้อ

2.4.6.4 ดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้ศึกษาและพัฒนาวิธีการเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ดังนี้

Costa และคณะ (2013) ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ผลิต N-glycosylation ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยเริ่มเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM medium ต่อจากนั้นปรับเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนั้นเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานาน โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มในการลดปริมาณของซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ กลุ่มระดับกลาง (0.25 - 0.15% ของซีรัม) และกลุ่มระดับสุดท้าย (0.075 - 0% ของซีรัม) ซึ่งผลปรากฏว่ากลุ่มระดับกลางมีการเพิ่มขึ้นของ galactosylation แต่ fucosylation ลดลง และมีการเพิ่มขึ้นของ sialylation ที่ไม่ต้องการอีกด้วย ซึ่งกลุ่มระดับสุดท้ายให้ผลตรงข้ามกับกลุ่มระดับกลาง สามารถสรุปได้ว่าความแตกต่างเหล่านี้ อาจเกี่ยวข้องกับการลดปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างการปรับตัวในอาหารที่มีปริมาณซีรัมน้อยลง ทำให้ได้ glycan ที่มีความแตกต่างกัน

Serrato และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีการผลิต glycosylation โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิม คือ ใช้ 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum) ที่ผสมใน DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) เปรียบเทียบกับ SFM (serum-free medium) หรือ CDM (chemically defined medium) ซึ่ง SFM และ CDM ช่วยส่งเสริมให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นกว่า DMEM/FBS จากนั้นใช้การวิเคราะห์โดย CE (Capillary electrophoresis) พบว่าใน DMEM/FBS แสดง 26 โครงสร้างของ glycan และพบ glycan microheterogeneity ต่ำใน CDM หรือ SFM ซึ่งแสดง 24 และ 22 โครงสร้างตามลำดับ

Basalp และคณะ (2000) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ hybrid cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Tobacco mosaic virus* (1F5) และ  $17\beta$ -estradiol (10F4) (15D4) โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เสริมด้วย 10% FCS เป็นเวลา 3 วัน และย้ายมาเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซีรัมเป็นเวลา 2 วัน และทำซ้ำอีกครั้งเพื่อเก็บของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) เพื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเป็นส่วนประกอบ จากนั้นทำบริสุทธิ์แอนติบอดีโดยใช้ขั้นตอนเดียวที่มีความบริสุทธิ์สูง



Butler และคณะ (2000) ได้ศึกษา *Reovirus* จำนวน 2 สายพันธุ์ (serotype 1 Lang/TIL และ serotype 3 Dearing/T3D) โดยมีการเพิ่มจำนวนไวรัสโดยใช้ Vero cells ที่เจริญอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (M-VSFM) ใช้ solid microcarriers (Cytodex-1) ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นเวลา 25 ชั่วโมง ทำให้ได้เซลล์  $1 \times 10^6$  cell/mL จากหัวเชื้อปริมาณ  $2 \times 10^5$  cell/mL เป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยซีรัม และมี virus titer เพิ่มขึ้น และ virus titer สูงสุดมากกว่า  $1 \times 10^9$  pfu/mL ของทั้งสองสายพันธุ์ที่อยู่ใน M-VSFM ซึ่ง M-VSFM ส่งเสริมให้ผลผลิตมากขึ้นในการเพาะเลี้ยงแบบ microcarrier ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลผลิตที่สูง และจำเพาะมากกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัม

Butler และ Huzel (1995) ทำการศึกษา murine B – lymphocyte hybridoma (CC9C10) ถูกนำมาปรับเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมโดยมีการเสริมด้วย cis-unsaturated fatty acids (10-50  $\mu$ M) เพื่อปรับปรุงให้เซลล์ผลิต oleic/linoleic > linoleic > oleic ซึ่งการเติม fatty acid มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (58%) ของปริมาณ monoclonal titer โดยจะเติมมากกว่า 5 passages ซึ่งสรุปได้ในการค่อย ๆ เสริมสภาพของโมโนโคลนอลแอนติบอดีไปพร้อมกับ lipid inclusions cytosol ผลผลิตของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สูงขึ้นโดยการจำกัด lipid-loaded cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก fatty acid โดยผลกระทบไม่ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโต ส่วน glucose และ glutamine ไม่มีผลกระทบต่อ fatty acid ดังนั้นความเหมาะสมของความเข้มข้นของ glucose และ glutamine มีความสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับ fatty acid

Murakami และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษาและพัฒนา hybridoma line MPC11-BL ซึ่งเกิดจากเซลล์ mouse plasmacytoma cell line (MPC11TG70na3) และ mouse (BALB/c) spleen cells ในกระบวนการได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์โดยการเติม ethanolamine เป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นสำหรับ hybridoma ส่วนถ้ามีการเติม Phosphoethanolamine ต้องใช้ความเข้มข้นสูงเป็น 10 เท่าของ ethanolamine และยังคงมีการเสริมด้วย insulin, transferrin, ethanolamine และ selenium และนำมาเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัม หลังจากนั้นนำของเหลวเหนือไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ได้โปรตีนที่เป็นอิมมูโนโกลบูลินสูงถึง 95%

## 2.5 กระบวนการแยกทางเคมี

กระบวนการแยกจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการแพร่ของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส (phase) ถ้ามีสารสองชนิดที่มีอัตราส่วนการแพร่กระจายระหว่างเฟสสองเฟสต่างกัน จะทำให้สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันได้ง่าย โดยเฉพาะถ้าอัตราส่วนของการแพร่กระจายของสารทั้งสองนั้นมากกว่า  $10^3$  เท่า จะสามารถแยกสารทั้งสองออกจากกันได้โดยสามารถทำการแยกเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เช่น การตกตะกอนคลอไรด์ด้วยเงินไอออนสามารถแยกคลอไรด์ไอออน ( $\text{Cl}^-$ ) ออกจากสารละลายที่มีไอออนอื่น ๆ ปนอยู่ (Wu *et al.*, 2000) เช่น ไนเตรตไอออน ( $\text{NO}_3^-$ ) กระบวนการแยกเปอร์คลอเรต ( $\text{ClO}_4^-$ ) ทั้งนี้ เพราะอัตราส่วนที่เกิดจากการแพร่กระจายของคลอไรด์ในเฟสที่เป็นของแข็ง ( $\text{AgCl}$ ) ต่อเฟสที่เป็นของเหลว (สารละลายคลอไรด์) มีค่ามากในขณะที่ไอออนอื่นมีค่าน้อยมากเข้าใกล้ศูนย์ การแยกที่ทำได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้การแยกเพียงครั้งเดียวนั้น เรียกว่า Single-stage process (Brown *et al.*, 2002) ถ้าสารละลายแต่ละตัวมีค่าอัตราส่วนของการแพร่กระจายแตกต่างกันไม่มาก การแยกให้สมบูรณ์สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการแยกหลาย ๆ ครั้ง เรียกว่า Multi-stage process (Leedham *et al.*, 2002) กลไกที่เกิดขึ้นในกระบวนการแยก คือ เกิดการแบ่งส่วนของสารที่สนใจระหว่างเฟสสองเฟส ดังนั้น เทคนิคการแยกนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Fractionation technique (Yohannes *et al.*, 2011) ซึ่งสามารถแบ่งได้อีกหลายแบบแล้วแต่ชนิดของเฟสว่าเป็นของแข็ง ของเหลว หรือก๊าซ (ตารางที่ 2.1)

### 2.5.1 การแยกโดยการตกตะกอน (Separation by Precipitation)

การแยกโดยการตกตะกอน คือ เทคนิคของการแยกเพราะไอออนที่สนใจซึ่งอยู่ในเฟสของเหลวจะถูกทำให้กระจายมาอยู่ในเฟสของแข็งหรือตะกอนได้ โดยเพิ่มสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับเป็นตัวตกตะกอน การแยกสามารถกระทำได้ดีบริสุทธิ์มากน้อยแค่ไหนนั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างผลคูณของการละลายของตะกอนแต่ละชนิดที่จะเกิดขึ้น และความเข้มข้นของไอออนที่ตกตะกอน การแยกโดยวิธีการตกตะกอนต้องอาศัยหลักของความแตกต่างกันระหว่างค่าผลคูณของการละลายของตะกอนที่ต้องการแยกออกจากกัน ตะกอนที่มีค่าผลคูณของการละลายต่ำสามารถตกตะกอนแยกออกมาได้ก่อนตะกอนที่มีค่าผลคูณของการละลายสูง วิธีการแยกโดยการตกตะกอนเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกที่มีปริมาณมาก ๆ แต่มีข้อเสีย คือ มักเกิดปรากฏการณ์การปนเปื้อน (contamination) ของตะกอนแบบตกตะกอนร่วม (coprecipitation) (Wang *et al.*, 2002) ถึงแม้ว่าไอออนที่รบกวน (interference ion) จะมีปริมาณน้อย ๆ ก็ตาม ทำให้ตะกอนที่ได้ไม่บริสุทธิ์ การตกตะกอนเพื่อแยกสารโดยตรงอาจทำให้ได้ตะกอนที่ไม่บริสุทธิ์ จำเป็นต้องมีวิธีการช่วยทำให้ตะกอนที่ได้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถทำได้โดยควบคุม pH ของสารละลาย และเลือกตัวตกตะกอนที่เฉพาะเจาะจง

**2.5.1.1 วิธีควบคุม pH** ในการแยกแคทไอออนด้วยวิธีการตกตะกอนกับ ตัวตกตะกอนแอนไอออนจำพวก ไฮดรอกไซด์ ซัลไฟด์ ออกซาเลต ฟอสเฟต และคาร์บอเนต ทำได้ โดยการควบคุม pH ของสารละลาย ทั้งนี้เพราะแอนไอออนเหล่านี้เป็นแอนไอออนของกรดอ่อน การ ควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน หรือ pH ของสารละลายจึงมีผลทำให้สามารถควบคุมความ เข้มข้นของแอนไอออนเหล่านี้ได้ ถ้าค่าผลคูณของการละลายของโลหะต่าง ๆ ที่อยู่ในรูปของ ไฮดรอก ไซด์ ออกซาเลต ฯลฯ มีค่าต่างกันจะทำให้สามารถตกตะกอนแยกไอออนของโลหะออกมาได้ เมื่อทำ การควบคุม pH ของสารละลาย เพราะการควบคุม pH ทำให้ความเข้มข้นของตัวตะกอนเหมาะสม สำหรับการตกตะกอนไอออนของโลหะต่าง ๆ ได้ (Huang *et al.*, 2013)

**2.5.1.2 วิธีการเลือกตัวตกตะกอนที่เฉพาะเจาะจง** มีแอนไอออนหลาย ชนิดที่สามารถตกตะกอนกับไอออนของโลหะเฉพาะบางตัวเท่านั้น ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

(1) ตัวตกตะกอนอินทรีย์ แอนไอออนของสารอินทรีย์ที่ใช้ใน การตกตะกอนแยกไอออนของโลหะได้อย่างเฉพาะเจาะจง ได้แก่ คลอไรด์ และซัลเฟต เป็นต้น คลอ ไรด์สามารถตกตะกอนได้กับเงินไอออนในขณะที่ไอออนของโลหะตัวอื่น ๆ ไม่สามารถตกตะกอนได้ และซัลเฟตสามารถตกตะกอนได้กับไอออนของแบเรียม ตะกั่ว และสทรอนเซียม จึงสามารถแยกได้ (West & Conrad, 1950)

(2) ตัวตกตะกอนอินทรีย์ ได้มีการพัฒนาอย่างกว้างขวางในการใช้ สารประกอบอินทรีย์สำหรับวิเคราะห์ไอออนของโลหะที่เป็นสารอินทรีย์ ทั้งนี้เพราะสารประกอบ อินทรีย์สามารถใช้เป็นคอมเพลกซิงเอเจนต์หรือตัวตกตะกอนหรือรีเอเจนต์สำหรับทำให้เกิดสีในการ วิเคราะห์แบบเทียบสีกับไอออนของโลหะต่าง ๆ ได้ดี ทำให้การศึกษาสารประกอบอินทรีย์ที่มี คุณสมบัติดังกล่าวนี้เป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งของสาขาเคมีวิเคราะห์ สารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติ เป็นตัวตกตะกอนกับไอออนของโลหะมีหลายชนิด ซึ่งสามารถจัดเป็น 2 ประเภท คือ

(2.1) ให้ตะกอนที่มีคุณสมบัติคล้ายเกลือ สารประกอบ อินทรีย์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ที่สามารถตกตะกอนเป็นเกลือกับแคทไอออน หรือแอนไอออนของสารอินทรีย์ได้

(2.2) ให้ตะกอนที่มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ในปี ค.ศ. 1905 Tschugaeff ได้พบว่า ไตเมทิลไกลออกซิม สามารถใช้ตกตะกอนกับนิกเกิลโดยเกิด เป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้นเป็นครั้งแรก ต่อจากนั้นได้มีการพัฒนาและค้นคว้าหาสารอินทรีย์ตัวอื่น ๆ ที่สามารถตกตะกอนได้ สารประกอบออกาโนเมทัลลิกที่เกิดขึ้นต้องมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบ เชิงซ้อนที่มีลักษณะเป็นซีเลต (Chelate Compound) (Hoffman *et al.*, 1953)

ตารางที่ 2.1 การแบ่งเทคนิคและวิธีการแยกตามชนิดของเฟส

ชนิดของเฟส	ชื่อของกระบวนการวิเคราะห์	เฟสสาร ตัวอย่าง	เฟสอีกเฟสหนึ่ง
Solid-Liquid	1. Precipitation	สารละลาย	ของแข็งคือตะกอนที่เกิดขึ้น
	2. Electrodeposition	สารละลาย	ของแข็งคือโลหะที่เกาะที่ขั้ว
	3. Adsorption-Chromatography	สารละลาย	ตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง
	4. Thin-layer Chromatography	สารละลาย	ตัวดูดซับที่เป็นผงของแข็งยึดอยู่บนแผ่นกระจก
	5. Ion-exchange Chromatography	สารละลาย	ของแข็งคือ เรซิน สำหรับแลกเปลี่ยนไอออนที่มีประจุ
	1. Extraction	สารละลาย	ของเหลวที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายตัวอย่าง
Liquid-Gas	2. Paper Chromatography	สารละลาย	ตัวทำละลายที่อยู่ในกระดาษ
	3. Thin Layer Chromatography	สารละลาย	ตัวทำละลายที่อยู่ในของแข็งที่เป็นผงยึดอยู่บนแผ่นกระจก
	1. Distillation	ก๊าซ	ของเหลวที่เกิดจากการควบแน่น
Liquid-Gas	2. Gas-Liquid Chromatography	ก๊าซ	ตัวทำละลายที่ยึดอยู่กับของแข็ง
	1. Gas-Solid Chromatography	ก๊าซ	ตัวดูดซับที่เป็นของแข็ง

สารอินทรีย์ที่ทำให้เกิดตะกอนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนชนิดซีเลต ต้องมีฟังก์ชันนอลกรุปเป็นอะซิดิกกรุป (acidic group) คือ มีหมู่  $-H$  และ  $-OH$  หรือโคออร์ดิเนตติ้งกรุป (Coordinating group) คือ มีอะตอมที่มีคู่ของอิเล็กตรอนอิสระอะซิดิกกรุปและโคออร์ดิเนตติ้งกรุป ต้องอยู่ในตำแหน่งที่ทำให้เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ แล้วให้สารประกอบที่เป็นวง 5 - 6 เหลี่ยมที่เสถียร และโลหะต้องมีค่าเลขออกซิเดชัน และค่าเลขโคออร์ดิเนชัน (Oxidation number and Coordination number) ที่เหมาะสม (Ettre, 1991)

### 2.5.1.3 การศึกษาการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการแยกโดยการตกตะกอนในหัวข้อ 2.5.1 ดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้ศึกษาการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

John R. Mills และคณะ (2015) ทำการศึกษาเรื่อง การตรวจวัดอิมมูโนโกลบูลินด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีในซีรัมของมนุษย์โดยใช้ mass spectrometry ซึ่งเลือกใช้วิธีการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินซีรัมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 40% - 50% แอมโมเนียมซัลเฟต โดยตะกอนที่ได้นั้นสามารถนำมาละลายได้อีกครั้งและนำไปตรวจวัดโดยใช้ mass spectrometry

Mariam และคณะ (2015) ทำการศึกษาเรื่อง การทำบริสุทธิ์โพลีโคลนอล IgG ของกระต่าย โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและวิธี mixed-mode chromatography ซึ่งเลือกใช้วิธีการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินที่อยู่ในของเหลวเหนือตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 40% แอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ได้ polyclonal IgG ที่ความเข้มข้น 7.8 mg/ml และสามารถตกตะกอนอัลบูมินได้ถึง 72% และทำบริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ SepFast™ MM AH-1 column chromatography สุดท้ายใช้วิธี ELISA ในการแสดงผล antigenicity ของตัวอย่างหลังจากการทำบริสุทธิ์

Sadeq Eivazi และคณะ (2015) ทำการศึกษาเรื่อง การผลิตและการทำบริสุทธิ์ของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถต้าน IgG2b ที่บริสุทธิ์ของหนูที่อยู่ในกระต่ายเพื่อออกแบบชุดทดสอบการแยกโมโนโคลนอลของหนู ซึ่งเลือกใช้วิธีการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินที่อยู่ในซีรัมของกระต่ายด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50% แอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากนั้น dialysis โดยใช้ tris-phosphate buffer (pH: 8.1) และใช้ ion exchange chromatography column ในการทำบริสุทธิ์ anti-mouse IgG2b

Yury kit และคณะ (2015) ทำการศึกษาเรื่อง การทำบริสุทธิ์ IgG ที่มีอยู่ในกระบวนการในกิจกรรมของเอนไซม์ sialidase ที่ได้จากซีรัมในเลือดของมนุษย์โดยใช้สองขั้นตอนของโครมาโทกราฟี ซึ่งเลือกใช้วิธีการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลินที่อยู่ในเลือดของผู้ป่วยโรคโรคพุ่มพวงหรือโรคแพ้ภูมิตัวเอง (Systemic lupus erythematosus, SLE) ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50% แอมโมเนียมซัลเฟต และทำบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีซึ่งใช้คอลัมน์ที่เป็น protein G-Sepharose

## 2.5.2 การแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี (Separation by Chromatography)

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคและวิธีการแยกอีกแบบหนึ่งที่นิยมใช้กันกว้างขวางมากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นเทคนิคในการทำให้สารละลายเข้มข้นมากขึ้น โดยสามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณและในการแสดงเอกลักษณ์ (identification) หรือวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ด้วย โครมาโทกราฟี คือ การทำให้ส่วนผสมของสารตัวอย่างแยกตัวออกจากกันเป็นโซนหรือแบ่งเป็นตอน ๆ ซึ่งเกิดขึ้นได้จากการกระจายของสารตัวอย่างระหว่างเฟสสองเฟส ซึ่งเฟสหนึ่ง คือ เฟสที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) อีกเฟสหนึ่ง คือ เฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) การเคลื่อนที่ของเฟสที่เคลื่อนที่ได้จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารผสมแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างแตกต่างกัน จึงทำให้สารผสมแยกออกจากกันเป็นตอน ๆ หรือเป็นโซนได้ กระบวนการที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่แยกออกจากกันได้โดยมีตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ได้เป็นตัวพาเรียกว่า อีลูชัน (elution) หรือการอีลูท ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวพาตัวถูกละลายนั้นจะถูกเรียกว่าตัวอีลูท (eluent) และตัวถูกละลายซึ่งถูกอีลูทจะเรียกว่า อีลูเอท (eluate) (Giddings, 1991) เหตุที่เรียกการวิเคราะห์นี้ว่าโครมาโทกราฟี เพราะผู้ค้นพบกรรมวิธีการวิเคราะห์แบบนี้เป็นคนแรกได้พบว่าการแยกที่ทำให้เกิดเป็นโซนหรือเป็นตอน ๆ นั้นให้โซนที่มีสี จึงตั้งชื่อวิธีการวิเคราะห์ว่า โครมาโทกราฟี (Chromatography) ซึ่งมาจากภาษากรีกที่แปลว่า “สีและการเขียน” (color and to write) คำว่าโครมาโทกราฟีจึงถูกใช้มาโดยตลอดสำหรับการวิเคราะห์ที่มีกรรมวิธีดังกล่าว ถึงแม้ว่าจะได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการใหม่ ๆ ขึ้นมาโดยที่วิธีวิเคราะห์นั้นไม่ได้ให้โซนที่มีสีก็ตาม (Ganetsos & Barker, 1992)

### 2.5.2.1 การแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี

เฟสเคลื่อนที่ได้ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ ของเหลวและก๊าซ ดังนั้นวิธีโครมาโทกราฟีจึงแบ่งออกเป็น 2 แขนง ดังนี้

(1) ก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) ประกอบด้วยเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ 2 วิธี คือ วิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสอยู่กับที่เรียกว่า gas-liquid chromatography (GLC) เฟสที่เขียนขึ้นก่อนหมายถึงเฟสที่เคลื่อนที่ได้ ส่วนเฟสที่เขียนตามมาทีหลังหมายถึงเฟสที่อยู่กับที่ และวิธีที่ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เรียกว่า gas-solid chromatography (GSC) (Saint Flour & Papirer, 1983)

(2) ลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid Chromatography) เป็นวิธีโครมาโทกราฟีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Snyder *et al.*, 2011) สามารถแบ่งได้อีกหลายวิธีขึ้นอยู่กับเทคนิคของการทำโครมาโทกราฟี คือ

(2.1) การทำโครมาโทกราฟีแบบแผ่น ที่เรียกว่า plane chromatography ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว เรียกว่า Liquid-Liquid Chromatography (LLC) ตัวอย่าง เช่น การทำ Paper Chromatography (PC) หรือ Thin Layer Chromatography (TLC) บางชนิด ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง เรียกว่า Liquid-Solid Chromatography (LSC) ตัวอย่าง เช่น การทำ Thin Layer Chromatography

(2.2) การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography) การทำโครมาโทกราฟีแบบนี้เป็นที่รู้จักกันดี และนำมาใช้กันทั่วไป สามารถใช้ได้กับเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว เรียกว่า LLC หรือที่เป็นของแข็ง เรียกว่า LSC

(2.3) ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ เช่น เรซิน จะทำให้เกิดเทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่า ion exchange chromatography

(2.4) ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งที่ไม่สามารถเกิดการดูดซับหรือแบ่งส่วนหรือแลกเปลี่ยนไอออน แต่เป็นสารที่สามารถกีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสาร ตัวอย่าง เนื่องจากมีรูพรุนให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปได้จะเรียกเทคนิคของการวิเคราะห์นี้ว่า เอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟี (exclusion Chromatography)

### 2.5.3 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ

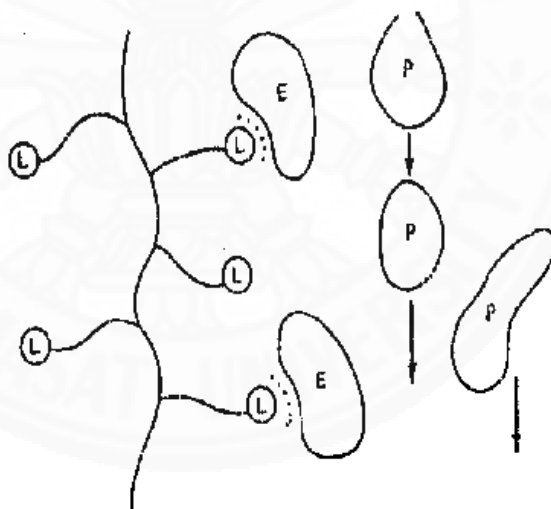
โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography) ถูกพัฒนาขึ้นในระหว่างปี ค.ศ. 1960 -1970 โดยสารที่จำเพาะกับโปรตีนหรือสารที่ต้องการแยกเกิดการยึดจับกันไว้ด้วยแรงดึงดูดใด ๆ สารอื่นที่ไม่จำเพาะจะจอย่อมเคลื่อนที่ผ่านลงมาตามคอลัมน์ คงเหลือแต่สารที่ต้องการแยกอยู่ภายในคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการไล่สารที่ต้องการแยกออกมาในภายหลัง (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971)

**2.5.3.1 หลักการของโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ** ประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนที่ต้องการ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารจำเพาะที่เรียกว่า ลิแกนด์ (biospecific ligand ; L) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้ติดอยู่บนเฟสคงที่ (stationary phase) ด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยเฟสคงที่นี้สามารถเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เมทริกซ์ (matrix) กลุ่มของลิแกนด์ที่ยึดติดกับเมทริกซ์นี้เรียกว่า ลิแกนด์ตรึง (immobilized ligand) (Teng *et al.*, 2000) ซึ่งมีความจำเพาะในการจับกับสารที่สนใจที่ต้องการจะแยก (S) หลังจากที่จะไล่สารอื่นที่ไม่จำเพาะกับลิแกนด์ออกไปหมดจากคอลัมน์แล้ว จากนั้นจึงทำการปรับสภาวะเพื่อให้สารที่สนใจหลุดออกจากการยึดจับโดยลิแกนด์ (ภาพที่ 2.13 และภาพที่ 2.14) ตามลำดับ

**2.5.3.2 เมทริกซ์ (Matrix) เมทริกซ์** เป็นส่วนของโครงสร้างที่ใช้ในการยึดจับของลิแกนด์หรือทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำจุนของเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

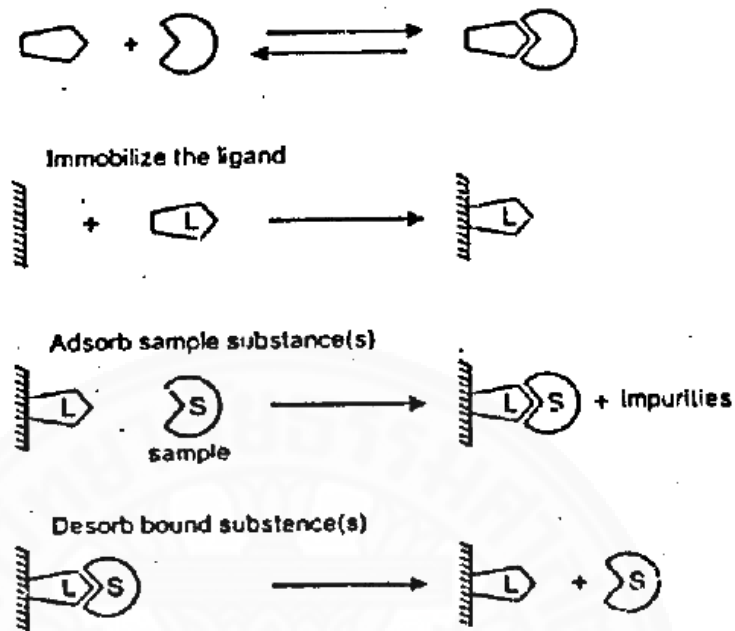
- (1) มีส่วนเปิดและโครงสร้างเป็นโครงร่างตาข่ายที่มีความพรุน
- (2) มีลักษณะเป็นของแข็ง ทรงกลม
- (3) เนื้อยต่อการทำปฏิกิริยาทั้งทางเคมีและชีวภาพ
- (4) มีความจำเพาะในการจับกับลิแกนด์
- (5) ส่งเสริมให้ลิแกนด์ตรึงมีความเสถียรสูงมากขึ้น

ตัวอย่างของเมทริกซ์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน เช่น agarose, cellulose, dextran และ polyacrylamide (Cuatrecasas, 1970) ดังนั้นจึงขอยกตัวอย่างของ agarose gel ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่นิยมใช้กันอย่างมาก มีลักษณะโครงสร้างเป็นโพลีแซคคาไรด์สายตรงของหน่วยย่อยกาแลคโตส โครงสร้างของ agarose นั้นเกิดขึ้นจากการเชื่อมโยงไขว้กันของ D-galactopyranose เชื่อมเข้ากับ 3,6 - anhydro-L-galactopyranose ที่ตำแหน่ง 2, 4 linked (ภาพที่ 2.15)

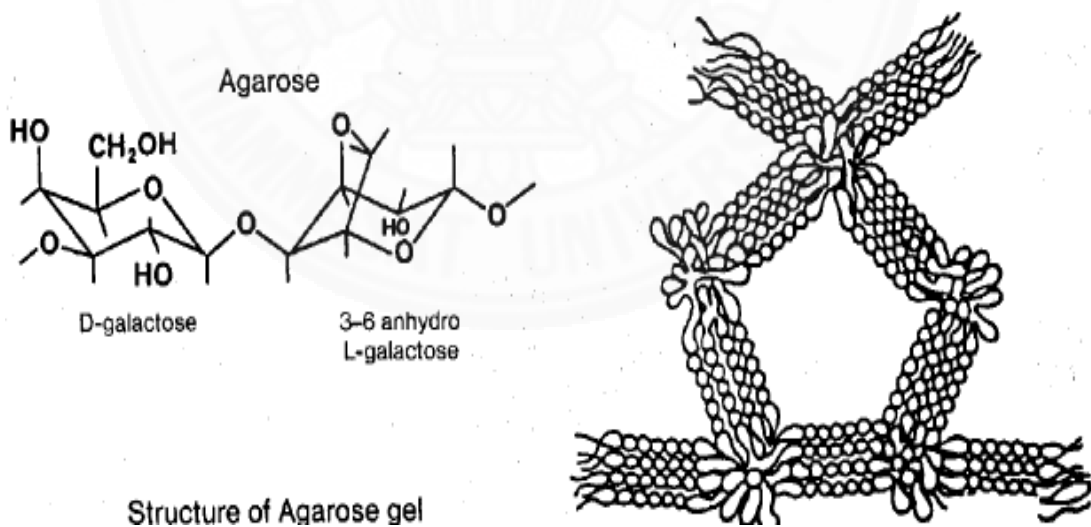


**ภาพที่ 2.13** การจับกันระหว่างลิแกนด์ (L) และเอนไซม์ที่สนใจ (E) โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (Scopes *et al.*, 1988)





ภาพที่ 2.14 หลักการของโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ แสดงการจับกันระหว่างสารที่สนใจ (S) กับ ลิแกนด์ (L) ในขณะที่อยู่ในคอลัมน์ (Johnsson *et al.*, 1991)



ภาพที่ 2.15 โครงสร้างของ agarose gel (Fatin-Rouge *et al.*, 2004)

**2.5.3.3 ลิแกนด์** ลิแกนด์เป็นส่วนสำคัญที่สุด เพราะเป็นส่วนที่จำเพาะกับสารที่สนใจต้องการแยก (Novick & Rubinstein, 2012) มีคุณสมบัติที่สำคัญดังต่อไปนี้

(1) มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการแยกโดยไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของสารตัวอย่างที่สนใจในขณะที่เกิดแรงดึงดูดกัน

(2) สามารถเลือกสภาวะในการทำให้สารตัวอย่างที่สนใจหลุดออกจากลิแกนด์ได้ง่าย

(3) สามารถนำเอาลิแกนด์ตรึงกลับมาใช้งานใหม่ได้อีกครั้ง

(4) การยึดจับกับเมทริกซ์ต้องกระทำได้ง่ายและไม่มีผลต่อโครงสร้างของเมทริกซ์

**2.5.3.4 Spacer arm** เนื่องจากบริเวณที่ว่องไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยา (active sites) ของสารชีวภาพมักอยู่ในตำแหน่งที่ไม่ง่ายหรือไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำปฏิกิริยา นอกจากนี้การเกิดแรงกระทำระหว่างเมทริกซ์และลิแกนด์อาจเกิดได้ไม่ดีพอหรือมีความจำเพาะต่ำ เช่น การจับกันระหว่างโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์กับเมทริกซ์ Sepharose 4B มีแรงยึดจับค่อนข้างต่ำ จึงหลุดออกจากกันได้ง่าย จากเหตุผลดังกล่าวจึงใช้ตัวเชื่อมที่เรียกว่า Spacer arm มาช่วยในการยึดจับกันระหว่างเมทริกซ์และลิแกนด์ให้ดียิ่งขึ้น และช่วยในการเพิ่มพื้นที่หรือโอกาสในการจับสารตัวอย่างที่สนใจในบริเวณที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาของสารชีวภาพได้มากขึ้น (O'Carra *et al.*, 1974) แสดงลักษณะการจับระหว่างลิแกนด์และเมทริกซ์โดยตรง และแบบมี spacer arm เชื่อมโดยใช้คุณสมบัติของ spacer arm มีดังต่อไปนี้

(1) ปลายด้านหนึ่งสามารถเกิดแรงกระทำในการยึดจับกับเมทริกซ์ได้ดี ในขณะที่ปลายอีกด้านหนึ่งต้องมีความจำเพาะเจาะจงในการจับกับลิแกนด์

(2) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่สนใจต้องการแยก

(3) ความยาวต้องเหมาะสม เพราะมีผลต่อแรงไฮโดรโฟบิกระหว่างสารที่สนใจต้องการแยกกับลิแกนด์ ทำให้ความจำเพาะเจาะจงในการจับกับสารตัวอย่างต่ำลง ถ้า spacer arm ยาวมากเกินไปส่งผลทำให้เกิดการหลุดของ spacer arm จากลิแกนด์และเมทริกซ์ในระหว่างที่มีการชะสารที่ต้องการแยกได้

**2.5.3.5 การเชื่อมลิแกนด์เข้ากับเมทริกซ์** ปฏิบัติการเคมีที่ใช้ในการกระตุ้นบริเวณเมทริกซ์ให้มีความพร้อมที่รับเอาลิแกนด์ หรือ spacer arm มาจับโดยอาศัยหมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนลิแกนด์ตรึงเป็นหลัก (ภาพที่ 2.16)

**2.5.3.6 การประยุกต์ใช้งาน** การนำเอาเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะไปใช้งานในด้านต่าง ๆ โดยจำเป็นต้องมีขั้นตอนในการเลือกสถานะให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการแยกของสารที่สนใจสูงสุด และลักษณะงานที่นิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

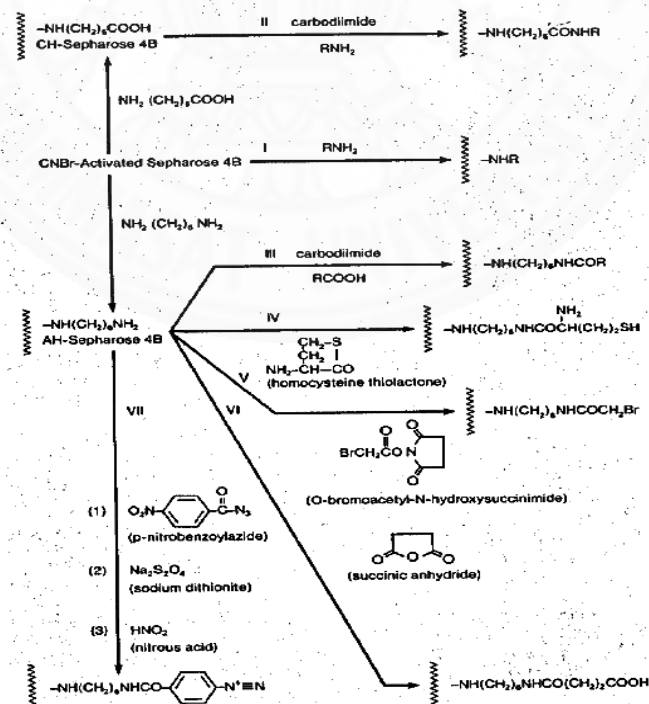
(1) การแยกโปรตีนหรือเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ตัวอย่างเช่น การทำเอนไซม์ horseradish peroxidase ให้บริสุทธิ์นั้น (Towbin *et al.*, 1979) เป็นการแยกสารที่สนใจผ่านเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (Gel filtration) ก่อน จากนั้นจึงแยกเก็บส่วนที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูงมาผ่านโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะจึงทำให้ได้เอนไซม์ที่สนใจต้องการแยกมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

(2) สามารถใช้ในการแยกกรดนิวคลีอิก (Ghislain & Fish, 1996)

(3) สามารถใช้ในการแยกพลาสมาโปรตีน (Burnouf & Radosevich, 2001)

(4) สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์สาร โดยเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีหรือระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (Ferreira *et al.*, 2008)

(5) สามารถใช้ในการแยกเซลล์ (Kumar & Srivastava, 2010)



ภาพที่ 2.16 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อระหว่างลิแกนด์และเมทริกซ์ (Fatin-Rouge *et al.*, 2004)

## 2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

อาศัยการเกิดปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของแอนติบอดีและแอนติเจนซึ่งใช้เอนไซม์ เช่น เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) หรือ เอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งเอนไซม์เป็นตัวตรวจวัดปฏิกิริยาสามารถทำให้เห็นสีที่เกิดขึ้น เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งแสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นนั้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณของแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Engvall & Perlmann, 1971)

### 2.6.1 หลักการของวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

อาศัยหลักการของแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่มีอยู่ในตัวอย่างโดยเกาะอยู่บน solid phase เช่น cellulose, polyacrylamide, nylon, polystyrene, polyvinyl หรือ polypropylene โดย solid phase เหล่านี้อาจจะอยู่ในรูปของ tube bead หรือ microplate เป็นต้น ซึ่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนนี้จะต้องมีการแยกเอาสารส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกไป จึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง เอนไซม์ที่นิยมใช้ในการทำ ELISA คือ Horseradish peroxidase (สารตั้งต้นที่นิยม คือ O-phenylene diamine ให้สีน้ำตาล), alkaline phosphatase (สารตั้งต้นที่นิยมคือ p-nitrophenyl phosphate ให้สีเหลือง) เป็นต้น (Gan & Patel, 2013)

### 2.6.2 ชนิดของ ELISA

#### 2.6.2.1 Direct method

หลักการของการทดสอบโดยวิธี direct ELISA คือ การเคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่าง เมื่อเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดี หลังจากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยากันออก และเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของตัวอย่างที่ต้องการตรวจเช่นกันและได้ติดฉลากแอนติบอดีนี้ด้วยเอนไซม์แล้ว โดยใส่ลงไปปริมาณที่มากเกินไป conjugate นี้จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวแรก เมื่อทำการล้าง conjugate ส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้วนั้น จากนั้นจึงเติมสารตั้งต้นลงไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างที่ต้องการตรวจหา โดยวิธีการทดสอบนี้อาจเรียกอีกอย่างว่า double antibody sandwich assay technique หรือ sandwich assay (Bauer *et al.*, 2014)

### 2.6.2.2 Indirect method

เป็นวิธีการสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่าง ๆ โดยมีหลักการคือ แอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่ติดอยู่กับพื้นผิวของ solid phase และใช้ anti-human immunoglobulin ซึ่งจะติดฉลาก (conjugate) ด้วยเอนไซม์ (enzyme-labelled detector antibody) หรืออาจจะใช้ anti-human immunoglobulin ที่ไม่ได้ติดฉลากเป็น detector antibody จากนั้นตามด้วย enzyme-labeled anti-detector antibody เข้าทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่อยู่ในตัวอย่างที่ต้องการตรวจหา นั้น การย่อย substrate จะมากขึ้นหรือขึ้นอยู่กับปริมาณของแอนติบอดีในตัวอย่างนั้น ๆ (Ackekman *et al.*, 1981)

### 2.6.2.3 Competitive method

(1) วิธีการนี้สามารถตรวจหาแอนติบอดีสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

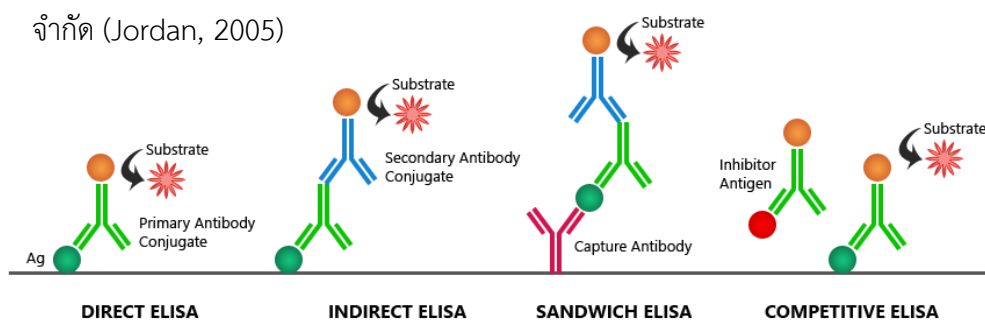
(1.1) เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในปริมาณที่แน่นอนลงไปและใส่ตัวอย่างที่คาดว่าจะมีแอนติบอดีอยู่ลงไป โดยให้แย่งกันจับแอนติเจนที่อยู่ solid phase

(1.2) เคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดี หลังจากนั้นจะเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป พร้อมกับตัวอย่างที่คาดว่าจะมีแอนติบอดีอยู่ลงไปให้แอนติบอดีทั้งสองแย่งกันจับกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และมีปริมาณจำกัดที่เติมลงไปนั้น

(2) วิธีการนี้สามารถตรวจหาแอนติเจนสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

(2.1) เคลือบ solid phase ด้วยแอนติบอดี หลังจากนั้นจะเติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ปริมาณแน่นอนลงไปพร้อมกับตัวอย่างที่คาดว่าจะมีแอนติเจนอยู่ลงไป ให้แย่งกันจับกับแอนติบอดีที่อยู่ solid phase

(2.2) เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน หลังจากนั้นจะเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ไปพร้อมกับตัวอย่างที่คาดว่าจะมีแอนติเจนอยู่ลงไป โดยให้แอนติเจนทั้งสองแย่งกันจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์และเติมลงไปปริมาณที่จำกัด (Jordan, 2005)



ภาพที่ 2.17 ชนิดของวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ที่มา: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>

### บทที่ 3 วิธีการวิจัย

#### 3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC<sup>®</sup> HB-112<sup>™</sup>) และการเพิ่มจำนวนเซลล์

##### 3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC<sup>®</sup> HB-112<sup>™</sup>) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum)

ละลายเซลล์ D1-4G2-4-15 อย่างรวดเร็วในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเซลล์ D1-4G2-4-15 ถูกเลี้ยงในงานหลุม 6 หลุม (6 well) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม หลุมละ 4 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ตารางที่ ก.2.2.1 และ ภาพผนวกที่ จ.1) โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่า  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 1 หลุม ซึ่งนับโดยใช้ Neubauer hemocytometer แสดงดังข้อที่ 3.1.3 จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5% เป็นเวลา 3 - 5 วัน เมื่อผ่านไปวันที่ 1 จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาพผนวกที่ จ.4) พร้อมทั้งสังเกตลักษณะของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ OLYMPUS รุ่น CKX 41 (ภาพผนวกที่ จ.6) เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Exponential phase) ย้ายเซลล์ไปยังหลุมใหม่ (subculture) โดยใช้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นที่มากกว่า  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 1 หลุมและต้องมีการ subculture ทุก ๆ 5 วันเป็นจำนวนอย่างน้อย 3-5 ครั้ง (passage) เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีความแข็งแรงพร้อมสำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

##### 3.1.2 การเพิ่มจำนวนเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC<sup>®</sup> HB-112<sup>™</sup>) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (Fetal bovine serum)

นำเซลล์ที่ผ่านการ subculture อย่างน้อย 3-5 passage จากข้อ 3.1.2 มาเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยวิธีการ subculture ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ (flask) ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (T75 cell culture flask) จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5% เป็นเวลา 3 - 5 วัน พร้อมทั้งสังเกตลักษณะของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับและสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้น subculture เซลล์ลงในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ขนาด 162 ตารางเซนติเมตร (T162 cell culture flask) ตามลำดับ โดยนำเซลล์จาก T75 cell culture flask ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

หลังจากนั้นล้างตะกอนด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว และใส่ลงใน T162 cell culture flask นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 5% เป็นเวลา 5 วัน หรือจนได้ปริมาณเซลล์มากกว่า  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเซลล์ที่ได้นั้นต้องมีลักษณะของเซลล์ที่ความแข็งแรง และรูปร่างของเซลล์สมบูรณ์พร้อมใช้งาน ซึ่งสามารถนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Neubauer hemocytometer แสดงดังข้อที่ 3.1.3

### 3.1.3 การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Neubauer hemocytometer

(1) นำเซลล์ที่เจริญเติบโตอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ซึ่งทำการกระจายเซลล์โดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นและลง จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tubes, eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

(2) ปิเปตต์สารละลายทริฟแพนบลู (0.4% Trypan Blue) ลงไปผสมกับสารแขวนลอยเซลล์ตามอัตราส่วนที่ต้องการเจือจางในการนับเซลล์

(3) ปิเปตต์สารแขวนลอยเซลล์ที่ย้อมด้วยสีทริฟแพนบลูแล้วปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบน Neubauer hemocytometer โดยให้สารแขวนลอยเซลล์ที่ย้อมสีเคลื่อนที่ภายใต้แผ่นกระจกด้วยแรงการดูดซึมตามรูเล็กจนเต็มพอดีช่องใส่เซลล์ในสไลด์ (ไม่ควรให้ปริมาณสารแขวนลอยเซลล์มากเกินไปหรือน้อยเกินไป) จากนั้นวางสไลด์สำหรับนับเซลล์ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที

(4) นำสไลด์สำหรับนับเซลล์วางบนแท่นสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 4X เพื่อหาดารางสำหรับนับเซลล์และเลื่อนไปยังบริเวณดารางสี่เหลี่ยมบริเวณมุม ที่มีพื้นที่ดาราง 1 มิลลิเมตร และมีดารางย่อย 16 ดาราง จากนั้นนับเซลล์ด้วยเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10X หรือ 20X

(5) นับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี (สีน้ำเงินเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว) และเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสี (วาวสะท้อนแสงเป็นเซลล์ที่มีชีวิต) ทั้งหมดในดารางสี่เหลี่ยมบริเวณมุมทั้งสี่มุมของดารางทั้งสองด้าน เพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ที่นับได้ในหลอดข้อที่ (1) วิธีคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต (% viability) แสดงดังสมการต่อไปนี้ (Schrek, 1936)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

โดยที่ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้  $\times$  ค่าการเจือจาง  $\times 10^4$

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด = ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ตายที่นับได้  $\times$  ค่าการเจือจาง  $\times 10^4$

จำนวนเซลล์ทั้งหมด = จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต + จำนวนเซลล์ตาย

### 3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมที่ใช้ในงานวิจัยมี 2 ชนิด คือ CD Hybridoma Medium (Gibco) (ภาพผนวกที่ จ.9) และ Hybridoma-SFM medium (Gibco) (ภาพผนวกที่ จ.10) และแบ่งวิธีเลี้ยงเซลล์เป็น 2 วิธี คือ Direct adaptation และ Sequential adaptation

#### 3.2.1 วิธี Direct adaptation

นับเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่ถูกเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัว โดยใช้เซลล์ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นอย่างน้อย  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ทิ้งของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) และล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma Medium หรือ Hybridoma-SFM medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม 2 ครั้ง มาเลี้ยงต่อในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 162 ตารางเซนติเมตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมอยู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้เซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) 5% เป็นเวลา 3 - 5 วัน และต้องมีการ subculture ทุก ๆ 3 - 5 วัน เป็นจำนวน 3 passage และเก็บของเหลวเหนือตะกอนทุกครั้งที่มีการ subculture เมื่อครบ 3 passage ปล่อยให้เซลล์ตายประมาณ 80% นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บของเหลวเหนือตะกอนทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2.2 วิธี Sequential adaptation

นำเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่ถูกเลี้ยงอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมตัวอ่อนลูกวัว ที่ผ่านการ subculture มาแล้วอย่างน้อย 3 - 5 passage มาทำการ subculture อีกครั้ง โดยเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัว เป็นอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัวต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม คือ 75:25 (passage 1) นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) 5% เป็นเวลา 3-5 วัน และต้องมีเก็บของเหลวเหนือตะกอนทุกครั้งที่มีการ subculture ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการ subculture โดยปรับอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัวต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมเป็น 50:50 (passage 2), 25:75 (passage 3) และ 0:100 (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมเป็น passage 4) ตามลำดับ (Van der Valk *et al.*, 2010)



### 3.3 การเก็บเซลล์ D1-4G2-4-15 ในไนโตรเจนเหลว

#### 3.3.1 การเก็บเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัวในไนโตรเจนเหลว

เตรียม freezing medium (90% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว และ 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO)) จากนั้นนับเซลล์ที่ต้องการจะเก็บให้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย  $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือเป็นเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า 90% จากนั้นนำเซลล์ใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เทอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แยกชั้นกันระหว่างตะกอนเซลล์ทิ้ง ละลายตะกอนโดยใส่ freezing medium และแบ่งใส่หลอด cryovial หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนจะนำเก็บใส่ถังไนโตรเจนเหลว (Nagahara *et al.*, 2016)

#### 3.3.2 การเก็บเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมของตัวอ่อนลูกวัวในไนโตรเจนเหลว

เตรียม freezing medium (92.5% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (ในอัตราส่วน 50:50 ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมที่เตรียมใหม่ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมเดิมที่ใช้เลี้ยงเซลล์) และ 7.5% DMSO) จากนั้นนับเซลล์ที่ต้องการจะเก็บให้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย  $0.5 \times 10^7$  -  $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือเป็นเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า 90% นำเซลล์ใส่หลอดเซนติฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา แล้วเทอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แยกชั้นกันระหว่างตะกอนเซลล์ทิ้ง ละลายตะกอนโดยใช้ freezing medium และแบ่งใส่หลอด cryovial หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนจะนำเก็บใส่ถังไนโตรเจนเหลว

### 3.4 ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15) ต่อแอนติเจน

เคลือบหลุมของถาด 96 หลุม (96-Well Plates) ด้วย Goat anti-Mouse IgG ที่ค่าการเจือจางในอัตราส่วน 1:400 ที่เตรียมใน 6 mM carbonate buffer, pH 9.0±0.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และล้างด้วย 0.5% BSA ใน 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 ต่อจากนั้นเติม 1% BSA ใน 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติมของเหลวเหนือตะกอน ที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของการเจือจางต่าง ๆ ดังนี้ ไม่เจือจาง, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 และ 1:3125 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอนติเจน (*Dengue virus type1*) ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของการเจือจาง 1:2 โดยเจือจางใน 0.5% BSA ที่ผสมอยู่ใน 20% NHS (acetone extracted) และ 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และเติม Human anti-flavivirus IgG-HRP โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ 0.5% BSA ที่ผสมอยู่ใน 20% NHS (acetone extracted) และ 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้นเติม o-phenylenediamine (OPD) หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ภาพผนวกที่ จ.15) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 30±15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2M sulfuric acid (ภาพผนวกที่ จ.16) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

### 3.5 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว

นำของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมที่มี Anti-flavivirus group monoclonal antibody ค่อย ๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัวในอัตราส่วน 1:1 จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50% แอมโมเนียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งกวนตลอดเวลาและทิ้งไว้ (ภาคผนวก ข 2.1 และ ภาพผนวกที่ จ.17) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง และละลายตะกอนด้วย 10 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 ปริมาตร 30-50% ของปริมาตรของเหลวเหนือตะกอนเริ่มต้น (Sambrook & Russel, 2001)

### 3.6 การทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟี

#### 3.6.1 Econo-Pac Serum IgG Purification Kit (Bio-Rad)

การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีโดยใช้ Econo-Pac Serum IgG Purification Kit ซึ่งประกอบไปด้วย 2 คอลัมน์ คือ

- (1) Econo - Pac 10 DG desalting column ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่าง
- (2) Econo - Pac Serum IgG Purification column โดยคอลัมน์จะถูกแพค (pack) ด้วย DEAE Affi-Gel Blue column

#### 3.6.2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Econo-Pac Serum IgG Purification Kit

##### 3.6.2.1 การเตรียมตัวอย่างโดยใช้ Econo-Pac 10 DG desalting column

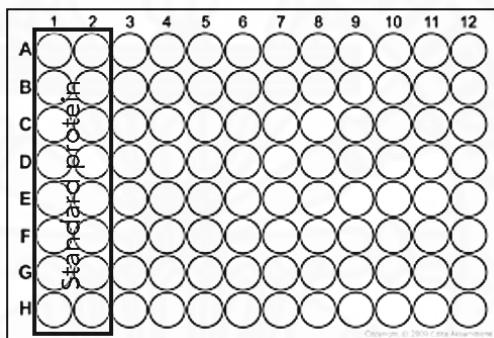
ก่อนใช้คอลัมน์ต้องทำให้คอลัมน์มีความสมดุลพร้อมสำหรับใช้งาน โดยการเติม application buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 3.1) ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำตะกอนที่ละลายด้วย 10 mM PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และชะด้วย 4 มิลลิลิตร ของ application buffer ทำให้ได้ 1 fraction ที่ไม่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปะปนกับตัวอย่างที่ต้องการ แยกซึ่งสามารถทดสอบปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลืออยู่ได้ด้วย Nessler's reagent ซึ่งการเตรียม Nessler's reagent (ภาคผนวก ข 2.2)

##### 3.6.2.2 การทำบริสุทธิ์ IgG โดยใช้ Econo-Pac Serum IgG Purification column

ก่อนใช้คอลัมน์ต้องทำให้คอลัมน์มีความสมดุลพร้อมสำหรับใช้งาน โดยการเติม regeneration buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 3.2) ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำ fraction ที่มีปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งได้จากการกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยคอลัมน์ Econo-Pac 10DG column ใส่ลงในคอลัมน์ Econo-Pac Serum IgG Purification column (BioRad) ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นชะด้วย application buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเก็บ 4 มิลลิลิตรต่อ fraction โดย 1 รอบของการทำบริสุทธิ์จะได้ทั้งหมด 5 fraction จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย regeneration buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำแต่ละ fraction ที่ได้ไปวัดปริมาณโปรตีน

### 3.7 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของตัวอย่างที่ได้จากการการทำบริสุทธิ์ IgG โดยใช้ Econo-Pac Serum IgG Purification column วัดโดยใช้วิธี Bradford assay (Bradford, 1976) (ภาพผนวกที่ จ.18) โดยใช้ Bovine serum albumin (SIGMA, USA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน การเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานที่ 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 และ 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับลงใน 96 well plate (ภาพที่ 3.1) จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ และใส่ใน 96 well plate ปริมาตร 160 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม และ dye reagent concentrate ปริมาตร 40 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่ควรไว้นานเกิน 1 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้โปรแกรม SOFTmax PRO 4.3.1 LS



ภาพที่ 3.1 รูปแบบของการเตรียมความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานลงใน 96 well plate

### 3.8 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน

#### 3.8.1 การทดสอบการเลือกบัพเฟอร์ (blocking) สำหรับนำมาใช้วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA

บัพเฟอร์ที่เลือกนำมาทดสอบทั้งหมดมี 3 ชนิด คือ

- (1) 13.5% Normal Human Serum
- (2) 5% Skim milk + 1% Tween20 ใน 10 mM PBS ที่ pH 7.4±0.1
- (3) 0.5% Casein + 0.5% BSA ใน 10 mM PBS ที่ pH 7.4±0.1

การเตรียมสารสำหรับทำ ELISA (ภาคผนวก ข 1) จากนั้นเคลือบหลุมของถาด 96 หลุม (96-Well Plates) ด้วย Goat anti-Mouse IgG ที่เตรียมใน 18 mM carbonate buffer, pH 9.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน และล้างด้วย 10 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 ต่อจากนั้น block ด้วย บัฟเฟอร์ที่ต้องการนำมาทดสอบ ทั้งสามชนิด ล้างถาดหลุมจากนั้นใส่ Mouse IgG ที่ความเข้มข้น 0, 0.015, 0.031, 0.062, 0.12, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ล้างถาดหลุมและใส่ Goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (1: 10000) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างถาดหลุมอีกครั้งและใส่ SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) (KPL, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยเติม 0.2 M sulfuric acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุมนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

### 3.8.2 การทดสอบความเข้มข้นของ Goat anti-mouse IgG-HRP (conjugate) สำหรับนำมาใช้วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA

เคลือบหลุมของถาด 96 หลุม (96-Well Plates) ด้วย Goat anti-Mouse IgG ที่เตรียมใน 18 mM carbonate buffer, pH 9.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน และล้างด้วย 10 mM PBS, pH 7.4 ต่อจากนั้น block ด้วย บัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ในข้อ 3.6.1 ล้างถาดหลุมจากนั้นใส่ Mouse IgG ที่ความเข้มข้น 0, 0.015, 0.031, 0.062, 0.12, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ล้างถาดหลุมและใส่ Goat anti-mouse IgG-HRP (conjugate) ตามอัตราส่วนความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:3500, 1:4000, 1:4500, 1:6000, 1:8000, 1:10000, 1:20000, 1:30000 และ 1:40000 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างถาดหลุมอีกครั้งและใส่ SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) (KPL, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M sulfuric acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

### 3.8.3 วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA

วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA ซึ่งเคลือบหลุมของถาด 96 หลุม (96-Well Plates) ด้วย Goat anti-Mouse IgG ที่เตรียมใน 18 mM carbonate buffer, pH 9.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคิน ล้างด้วย 10 mM PBS, pH 7.4 ต่อจากนั้น block ด้วย 5% skimmed milk, 1% Tween 20 ที่เตรียมใน 10 mM PBS ล้างถาดหลุม จากนั้นใส่ตัวอย่างที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ลงในแต่ละหลุม และใช้ Mouse IgG เป็นโปรตีนมาตรฐาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ล้างถาดหลุม และใส่ Goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (1:10000) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างถาดหลุมอีกครั้ง และใส่ SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) (KPL, USA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

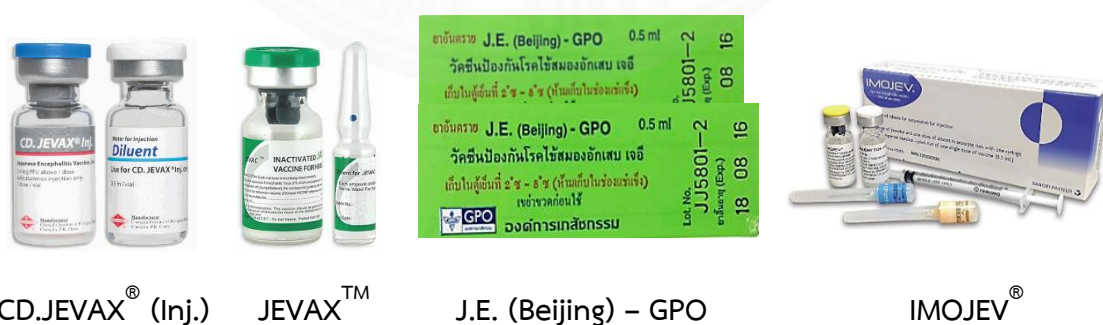
### 3.9 ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน

#### 3.9.1 ทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอนติเจน

การทดสอบความสามารถของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับแอนติเจนโดยวิธี typing ELISA ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทางทหาร (Innis *et al.*, 1989) (ภาพผนวกที่ จ. 19) เคลือบหลุมของถาด 96 หลุม (96-Well Plates) ด้วย Goat anti-Mouse IgG ที่ค่าการเจือจางในอัตราส่วน 1:400 ที่เตรียมใน 6 mM carbonate buffer, pH 9.0±0.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคิน และล้างด้วย 0.5% BSA ใน 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 ต่อจากนั้นเติม 1% BSA ใน 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากข้อ 3.4.2 ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของการเจือจางต่าง ๆ ดังนี้ 1:10, 1:100 และ 1:1000 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอนติเจน (*Dengue virus type 1*) ที่ความเข้มข้นของการเจือจาง 1:2 โดยเจือจางใน 0.5% BSA ที่ผสมอยู่ใน 20% NHS (acetone extracted) และ 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคิน และเติม Human anti-flavivirus IgG-HRP โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ 0.5% BSA ที่ผสมอยู่ใน 20% NHS (acetone extracted) และ 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม o-phenylenediamine (OPD) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 30±15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2M sulfuric acid นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

### 3.9.2 ทดสอบความจำเพาะของ ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน

เคลือบหลุมของถาด 96 หลุม (96-Well Plates) ด้วย Goat anti-Mouse IgG ที่ค่าการเจือจางในอัตราส่วน 1:400 ที่เตรียมใน 6 mM carbonate buffer, pH 9.0±0.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคั้น และล้างด้วย 0.5% BSA ใน 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 ต่อจากนั้นเติม 1% BSA ใน 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากข้อ 3.4.2 ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของการเจือจางที่ 1:1000 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมแอนติเจน โดยใช้แอนติเจนคือ *Dengue virus* type1 และ Japanese Encephalitis Vaccines ได้แก่ CD.JEVAX<sup>®</sup> (Inj.) ของ บริษัท Chengdu Institute of Biological Products ประเทศจีน, IMOJEV<sup>®</sup> ของบริษัท Sanofi Pasteur Ltd. ประเทศออสเตรเลีย, J.E. (Beijing) – GPO ขององค์การเภสัชกรรมประเทศไทย และ JEVAX<sup>™</sup> ของบริษัท Liaoning Cheng Da Biotechnology Co., Ltd. ประเทศจีน อัตราส่วนความเข้มข้นของการเจือจางแอนติเจน ได้แก่ ไม่เจือจาง, 1:2, 1:10 และ 1:50 โดยแอนติเจนถูกเจือจางใน 0.5% BSA ที่ผสมอยู่ใน 20% NHS (acetone extracted) และ 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคั้น และเติม Human anti-flavivirus IgG-HRP โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ 0.5% BSA ที่ผสมอยู่ใน 20% NHS (acetone extracted) และ 10 mM PBS, pH 7.4±0.1 หลุมละ 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติม o-phenylenediamine (OPD) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30±15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 2M sulfuric acid นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร



ภาพที่ 3.2 แอนติเจนสำหรับทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15

### 3.10 ทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15

การทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ทำโดยแบ่ง anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็น 10 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บมาทดสอบความคงทนโดยวิธี typing ELISA ตามข้อ 3.7.1 โดยใช้แอนติเจนที่มีความจำเพาะกับจีโนส *flavivirus* คือ *Dengue virus* type 1 ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 หลอด จนครบเป็นเวลาทั้งหมด 10 สัปดาห์ (Morgenthaler *et al.*, 2006)





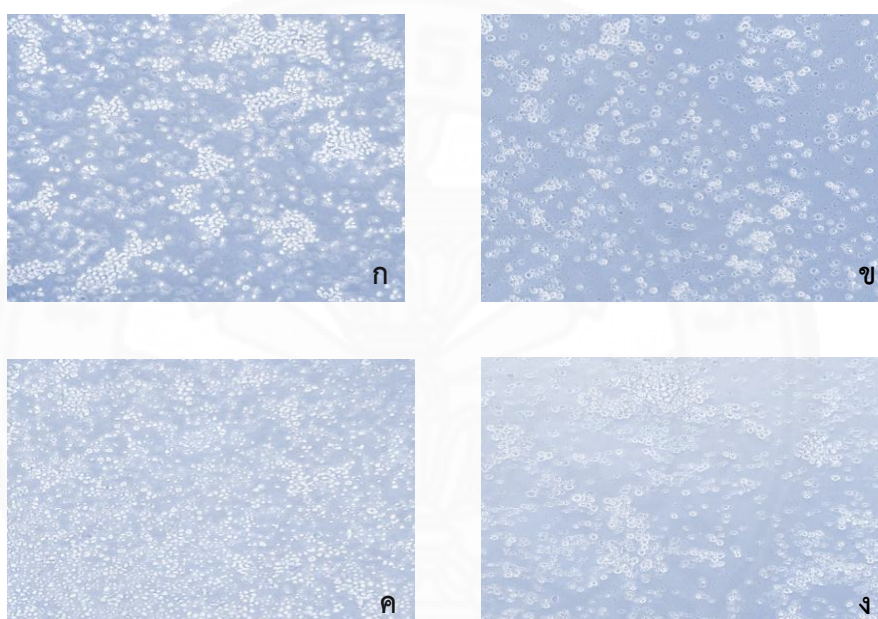
## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC<sup>®</sup> HB-112<sup>™</sup>) และการเพิ่มจำนวนเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว (FBS) โดยเริ่มจากการละลายเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว ใน 6 well plate และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง และสังเกตลักษณะของเซลล์และสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาพผนวกที่ จ.2 และ ภาพผนวกที่ จ.3) รวมถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับเป็นเวลา 3 - 5 วัน (ภาพที่ 4.1) พบว่าหลังจากที่มีการละลายเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมและเปลี่ยนอาหารหลังจากละลายเซลล์แล้วนั้น เซลล์มีลักษณะอยู่กันเป็นกลุ่ม ๆ คล้ายพวงอุ้งน เซลล์มีความใสมันวาวขอบเรียบ (ภาพที่ 4.1 ก) ซึ่งนักวิจัยหลายท่านได้มีการเพาะเลี้ยง hybridoma cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมเช่นเดียวกัน โดยตัวอย่างของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ได้แก่ D1-4G2-4-15 (Watanabe & Vasudevan, 2014), EHME5-1 human mesothelioma cells (Umitsu *et al.*, 2016), murine IL-3 dependent pro-B cell line (Kawada *et al.*, 2017), Monoclonal Antibody Against Human Sortilin (Ghaemimanesh *et al.*, 2015) เป็นต้น ต่อมาเมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง (วันที่ 2) เซลล์เริ่มมีการตายเพิ่มมากขึ้น โดยจะสังเกตเห็นเซลล์ตายที่ก้นหลุมนั้นมีลักษณะเป็นตะกอนขุยขาว ๆ และเซลล์บางส่วนเริ่มมีสีขุ่นไม่ใส ขอบของเซลล์จะมีลักษณะหยัก หมายความว่าเซลล์เหล่านี้มีแนวโน้มที่จะมีการตายเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังมีเซลล์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ยังมีลักษณะของเซลล์ที่ใส วาว ขอบเรียบ แต่เซลล์จะเริ่มกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ไม่มีการอยู่เป็นกลุ่ม (ภาพที่ 4.1 ข) เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง (วันที่ 3) เนื่องจากสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเปลี่ยนเป็นสีโอรสถึงเกือบจะเป็นสีเหลืองจึงต้องมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมใหม่ และนำเซลล์ที่ตายซึ่งมีลักษณะเป็นตะกอนขุยขาว ๆ ตกรวมกันที่บริเวณก้นหลุมออก เพื่อให้เซลล์ที่มีชีวิตรอดจากการละลายเซลล์นั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ลักษณะของเซลล์ (ภาพที่ 4.1 ค) เมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง (วันที่ 4) เซลล์ที่มีชีวิตรอดมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนเต็มหลุม เซลล์มีลักษณะใส วาว ขอบเรียบ (ภาพที่ 4.1 ง) เซลล์ให้มีความแข็งแรงพร้อมทั้งให้เซลล์มีลักษณะของเซลล์ที่แข็งแรงสมบูรณ์พร้อมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (ภาพที่ 4.3 และ ภาพผนวกที่ จ.7) จึงเริ่มทำการ subculture เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Exponential phase) จึงย้ายเซลล์ไปเพาะเลี้ยงยังหลุมใหม่ (subculture) โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่า  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรใน 1 หลุม (ภาคผนวกที่จ.5) และต้องมีการ subculture ทุก ๆ 3 - 5 วันเป็น

จำนวนอย่างน้อย 3 - 5 ครั้ง (passage) เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีความแข็งแรงสมบูรณ์ พร้อมสำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจาก subculture ครั้งที่ 1 ลักษณะของเซลล์ มีลักษณะของการตายลดน้อยลง เซลล์ที่มีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนนั้นมีลักษณะ ขอบเรียบ ใส วาว (ภาพที่ 4.2) ลักษณะของเซลล์หลังจาก subculture ครั้งที่ 1 ที่กำลังขยาย 10X, 20X, และ 40X ต่อจากนั้นมีการ subculture ครั้งที่ 2 ลงใน flask T75 เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และ subculture ครั้งที่ 3 ลงใน flask T162 เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากขึ้นและเตรียม เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากการ subculture ครั้งที่ 3 (ภาพผนวกที่ จ.8)



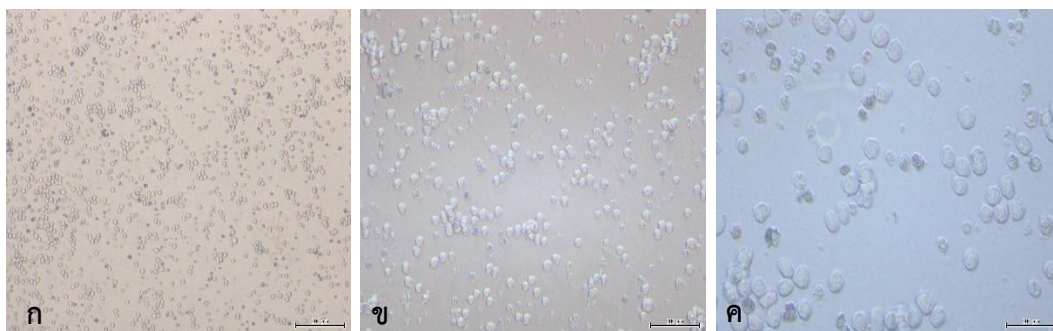
**ภาพที่ 4.1** ลักษณะของเซลล์ D1-4G2-4-15 ภายหลังจากการละลายเซลล์ที่ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

ก. เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม หลังจากละลายเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วันที่ 1)

ข. เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม หลังจากละลายเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (วันที่ 2)

ค. เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม หลังจากละลายเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (วันที่ 3)

ง. เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม หลังจากละลายเซลล์เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (วันที่ 4)

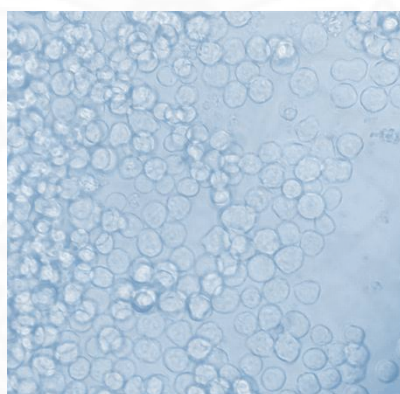


ภาพที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 หลังการ subculture ครั้งที่ 1 ที่กำลังขยายต่าง ๆ

ก. ลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 หลังการ subculture ครั้งที่ 1 ที่กำลังขยาย 4X

ข. ลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 หลังการ subculture ครั้งที่ 1 ที่กำลังขยาย 10X

ค. ลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 หลังการ subculture ครั้งที่ 1 ที่กำลังขยาย 40X



ภาพที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่กำลังขยาย 40X หลังการ subculture ครั้งที่ 3 ที่  
แข็งแกร่งสมบูรณ์พร้อมที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

## 4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC® HB-112™) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

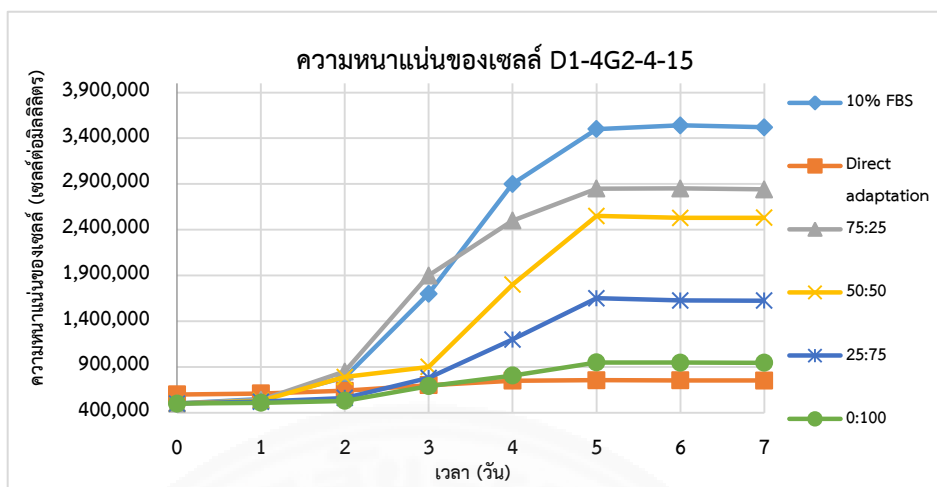
การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยแบ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 วิธี คือ วิธี Direct adaptation และ Sequential adaptation ซึ่งแต่ละวิธีใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด คือ CD Hybridoma medium (gibco) และ Hybridoma-SFM medium (gibco) ซึ่งพบว่าเมื่อนำแต่ละวิธีและแต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมมาเปรียบเทียบกันได้ ผลการวิจัยดังต่อไปนี้

### 4.2.1 CD Hybridoma medium

เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium (ภาพผนวกที่ จ.13) ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ D1-4G2-4-15 ของวิธีทั้งสองวิธี คือ Direct adaptation และ Sequential adaptation (75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม มีความหนาแน่นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมที่เลี้ยงในทั้งสองวิธี แต่เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมเหมือนกันแต่วิธีการเพาะเลี้ยงนั้นแตกต่างกัน พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation มีความหนาแน่นสูงกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation และเมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยใช้วิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าที่อัตราส่วน 75:25 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่ 50:50, 25:75 และ 0:100 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ที่สภาวะต่าง ๆ (ภาคผนวก ค ตาราง ค.1) เซลล์ D1-4G2-4-15 มีระยะ lag phase ในวันที่ 0 - 2 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ส่วนระยะ exponential phase เริ่มวันที่ 3 และสิ้นสุดของระยะ exponential phase ลงใน วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ สุกท้ายเซลล์เข้าสู่ช่วงระยะ stationary phase ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 4.4)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) (ภาพที่ 4.5) พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 เริ่มต้นที่มีชีวิตมีมากกว่า 90% ก่อนที่จะทำการ subculture ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอดที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิต

รอดมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation ที่อัตราส่วน 75:25 มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอดสูงที่สุดและที่อัตราส่วน 50:50 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดมากกว่าที่อัตราส่วน 25:75 และ 0:100 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation มีแนวโน้มการลดลงอย่างรวดเร็วกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation การเปรียบเทียบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร และค่าที่ได้จากการวัดมากกว่าหรือเท่ากับ 0.2 สามารถสรุปได้ว่าเป็น positive หมายความว่าเซลล์ D1-4G2-4-15 มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่อยู่ในจีโนม *flavivirus* ซึ่งใช้ *Dengue virus* type1 เป็นแอนติเจนตัวแทนของจีโนม *flavivirus* ในการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่ผลิตขึ้นทั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมและปราศจากซีรัมของทั้งสองวิธีการเลี้ยงซึ่งมีการเริ่มผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 4.6) โดยที่ลักษณะของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวิธี Direct adaptation หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 4.7) และลักษณะเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวิธี Sequential adaptation (ภาพที่ 4.8) เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ที่สภาวะต่าง ๆ (ภาคผนวก ค ตาราง ค.2) หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ที่กำลังขยายต่าง ๆ พบว่าเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation มีลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นขอบหยัก ฝ่อ ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่ตายในที่สุด และยังมีเซลล์ที่ตายอยู่กัน ขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80% เนื่องจากวิธี Direct adaptation เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมแบบทันที โดยไม่มีการ subculture ระหว่างที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมจึงทำให้เซลล์มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งแตกต่างจากวิธี Sequential adaptation ที่มีการ subculture ในทุก ๆ อัตราส่วนและค่อย ๆ ลดเปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเซลล์ลงอย่างช้า ๆ จึงทำให้เซลล์มีลักษณะขาวใส ขอบเรียบ เป็นส่วนใหญ่ซึ่งหมายความว่าเซลล์เหล่านั้นเป็นเซลล์ที่มีชีวิตรอดและแข็งแรงอยู่ตลอดซึ่งพร้อมจะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่อยู่ในจีโนม *flavivirus*



ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium)

(-◆-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

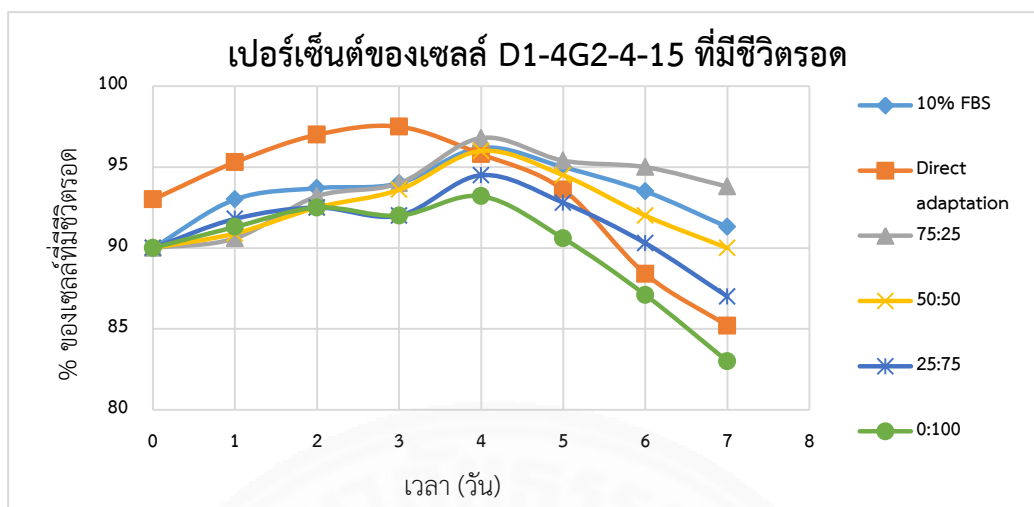
(-■-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Direct adaptation

(-▲-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (75:25)

(-X-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (50:50)

(-|<-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (25:75)

(-●-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation (0:100)



**ภาพที่ 4.5** การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium)

(-◆-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

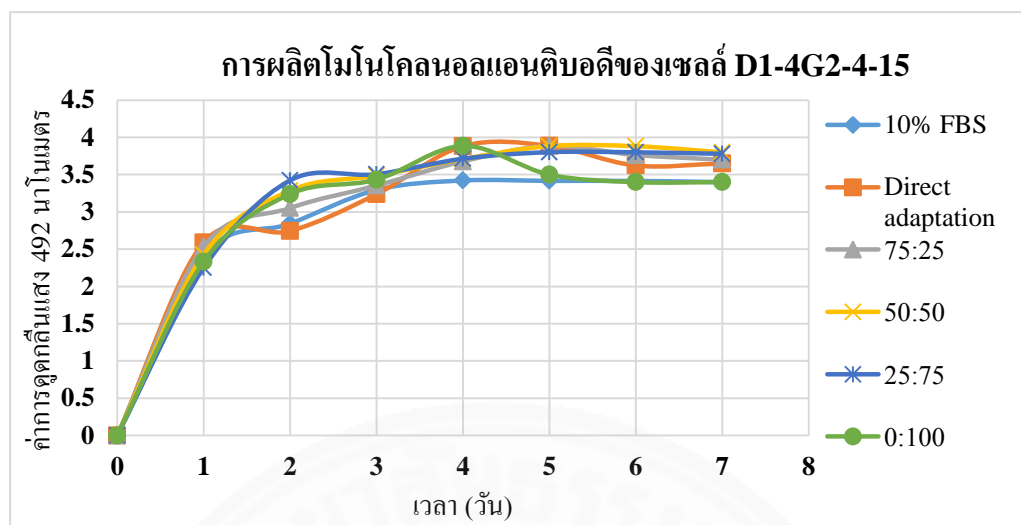
(-■-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Direct adaptation

(-▲-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (75:25)

(-X-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (50:50)

(->-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (25:75)

(-●-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation (0:100)



**ภาพที่ 4.6** การเปรียบเทียบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium)

(-◆-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

(-■-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Direct adaptation

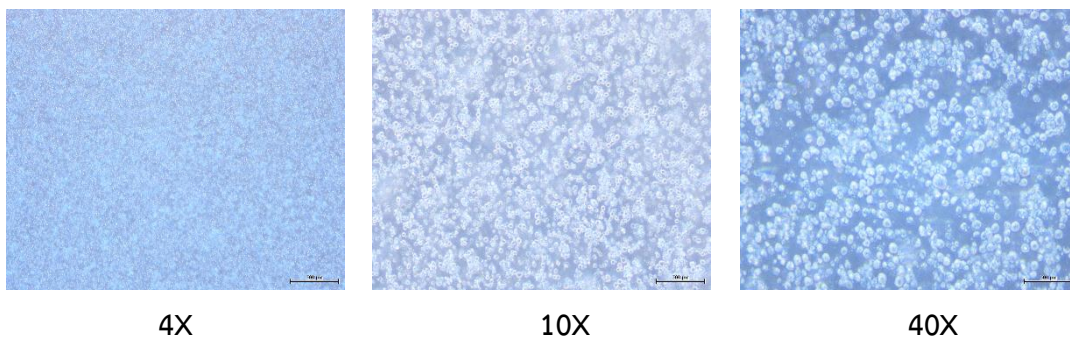
(-▲-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (75:25)

(-X-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (50:50)

(->|-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (25:75)

(-●-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation (0:100)



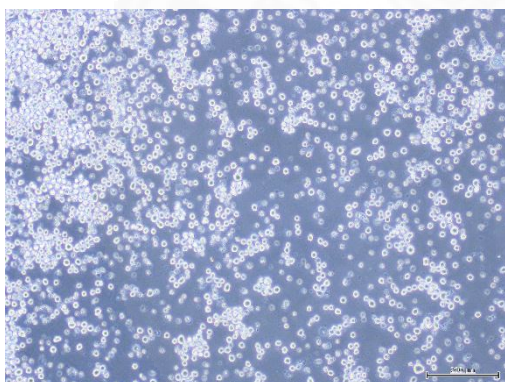


4X

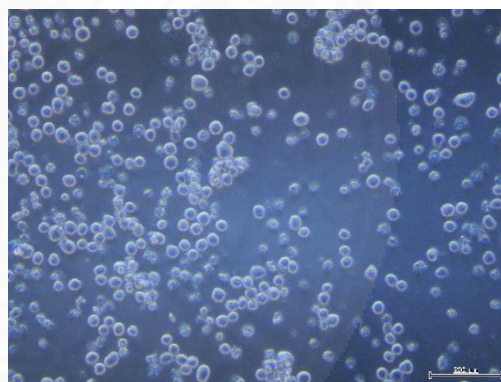
10X

40X

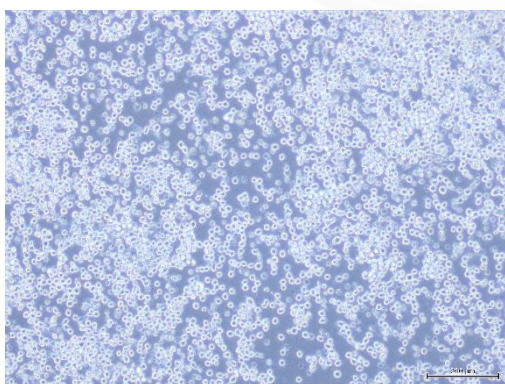
ภาพที่ 4.7 เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวิธี Direct adaptation หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ที่กำลังขยายต่าง ๆ



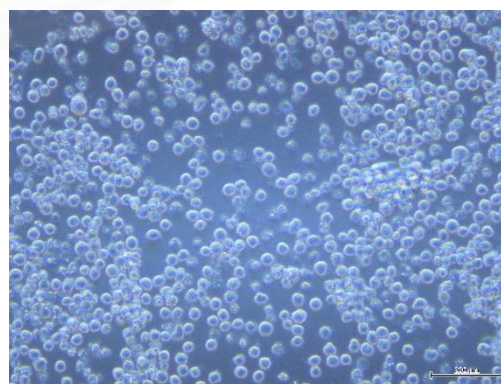
50: 50 (10X)



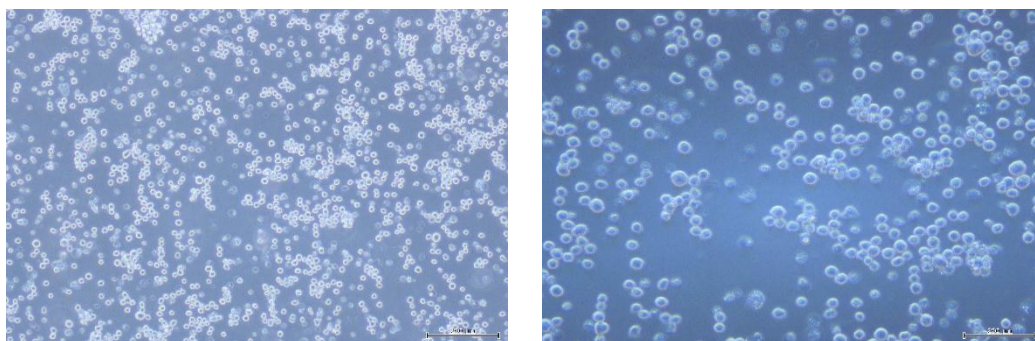
50: 50 (40X)



25: 75 (10X)



25: 75 (40X)



0: 100 (10X)

0: 100 (40X)

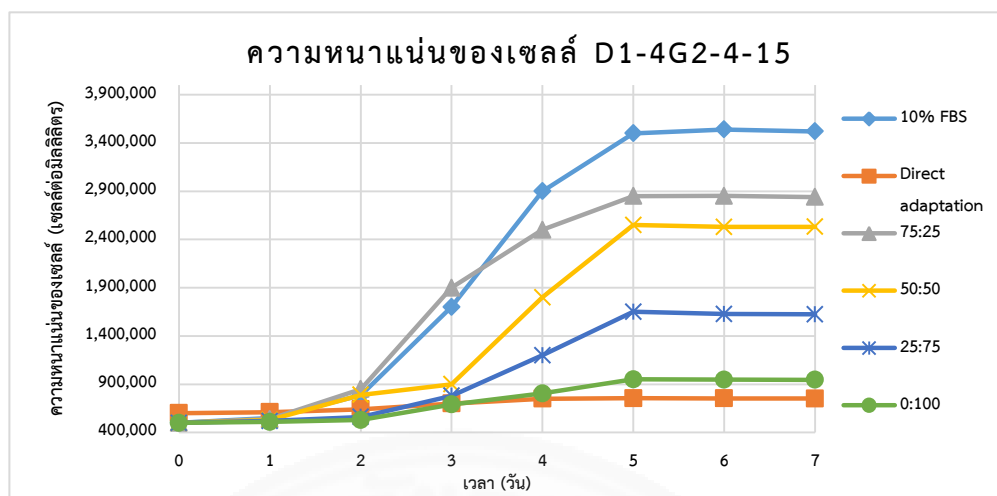
**ภาพที่ 4.8** เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium) โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ที่กำลังขยายต่าง ๆ

#### 4.2.2 Hybridoma-SFM medium

การเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium (**ภาพผนวกที่ จ.12**) ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ D1-4G2-4-15 ของวิธีทั้งสองวิธี คือ Direct adaptation และ Sequential adaptation (75:25, 50:50, 25:75 และ 0:100) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม มีความหนาแน่นสูงสุด เมื่อเทียบกับความหนาแน่นของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมของทั้งสองวิธี แต่เมื่อเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่เหมือนกันแต่วิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกันนั้น ผลการวิจัยพบว่าความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation มีความหนาแน่นสูงกว่าเซลล์ที่เลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation และเปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมโดยใช้วิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าที่อัตราส่วน 75:25 มีความหนาแน่นสูงสุด เมื่อเทียบกับอัตราส่วนที่ 50:50, 25:75 และ 0:100 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่สภาวะต่าง ๆ (**ภาคผนวก ค ตาราง ค.3**) เซลล์ D1-4G2-4-15 มีระยะ lag phase ในวันที่ 0-2 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ระยะ exponential phase เริ่มวันที่ 3 และสิ้นสุดวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ สุกท้ายเซลล์เข้าสู่ช่วงระยะ stationary phase ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium (**ภาพที่ 4.9**)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์เริ่มต้นของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอดมีมากกว่า 90% ก่อนที่จะ subculture ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตที่เลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอดมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมโดยวิธี Sequential adaptation ที่อัตราส่วน 75:25 มีเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอดสูงสุดและที่อัตราส่วน 50:50 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดมากกว่าที่อัตราส่วน 25:75 และ 0:100 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่สภาวะต่างๆ (ภาคผนวก ค ตาราง ค.4) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์โดยวิธี Direct adaptation มีแนวโน้มของการลดลงอย่างรวดเร็วกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation เช่นเดียวกับการเลี้ยงด้วย CD Hybridoma medium (ภาพที่ 4.10)

การเปรียบเทียบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) ก่อนทำบริสุทธิ์ พบว่าเซลล์ D1-4G2-4-15 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในจิ้นัส *flavivirus* ขึ้นทั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมและปราศจากซีรัมของทั้งสองวิธีการเลี้ยงมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ค่าดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกัน เพราะฉะนั้นสามารถใช้ได้ทั้งสองวิธีในการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ภาพที่ 4.11) ลักษณะของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) โดยวิธี Direct adaptation หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 4.12) และ ลักษณะของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) โดยวิธี Sequential adaptation หลังเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ที่กำลังขยายต่าง ๆ (ภาพที่ 4.13) พบว่าเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Direct adaptation มีลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นขอบหยัก ฝ่อ และตายมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Sequential adaptation โดยเซลล์ส่วนใหญ่ยังมีลักษณะวาวใส ขอบเรียบ เช่นเดียวกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium



**ภาพที่ 4.9** การเปรียบเทียบความหนาแน่น D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium)

(-◆-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

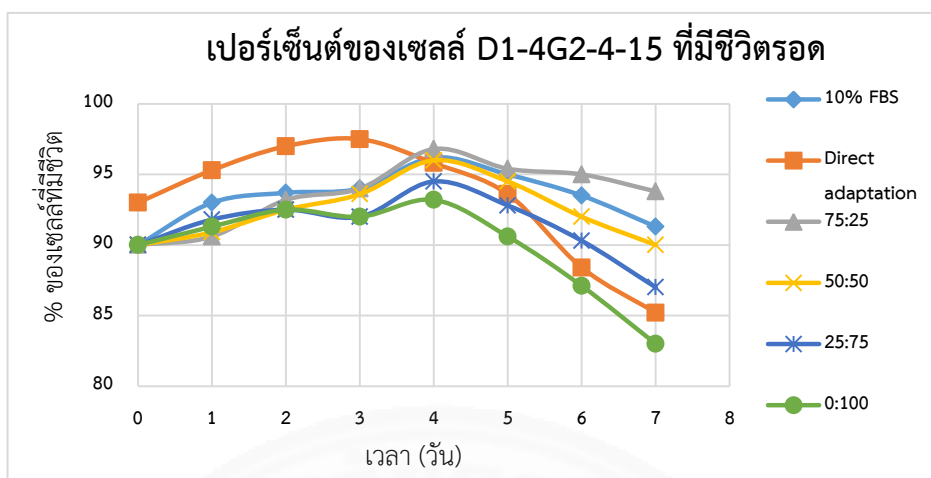
(-■-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Direct adaptation

(-▲-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (75:25)

(-X-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (50:50)

(->|-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (25:75)

(-●-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation (0:100)



**ภาพที่ 4.10** การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิตรอด ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium)

(-◆-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

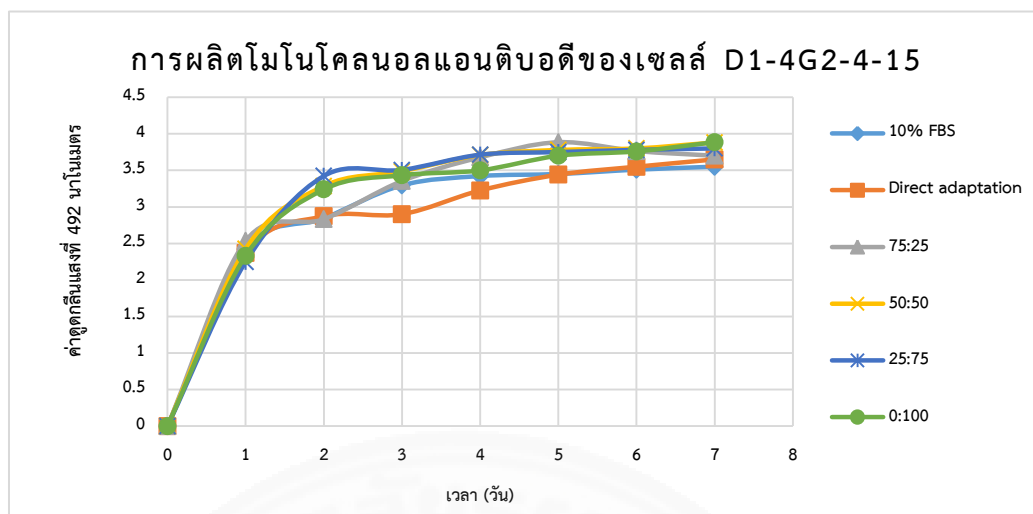
(-■-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Direct adaptation

(-▲-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (75:25)

(-X-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (50:50)

(->-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (25:75)

(-●-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation (0:100)



**ภาพที่ 4.11** การเปรียบเทียบการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ D1-4G2-4-15 ที่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม และในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium)

(-◆-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม

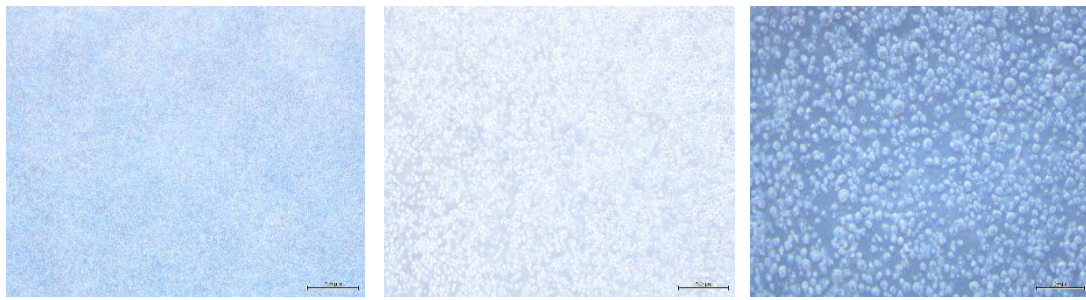
(-■-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Direct adaptation

(-▲-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (75:25)

(-X-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 50% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (50:50)

(->|-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 โดยวิธี Sequential adaptation ในอัตราส่วนระหว่าง 25% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ต่อ 75% ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (25:75)

(-●-) การเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม โดยวิธี Sequential adaptation (0:100)

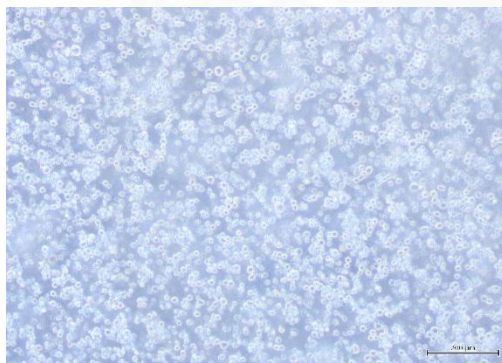


4X

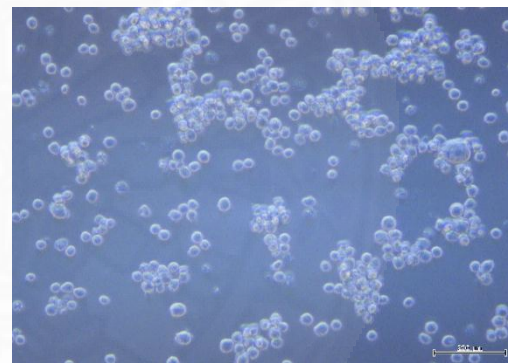
10X

40X

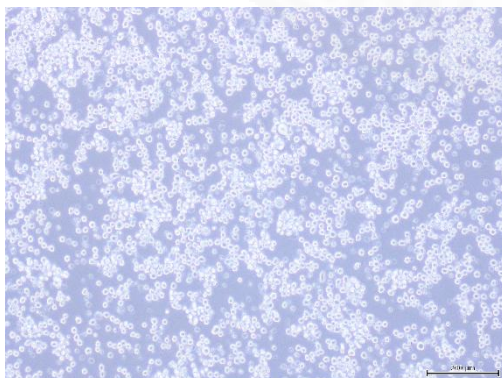
ภาพที่ 4.12 เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) โดยวิธี Direct adaptation หลังเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน ที่กำลังขยายต่าง ๆ



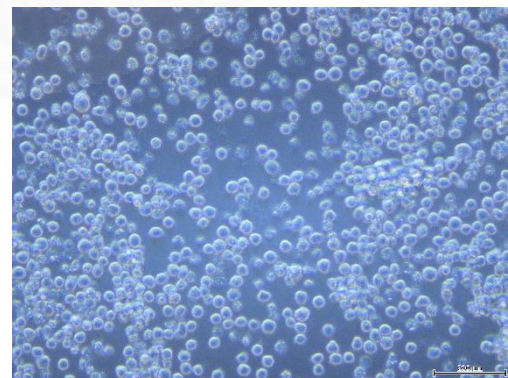
50: 50 (10X)



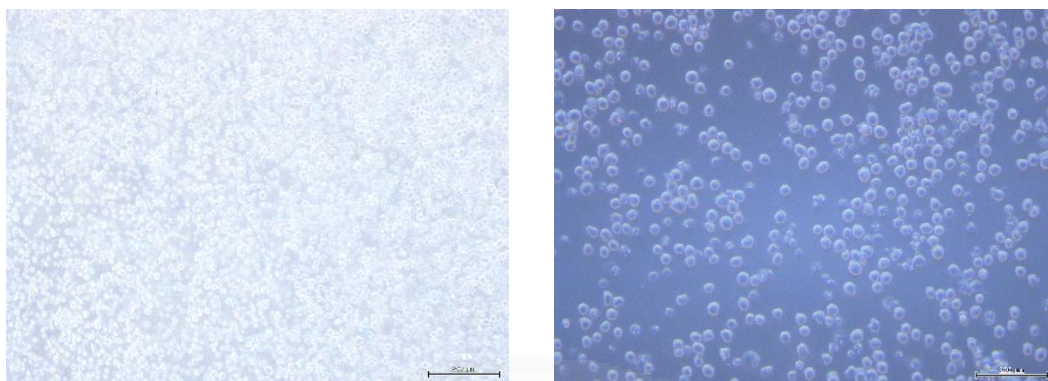
50: 50 (40X)



25: 75 (10X)



25: 75 (40X)



O: 100 (10X)

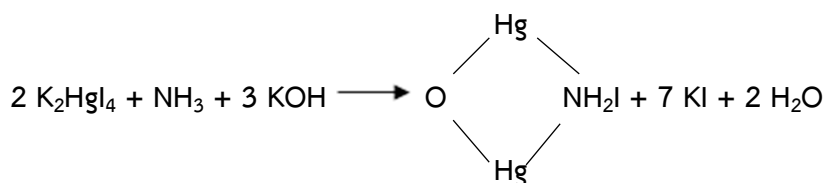
O: 100 (40X)

**ภาพที่ 4.13** เซลล์ D1-4G2-4-15 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (Hybridoma-SFM medium) โดยวิธี Sequential adaptation ที่อัตราส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ที่กำลังขยายต่าง ๆ

#### 4.3 การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการนำของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ปราศจากซีรัม คือ CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium ของทั้งสองวิธีที่ใช้เลี้ยงเซลล์ คือ Direct adaptation และ Sequential adaptation มาทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในจีนัส *flavivirus* โดยวิธี tryptic ELISA นั้นจากผลการทดสอบพบว่า ในของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ปราศจากซีรัมมีความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในจีนัส *flavivirus* จึงนำของเหลวเหนือตะกอนนั้นมาทำบริสุทธิ์โดยเริ่มต้นจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นวิธีที่สามารถลดปริมาณตัวอย่างและทำบริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลินได้วิธีหนึ่ง โดยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเต็มจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว หลังจากการตกตะกอนนำตะกอนที่ได้นั้นละลายด้วย 10 mM PBS มาทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป โดยใช้วิธีการทำบริสุทธิ์และคอลัมน์ในข้อ 3.6 ซึ่งคอลัมน์ Econo-Pac 10 DG desalting column ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ปะปนอยู่กับตัวอย่างในขั้นตอนการตกตะกอนออก หลังจากที่ทำตัวอย่างผ่านคอลัมน์แล้ว จึงนำมาทดสอบปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตด้วย Nessler's reagent นำยาชนิดนี้เตรียมขึ้นจากการผสมปรอทคลอไรด์ ( $\text{HgCl}_2$ ) โพตัสเซียมไอโอดेट (KI) ในสารละลายต่างทำให้ได้สารประกอบ  $\text{K}_2\text{HgI}_4$  เกิดขึ้น ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียได้ (ภาพที่ 4.14) ทำให้ได้ตะกอนสีเหลือง ส้ม หรือน้ำตาลขึ้นกับปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่ในตัวอย่าง (ภาพที่ 4.15)



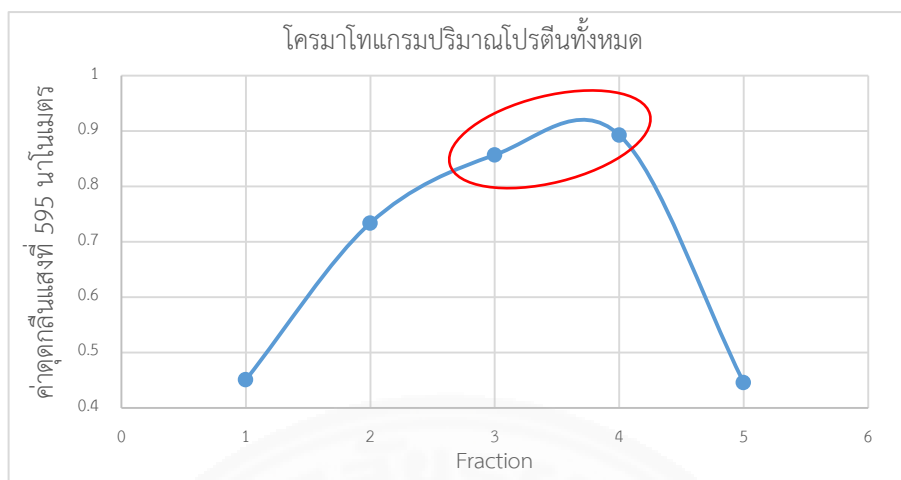


ภาพที่ 4.14 Nessler's reagent ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียได้ตะกอนสีเหลือง ส้ม หรือน้ำตาลขึ้นกับปริมาณแอมโมเนีย (Zhou & Boyd, 2016)

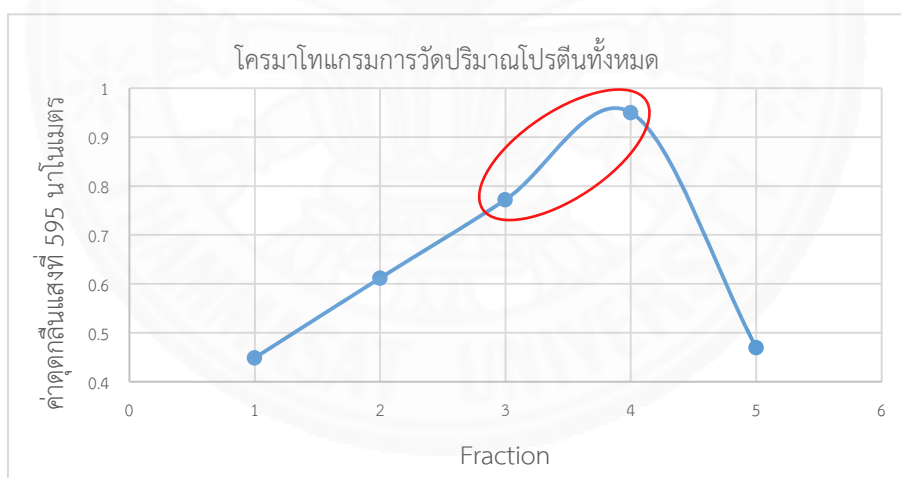


ภาพที่ 4.15 ตัวอย่างคอลัมน์ Econo-Pac 10 DG desalting column และนำมาทดสอบด้วย Nessler's reagent

เมื่อมีปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ปริมาณมากทำให้เมื่อทดสอบแล้วได้ตะกอนสีเหลืองอมส้มในตัวอย่างที่ทดสอบ แต่ถ้าไม่มีปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ในตัวอย่างเมื่อทดสอบแล้วตัวอย่างจะคงเป็นสีขาวใสดั้งเดิม จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Econo-Pac 10 DG desalting column มาแยกอิมมูโนโกลบูลินโดยใช้คอลัมน์ Econo-Pac Serum IgG Purification column ซึ่งหลังจากตัวอย่างผ่านคอลัมน์จะได้ปริมาณสารละลาย IgG ปริมาตร 4 มิลลิลิตรต่อ fraction โดย 1 รอบของการทำบริสุทธิ์จะได้ทั้งหมด 5 fraction เมื่อนำ fraction ไปวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร (ภาคผนวก ง ตาราง ง.1.1) จากนั้นนำมาสร้างกราฟ (ภาพที่ 4.14 และ ภาพที่ 4.15) พบว่าจะมีส่วนของยอดพีกซึ่งเป็น fraction ที่มีค่าดูดกลืนแสงที่มากที่สุด 1-3 อันดับ (แสดงในจุดของกราฟที่อยู่ในวงกลมสีแดง) นำมารวมกันเพื่อที่จะไปวัดปริมาณ IgG ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี ELISA ต่อไป ซึ่งปริมาณโปรตีนทั้งหมดนั้นสามารถคำนวณเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (BSA) (ภาพผนวกที่ ง 2.3.1) และค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium โดยใช้วิธี Bradford assay (ภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง 2.3.1 และ 2.3.2)



**ภาพที่ 4.16** โครมาโทแกรมการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตรของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium



**ภาพที่ 4.17** โครมาโทแกรมการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตรของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium

#### 4.4 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี ELISA นั้นจำเป็นต้องมีการเลือกบัฟเฟอร์ (blocking) ที่มีค่าดูดกลืนแสงใกล้ 0 มากที่สุดเนื่องจากจะทำให้ได้ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่ถูกต้องแท้จริง เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบบัฟเฟอร์ดังข้อ 3.8.1 โดยบัฟเฟอร์ที่เลือกนำมาทดสอบทั้งหมดมี 3 ชนิดคือ

- (1) 13.5% Normal Human Serum
- (2) 5% Skim milk + 1% Tween 20 ใน 10 mM PBS ที่ pH 7.4±0.1
- (3) 0.5% Casein + 0.5% BSA ใน 10 mM PBS ที่ pH 7.4±0.1

จากค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของบัฟเฟอร์ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 4.1) พบว่าเมื่อทดสอบบัฟเฟอร์โดยใช้ mouse IgG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร IgG ที่ความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น ที่บัฟเฟอร์ 13% NHS ให้ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.100 ส่วนบัฟเฟอร์ 5% Skim milk + 1% Tween20 ให้ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.001 และ บัฟเฟอร์ 0.5% Casein + 0.5% BSA ให้ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.003 เมื่อนำค่าทั้งสามมาเปรียบเทียบกันพบว่า ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของ บัฟเฟอร์ 5% Skim milk + 1% Tween20 และ 0.5% Casein + 0.5% BSA มีค่าใกล้เคียง 0 มากที่สุดซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการวัดปริมาณ IgG โดยวิธี ELISA ค่าดูดกลืนแสงของบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดที่ค่าความเจือจางของ Goat anti-mouse IgG-HRP 1:1000 และ 1:2000 (ภาคผนวก ง ตาราง ง 2.1) ซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือก บัฟเฟอร์ 5% Skim milk + 1% Tween20 มาใช้ เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมบัฟเฟอร์ง่ายและใช้เวลาการเตรียมน้อยกว่าการเตรียม บัฟเฟอร์ 0.5% Casein + 0.5% BSA

การทดสอบความเข้มข้นของ conjugate สำหรับนำมาใช้วัดปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี ELISA ดังข้อ 3.8.2 นั้น ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของ Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจางต่าง ๆ (ภาคผนวก ง ตาราง 2.2.1 และ ตาราง 2.2.2) พบว่าที่ความเข้มข้นของ Goat anti-mouse IgG-HRP (conjugate) ที่ความเจือจาง 10,000 เท่า ค่าดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น IgG ต่าง ๆ นั้นมีค่าอยู่ระหว่าง 0.000-1.661 และระยะเวลาในการหยุดปฏิกิริยา 15 นาที ซึ่งอยู่ระหว่าง 30±15 นาที ตามที่กำหนดไว้จึงเลือกใช้ Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจาง 10,000 เท่า

เมื่อเลือกบัฟเฟอร์โดยใช้ 5% Skim milk + 1% Tween 20 และ เลือกใช้ Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจาง 10,000 เท่า เพื่อใช้ในการหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินดังข้อ 3.8.3 และคำนวณโดยใช้กราฟโปรตีนมาตรฐานของ Mouse IgG ที่ความเข้มข้นต่าง (ภาคผนวก ง ภาพผนวกที่ ง 2.4.1) ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium (ตารางที่ 4.2 และ ตารางที่ 4.3)

ตามลำดับ จากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร CD Hybridoma medium โดยวิธี Direct adaptation ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ย  $307.58 \pm 90.52$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินเฉลี่ยเท่ากับ  $36.47 \pm 6.22$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่เลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ย  $359.96 \pm 89.89$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินเฉลี่ยเท่ากับ  $38.68 \pm 6.32$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium โดยวิธี Direct adaptation ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ย  $361.60 \pm 90.52$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินเฉลี่ยเท่ากับ  $41.82 \pm 5.93$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ย  $425.44 \pm 90.58$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินเฉลี่ยเท่ากับ  $68.88 \pm 8.18$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.3)

**ตารางที่ 4.1** ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร ของบัฟเฟอร์ที่นำมาทดสอบสำหรับใช้ในการวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (IgG)

ความเข้มข้น ของ IgG ( $\mu\text{g/ml}$ )	บัฟเฟอร์		
	13% NHS	5% Skim milk + 1% Tween20	0.5% Casein + 0.5% BSA
0.000	0.100	0.001	0.003
0.150	0.742	0.694	0.695
0.031	1.209	1.006	1.011
0.062	1.652	1.256	1.273
0.120	1.967	1.413	1.650
0.250	2.188	1.585	1.807
0.500	2.359	1.667	1.737
1.000	2.460	1.953	1.969

**ตารางที่ 4.2** ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ( $\mu\text{g/ml}$ ) หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15

ยอดพืช	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด <sup>ก</sup>	ปริมาณ IgG <sup>ข</sup>	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด	ปริมาณ IgG
1	72.5160	20.7400	80.7006	21.3773
2	137.9931	27.8112	228.0242	29.2783
3	481.7482	47.3542	612.7026	50.9902
4	825.5034	73.6621	881.1589	75.9436
5	732.1984	65.7697	776.3955	67.3570
6	324.6030	36.0794	383.5325	40.8076
7	296.7752	31.5695	319.6923	33.8310
8	105.2545	23.6771	177.2794	25.8218
9	56.1467	19.5430	72.5160	21.1640
10	43.0512	18.5020	67.6052	20.2155
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>307.5790</b>	<b>36.4708</b>	<b>359.9607</b>	<b>38.6786</b>
<b>ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</b>	<b>286.2460</b>	<b>19.6633</b>	<b>284.2505</b>	<b>19.9760</b>
<b>ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย</b>	<b>90.5189</b>	<b>6.2181</b>	<b>89.8879</b>	<b>6.3170</b>

<sup>ก</sup> วัดปริมาณโดยใช้วิธี Bradford assay

<sup>ข</sup> วัดปริมาณโดยใช้วิธี ELISA

**ตารางที่ 4.3** ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ( $\mu\text{g/ml}$ ) หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15

ยอดฟีด	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด <sup>n</sup>	ปริมาณ IgG <sup>ข</sup>	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด	ปริมาณ IgG
1	126.5346	28.5628	175.6425	43.5959
2	192.0118	31.5695	224.7504	54.1191
3	535.7669	51.8641	584.8748	81.9302
4	879.5220	77.4203	944.9992	99.9699
5	786.2171	70.0541	868.0635	107.6368
6	378.6217	39.8376	394.9910	92.4534
7	350.7939	38.3343	416.2711	75.9170
8	159.2732	30.9681	290.2275	53.5177
9	110.1653	26.3079	208.3811	41.3410
10	97.0699	23.3013	146.1778	38.3343
<b>ค่าเฉลี่ย</b>	<b>361.5976</b>	<b>41.8220</b>	<b>425.4379</b>	<b>68.8815</b>
<b>ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</b>	<b>286.2460</b>	<b>18.7488</b>	<b>286.4238</b>	<b>25.8818</b>
<b>ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย</b>	<b>90.5189</b>	<b>5.9289</b>	<b>90.5752</b>	<b>8.1845</b>

<sup>n</sup> วัดปริมาณโดยใช้วิธี Bradford assay

<sup>ข</sup> วัดปริมาณโดยใช้วิธี ELISA

ตารางที่ 4.4 สรุปปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ( $\mu\text{g/ml}$ ) หลังจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 (แสดงผลโดยค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย)

อาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ปราศจากซีรัม	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด <sup>๑</sup>	ปริมาณ IgG <sup>๒</sup>	ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด	ปริมาณ IgG
CD Hybridoma medium	307.58 $\pm$ 90.52	36.47 $\pm$ 6.22	359.96 $\pm$ 89.89	38.68 $\pm$ 6.32
Hybridoma-SFM medium	361.60 $\pm$ 90.52	41.82 $\pm$ 5.93	425.44 $\pm$ 90.58	68.88 $\pm$ 8.18

ตารางที่ 4.5 สรุปค่าการทดสอบทางสถิติของอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium ที่วิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ปราศจากซีรัม	F - test				T - test			
	ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด		ปริมาณ IgG		ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด		ปริมาณ IgG	
	F	Sig.	F	Sig.	T	Sig.	T	Sig.
CD Hybridoma medium	0.052	0.821	0.016	0.902	0.400	0.694	0.249	0.806
Hybridoma-SFM medium	0.001	0.973	3.045	0.098	0.499	0.624	2.677	0.015

การสรุปค่าสถิติพื้นฐานของตัวแปรตาม (ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน) โดยจำแนกตามวิธีที่เลี้ยงเซลล์ (Direct adaptation และ Sequential adaptation) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM โดยผลของโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20 ที่ทำการทดสอบมีดังต่อไปนี้

การทดสอบความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium (โดยใช้ค่าสถิติ F-test ) ปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 0.052 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.821 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสองวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการทดสอบความแปรปรวนของปริมาณ IgG ปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 0.016 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.902 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสองวิธีการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium (โดยใช้ค่าสถิติ T-test) ปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 0.400 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.694 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าวิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองวิธีในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกัน ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี Sequential adaptation มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ยสูงกว่าวิธี Direct adaptation ส่วนการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณ IgG ปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 0.249 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.806 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าวิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองวิธีในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกันค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน IgG แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี Sequential adaptation เฉลี่ยสูงกว่าวิธี Direct adaptation

การทดสอบความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium (โดยใช้ค่าสถิติ F-test ) ปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 0.001 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.973 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสองวิธีการเลี้ยงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการทดสอบความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 3.045 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.098 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยสองวิธีการเลี้ยงแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ



การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium (โดยใช้ค่าสถิติ T-test) ปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 0.499 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.624 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าวิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองวิธีในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบเดียวกันค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี Sequential adaptation มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยสูงกว่าวิธี Direct adaptation ส่วนการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีน IgG ปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 2.677 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.015 มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าวิธีที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองวิธีในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกันค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน IgG แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยวิธี Sequential adaptation เฉลี่ยสูงกว่าวิธี Direct adaptation

**ตารางที่ 4.6** สรุปค่าการทดสอบทางสถิติของวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Direct adaptation และ Sequential adaptation ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกัน

วิธีเลี้ยงเซลล์	F-test				T- test			
	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด		ปริมาณ IgG		ปริมาณโปรตีนทั้งหมด		ปริมาณ IgG	
	F	Sig.	F	Sig.	T	Sig.	T	Sig.
Direct adaptation	0.000	1.000	0.021	0.885	0.422	0.678	0.623	0.541
Sequential adaptation	0.068	0.789	2.097	0.165	0.500	0.623	2.921	0.009

การสรุปค่าสถิติพื้นฐานของตัวแปรตาม (ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน) โดยจำแนกตามชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ (CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium) ตามวิธีการเลี้ยงแบบ Direct adaptation และ Sequential adaptation โดยผลของโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20 ที่ทำการทดสอบมีดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 4.6)

การทดสอบความแปรปรวนของโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Direct adaptation ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด (โดยใช้ค่าสถิติ F-test ) ปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 0.000 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 1.000 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการทดสอบความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 0.021 มีนัยสำคัญ

ทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.885 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Direct adaptation ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด (โดยใช้ค่าสถิติ T-test) ปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 0.422 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.678 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Hybridoma-SFM medium มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ยสูงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด CD Hybridoma medium ส่วนการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 0.623 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.541 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Hybridoma-SFM medium มีปริมาณโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินเฉลี่ยสูงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด CD Hybridoma medium เช่นเดียวกัน

การทดสอบความแปรปรวนของโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Sequential adaptation ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด (โดยใช้ค่าสถิติ F-test ) ปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 0.068 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.789 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการทดสอบความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินปรากฏว่า ค่า F-test เท่ากับ 2.097 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.165 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่า ความแปรปรวนของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินที่เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Sequential adaptation ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด (โดยใช้ค่าสถิติ T-test) ปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 0.500 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.623 มีค่ามากกว่า 0.05 แสดงว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Hybridoma-SFM medium มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเฉลี่ยสูงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด CD Hybridoma medium ส่วนการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินปรากฏว่า ค่า T-test เท่ากับ 2.921 มีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig.) ที่ระดับ 0.009 มีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน อิมมูโนโกลบูลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

ชนิด Hybridoma-SFM medium มีปริมาณโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินเฉลี่ยสูงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด CD Hybridoma medium

สรุปได้ว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม (CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium) โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงสองวิธี คือ Direct adaptation และ Sequential adaptation โดยเปรียบเทียบความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลินของทั้งสองวิธีและอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด ซึ่งใช้ F-test ในการทดสอบความแปรปรวน พบว่า ความแปรปรวนไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลินโดยใช้ T-test พบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของทั้งสองวิธีและอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันทางสถิติแต่ค่าเฉลี่ยของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium เมื่อใช้วิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันค่าเฉลี่ยของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินมีความแตกต่างกันทางสถิติและเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ อิมมูโนโกลบูลินที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันทางสถิติ

#### 4.5 ทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน

เมื่อนำ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาทำการทดสอบความจำเพาะต่อแอนติเจน โดยใช้แอนติเจนคือ *Dengue virus type1* และ Japanese Encephalitis Vaccines ได้แก่ CD.JEVAX<sup>®</sup> (Inj.) ของ บริษัท Chengdu Institute of Biological Products ประเทศจีน, IMOJEV<sup>®</sup> ของบริษัท Sanofi Pasteur Ltd. จากประเทศออสเตรเลีย, J.E. (Beijing) – GPO ขององค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย และ JEVAX<sup>™</sup> ของบริษัท Liaoning Cheng Da Biotechnology Co., Ltd. ประเทศจีน โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อัตราส่วนการเจือจางต่าง ๆ (ภาคผนวก ง ตารางผนวกที่ ง 2.5.1) ผลการทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน (ตารางที่ 4.7) พบว่า anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 มีความจำเพาะต่อแอนติเจน ได้แก่ Beijing-GPO, JEVAC<sup>™</sup> และ *Dengue virus type1* ซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร มากกว่าหรือเท่ากับ 0.200 หรือให้ผลบวก (positive) กับแอนติเจนและ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ไม่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร น้อยกว่า 0.200 หรือให้ผลลบ (negative) กับแอนติเจน ได้แก่ CD.JEVAX<sup>®</sup> Inj. และ IMOJEV<sup>®</sup> ซึ่ง Beijing-GPO เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายที่เพาะเลี้ยงเชื้อในสมองหนู (Inactivated mouse brain JEV) โดยจะฆ่าเชื้อ

ไวรัสคเวฟอราลินและผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ส่วนวัคซีน JEVAC™ เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตายที่ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนไวรัสเซลล์รูปแบบผงแห้งซึ่งเตรียมจากการเพาะเชื้อสายพันธุ์ Beijing P3 บนไวรัสเซลล์และทำให้เชื้อตายด้วยเบตา-โปรปิโอะแลคโตน (beta-Propiolactone) และ *Dengue virus type1* เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้เลือดออกที่อยู่ในแฟมิลี *flaviviridae* ส่วนวัคซีน CD.JEVAX® Inj. เป็นวัคซีนเชื้อเป็นที่ทำให้อ่อนฤทธิ์ ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีสายพันธุ์ SA14-14-2 ในเซลล์ไตของหนูแฮมสเตอร์ (Primary Hamster Kidney : PHK) ที่แยกออกมาเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์ชั้นเดียวและ วัคซีน IMOJEV® ผลิตโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมโดยการตัดยีนส่วน PrM และ E ของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีสายพันธุ์ SA14-14-2 ใส่เข้าไปแทนที่ยีน PrM และ E ของไวรัสไข้เหลือง สายพันธุ์ 17D เพื่อให้ได้ไวรัสที่มี structural protein เหมือนไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี และมี non-structural protein เหมือนไวรัสไข้เหลือง เพราะฉะนั้น anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความจำเพาะกับวัคซีนไข้สมองอักเสบที่เป็นเชื้อตายและไวรัส *Dengue virus type1* ซึ่งเป็นตัวแทนของไวรัสที่อยู่ในแฟมิลี *flaviviridae*

**ตารางที่ 4.7** ผลการทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน (positive  $\geq 0.200$  >negative)

แอนติเจน	อัตราส่วนการเจือจาง anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15			
	ไม่เจือจาง	1:2	1:10	1:50
CD.JEVAX® Inj.	-	-	-	-
IMOJEV®	-	-	-	-
Beijing-GPO	+	+	+	+
JEVAC™	+	+	+	+
<i>Dengue virus type1</i>	+	+	+	+

Positive (+) หมายถึง anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 มีความจำเพาะต่อแอนติเจน

Negative (-) หมายถึง anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ไม่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน

#### 4.6 ทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 (ในรูปแบบน้ำ)

การทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี typing ELISA ตามข้อ 3.7.1 ซึ่งใช้แอนติเจนที่มีความจำเพาะกับจีโนม *flavivirus* คือ *Dengue virus* type 1 ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ค่าความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1000 ในครั้งแรกสัปดาห์ที่ 0 ให้ผลเป็น positive ทุกค่าความเจือจาง (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 (positive  $\geq 0.200$  > negative)

สัปดาห์ที่	ค่าการเจือจาง anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15		
	1:10	1:100	1:1000
0	0.997 (positive)	0.834 (positive)	0.241 (positive)
1	0.991 (positive)	0.802 (positive)	0.209 (positive)
2	0.993 (positive)	0.836 (positive)	0.219 (positive)
3	0.990 (positive)	0.822 (positive)	0.232 (positive)
4	0.981 (positive)	0.847 (positive)	0.204 (positive)
5	0.991 (positive)	0.819 (positive)	0.242 (positive)
6	0.973 (positive)	0.807 (positive)	0.238 (positive)
7	0.952 (positive)	0.811 (positive)	0.206 (positive)
8	0.964 (positive)	0.835 (positive)	0.244 (positive)
9	0.913 (positive)	0.799 (positive)	0.195 (negative)
10	0.942 (positive)	0.784 (positive)	0.183 (negative)
11	0.927 (positive)	0.792 (positive)	0.196 (negative)
12	0.905 (positive)	0.795 (positive)	0.197 (negative)

เมื่อทดสอบทุก ๆ สัปดาห์ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1-8 ให้ผลเป็น positive ทุกค่าความเจือจางเช่นเดียวกับสัปดาห์ที่ 0 และทดสอบความคงทนต่อเนื้องในสัปดาห์ที่ 9-12 ให้ผลเป็น positive ที่ค่าความเจือจาง 1:10 และ 1:100 ให้ผลเป็น negative ที่ค่าความเจือจาง 1:1000 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 มีความคงทนเหมือนกับสัปดาห์ที่ 0 ไม่เปลี่ยนแปลง จนเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 มีความคงทนลดลง โดยลดลงในสัปดาห์ที่ 9 ที่ค่าความเจือจาง 1:1000 ซึ่งให้ค่า negative

จากผลการวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นทำให้ทางผู้วิจัยสามารถเขียนบทความงานวิจัยลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (NU. International of Science) ซึ่งได้รับการตอบรับให้ส่งบทความวิจัยลงตีพิมพ์จากผู้วิจารณ์ (reviewer) (ภาคผนวก ฉ) ซึ่งบทความวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการปิดโครงการของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) สัญญาเลขที่ MSD57I0119 และยังได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการต่าง ๆ เพื่อเป็นการเผยแพร่งานวิจัยให้เกิดประโยชน์ต่อไป รวมถึงทางผู้วิจัยกำลังดำเนินการส่งคำร้องขออนุญาตจดอนุสิทธิบัตรสำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมอีกด้วย

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสโรคไข้สมองอักเสบเจอีในพืช โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 ซึ่งเป็น hybridoma cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมของตัวอ่อนลูกวัว หลังจากละลายเซลล์แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อล้างเอา freezing medium ออก และเลี้ยงเซลล์ต่อพร้อมทั้ง subculture เป็นจำนวน passage อย่างน้อย 3 passage เพื่อให้เซลล์ D1-4G2-4-15 นั้นมีความแข็งแรง สมบูรณ์พร้อมที่จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม ซึ่งต้องมีการสังเกตลักษณะของเซลล์ จำนวนเซลล์ และเก็บของเหลวเหนือตะกอนอย่างสม่ำเสมอ โดยลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตรอดนั้นจะมีลักษณะเซลล์ที่ วาวใส ขอบเซลล์เรียบ อยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 2 แบบ คือ CD Hybridoma medium และ Hybridoma-SFM medium และแบ่งวิธีการเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 วิธี คือ Direct adaptation และ Sequential adaptation โดยใช้เซลล์เริ่มต้น  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมแล้วต้องมีการสังเกตลักษณะเซลล์ จำนวนเซลล์ และเก็บของเหลวเหนือตะกอนอย่างสม่ำเสมอเช่นกัน นำของเหลวเหนือตะกอนไปทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยใช้วิธี ELISA ต่อจากนั้นจึงนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50% เพื่อเป็นการทำบริสุทธิ์ขั้นต้น รวมถึงการลดปริมาณของเหลวเหนือตะกอนเพื่อให้มีความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีมากขึ้น และนำตัวอย่างที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่ปริมาณ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่ได้หลังจากการทำบริสุทธิ์แล้ว พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมชนิด Hybridoma-SFM medium ที่เลี้ยงโดยวิธี Sequential adaptation ได้ปริมาณ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 สูงสุด แต่เมื่อพิจารณาทางสถิติแล้วความแปรปรวนไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนทั้งหมดและปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ทั้งสองวิธีการเพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งในทางปฏิบัติที่ต้องการปริมาณมากหรือนำไปประยุกต์ใช้ในภาคอุตสาหกรรม สามารถเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี Direct adaptation เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการผลิต anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 สั้นกว่าวิธี Sequential adaptation คือวิธี Direct adaptation ใช้เวลาในการผลิต anti-flavivirus

group antigen clone D1-4G2-4-15 อย่างน้อย 7 วัน ส่วนวิธี Sequential adaptation ใช้เวลาในการผลิต anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 อย่างน้อย 25 วัน ส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์ทางผู้วิจัยขอแนะนำให้ใช้ อาหารที่เลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัมชนิด Hybridoma-SFM medium เนื่องจากมีราคาถูกกว่า ซึ่งการเลือกใช้วิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ Direct adaptation และอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium จึงช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนในการผลิต anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 รวมถึงสามารถลดการปนเปื้อน ไวรัส แบคทีเรีย หรือ การปนเปื้อนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ พร้อมทั้งยังสามารถช่วยลดขั้นตอนในการกำจัดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของซีรัมในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์นั้นง่ายขึ้น เมื่อนำ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 มาทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อยู่ในจีโนม *flavivirus* พบว่า anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่อยู่ในจีโนม *flavivirus* ซึ่งสามารถบอกได้ว่างานวิจัยนี้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยที่ตั้งไว้ข้างต้นคือ สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่บริสุทธิ์ และจำเพาะต่อแอนติเจนของจีโนม *flavivirus* เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัส จากนั้นเมื่อนำตัวอย่างมาทำการทดสอบความคงทนของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ที่อยู่ในรูปแบบน้ำโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งหมด 12 สัปดาห์ พบว่า anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ยังสามารถจับกับแอนติเจน ที่อยู่ในจีโนม *flavivirus* ได้อย่างจำเพาะ เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ได้ยาวนานมากขึ้น โดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็งซึ่งทำให้สะดวกต่อการเก็บรักษาและการใช้งานที่จะนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอีกเสบเจอีในใบยาสูบต่อไป และเป้าหมายสูงสุดของงานวิจัยนี้ในลำดับต่อไปนั้นจะเป็นการยื่นคำร้องขอจดสิทธิบัตรส่วนใดส่วนหนึ่งของกระบวนการวิจัย หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้ในอนาคต โดยเป็นการใช้นวัตกรรมของคนไทย ภายใต้เครื่องหมายการค้าไทย และเทคโนโลยีภายในประเทศ ซึ่งงานวิจัยนี้อาจจะมีการพัฒนาต่อไปได้และส่งผลให้มีการพัฒนาเทคโนโลยีให้สูงขึ้นซึ่งช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ ที่ภาคอุตสาหกรรมสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตสินค้า ลดต้นทุนการผลิตสินค้า เพิ่มภาษีมูลค่าเพิ่ม ปรับปรุงคุณภาพของสินค้าจะเป็นการลดการพึ่งพาหรือการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ เพื่อสุขภาพและอนามัยของประชาชนที่ดีขึ้น โดยมีพื้นฐานจากการประดิษฐ์คิดค้นสิ่งใหม่ ๆ ที่มีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์สามารถประยุกต์ใช้ได้จริงอย่างเป็นรูปธรรมได้ในอนาคตอันใกล้



## รายการอ้างอิง

### หนังสือและบทความในหนังสือ

- วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์, จุฑารัตน์ เมฆมัลลิกา, ทวี โชติพิทยสุนนท์, และอุษา ทิสยากร. (2548). *วัคซีนและโรคติดเชื้อที่ป้องกันได้ด้วยวัคซีน*. กรุงเทพมหานคร: ธราเพลส จำกัด.
- วัชระ กสิณฤกษ์. (2551). *แอนติบอดี ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้*. เชียงใหม่: หจก. ดาราวรรณการพิมพ์.
- โอฬาร พรหมลิขิต, อัจฉรา ตั้งสถาพรพงษ์ และอุษา ทิสยากร. (2554). *วัคซีน*. กรุงเทพฯ: นพชัยการพิมพ์ จำกัด.
- Albert, W. H. W. (1985). Monoclonal antibodies: advantages and disadvantages in production of test systems. In N. K. Shinton (Ed.), *New Technologies in Clinical Laboratory Science: Proceedings of the fifth ECCLS Seminar held at Siena, Italy, 23–25 May 1984* (pp. 83-96). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Albitar, M. (2007). *Monoclonal antibodies: methods and protocols* (Vol. 378): Springer Science & Business Media.
- Amarasekera, M. (2011). Immunoglobulin E in health and disease. *Asia Pacific Allergy*, 1(1), 12-15.
- Brown, S. H., Levin, D., Shinnar, R., & Weber, W. A. (2002). Single stage process for converting oxygenates to gasoline and distillate in the presence of undimensional ten member ring zeolite: Google Patents.
- Cuatrecasas, P., & Anfinsen, C. B. (1971). Affinity chromatography. *Methods in enzymology*, 22, 345-378.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (pp3. 17-3.32): Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ettre, C. H. a. L. S. (1991). *Chromatography in Biotechnology*. New York: American Chemical Society.

- Ferreira, C., Papamichael, K., Guilbault, G., Schwarzacher, T., Garipey, J., & Missailidis, S. (2008). DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390(4), 1039-1050.
- Freshney, R. I. (2005). Serum-Free Media. *Culture of animal cells*.
- Fong, F. C. N. H. K., & Weng, S. O. K. (1997). Cell culture media for enhanced protein production: Google Patents.
- Ganetsos, G., & Barker, P. E. (1992). *Preparative and production scale chromatography* (Vol. 61): CRC Press.
- Giddings, J. C. (1991). *Unified separation science*: Wiley New York etc.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (1997). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (Vol. 1): Current Biology Singapore.
- Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (2001). *Immunology*. Mosby. New York.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*: John Wiley & Sons.
- Spiegelberg, H. L. (1974). Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. *Advances in immunology*, 19, 259-294.
- Vladutiu, A. O. (2000). Immunoglobulin D: Properties, Measurement, and Clinical Relevance. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(2), 131-140.

### บทความวารสาร

- เฉลิมเกียรติ สุวรรณเทน, และสมศักดิ์ เทียมเก่า. (2554). Japanese encephalitis. *วารสารของสมาคมประสาทวิทยาศาสตร์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ*, 6(4), 93-100.
- นิรันดร ยิ้มจ่อหอ. (2555). โรคไข้มองอักเสบ (Encephalitis). *สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2555*.

- Ackekman, S. B., Wortham, J., & Swamson, R. J. (1981). An Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection and Quantitation of Antisperm Antibodies. *American journal of reproductive immunology*, 1(4), 199-205.
- Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Current protocols in microbiology*, APPENDIX, Appendix-4E.
- Appaiahgari, M. B., & Vrati, S. (2010). IMOJEV<sup>®</sup>: a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 9(12), 1371-1384.
- Apte-Sengupta, S., Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2014). Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current Opinion in Virology*, 9, 134-142.
- Aranda-Peres, A. N., Peres, L. E. P., Higashi, E. N., & Martinelli, A. P. (2009). Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. *HortScience*, 44(1), 106-112.
- Ariff, I. M., Thounaojam, M. C., Das, S., & Basu, A. (2013). Japanese encephalitis virus infection alters both neuronal and astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(3), 664-676.
- BAŞALP, A., ÇIRAKOĞLU, B., & BERMEK, E. (2000). Simple production and purification of monoclonal antibodies in serum-free medium. *Turkish Journal of Biology*, 24(2), 189-196.
- Bauer, S. M., Gehringer, M., & Laufer, S. A. (2014). A direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative evaluation of Janus Kinase 3 (JAK3) inhibitors. *Analytical Methods*, 6(21), 8817-8822.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2), 248-254.

- Brussow, H., Baensch, M., & Sidoti, J. (1992). Seroprevalence of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in different age groups of Ecuadorian and German children. *J Clin Microbiol*, 30(11), 2765-2771.
- Büntemeyer, H., & Lehmann, J. (2001). The Role of Vitamins in Cell Culture Media. In E. Lindner-Olsson, N. Chatzissavidou, & E. Lüllau (Eds.), *Animal Cell Technology: From Target to Market: Proceedings of the 17th ESACT Meeting Tylösand, Sweden, June 10–14, 2001* (pp. 204-206). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Butler, M., Burgener, A., Patrick, M., Berry, M., Moffatt, D., Huzel, N., & Coombs, K. (2000). Application of a Serum-Free Medium for the Growth of Vero Cells and the Production of Reovirus. *Biotechnology progress*, 16(5), 854-858.
- Butler, M., & Huzel, N. (1995). The effect of fatty acids on hybridoma cell growth and antibody productivity in serum-free cultures. *Journal of biotechnology*, 39(2), 165-173.
- Burnouf, T., & Radosevich, M. (2001). Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1), 575-586.
- Burteau, C. C., Verhoeve, F. R., Mols, J. F., Ballez, J.-S., Agathos, S. N., & Schneider, Y.-J. (2003). Fortification of a Protein-Free Cell Culture Medium with Plant Peptones Improves Cultivation and Productivity of an Interferon- $\gamma$ -Producing CHO Cell Line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 39(7), 291-296.
- Chokephaibulkit, K., Houillon, G., Feroldi, E., & Bouckenoghe, A. (2016). Safety and immunogenicity of a live attenuated Japanese encephalitis chimeric virus vaccine (IMOJEV(R)) in children. *Expert Rev Vaccines*, 15(2), 153-166.

- Chokephaibulkit, K., Houillon, G., Feroldi, E., & Bouckenooghe, A. (2016). Safety and immunogenicity of a live attenuated Japanese encephalitis chimeric virus vaccine (IMOJEV®) in children. *Expert review of vaccines*, 15(2), 153-166.
- Chokephaibulkit, K., Sirivichayakul, C., Thisyakorn, U., Pancharoen, C., Boaz, M., Bouckenooghe, A., & Feroldi, E. (2016). Long-term follow-up of Japanese encephalitis chimeric virus vaccine: Immune responses in children. *Vaccine*, 34(46), 5664-5669.
- Coffey, R. N., Watson, R. W. G., Hegarty, P. K., Watson, C. L., Wolohan, L., Brady, H. R., & Fitzpatrick, J. M. (2001). Priming prostate carcinoma cells for increased apoptosis is associated with up-regulation of the caspases. *Cancer*, 92(9), 2297-2308.
- Contu, F., Elsener, B., & Böhni, H. (2002). Characterization of implant materials in fetal bovine serum and sodium sulfate by electrochemical impedance spectroscopy. I. Mechanically polished samples. *Journal of biomedical materials research*, 62(3), 412-421.
- Corbin, J. M., Hashimoto, B. I., Karuppanan, K., Kyser, Z. R., Wu, L., Roberts, B. A., & Nandi, S. (2016). Semicontinuous Bioreactor Production of Recombinant Butyrylcholinesterase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 7, 412.
- Costa, A. R., Withers, J., Rodrigues, M. E., McLoughlin, N., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2013). The impact of cell adaptation to serum-free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. *New biotechnology*, 30(5), 563-572.
- Cramer, J. P., Dubischar, K., Eder, S., Burchard, G. D., Jelinek, T., Jilma, B., & Westritschnig, K. (2016). Immunogenicity and safety of the inactivated Japanese encephalitis vaccine IXIARO® in elderly subjects: Open-label, uncontrolled, multi-center, phase 4 study. *Vaccine*, 34(38), 4579-4585.

- Cuatrecasas, P. (1970). Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059-3065.
- Daniels, P. W., Williams, D. T., Mackenzie, J. S., Morilla, A., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2002). Japanese encephalitis virus. *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*, 251-263.
- de Wispelaere, M., Khou, C., Frenkiel, M.-P., Desprès, P., & Pardigon, N. (2016). A Single Amino Acid Substitution in the M Protein Attenuates Japanese Encephalitis Virus in Mammalian Hosts. *Journal of Virology*, 90(5), 2676-2689.
- Deorosan, B., & Nauman, E. A. (2011). The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells international*, 2011.
- Dienstmann, R., Markman, B., & Taberner, J. (2012). Application of monoclonal antibodies as cancer therapy in solid tumors. *Curr Clin Pharmacol*, 7(2), 137-145.
- Eivazi, S., Majidi, J., Aghebati Maleki, L., Abdolalizadeh, J., Yousefi, M., Ahmadi, M., & Zolali, E. (2015). Production and Purification of a Polyclonal Antibody Against Purified Mouse IgG2b in Rabbits Towards Designing Mouse Monoclonal Isotyping Kits. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(1), 109-113.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- Fatin-Rouge, N., Starchev, K., & Buffle, J. (2004). Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels. *Biophysical Journal*, 86(5), 2710-2719.
- Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. (2009). Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe*, 5(4), 318-328.
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3.

- Genzel, Y., Konig, S., & Reichl, U. (2004). Amino acid analysis in mammalian cell culture media containing serum and high glucose concentrations by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection. *Anal Biochem*, 335(1), 119-125.
- Ghaemimanesh, F., Bayat, A. A., Babaei, S., Ahmadian, G., Zarnani, A.-H., Behmanesh, M., & Rabbani, H. (2015). Production and characterization of a novel monoclonal antibody against human sortilin. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 34(6), 390-395.
- Ghislain, J. J., & Fish, E. N. (1996). Application of genomic DNA affinity chromatography identifies multiple interferon- $\alpha$ -regulated Stat2 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12408-12413.
- Glassy, M. C., Tharakan, J. P., & Chau, P. C. (1988). Serum-free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production. *Biotechnology and bioengineering*, 32(8), 1015-1028.
- Goncalvez, A. P., Purcell, R. H., & Lai, C.-J. (2016). Humanized monoclonal antibodies that specifically bind and/or neutralize Japanese encephalitis virus (JEV) and their use: Google Patents.
- Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*, 20(4), 275-281.
- Halstead, S. B., & Jacobson, J. (2003). Japanese encephalitis. *Advances in virus research*, 61, 103-138.
- Halstead, S. B., & Thomas, S. J. (2011). New Japanese encephalitis vaccines: alternatives to production in mouse brain. *Expert Rev Vaccines*, 10(3), 355-364. doi:10.1586/erv.11.7
- Ham, R. G., & McKeehan, W. L. (1979). [5] Media and growth requirements. *Methods in enzymology*, 58, 44-93.

- Hanko, V. P., & Rohrer, J. S. (2004). Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Anal Biochem*, 324(1), 29-38.
- Hoffman, I., Schweitzer, J. E., Ryan, D. E., & Beamish, F. E. (1953). Quantitative Organic Precipitants for Osmium. *Analytical Chemistry*, 25(7), 1091-1094.
- Hoke, C. H., Nisalak, A., Sangawhipa, N., Jatanasen, S., Laorakapongse, T., Innis, B. L., & Fukai, K. (1988). Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines. *New England Journal of Medicine*, 319(10), 608-614.
- Howat, W. J., Holgate, S. T., & Lackie, P. M. (2002). TGF- $\beta$  isoform release and activation during in vitro bronchial epithelial wound repair. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(1), L115-L123.
- Hua, R.-H., Liu, L.-K., Chen, Z.-S., Li, Y.-N., & Bu, Z.-G. (2013). Comprehensive mapping antigenic epitopes of NS1 protein of Japanese encephalitis virus with monoclonal antibodies. *PloS one*, 8(6), e67553.
- Huang, H., Mao, Y., Ying, Y., Liu, Y., Sun, L., & Peng, X. (2013). Salt concentration, pH and pressure controlled separation of small molecules through lamellar graphene oxide membranes. *Chemical Communications*, 49(53), 5963-5965.
- Innis, B., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., & Hoke, C. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 40(4), 418-427.
- Jan, L.-R., Yang, C.-S., Trent, D. W., Falgout, B., & Lai, C.-J. (1995). Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *Journal of General Virology*, 76(3), 573-580.
- Jayme, D., Watanabe, T., & Shimada, T. (1997). Basal medium development for serum-free culture: a historical perspective. *Cytotechnology*, 23(1-3), 95-101.



- Johnsson, B., Lofas, S., & Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem*, 198(2), 268-277.
- Jordan, W. (2005). Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In R. Burns (Ed.), *Immunochemical Protocols* (pp. 215-225). Totowa, NJ: Humana Press.
- Junaid, M., Chalayat, C., Torrejon, A. S., Angsuthanasombat, C., Shutava, I., Lapins, M., & Katzenmeier, G. (2012). Enzymatic analysis of recombinant Japanese encephalitis virus NS2B (H)-NS3pro protease with fluorogenic model peptide substrates. *PLoS one*, 7(5), e36872.
- Kawada, M., Inoue, H., Kajikawa, M., Sugiura, M., Sakamoto, S., Urano, S., & Masuda, T. (2017). A novel monoclonal antibody targeting coxsackie virus and adenovirus receptor inhibits tumor growth in vivo. *Scientific Reports*, 7, 40400.
- Keenan, J., Pearson, D., & Clynes, M. (2006). The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. *Cytotechnology*, 50(1-3), 49-56.
- Khemakanok, K., Chataroopwijit, J., Upiya, N. U., Hutspardol, S. H., Treesirichod, A., Methawasin, K., & Angtong, W. (2010). Delayed onset acute hemiparesis in Japanese Encephalitis: A case report and literature review. *Journal of Medicine and Health Sciences*, 17(2), 114-121.
- Kim, E. J., Nam, J. H., Park, Y. K., & Cho, H. W. (1997). Analysis of NS4 Region of Japanese Encephalitis virus K94P05 Isolated from Korea. *Journal of the Korean Society of Virology*, 27(2), 197-208.
- Kim, S. W., Kim, S.-J., Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2015). Modulation of the cancer cell transcriptome by culture media formulations and cell density. *International Journal of Oncology*, 46(5), 2067-2075.
- Kit, Y., Bilyy, R., Korniy, N., Tomin, A., Chop'yak, V., Tolstyak, Y., & Stoika, R. (2015). Two-step chromatography purification of IgGs possessing sialidase activity from human blood serum. *Biomedical Chromatography*, 29(3), 328-332.

- Ku, C. C., King, C. C., Lin, C. Y., Hsu, H. C., Chen, L. Y., Yueh, Y. Y., & Chang, G. J. J. (1994). Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *Journal of medical virology*, 44(2), 122-131.
- Kumar, A., & Srivastava, A. (2010). Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. *Nature protocols*, 5(11), 1737-1747.
- Lane, C. A., Pax, R. A., & Bennett, J. L. (1987). L-glutamine: an amino acid required for maintenance of the tegumental membrane potential of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 94 ( Pt 2), 233-242.
- Larena, M., Regner, M., & Lobigs, M. (2013). Cytolytic effector pathways and IFN- $\gamma$  help protect against Japanese encephalitis. *European journal of immunology*, 43(7), 1789-1798.
- Lee, S., Moon, H., Kim, M. G., Kim, D. K., Chung, H. J., Park, Y. K., & Oh, H. J. (2016). Establishment of the 3rd national standard for lot release testing of the Japanese encephalitis vaccine (Nakayama-NIH strain) in Korea. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(7), 1805-1807.
- Leedham, G., Varma, S., Patankar, A., & Govindaraju, V. (2002). *Separating text and background in degraded document images-a comparison of global thresholding techniques for multi-stage thresholding*. Paper presented at the Frontiers in Handwriting Recognition, 2002. Proceedings. Eighth International Workshop on.
- Lesniak, A., Campbell, A., Monopoli, M. P., Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2010). Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake. *Biomaterials*, 31(36), 9511-9518.
- Li, G., Tong, H., Chen, J., Wei, J., Zhao, X., Zhang, G., & Shi, Z. (2015). Current Progress and Future Perspectives of Controlling Japanese Encephalitis Virus. *British Journal of Virology*, 2(4), 53.

- Liu, C.-C., Lee, S.-C., Butler, M., & Wu, S.-C. (2008). High genetic stability of dengue virus propagated in MRC-5 cells as compared to the virus propagated in vero cells. *PloS one*, 3(3), e1810.
- Lu, G., & Gong, P. (2013). Crystal Structure of the full-length Japanese encephalitis virus NS5 reveals a conserved methyltransferase-polymerase interface. *PLoS Pathog*, 9(8), e1003549.
- Luca, V. C., AbiMansour, J., Nelson, C. A., & Fremont, D. H. (2012). Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J Virol*, 86(4), 2337-2346.
- Mariam, S. H. S., Ooi, C. W., Tan, W. S., Janna, O. A., Arbakariya, A., & Tey, B. T. (2015). Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and Purification Technology*, 144, 133-138.
- Murakami, H., Masui, H., Sato, G. H., Sueoka, N., Chow, T. P., & Kano-Sueoka, T. (1982). Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolamine is an essential component. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(4), 1158-1162.
- Melian, E. B., Hinzman, E., Nagasaki, T., Firth, A. E., Wills, N. M., Nouwens, A. S., & Khromykh, A. A. (2010). NS1' of Flaviviruses in the Japanese Encephalitis Virus Serogroup Is a Product of Ribosomal Frameshifting and Plays a Role in Viral Neuroinvasiveness. *Journal of Virology*, 84(3), 1641-1647.
- Mills, J. R., Barnidge, D. R., & Murray, D. L. (2015). Detecting monoclonal immunoglobulins in human serum using mass spectrometry. *Methods*, 81, 56-65.
- Monath, T. P. (2002). Japanese encephalitis vaccines: current vaccines and future prospects. *Curr Top Microbiol Immunol*, 267, 105-138.

- Monath, T. P., Guirakhoo, F., Nichols, R., Yoksan, S., Schrader, R., Murphy, C., & Mathis, D. (2003). Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 188(8), 1213-1230.
- Monto, A. S., Maassab, H. F., & Bryan, E. R. (1981). Relative efficacy of embryonated eggs and cell culture for isolation of contemporary influenza viruses. *J Clin Microbiol*, 13(1), 233-235.
- Morgenthaler, N. G., Struck, J., Alonso, C., & Bergmann, A. (2006). Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clinical chemistry*, 52(1), 112-119.
- Mori, Y., Yamashita, T., Tanaka, Y., Tsuda, Y., Abe, T., Moriishi, K., & Matsuura, Y. (2007). Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells. *Journal of Virology*, 81(16), 8477-8487.
- Morita, K., Nabeshima, T., & Buerano, C. (2015). Japanese encephalitis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 441-452.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. m. i. b. p. e. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.
- Nagahara, Y., Sekine, H., Otaki, M., Hayashi, M., & Murase, N. (2016). Use of high concentrations of dimethyl sulfoxide for cryopreservation of HepG2 cells adhered to glass and polydimethylsiloxane matrices. *Cryobiology*, 72(1), 53-59.
- Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. G. (2000). Demystified Monoclonal antibodies. *Molecular Pathology*, 53(3), 111-117.

- Nema, R., & Khare, S. (2012). An animal cell culture: Advance technology for modern research.
- Novick, D., & Rubinstein, M. (2012). Ligand affinity chromatography, an indispensable method for the purification of soluble cytokine receptors and binding proteins. *Methods Mol Biol*, 820, 195-214.
- O'Carra, P., Barry, S., & Griffin, T. (1974). Spacer arms in affinity chromatography: Use of hydrophilic arms to control or eliminate nonbiospecific adsorption effects. *FEBS Letters*, 43(2), 169-175.
- Organization, W. H. (2016). Japanese Encephalitis vaccines: WHO position paper, February 2015-recommendations. *Vaccine*, 34(3), 302-303.
- Pandey, S. (2010). Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 1(2), 017.
- Pasieka, A. E., & Morgan, J. F. (1959). Glutamine metabolism of normal and malignant cells cultivated in synthetic media. *Nature*, 183(4669), 1201-1202.
- Payne, W. J., Marshall, D. L., Shockley, R. K., & Martin, W. J. (1988). Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(3), 313-329.
- Peehl, D. M., Wong, S. T., & Stamey, T. A. (1988). Clonal growth characteristics of adult human prostatic epithelial cells. *In vitro cellular & developmental biology*, 24(6), 530-536.
- Pfeffer, M., & Dobler, G. (2010). Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*, 3(1), 1.
- Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, 13, 131.
- Ren, D., & Miller, J. D. (2003). Primary cell culture of suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull*, 61(5), 547-553.

- Ryan, P. A., Maher, V. M., & McCormick, J. J. (1987). Modification of MCDB 110 medium to support prolonged growth and consistent high cloning efficiency of diploid human fibroblasts. *Experimental cell research*, 172(2), 318-328.
- Sainsbury, F., & Lomonossoff, G. P. (2008). Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant physiology*, 148(3), 1212-1218.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E. C., & Lomonossoff, G. P. (2009). pEAO: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant biotechnology journal*, 7(7), 682-693.
- Saint Flour, C., & Papirer, E. (1983). Gas-solid chromatography: a quick method of estimating surface free energy variations induced by the treatment of short glass fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 91(1), 69-75.
- Schrek, R. (1936). A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *The American Journal of Cancer*, 28(2), 389-392.
- Scopes, R. K., Rogers, P. L., & Leigh, D. A. (1988). Method for the production of sorbitol and gluconate: Google Patents.
- Serrato, J. A., Hernández, V., Estrada-Mondaca, S., Palomares, L. A., & Ramírez, O. T. (2007). Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnology and applied biochemistry*, 47(2), 113-124.
- Singh, S. K., Kulshreshtha, D., Singh, A. K., Maurya, P. K., & Thacker, A. K. (2016). Acute Encephalitic Syndrome in Adults and its Correlation with Cytokine Levels in Serum and Cerebrospinal Fluid. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, JJID. 2016.2063.
- Solomon, T. (2003). Recent advances in Japanese encephalitis. *Journal of neurovirology*, 9(2), 274-283.

- Sternberg, J., Benoit, J. C., Mercier, A., & Paquette, J. C. (1964). ROLE OF SOME TRACE ELEMENTS (ZINC AND COBALT) IN THE GROWTH OF B.C.G. *Rev Can Biol*, 23, 353-365.
- Su, C.-L., Yang, C.-F., Chang, S.-F., & Shu, P.-Y. (2016). Molecular Epidemiology of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes during 2013-2014. *Epidemiology Bulletin*, 32(7), 47-47.
- Suhaimi, H., Wang, S., & Das, D. B. (2015). Glucose diffusivity in cell culture medium. *Chemical Engineering Journal*, 269, 323-327.
- Svitkin, Y. V., Lyapustin, V. N., Lashkevich, V. A., & Agol, V. I. (1978). A comparative study on translation of flavivirus and picornavirus RNAs in vitro. *FEBS Letters*, 96(1), 211-215.
- Syrigos, K. N., Deonarian, D. P., & Epenetos, A. A. (1999). Use of monoclonal antibodies for the diagnosis and treatment of bladder cancer. *Hybridoma*, 18(3), 219-224.
- Takegami, T., Sakamuro, D., & Furukawa, T. (1995). Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. *Virus genes*, 9(2), 105-112.
- Tan, K. Y., Teo, K. L., Lim, J. F. Y., Chen, A. K. L., Reuveny, S., & Oh, S. K. W. (2015). Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. *Cytotherapy*, 17(8), 1152-1165.
- Teng, S. F., Sproule, K., Husain, A., & Lowe, C. R. (2000). Affinity chromatography on immobilized "biomimetic" ligands: Synthesis, immobilization and chromatographic assessment of an immunoglobulin G-binding ligand. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 740(1), 1-15.
- Thisyakorn, U., & Nimmannitya, S. (1985). Japanese encephalitis in Thai children, Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 16(1), 93-97.

- Tian, H.-Y., Bi, P., Cazelles, B., Zhou, S., Huang, S.-Q., Yang, J., & Xu, B. (2015). How environmental conditions impact mosquito ecology and Japanese encephalitis: An eco-epidemiological approach. *Environment International*, 79, 17-24.
- Tiselius, A. (1937). Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochemical Journal*, 31(9), 1464.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Tsai, T. F. (2000). New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination:: Minutes of a WHO/CVI meeting, Bangkok, Thailand, 13–15 October 1998. *Vaccine*, 18, 1-25.
- Tyagi, B., Samuel, P. P., Thenmozhi, V., Nagaraj, J., Ramesh, D., Selvi, S. K., & Venkatesh, A. (2016). Determination of critical density and vectorial capacity for *Culex tritaeniorhynchus* Giles, 1901 (Diptera: Culicidae), the primary vector for Japanese encephalitis in southern India.
- Uchil, P. D., & Satchidanandam, V. (2001). Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 65(3), 242-251.
- Umitsu, M., Sakai, K., Ogasawara, S., Kaneko, M. K., Asaki, R., Tamura-Kawakami, K., & Takagi, J. (2016). Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. *Scientific Reports*, 6, 33149.



- Unni, S. K., Růžek, D., Chhatbar, C., Mishra, R., Johri, M. K., & Singh, S. K. (2011). Japanese encephalitis virus: from genome to infectome. *Microbes and Infection*, 13(4), 312-321.
- Upadhyay, R. K., & Ahmad, S. (2011). Japanese encephalitis virus (JEV): its epidemiology, disease and vector control with special reference to immune surveillance and safety measures: A review. *Journal of Pharmacy Research* Vol, 4(8), 2490-2499.
- Van den Hurk, A. F., Ritchie, S. A., & Mackenzie, J. S. (2009). Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annual review of entomology*, 54, 17-35.
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L. E., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053-1063.
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Svenningsen, Å. F., Honegger, P., Knudsen, L. E., & Scarino, M. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053-1063.
- Wang, H.-J., Liu, L., Li, X.-F., Ye, Q., Deng, Y.-Q., Qin, E.-D., & Qin, C.-F. (2016). In vitro and in vivo characterization of chimeric duck Tembusu virus based on Japanese encephalitis live vaccine strain SA14-14-2. *Journal of General Virology*, 97(7), 1551-1556.
- Wang, H., & Liang, G. (2015). Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects. *Therapeutics & Clinical Risk Management*, 11.
- Wang, L., Hu, B., Jiang, Z., & Li, Z. (2002). Speciation of Cr III and Cr VI in aqueous samples by coprecipitation/slurry sampling fluorination assisted graphite furnace atomic absorption spectrometry. *International Journal of Environmental & Analytical Chemistry*, 82(6), 387-393.

- Wang, X., Hou, L., Du, J., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., & Yang, H. (2015). Capsid, membrane and NS3 are the major viral proteins involved in autophagy induced by Japanese encephalitis virus. *Veterinary Microbiology*, 178(3-4), 217-229.
- Watanabe, S., & Vasudevan, S. G. (2014). Evaluation of Dengue Antiviral Candidates In Vivo in Mouse Model. In R. Padmanabhan & S. G. Vasudevan (Eds.), *Dengue: Methods and Protocols* (pp. 391-400). New York, NY: Springer New York.
- Wei, J.-c., Huang, Y.-z., Zhong, D.-k., Kang, L., Ishag, H., Mao, X., & Chen, P.-y. (2010). Design and evaluation of a multi-epitope peptide against Japanese encephalitis virus infection in BALB/c mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(4), 787-792.
- West, P. W., & Conrad, L. J. (1950). A comparison study of the coprecipitation of cations by organic and inorganic precipitants. *Analytica Chimica Acta*, 4, 561-565.
- Woof, J. M., & Kerr, M. A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of pathology*, 208(2), 270-282.
- Wu, P.-W., Dunn, B., Doan, V., Schwartz, B. J., Yablonovitch, E., & Yamane, M. (2000). Controlling the spontaneous precipitation of silver nanoparticles in sol-gel materials. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 19(1), 249-252.
- Ye, Q., Li, X.-F., Zhao, H., Li, S.-H., Deng, Y.-Q., Cao, R.-Y., & Yu, Y.-X. (2012). A single nucleotide mutation in NS2A of Japanese encephalitis-live vaccine virus (SA14-14-2) ablates NS1'formation and contributes to attenuation. *Journal of General Virology*, 93(9), 1959-1964.
- Yohannes, G., Jussila, M., Hartonen, K., & Riekkola, M.-L. (2011). Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *Journal of Chromatography A*, 1218(27), 4104-4116.

Zhou, L., & Boyd, C. E. (2016). Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture. *Aquaculture*, 450, 187-193.

### วิทยานิพนธ์

Nukdee, K. (2003). *Characterization of japanese encephalitis virus grown at high temperature*. (Master's thesis). mahidol university, Science, Microbiology.

Tangkananond, W. (2008). *Molecular evolution of Japanese encephalitis virus (JEV) in nature*. university of Liverpool, Liverpool, United Kingdom.

### สื่ออิเล็กทรอนิกส์

Affmetrix. (2008, July 9). Immunoglobulin Structure [Web blog message]. Retrieved from <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/structure.htm>

Antimicrobe. (2010). Japanese Encephalitis [Web blog message]. Retrieved from <http://www.antimicrobe.org/v43tabs.htm>

Boster Biological Technology. (2016). Four Most Common ELISA Types [Web blog message]. Retrieved from <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>

Diagnostic automation. (2015, January 3). Japanese Encephalitis IgM ELISA kit [Web blog message]. Retrieved from <http://www.rapidtest.com/index.php?i=Parasitology-ELISA-kits&id=619&cat=17>

InaDays Turkey. (2010, January 22). Mosquito museum [Web blog message]. Retrieved from <http://www.inadays.com.tr/en/about/mosquito-museum>



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15

## ก.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรัม

## ก.1.1 วิธีเตรียม CD Hybridoma medium ปริมาตร 1 ลิตร

CD Hybridoma medium (Catalog No. 11279-023)	1	ลิตร
L-glutamine	40	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกันโดย CD Hybridoma medium ที่ใช้คือยี่ห้อ gibco ของบริษัท Thermo Fisher Scientific (Catalog No. 11279-023) เมื่อผสมกันเสร็จแล้ว ก่อนใช้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

## ก.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมตัวอ่อนของลูกวัว

## ก.2.1 วิธีเตรียม OPI ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก. 2.1.1 องค์ประกอบของการเตรียม OPI ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

องค์ประกอบ	ยี่ห้อ	Catalog Number	Lot Number	ปริมาตร (ml)
1. Oxaloacetic acid MW132	SIGMA	0-4126	112F-0709	1.320 gm
2. Pyruvic acid MW 110	SIGMA	127-17-3	064K06182	0.550 gm
3. CrystallineBovine Insulin 25 units/mg	SIGMA	I-5500	23F-0678	0.080 gm
4. Milli Q water (ปริมาตรสุดท้าย 100 ml)	N/A	N/A	N/A	100 ml

ผสมส่วนผสม 1 และ 2 เข้าด้วยกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นผสมส่วนผสมที่ 3 จนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองที่ความละเอียดรูพรุน 0.2 ไมครอน

2.2 วิธีเตรียม Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium เสริมด้วย 10% ซีรัมตัวอ่อนของลูกวัว ปริมาตร 120 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก.2.2.1 สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมตัวอ่อนของลูกวัวสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC® HB-112™)

องค์ประกอบ	ยี่ห้อ	Catalog Number	Lot Number	ปริมาณ (ml)
RPMI 1640 medium	GIBCO	11875-093	289890	80
NCTC 109 medium	GIBCO	21340-039	1271419	10
Heat Inactivated Fetal Bovine Serum	GIBCO	26140-079	1342224	10
OPI 100X	N/A	N/A	N/A	1
L-Glutamine 100X	GIBCO	25030-081	1375798	1
100X Non-Essential Amino Acids	GIBCO	11140-050	403895	1
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	GIBCO	15140-122	308642	1
HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid) 1 M	GIBCO	15630-080	396578	4
7.5% NaHCO <sub>3</sub>	SIGMA	23652-7	14731KF	2
<b>Total</b>				<b>110</b>

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองที่ความละเอียดรูพรุน 0.2 ไมครอน ก่อนใช้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

**ภาคผนวก ข**  
**การเตรียมสารเคมี**

**1. การเตรียมสารสำหรับทำ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

**1.1 วิธีการเตรียม Goat anti-mouse IgG**

Goat anti-mouse IgG	5	ไมโครลิตร
0.006M carbonate buffer pH9 ± 0.2	19.995	ไมโครลิตร

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง โดยการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้

**1.2 วิธีการเตรียม 1% BSA ในสารละลาย 10 mM PBS, pH 7.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร**

Bovine serum albumin (BSA)	0.25	กรัม
Phosphate buffered saline (PBS)	25	มิลลิลิตร

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**1.3 วิธีการเตรียม Human anti-flavivirus IgG-HRP ปริมาตร 3 มิลลิลิตร**

Human anti-flavivirus IgG-HRP	6	ไมโครลิตร
0.5% BSA in 20% NHS ใน 10 mM PBS pH 7.4 ± 0.1	3	มิลลิลิตร

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง โดยการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้

**1.4 วิธีการเตรียม O-phenylenediamine (OPD) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร**

O-phenylenediamine	0.5	มิลลิกรัม
0.01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33.3	ไมโครลิตร
0.1M citrate phosphate pH 5.0 ± 0.2	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง โดยการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้

### 1.5 วิธีการเตรียม 0.1 M Phosphate Buffered Saline (10X PBS)

Sodium chloride (NaCl)	320	กรัม
Potassium chloride (KCl)	8	กรัม
Potassium phosphate, monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7.6	กรัม
Sodium phosphate, dibasic, anhydrous (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	36	กรัม
MQ water	4,000	มิลลิลิตร

ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### 1.6 วิธีการเตรียม 0.5% Casein และ 0.5% BSA ในสารละลาย 10 mM PBS pH 7.4

Casein	5	กรัม
Sodium hydroxide (NaOH)	3	มิลลิลิตร
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4	600	มิลลิลิตร
Bovine serum albumin (BSA)	5	กรัม
MQ water	300	มิลลิลิตร

เตรียม MQ water ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร และเติม Sodium hydroxide จากนั้น ต้มจนเกิดไอเคาะบริเวณข้าง ๆ บีกเกอร์อุณหภูมิประมาณ 80-85 องศาเซลเซียส เติม Casein ลงใน สารละลายและทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง เมื่อละลายแล้วเติม 10mM Phosphate buffered saline ทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเติม Bovine serum albumin จากนั้นปรับพีเอชด้วย 2N HCl หรือ 1N NaOH สุดท้ายปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วย 10 mM Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4

### 1.7 วิธีการเตรียม 5% skim milk และ 1% Tween20 ในสารละลาย 10 mM PBS pH 7.4

Skim milk	10	กรัม
Tween 20	2	มิลลิลิตร
10 mM PBS	200	มิลลิลิตร

ผสม Skim milk และ 10 mM PBS ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเติม Tween 20 โดยใช้ magnetic bar ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง หลีกจากใช้ควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



### 1.8 วิธีการเตรียม 0.018M carbonate buffer pH 9.0±0.1

Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.152	กรัม
Sodium bicarbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	1.400	กรัม
MQ water	1,000	มิลลิลิตร

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับพีเอชให้ได้ 9.0±0.1 ด้วย 2N HCl หรือ 1N NaOH

สุดท้ายปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

## 2. การเตรียมสารเคมีสำหรับการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน

### 2.1 วิธีการเตรียม Saturated (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Ammonium sulfate (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	76.1	กรัม
MQ water	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น

ปรับพีเอชให้ได้ pH 7.8

### 2.2 วิธีการเตรียม Nessler's Reagent

#### สารละลาย 1

Potassium iodide (KI)	10	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

#### สารละลาย 2

Saturated mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>)

#### สารละลาย 3

Potassium hydroxide (KOH)	30	กรัม
น้ำกลั่น	60	มิลลิลิตร

เติมสารละลาย 2 ลงในสารละลาย 1 อย่างช้า ๆ โดยการเขย่าหรือกวนจนกระทั่งตะกอนแดงนั้นไม่มีการละลาย จากนั้นเติมสารละลาย 3 ที่เย็นจัด และเติมสารละลาย 2 อีก 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ 200 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ดูดเอาส่วนน้ำใสมาใช้

### 3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทำบริสุทธิ์อิมมูโนโกลบูลิน

#### 3.1 วิธีการเตรียม application buffer ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

application buffer powder	1.3	กรัม
MQ water	300	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับพีเอชให้ได้ pH  $8.0 \pm 0.2$  จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองที่ความละเอียดรูพรุน 0.2 ไมครอน

#### 3.2 วิธีการเตรียม Regeneration buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Regeneration buffer powder	12.1	กรัม
MQ water	300	มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองที่ความละเอียดรูพรุน 0.2 ไมครอน

## ภาคผนวก ค

ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของจำนวนเซลล์และเปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตที่สภาวะต่าง ๆ

ตารางผนวกที่ ค.1 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ที่สภาวะต่าง ๆ

จำนวน วัน	ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตรอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	RPMI + 10% FBS	Direct adaptation	Sequential adaptation			
			75:25	50:50	25:75	0:100
0	$5.00 \times 10^5$	$6.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$
1	$5.50 \times 10^5$	$6.40 \times 10^5$	$5.40 \times 10^5$	$5.30 \times 10^5$	$5.20 \times 10^5$	$5.09 \times 10^5$
2	$7.85 \times 10^5$	$6.20 \times 10^5$	$8.50 \times 10^5$	$7.90 \times 10^5$	$5.60 \times 10^5$	$5.30 \times 10^5$
3	$1.70 \times 10^6$	$6.50 \times 10^5$	$1.90 \times 10^6$	$9.00 \times 10^5$	$7.80 \times 10^5$	$6.90 \times 10^5$
4	$2.90 \times 10^6$	$7.50 \times 10^5$	$2.50 \times 10^6$	$1.80 \times 10^6$	$1.20 \times 10^6$	$8.05 \times 10^5$
5	$3.50 \times 10^6$	$7.55 \times 10^5$	$2.85 \times 10^6$	$2.55 \times 10^6$	$1.65 \times 10^6$	$9.50 \times 10^5$
6	$3.54 \times 10^6$	$7.53 \times 10^5$	$2.85 \times 10^6$	$2.53 \times 10^6$	$1.63 \times 10^6$	$9.47 \times 10^5$
7	$3.52 \times 10^6$	$7.51 \times 10^5$	$2.84 \times 10^6$	$2.53 \times 10^6$	$1.63 \times 10^6$	$9.46 \times 10^5$

ตารางผนวกที่ ค.2 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตรอดในอาหาร CD Hybridoma medium สภาวะต่าง ๆ

จำนวน วัน	เปอร์เซนต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์					
	RPMI + 10% FBS	Direct adaptation	Sequential adaptation			
			75:25	50:50	25:75	0:100
0	90.0	93.0	90.0	90.0	90.0	90.0
1	93.0	95.3	90.6	90.9	91.8	91.3
2	93.7	97.0	93.2	92.5	92.5	92.5
3	94.0	97.5	94.0	93.6	92.0	92.0
4	96.2	95.8	96.8	96.0	94.5	93.2
5	95.0	93.6	95.4	94.5	92.8	90.6
6	93.5	88.4	95.0	92.0	90.3	87.1
7	91.3	85.2	93.8	90.0	87.0	83.0

ตารางผนวกที่ ค.3 ค่าเฉลี่ยความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่สภาวะต่าง ๆ

จำนวน วัน	ความหนาแน่นของเซลล์ที่มีชีวิตรอด (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	RPMI + 10% FBS	Direct adaptation	Sequential adaptation			
			75:25	50:50	25:75	0:100
0	$5.00 \times 10^5$	$6.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$	$5.00 \times 10^5$
1	$5.52 \times 10^5$	$6.30 \times 10^5$	$5.38 \times 10^5$	$5.25 \times 10^5$	$5.21 \times 10^5$	$5.03 \times 10^5$
2	$7.79 \times 10^5$	$6.23 \times 10^5$	$8.41 \times 10^5$	$7.97 \times 10^5$	$5.59 \times 10^5$	$5.21 \times 10^5$
3	$1.74 \times 10^6$	$6.50 \times 10^5$	$1.92 \times 10^6$	$9.05 \times 10^5$	$7.89 \times 10^5$	$6.92 \times 10^5$
4	$2.96 \times 10^6$	$7.57 \times 10^5$	$2.54 \times 10^6$	$1.83 \times 10^6$	$1.27 \times 10^6$	$8.35 \times 10^5$
5	$3.56 \times 10^6$	$7.59 \times 10^5$	$2.91 \times 10^6$	$2.57 \times 10^6$	$1.69 \times 10^6$	$9.57 \times 10^5$
6	$3.59 \times 10^6$	$8.01 \times 10^5$	$2.95 \times 10^6$	$2.58 \times 10^6$	$1.70 \times 10^6$	$9.68 \times 10^5$
7	$3.55 \times 10^6$	$8.07 \times 10^5$	$2.99 \times 10^6$	$2.62 \times 10^6$	$1.72 \times 10^6$	$9.81 \times 10^5$

ตารางผนวกที่ ค.4 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่สภาวะต่าง ๆ

จำนวน วัน	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์					
	RPMI + 10% FBS	Direct adaptation	Sequential adaptation			
			75:25	50:50	25:75	0:100
0	90.0	93.0	90.0	90.0	90.0	90.0
1	93.4	95.5	90.7	91.3	91.9	91.5
2	93.9	97.3	93.4	92.7	92.7	92.7
3	94.5	97.4	94.2	93.4	92.4	92.2
4	96.3	95.7	96.9	96.3	94.6	93.1
5	95.4	93.9	95.6	94.9	92.7	90.9
6	93.7	88.6	95.3	92.2	90.7	87.5
7	91.8	85.7	93.7	90.5	87.4	83.6

## ภาคผนวก ง

## กราฟมาตรฐานและค่าดูดกลืนแสง

ง 1. ค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์

ตารางผนวกที่ ง.1.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Direct adaptation ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์

อาหารเลี้ยงเซลล์	วัน	ไม่เจือจาง	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125
RPMI+10%FBS	3	3.416	3.417	3.442	3.295	2.415	0.836
CD Hybridoma medium	1	3.692	3.632	3.560	3.415	3.241	2.351
	2	3.745	3.853	3.524	3.613	3.142	2.835
	3	3.840	3.973	3.590	3.157	3.214	2.535
	4	3.600	3.882	3.516	3.583	3.433	2.357
	5	3.354	3.887	3.303	3.383	3.261	2.217
	6	3.262	3.263	3.447	3.517	3.330	2.520
	7	3.474	3.377	3.359	3.333	3.149	2.967
Hybridoma-SFM medium	1	3.354	3.401	3.356	3.352	3.215	2.856
	2	3.356	3.451	3.476	3.356	3.278	2.843
	3	3.395	3.424	3.412	3.312	3.264	2.870
	4	3.398	3.413	3.310	3.353	3.286	2.371
	5	3.473	3.691	3.412	3.414	3.435	2.871
	6	3.379	3.420	3.325	3.357	3.350	2.832
	7	3.431	3.430	3.443	3.399	3.451	3.225

ตารางผนวกที่ ง.1.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Sequential adaptation ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์

อัตราส่วน	วัน	ไม่เจือจาง	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125
75:25	1	3.416	3.417	3.442	3.295	2.415	0.836
	2	3.423	3.472	3.418	3.241	2.456	0.857
	3	3.442	3.478	3.484	3.254	2.489	0.945
	4	3.452	3.456	3.470	3.274	2.524	0.973
	5	3.468	3.480	3.409	3.257	2.584	1.947
50:50	1	3.483	3.492	3.283	3.268	3.157	1.348
	2	3.479	3.535	3.957	3.257	2.925	2.162
	3	3.453	3.570	3.188	3.287	2.947	2.047
	4	3.451	3.297	3.744	3.310	3.015	1.937
	5	3.470	3.926	3.823	3.536	3.285	1.814
25:75	1	3.479	3.266	2.947	2.924	2.346	1.736
	2	3.425	3.390	2.974	2.823	2.385	1.926
	3	3.328	3.293	2.745	2.835	2.745	1.631
	4	3.396	3.108	2.957	2.922	2.537	1.937
	5	3.253	3.003	2.896	2.765	2.753	1.927
0:100	1	3.363	3.311	3.028	2.922	2.728	1.823
	2	3.495	3.424	2.931	2.832	2.638	1.028
	3	3.468	3.395	2.820	2.912	2.830	1.935
	4	3.368	3.381	2.983	2.846	2.539	1.482
	5	3.562	3.419	3.099	2.974	2.293	1.943

**ตารางผนวกที่ ง.1.3** ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์โดยวิธี Sequential adaptation ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ก่อนผ่านการทำบริสุทธิ์

อัตราส่วน	วัน	1	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125
75:25	1	3.529	3.498	3.204	3.102	2.531	1.537
	2	3.491	3.405	3.399	3.105	2.635	1.482
	3	3.184	3.090	2.937	2.849	2.492	1.148
	4	3.573	3.284	3.240	3.126	2.784	1.049
	5	3.295	3.092	2.937	2.735	2.329	0.936
50:50	1	3.461	3.392	3.193	3.004	2.847	1.246
	2	3.402	3.365	3.249	3.142	2.946	1.500
	3	3.491	3.400	3.182	2.913	2.765	1.391
	4	3.530	3.204	2.947	2.769	2.392	1.570
	5	3.475	3.294	2.837	2.583	2.193	1.273
25:75	1	3.464	3.329	3.045	2.956	2.375	0.973
	2	3.482	3.274	3.002	2.810	2.535	1.048
	3	3.428	3.284	3.103	2.736	2.548	1.076
	4	3.384	3.301	3.054	2.860	2.473	0.946
	5	3.381	3.193	3.092	2.946	2.571	0.921
0:100	1	3.492	3.294	3.183	2.919	2.752	1.837
	2	3.402	3.243	3.149	2.397	2.018	0.934
	3	3.475	3.255	3.082	2.858	2.764	1.057
	4	3.310	3.174	3.007	2.746	2.384	0.962
	5	3.397	3.122	3.102	2.877	2.463	1.082

## 2. ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) หลังผ่านการทำบริสุทธิ์

### 2.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของการทดสอบบัฟเฟอร์สำหรับใช้ใน ELISA

ตารางผนวกที่ ง 2.1 ค่าดูดกลืนแสงของบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดที่ค่าความเจือจางของ Goat anti-mouse IgG-HRP 1:1000 และ 1:2000

Mouse IgG (mg/ml)	Goat anti- mouse IgG-HRP	บัฟเฟอร์		
		13.5% Normal human serum	5%skim milk + 1% tween 20 in PBS	0.5% casein + 0.5% BSA in PBS
0.000	1:1000	0.150	0.042	0.096
	1:2000	0.105	0.001	0.044
0.015	1:1000	1.001	0.719	0.860
	1:2000	0.704	0.668	0.527
0.031	1:1000	1.439	1.214	1.326
	1:2000	1.214	1.087	0.979
0.062	1:1000	1.768	1.687	1.727
	1:2000	1.602	1.456	1.404
0.120	1:1000	2.432	1.976	2.204
	1:2000	2.030	1.719	1.738
0.250	1:1000	2.394	2.133	2.263
	1:2000	2.150	1.787	1.869
0.500	1:1000	2.503	2.110	2.307
	1:2000	2.219	1.881	1.885
1.000	1:1000	2.525	2.283	2.404
	1:2000	2.495	2.077	2.060



## 2.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของการทดสอบความเข้มข้นของ Goat anti-mouse IgG-HRP สำหรับใช้ใน ELISA

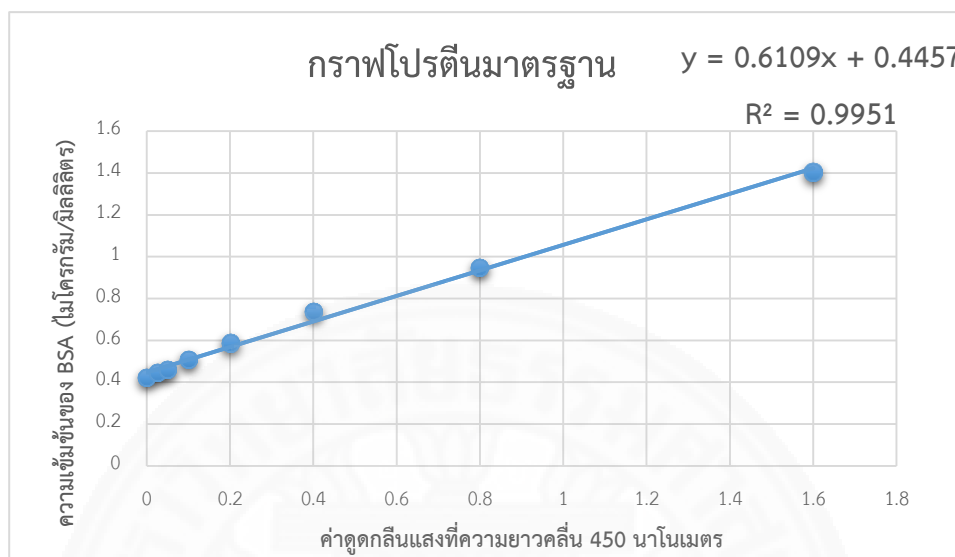
ตารางผนวกที่ ง 2.2.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสง Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจางต่าง ๆ

Mouse IgG (mg/mL)	ความเข้มข้นของ Goat anti-mouse IgG-HRP					
	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000	1:4500
0.000	-0.003	-0.001	0.000	0.003	0.002	-0.009
0.015	0.645	0.526	0.792	0.619	0.602	0.510
0.031	1.166	0.949	1.251	1.141	0.718	1.012
0.062	1.727	1.470	1.816	1.740	1.766	1.359
0.120	2.069	1.701	2.096	2.074	2.058	1.623
0.250	2.384	1.978	2.357	2.274	2.350	1.859
0.500	2.178	2.050	2.528	2.375	2.411	2.071
1.000	2.466	2.399	2.731	2.489	2.567	2.120

ตารางผนวกที่ ง 2.2.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของ Goat anti-mouse IgG-HRP ที่ความเจือจางต่าง ๆ

Mouse IgG (mg/mL)	ความเข้มข้นของ Goat anti-mouse IgG-HRP			
	1:10000	1:20000	1:30000	1:40000
0.000	-0.005	-0.003	-0.004	-0.003
0.001	0.006	-0.002	0.002	0.000
0.002	0.021	0.004	0.013	0.008
0.004	0.048	0.017	0.032	0.024
0.006	0.074	0.026	0.050	0.038
0.008	0.135	0.043	0.089	0.066
0.010	0.187	0.061	0.124	0.092
0.020	0.342	0.140	0.241	0.190
0.040	0.664	0.285	0.474	0.379
0.060	0.812	0.413	0.612	0.512
0.080	0.932	0.506	0.719	0.612
0.100	1.202	0.650	0.926	0.788

2.3 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) หลังผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธี Bradford assay



ภาพผนวกที่ 2.3.1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

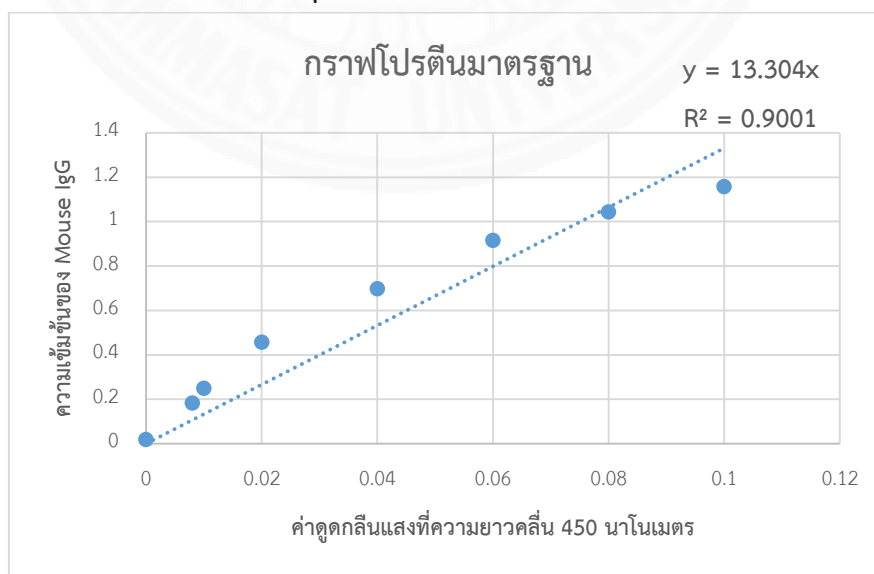
ตารางผนวกที่ 2.3.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium โดยใช้วิธี Bradford assay

Lot.	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน	ค่าดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน
1	0.4930	126.5346	0.5230	175.6425
2	0.5330	192.0118	0.5630	224.7504
3	0.7430	535.7669	0.7730	584.8748
4	0.9530	879.5220	0.9830	944.9992
5	0.8960	786.2171	0.9260	868.0635
6	0.6470	378.6217	0.6770	394.9910
7	0.6300	350.7939	0.6600	416.2711
8	0.5130	159.2732	0.5430	290.2275
9	0.4830	110.1653	0.5130	208.3811
10	0.4750	97.0699	0.5050	146.1778

ตารางผนวกที่ ง 2.3.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma โดยใช้วิธี Bradford assay

Lot.	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน	ค่าดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน
1	0.4900	72.5160	0.495	80.7006
2	0.5300	137.9931	0.585	228.0242
3	0.7400	481.7482	0.820	612.7026
4	0.9500	825.5034	0.984	881.1589
5	0.8930	732.1984	0.920	776.3955
6	0.6440	324.6030	0.680	383.5325
7	0.6270	296.7752	0.641	319.6923
8	0.5100	105.2545	0.554	177.2794
9	0.4800	56.1467	0.490	72.5160
10	0.4720	43.0512	0.487	67.6052

2.4 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) หลังผ่านการทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธี ELISA



ภาพผนวกที่ ง 2.4.1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ Mouse IgG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางผนวกที่ ง 2.4.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma ที่วัดโดยใช้วิธี ELISA

Lot.	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน	ค่าดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน
1	0.0276	20.7400	0.028	21.3773
2	0.0370	27.8112	0.039	29.2783
3	0.0630	47.3542	0.068	50.9902
4	0.0980	73.6621	0.101	75.9436
5	0.0875	65.7697	0.090	67.3570
6	0.0480	36.0794	0.054	40.8076
7	0.0420	31.5695	0.045	33.8310
8	0.0315	23.6771	0.034	25.8218
9	0.0260	19.5430	0.028	21.1640
10	0.0246	18.5020	0.027	20.2155

ตารางผนวกที่ ง 2.4.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่วัดโดยใช้วิธี ELISA

Lot.	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน	ค่าดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน
1	0.038	28.5628	0.058	43.5959
2	0.042	31.5695	0.072	54.1191
3	0.069	51.8641	0.109	81.9302
4	0.103	77.4203	0.133	99.9699
5	0.0932	70.0541	0.143	107.6368
6	0.053	39.8376	0.123	92.4534

ตารางผนวกที่ ง 2.4.2 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium ที่วัดโดยใช้วิธี ELISA (ต่อ)

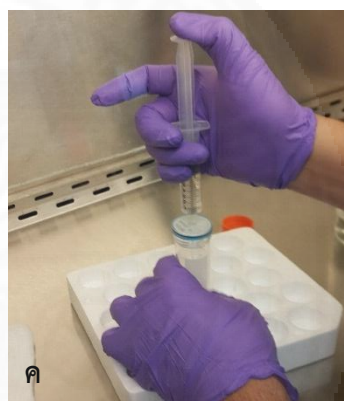
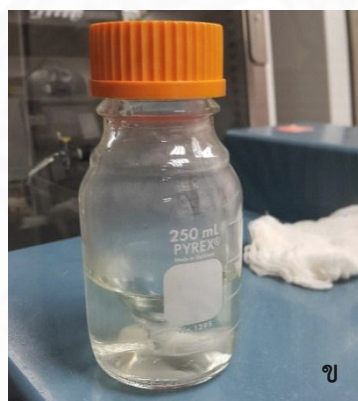
Lot.	Direct adaptation		Sequential adaptation	
	ดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน	ค่าดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน
7	0.051	38.3343	0.101	75.9170
8	0.0412	30.9681	0.071	53.5177
9	0.035	26.3079	0.055	41.3410
10	0.031	23.3013	0.051	38.3343

2.5 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของการทดสอบความจำเพาะของ anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 ต่อแอนติเจน

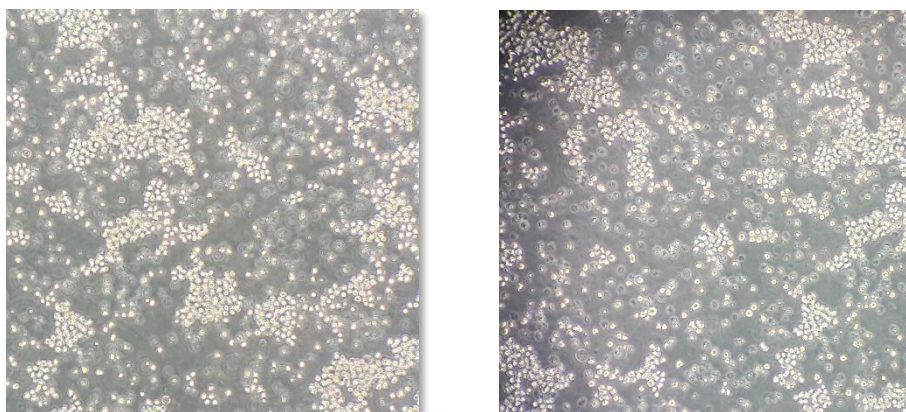
ตารางผนวกที่ ง 2.5.1 ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสงของแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่อัตราส่วนการเจือจางต่าง ๆ

แอนติเจน	อัตราส่วนการเจือจาง	anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15		
		1:10	1:100	1:1000
<i>Dengue virus</i> type1	0	0.9965	0.802	0.3075
	1:2	0.572	0.4685	0.2085
	1:10	0.0315	0.02	0.176
	1:50	0.973	0.8245	0.0115
CD.JEVX <sup>®</sup> lnj.	0	0.009	0.001	0.0065
	1:2	0.0205	0.0115	0.0015
	1:10	0.007	0.005	0.005
	1:50	0.0025	0.011	0.0065
IMOJEV <sup>®</sup>	0	0.004	0.001	0.0035
	1:2	-0.002	0.0025	0.0035
	1:10	0.007	0.006	0.0015
	1:50	0.0085	0.0035	-0.0005
Beijing-GPO	0	0.692	0.4225	0.3185
	1:2	0.472	0.3105	0.085
	1:10	0.119	0.1005	0.0335
	1:50	0.02	0.015	0.0095

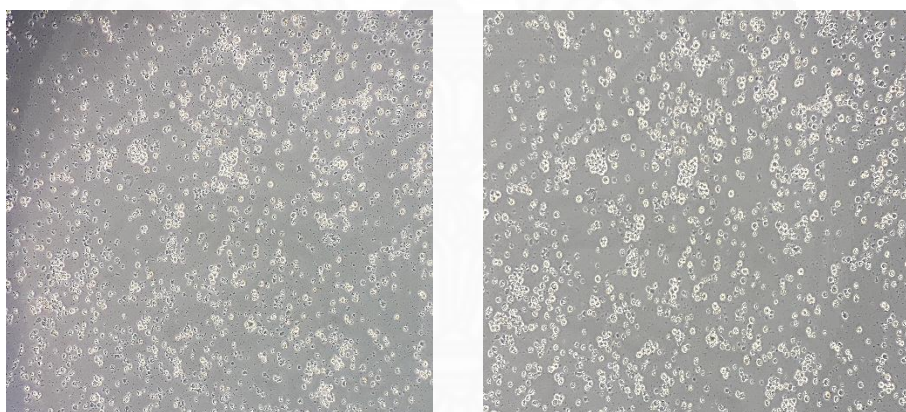
ภาคผนวก จ  
ประมวลภาพการดำเนินงานวิจัย



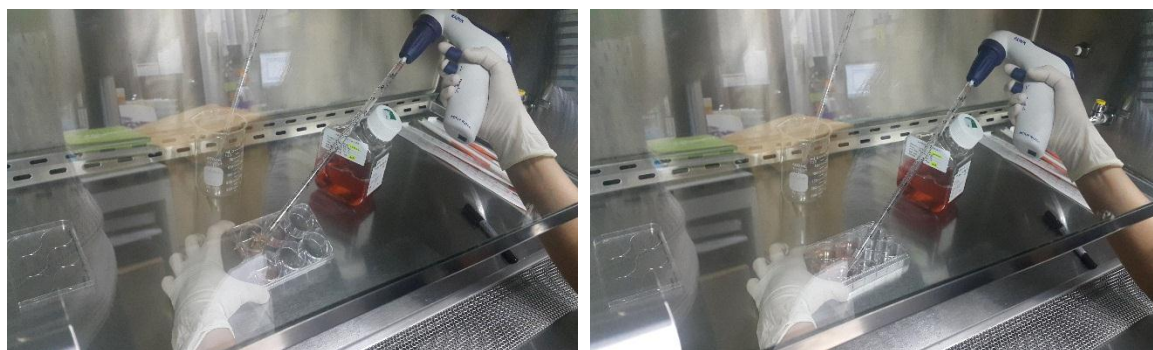
- ภาพผนวกที่ จ.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม
- ก. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม
  - ข. การละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ magnetic stirrer
  - ค. การกรองสารละลายด้วย syringe filter ที่มีความละเอียดรูพรุน 0.2 ไมครอน
  - ง. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม



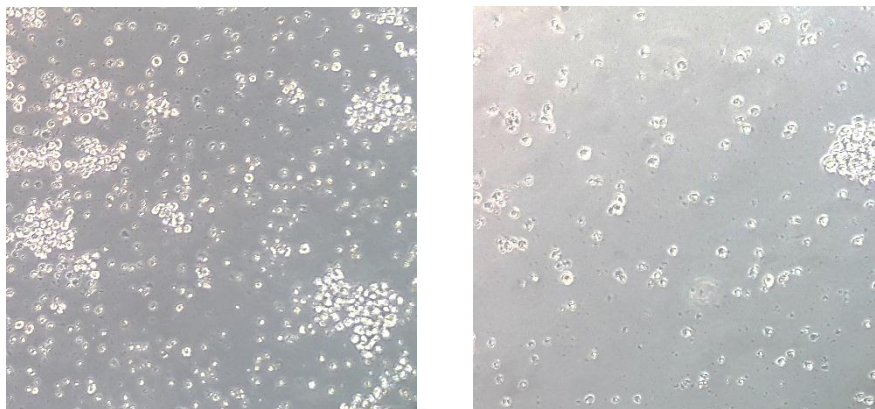
ภาพผนวกที่ จ.2 เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากละลายเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม



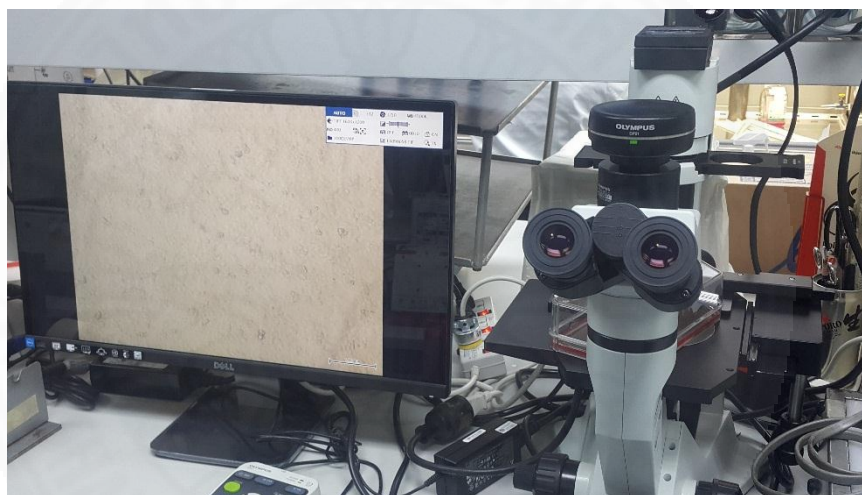
ภาพผนวกที่ จ.3 เซลล์ D1-4G2-4-15 ก่อนการเปลี่ยนอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม



ภาพผนวกที่ จ.4 การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม



ภาพผนวกที่ จ.5 เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากการ subculture ครั้งที่ 1

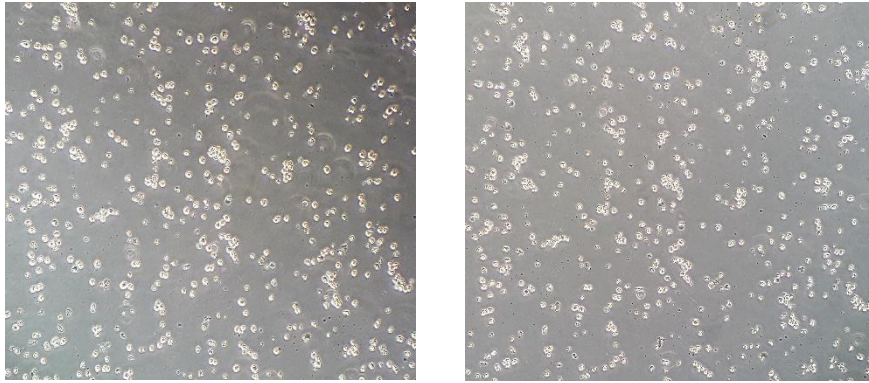


ภาพผนวกที่ จ.6 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ OLYMPUS รุ่น CKX 41 สำหรับการเจริญของเซลล์

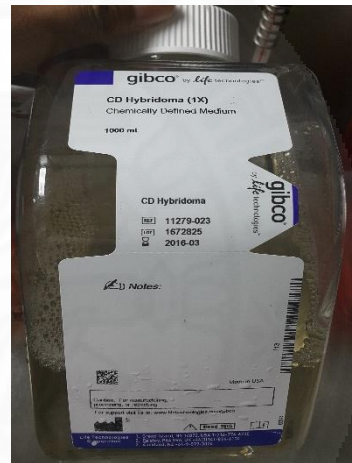
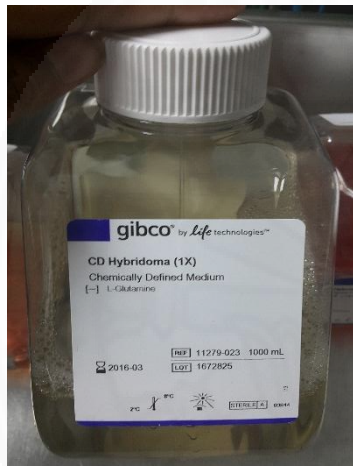


ภาพผนวกที่ จ.7 สีของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เสริมด้วย 10% ซีรัม ก่อน subculture

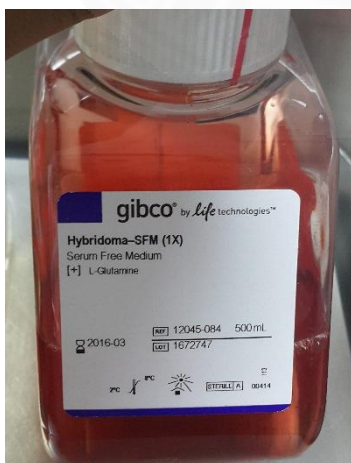




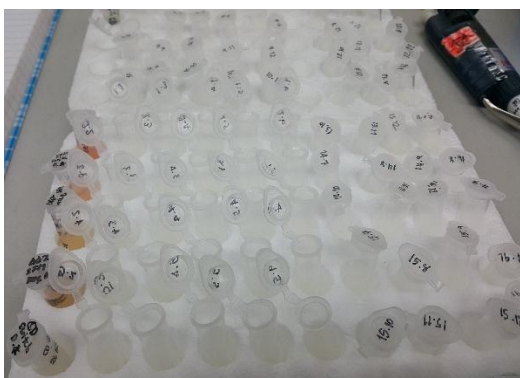
ภาพผนวกที่ จ.8 เซลล์ D1-4G2-4-15 หลังจากการ subculture ครั้งที่ 3



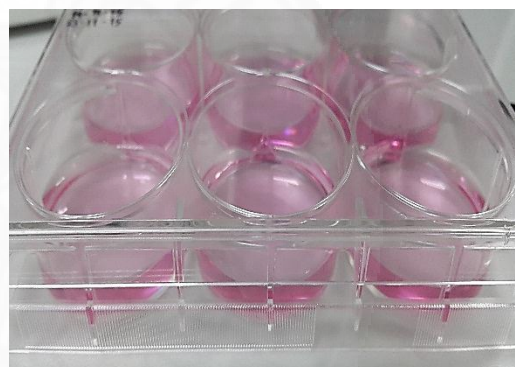
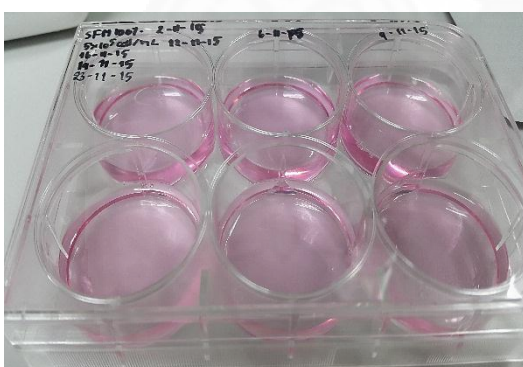
ภาพผนวกที่ จ.9 อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมมีชื่อทางการค้า คือ CD Hybridoma medium



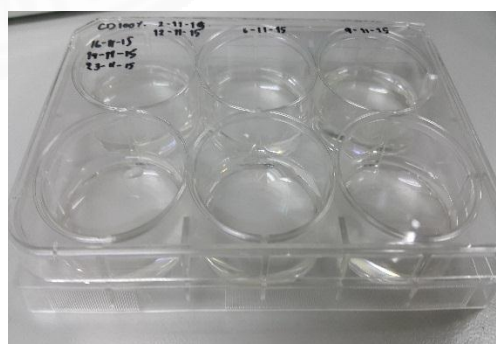
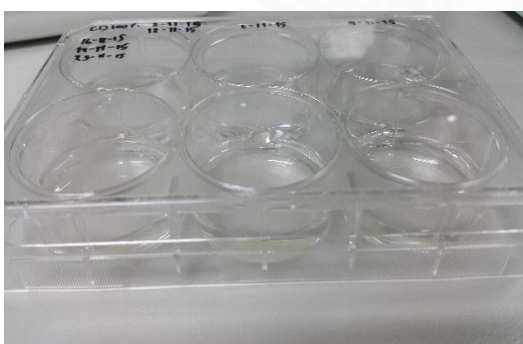
ภาพผนวกที่ จ.10 อาหารเลี้ยงเซลล์ปราศจากซีรัมมีชื่อทางการค้า คือ Hybridoma-SFM medium



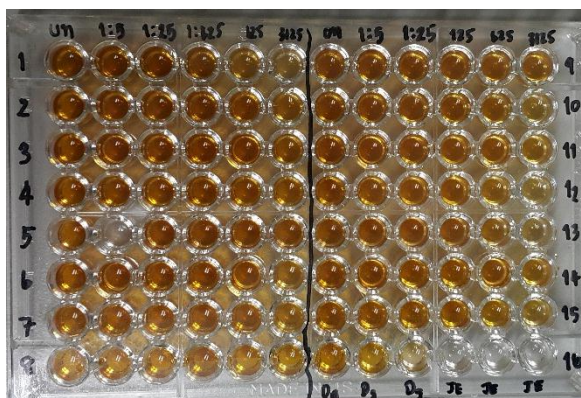
ภาพผนวกที่ จ.11 การเก็บของเหลวเหนือตะกอน (supernatant)



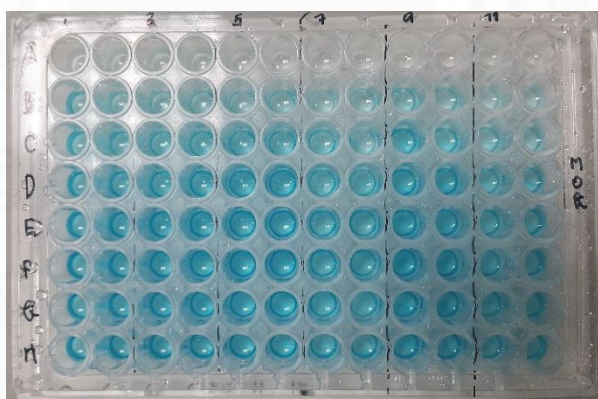
ภาพผนวกที่ จ.12 เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybridoma-SFM medium



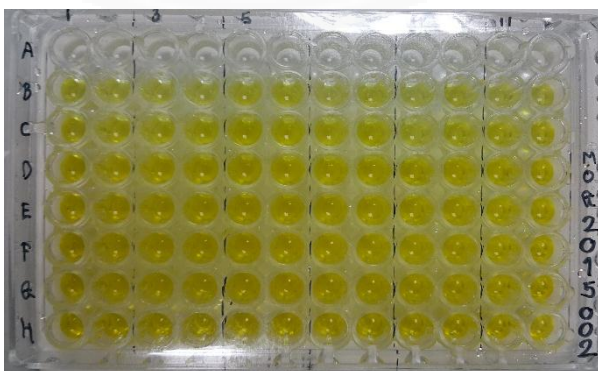
ภาพผนวกที่ จ.13 เซลล์ D1-4G2-4-15 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ CD Hybridoma medium



ภาพผนวกที่ จ.14 ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนเบื้องต้นก่อนการทำริสทูธโดยวิธี ELISA



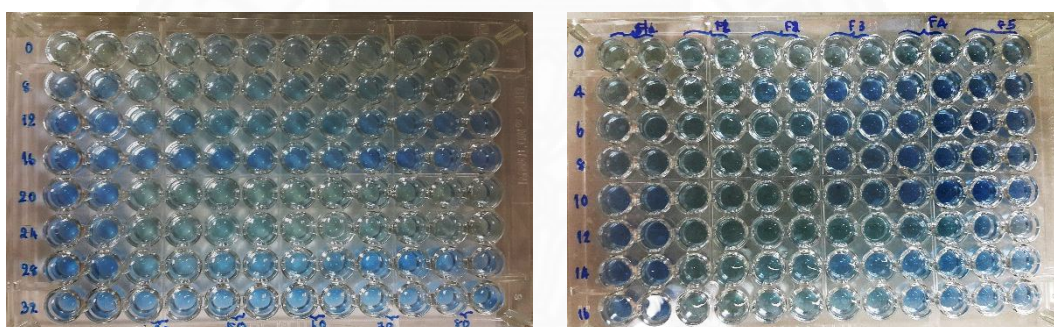
ภาพผนวกที่ จ.15 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน โดยวิธี ELISA ขั้นตอนหลังการใส่สับสเตรทโดยวิธี ELISA



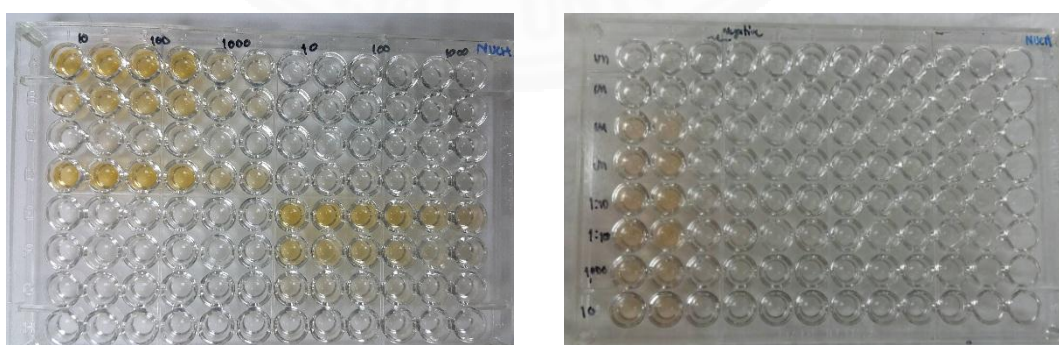
ภาพผนวกที่ จ.16 การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน โดยวิธี ELISA ขั้นตอนการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M sulfuric acid



ภาพผนวกที่ จ.17 การตักตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว



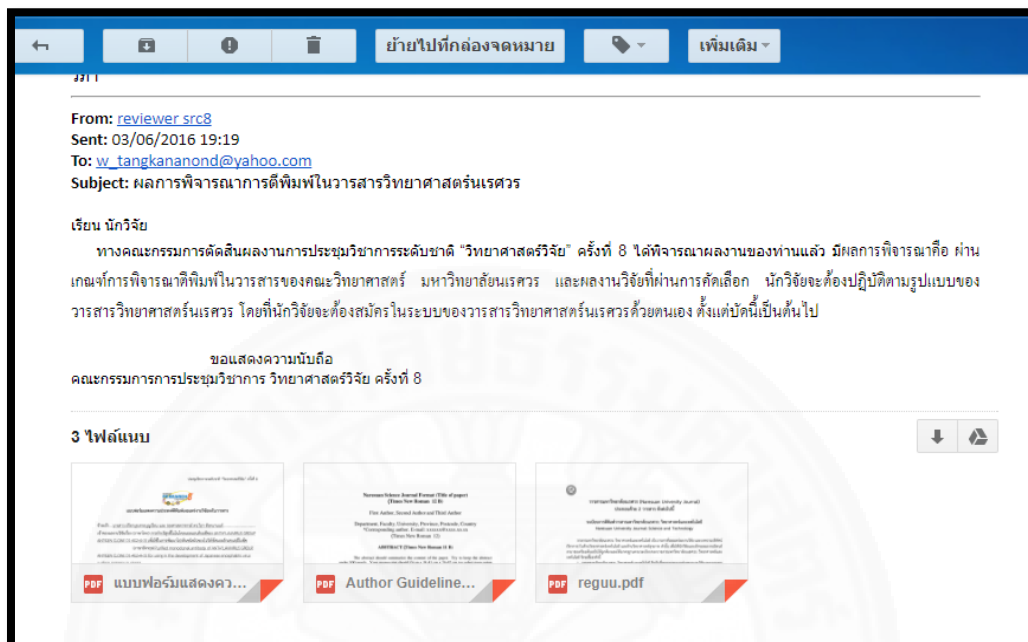
ภาพผนวกที่ จ.18 การทดสอบปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford assay



ภาพผนวกที่ จ.19 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยวิธี ELISA

## ภาคผนวก ฉ

### บทความวิจัยส่งตีพิมพ์



ภาพผนวกที่ ฉ 1. จดหมายตอบรับจากผู้วิจารณ์ (reviewer) ให้สามารถลงตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสารของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์



ภาพผนวกที่ ฉ 3. การส่งลงตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสาร NU. International Journal of Science ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ภาพผนวกที่ ๓. บทความวิจัยที่ส่งตีพิมพ์ในวารสารของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

**The Purified Monoclonal Antibody of Anti-Flavivirus Group Antigen  
Clone D1-4G2-4-15 for Development of  
Japanese Encephalitis Virus Surface Proteins in Plants**

Preeyanuch Sayboonruan<sup>1</sup>, Wassana Wijagkanalan<sup>2</sup>,  
Butsaya Thaisomboonsuk<sup>3</sup> and Wipa Tangkananond<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology,  
Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>2</sup> BioNet-Asia Co., Ltd, Hi-Tech Industrial Estate,  
Phra Nakhon Si Ayutthaya 13160, Thailand

<sup>3</sup> Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical  
Sciences, U.S. Army Medical Directorate, Bangkok 10400, Thailand

\*Corresponding author. E-mail: w\_tangkananond@yahoo.com

**ABSTRACT**

Production of Japanese encephalitis virus (JEV) surface proteins in plants requires monoclonal antibodies specific to some part of antigens of JEV as a tool of detection. This research is to develop anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 monoclonal antibodies specific to the envelope protein of viral particle of genus *Flavivirus* in serum-free media by inside adaptation culture method. The monoclones grew quickly in serum-free media and were purified from cell culture supernatant by precipitation with 50% saturated ammonium sulfate and fractionated by affinity chromatography. Then, the product was tested for antibody specificity by typing ELISA. The test results were positive with Japanese encephalitis vaccines and *Dengue virus* type 1. The stability tests were performed at -20 ° C for 10 weeks. The detection of antibodies against the *Dengue virus* type 1 can be used at a dilution of 1: 1000. The cost of production can be reduced when compared to the price of the cells can produce antibodies in serum media because this technique is simple and applicable for research with less budget constraint. The monoclonal antibodies derived from this research are stable and specific to *Flavivirus* antigens. It can be used to study the properties of the JEV surface protein production in plants and other research of the genus *Flavivirus*.

*Keywords: Japanese encephalitis virus, D1-4G2-4-15, serum-free media, purification.*

**INTRODUCTION**

*Japanese encephalitis virus* (JEV) is an important cause of virus encephalitis in Asia. It is estimated that each year there are Japanese encephalitis (JE) patients approximately 68,000 cases and deaths of approximately 15,000 cases (Campbell *et al.*, 2011). Japanese encephalitis vector is *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes and amplifying vertebrate hosts include pigs and water birds (De Wispelaere *et al.*, 2015). Pigs are infected with JEV and showed asymptomatic appearance with JEV in their blood. Mosquitoes that bite these pigs were infected and had high level of JEV in blood circulation, the bitten mosquito can spread the viruses to humans. JEV is a member of

the *Flavivirus* genus in the *Flaviviridae* family and it is an enveloped virus of ~ 50 nm in diameter with a positive-sense ssRNA viruses. JEV encoded proteases into ten proteins: three structural proteins include envelope (E), pre-membrane (prM), and core (C) Among all three the envelope protein is the most studied and is the most important one. Envelope protein is a major structural protein that contains numerous neutralization epitopes, membrane fusion, attachment of the virus to host cells and entry of the viruses into the host cells (Kant Upadhyay., 2013). It is the major target of humoral immune (Misra & Kalita., 2010). There are seven nonstructural (NS) proteins are included NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5 (De Wispelaere *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2013; Unni *et al.*, 2011).

Monoclonal antibodies (mAbs) are very specific and homogeneous immunoglobulins as known “hybridoma”. They have been widely used in immunotherapeutics, immunoaffinity chromatography, immunodiagnosics, and development of immunoassays (BAŞALP *et al.*, 2000; Poonam Rajak., 2012). In recent technology, hybridoma is produced *in vitro* by cell culture method. The culture of hybridoma cells requires supplement composed of Fetal bovine serum (FBS), amino acids, growth factors and vitamins for the production of monoclonal antibodies (Dráber *et al.*, 1995; Köhler & Milstein., 1975; Spriggs *et al.*, 2011). FBS is the preferred animal serum for cell culture enhancement. There are abundance of high proteins content, enzymes, growth factors and other chemical components for promoting cell health and growth in FBS (Even *et al.*, 2006). However, FBS in cell culture have disadvantages: serum has various factors in cell culture and defined medium supplement (Bjare., 1992). The serum is a qualitative change of the composition and serum batches display quantitative, and serum as a source of contamination of bacteria, viruses, fungi etc. (Peyrin *et al.*, 1999). The disadvantages in the use of FBS in cell culture allowed the researchers to develop methods of cell culture in serum-free media.

Purification is an important method for antibodies specific antigens use in research and pharmaceutical industry. The antibodies specific antigens also allow the functional manipulation of target antigens. The purification of the therapeutic antibodies produced, equivalent to 50-80% of total process costs (Azevedo *et al.*, 2009). The purification IgG in the industry has reduced significantly in increases antibody treatment. In general, selecting the appropriate purification method based on the desired antibodies for example, application, the purity and recovery of IgG usually purified by either purification methods such as precipitation method or chromatography (Zaidi *et al.*, 1995). Purification by chromatography is widely used to purify proteins at high prices because of to the high purity of the product. The purification of the protein can be processed under varying parameters such as flow rate of the mobile phase, pH and type of the buffer, the length of gradient elution, and ionic strength (Yang *et al.*, 2009). Other method include ammonium sulfate precipitation which is used as downstream processing at the first stage which has a high recovery of antibody, usually successful and easy purification method (Mariam *et al.*, 2015).

In this work, researchers focused on 2 aims: (i) the development cell culture of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 in serum-free media for producing of monoclonal antibodies specific to the antigen of the genus *Flavivirus*. (ii) Purification of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 from a serum-free cell culture

medium with the specificity to *Flavivirus* antigens obtained and stability of monoclonal antibody derived from this research can be used to study the properties of the Japanese encephalitis virus surface protein in plants.

## MATERIALS AND METHODS

### D1-4G2-4-15 (ATCC® HB-112™) Cell Culture and Expansion

Frozen cells of D1-4G2-4-15 (Gentry *et al.*, 1982; Henchal *et al.*, 1982) were rapidly thawed in a 37°C water bath and transferred the entire contents of the cryovial into 6-well tissue culture plate (costar®3516, USA) containing pre-warmed complete Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco™, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco™) and final concentration of 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 100 I.U./ml penicillin (Invitrogen) and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen) of which was called the complete RPMI 1640 medium and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured during an exponential phase at 3–5 days post-thawed, at a seeding density of  $5 \times 10^5$  viable cells/ml. They were subcultured at a minimum of 3 passages before expansion.

Cells were expanded by subculturing to T75 and T162 cell culture flasks containing complete RPMI 1640 medium respectively. When viable cell density reached  $\geq 1 \times 10^6$  viable cells/ml, and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and grown for 5 days.

### Adaptation of D1-4G2-4-15 Cells to Serum-Free Media Cell Culture by Inside Adaptation

Viable cell density was determined using a Neubauer hemocytometer and cells were seeded at  $\geq 1 \times 10^6$  viable cells/ml in T162 cell culture flask containing complete RPMI 1640 medium. D1-4G2-4-15 cells were washed 2 times by using CD Hybridoma medium supplement with final concentration of 8 mM L-glutamine (Invitrogen) which was called the complete CD Hybridoma medium and centrifuged at 200g for 5 minutes and subcultured to  $6 \times 10^5$  viable cells/ml in fresh pre-warmed complete CD Hybridoma medium. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in the air and grown for 5 days. Then, cells were monitored and passed for 3 – 5 passages until consistent growth was achieved. After cells were subcultured, the supernatant was harvested from cell culture by centrifuging at 200g for 10 minutes and supernatant was stored at -20°C for testing their antibody activity.

### Ammonium Sulfate Precipitation

The supernatant from D1-4G2-4-15 in serum-free media cell culture was transferred to the beaker containing a stir bar, placed on the magnetic stirrer and saturated ammonium sulfate was slowly added to the final concentration of 50% saturation at 4°C and stirred for overnight and the precipitate was centrifuged at 10,000g for 15 minutes. The pellets were resuspended in phosphate buffer saline (1X PBS (Gibco™)), pH 7.4 with the minimum volume. (Arora *et al.*, 2014; Sambrook & Russell., 2001)



### **Chromatography Purification Process**

Sample purification is simplified by using the Econo-Pac® Serum IgG Purification Kit (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.). It composed of Econo-Pac 10DG and DEAE Affi-Gel blue gel column. According to the manufacturer's instructions, each Econo-Pac 10DG column can process up to 3 milliliters of pellet dissolved in 1X PBS (Gibco™) per cycle and qualitative detection of ammonia sulfate by Nessler's reagent. Then, apply prepared sample to the DEAE Affi-Gel blue gel column and elute the IgG with 20 ml of application buffer collect fractions 4 ml/fraction. The determination total protein using Bio-Rad Protein Assay can be used for the determination of total proteins in each supernatant by measuring OD at 595 nm with a microplate reader following Bradford (Bradford., 1976). The Mouse IgG protein standards (SIGMA, USA) were used for calculation of protein fraction concentrations.

### **Immunoglobulin Determination**

The determination of immunoglobulin concentration by using ELISA, the 96-Well Plates were coated with goat anti-mouse IgG prepared in 18 mM carbonate buffer (pH 9.0) and incubated overnight at 4°C. Then, the coating solution was removed and the plate was washed with 1X PBS, pH 7.4 (Prepare from 10X PBS contains 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 13.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at pH 7.4). The remaining protein-binding sites was blocked by blocking buffer and incubated for at least 1–2 h at 37°C. The plate was washed with 1X PBS (pH 7.4). Diluted samples and mouse IgG standard curve to each well were added, compared to unknown samples, incubated for at least 2–3 h at 37°C and the plate was washed with 1X PBS (pH 7.4). Conjugated secondary antibodies was added and incubated for at least 1 hr. at 37°C, and the plate was washed with 1X PBS (pH 7.4). SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate 1-Component (KPL, A SeraCare Company) was added to each well and incubated for 15–30 min, 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stopping solution was added and the optical density at 450 nm was determined.

### **Antibody Specificity**

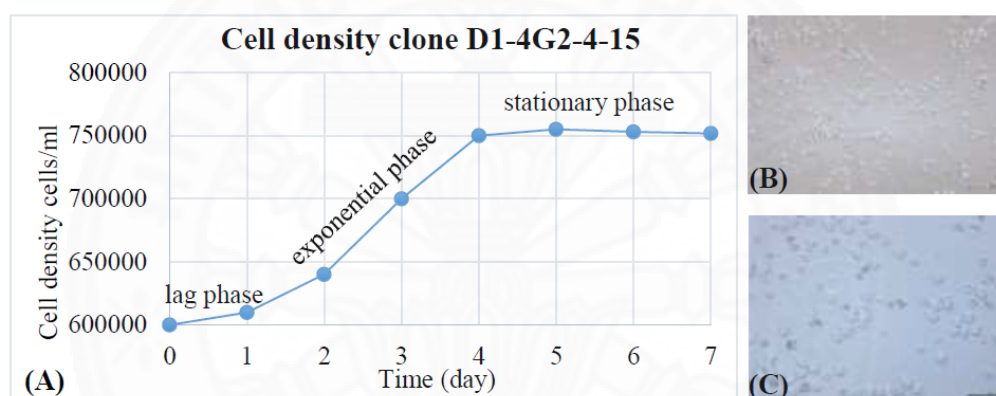
To test the antibody specific antigen by using typing ELISA was performed by the protocol which established at Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) laboratory (Jarman *et al.*, 2011). The antigens were *Dengue virus* type1 and Japanese Encephalitis Vaccines as follows: (I) CD.JEVAX® (Inj.) from Chengdu Institute of Biological Products, China, (II) IMOJEV® from Sanofi Pasteur Ltd, Australia, (III) J.E. (Beijing) – GPO from Government Pharmaceutical Organization, Thailand and (IV) JEVAX™ from Liaoning Cheng Da Biotechnology Co., Ltd., China. The 96-well plates were coated with Goat anti-Mouse IgG in 6 mM carbonate buffer (pH 9.0±0.2). The plate was read on a microplate reader at an absorbance of 492 nm.

### **Antibody Stability**

Ten aliquots of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 were prepared and stored at -20°C and tested every week for 10 weeks by typing ELISA to determine the specificity and stability of mAbs. The D1-4G2-4-15 mAbs was ten-fold serially diluted for testing specificity of antibody (Morgenthaler *et al.*, 2006).

## RESULTS AND DISCUSSION

The basal media for hybridoma cell cultures are Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), and RPMI-1640, supplemented with FBS (Butler & Dawson., 1992). D1-4G2-4-15 cells were cultured in complete RPMI 1640 supplement 10% FBS at a minimum of 3 passages before adaptation to serum-free media. Serum has growth factors which are important for cells and helps promote the growth of cells, including substances that help adhesion to the surfaces. In addition, serum also serves as good source of minerals, lipids, carbohydrates, enzymes and hormones etc. (Gstraunthaler., 2003) so the cells are in good health and ready to adaptation for growth in serum-free media by Inside adaptation when seeding of cells at  $1 \times 10^6$  viable cells/ml in CD hybridoma medium. The morphology of growing cells was observed using an Olympus phase contrast inverted microscope at 20 x, 40 x magnification. The D1-4G2-4-15 cells were grown well similar to cells in complete RPMI 1640 supplement 10% FBS (**Fig. 1**).



**Fig. 1.** D1-4G2-4-15 cells were cultured in serum-free media (A) Growth curve for D1-4G2-4-15 cells, showing cell density during day 0-7. Cells should be subcultured during the exponential phase. (B) D1-4G2-4-15 cells at 20x magnification (C) D1-4G2-4-15 cells at 40x magnification

Suspension of cells is composed of population of a single cell and cells in group with various ratios. Most viable cells contained a shiny circular shape. For the size and characteristic of cells, depend on the type and concentration of ingredients of the media, in particular, growth regulators. Range of lag phase is on the 1<sup>st</sup> day, exponential phase is during days 2<sup>nd</sup> - 4<sup>th</sup> and stationary phase is during days 5<sup>th</sup> - 7<sup>th</sup> while subculture range is optimum at the exponential phase on days 3<sup>rd</sup>. Researchers have adapted various kinds of cells to serum-free media such as CB. Hep-1 hybridoma cells (Aragón *et al.*, 2013), Chinese hamster ovary cells (Costa *et al.*, 2013), HEK 293T and Huh 7.0 cells (Paschoal *et al.*, 2014), BHK 21 cell lines (Reddy *et al.*, 2016) and hybridoma cell lines: C4B, 10C2G5, 6C5F4C7, 2D10G11 (Manna *et al.*, 2015).

Previous researchers prepared immunoglobulin by using 50% ammonium sulfate precipitation from cell supernatant of D1-4G2-4-15 in serum-free media cell culture (Burgess., 2009, Cruz *et al.*, 2013) Sample purifications were simplified by using the Econo-Pac® Serum IgG Purification Kit (Bruck *et al.*, 1986; Bruck *et al.*,

1982; Mendelson *et al.*, 1985). The total proteins were determined by using Bio-Rad Protein Assay with the absorbance at 595 nm of each fraction, using a microplate reader and combine effluent tubes containing the unbound protein peak. The determination of immunoglobulin concentration of protein peak was using ELISA. The concentration of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 was 0.2 mg / ml calculation equation from Mouse IgG standard curve. The yield of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 was 96.27%. The yield was defined as the ratio of the purified anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 to the initial amount of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 in the cell culture supernatant and it was expressed as a percentage (Mariam *et al.*, 2015). The purity of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 was 97%. The purity of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 was the amount of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 as a percentage of the total protein present in the cell culture supernatant (Poonam Rajak., 2012). The product was tested for antibody specificity by typing ELISA. The antigens tested included *Dengue virus* type 1 and 4 types of Japanese encephalitis vaccines as follows: (I) CD.JEVAX® (Inj.), live attenuated viral vaccine, prepared by passaging *Japanese encephalitis virus* strain SA14-14-2 in a monolayer of primary hamster kidney cell culture and lyophilized (II) IMOJEV®, live attenuated viral vaccine, prepared by using the pre-membrane (prM) and envelope (E) coding sequences of the SA14-14-2 live attenuated Japanese Encephalitis vaccine virus, a recombinant DNA technology used in the 17D-204 yellow fever vaccine virus of which two genes have been replaced by the corresponding genes from Japanese encephalitis virus. (III) J.E. (Beijing) – GPO, an inactivated mouse brain-based Japanese encephalitis vaccines, strain Beijing-1 and (IV) JEVAX™, an inactivated Japanese Encephalitis Vaccine, prepared by passaging *Japanese encephalitis virus*, P3 strain in Vero cell and inactivated with  $\beta$ -propiolactone and sterile lyophilized vaccine for intramuscular use or subcutaneous, (Ishikawa *et al.*, 2014).

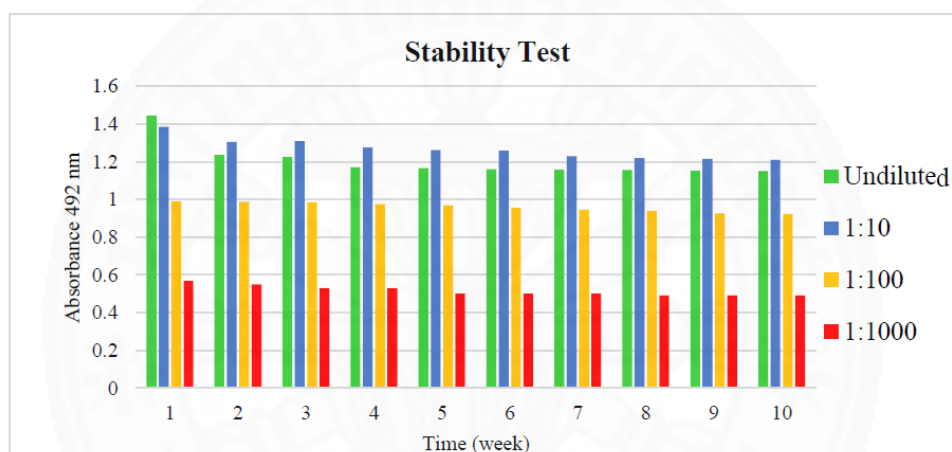
**Table 1.** The result of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs was tested for antibody specificity by typing ELISA (positive  $\geq 0.2$  > negative)

Antigen	Anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15			
	Undiluted	1:10	1:100	1:1000
<b>CD.JEVAX® Inj.</b>	-	-	-	-
<b>IMOJEV®</b>	-	-	-	-
<b>Beijing-GPO</b>	+	+	+	+
<b>JEVAC™</b>	+	+	+	+
<b><i>Dengue virus</i> type1</b>	+	+	+	+

The positive outcome is determined by the absorbance measurement at 492 nm to be greater than or equal to 0.2 means, while negative control is less than 0.1 means. The results of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs were positive against *Dengue virus* type 1, Beijing-GPO and JEVAC™ (Table 1.) of which, Beijing-

GPO and JEVAC™ were inactivated Japanese Encephalitis Vaccine. Scientists have produced a vaccine by killing the virus that causes disease with heat, chemicals or radiation. The inactivated vaccine is safe and stable than the live vaccine. The inactivated vaccines can be stored easily and delivered in a freeze-dried form, which makes them more accessible to people in developing countries. (Petrovsky & Aguilar., 2004).

The stability test of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs when stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and tested every week for 10 weeks to determine the antibody specificity against *Dengue virus* type 1 showed that the anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs can be used at undiluted and ten-fold serial dilutions (1:10, 1:100 and 1:1000).



**Fig. 2.** Stability test of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs when stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and tested every week for 10 weeks by using typing ELISA at various antibody dilutions [(Undiluted (■), 1:10 (■), 1:100 (■), 1:1000 (■)] (positive  $\geq 0.2$  > negative).

The results showed that the anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs was stable for 1-10 weeks when stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  by Typing ELISA. The OD, which was greater than 0.2, was positive. It meant, that anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs with OD greater than 0.49 (**Fig. 2**) was stable and antibody specific to *Dengue virus* type 1 antigen was retained for 1-10 weeks. And Anti-Flavivirus Group Antigen Clone D1-4G2-4-15 mAbs at dilution 1:1000 can interact with an epitope on *Dengue virus* type 1 antigen binding site (Bobrovnik., 2003).

The anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 at the concentration of 0.2 mg / ml from the Absolute Antibody Ltd. was \$300 or 10552.5 baht (rate 35.175 baht/US) while the cost of total production process/unit was 680.97 baht of which can reduce the cost of all process by up to 93.54 percent. Details of the cost and cell culture assumptions are as follows: medium costs ₱1,300.00/500 ml bottle; fetal bovine serum costs ₱18,000.00 /500 ml and other supplement containing Medium NCTC-109 (1X), OPI (Oxaloacetic acid, Pyruvic acid, Insulin), L-glutamine, NEAA (non-essential amino), HEPES [4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-

Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)], 7.5% NaHCO<sub>3</sub>, penicillin and streptomycin are shown in **Table 2**. The total cost of D1-4G2-4-15 cells grown in the medium with 10% FBS and switching to serum-free media, were only 3,145 bath/bottle, an approximately of 33% total saving from all the process to produce Anti-Flavivirus Group Antigen Clone D1-4G2-4-15 mAbs.

**Table 2.** Potential cost saving from reducing use of FBS in cell culture.

Medium with 10% FBS		Serum-free media	
500 ml medium	฿1,300.00	CD hybridoma	฿3,145.00
50 ml FBS	฿1,800.00		
supplement etc.	฿1,601.70		
<b>Total</b>	<b>฿4,701.70</b>	<b>Total</b>	<b>฿3,145.00</b>

## CONCLUSION

This research aimed to develop anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 cell culture method to produce monoclonal antibodies specific to antigens of the genus *Flavivirus* in serum-free media by inside adaptation. The cells can be grown in serum-free media quickly. Range of lag phase on the 1<sup>st</sup> day, exponential phase during days 2<sup>nd</sup> - 4<sup>th</sup> and stationary phase during days 5<sup>th</sup> – 7<sup>th</sup> showed similar cell growth profile to the cells cultured from RPMI 1640 supplement with 10% FBS. The concentration of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs was 0.2 mg / ml by calculation from Mouse IgG standard curve. The yield of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs was 96.27% and the purity was 97%. The antigen specific binding to several viral vaccine products against flavivirus was performed in commercial products by ELISA. The result of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs were positive with *Dengue virus* type 1, Beijing-GPO and JEVAC<sup>TM</sup> which, Beijing-GPO and JEVAC<sup>TM</sup> were inactivated Japanese encephalitis vaccine. The anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 were stabled for 1-10 weeks when stored at -20°C and the specific activity of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs at 1:1000 dilution retained. The process of producing anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs can reduce production cost by up to 93.54 percent when compared to the price of Absolute Antibody Ltd. at the same concentration of 0.2 mg / ml and could save approximately 33% of the first step from all production process of anti-flavivirus group antigen clone D1-4G2-4-15 mAbs.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Research and Researchers for Industry Program, The Thailand Research Fund (TRF) Bangkok THAILAND Grant code

number: MSD5710119, and BioNet-Asia Co., Ltd, Hi-Tech Industrial Estate, Phra Nakhon Si Ayutthaya for funding this project. We would also thank the Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, US Army Medical Directorate, Bangkok and the Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani for supporting materials and laboratories.

## REFERENCES

- Aragón, Hasel, Marcos González, Rodolfo Valdés, Tatiana Álvarez, Enma Brown, Yadira Rodríguez, Tatiana González, Regla Somoza, and Mayra Wood. (2013). Replacement of serum supplemented medium for CB. Hep-1 hybridoma cell freezing and monoclonal antibody production. *Biotecnología Aplicada* 30 (1):57-62.
- Arora, Sushrut, B Vijayalakshmi Ayyar, and Richard O'Kennedy. (2014). Affinity chromatography for antibody purification. *Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods*:497-516.
- Azevedo, A. M., P. A. J. Rosa, I. F. Ferreira, A. M. M. O. Pisco, J. de Vries, R. Korporaal, T. J. Visser, and M. R. Aires-Barros. (2009). Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. *Separation and Purification Technology* 65 (1):31-39.
- BAŞALP, AYNUR, BEYAZIT ÇIRAKOĞLU, and ENGIN BERMEK. (2000). Simple production and purification of monoclonal antibodies in serum-free medium. *Turkish Journal of Biology* 24 (2):189-196.
- Bjare, Ulf. (1992). Serum-free cell culture. *Pharmacology & therapeutics* 53 (3):355-374.
- Bobrovnik, S. A. (2003). Determination of antibody affinity by ELISA. Theory. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 57 (3):213-236.
- Bradford, Marion M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72 (1-2):248-254.
- Bruck, C., D. Portetelle, C. Glineur, and A. Bollen. (1982). One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE Affi-gel blue chromatography. *Journal of Immunological Methods* 53 (3):313-319.
- Bruck, Claudine, Jeffrey A. Drebin, Corinne Glineur, and Daniel Portetelle. (1986). Purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid by DEAE affi-gel blue chromatography. In *Methods in Enzymology*, 587-596.
- Burgess, R. R. (2009). Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol*, 463, 331-342.
- Butler, Michael, and Maureen M Dawson. (1992). *Cell culture labfax*: BIOS Scientific; Distributed in the US by Academic Press. 226-236.
- Campbell, Grant L, Susan L Hills, Marc Fischer, Julie A Jacobson, Charles H Hoke, Joachim M Hombach, Anthony A Marfin, Tom Solomon, Theodore F Tsai, and Vivien D Tsu. (2011). Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization* 89 (10):766-774.
- Costa, Ana Rita, Joanne Withers, Maria Elisa Rodrigues, Niaobh McLoughlin, Mariana Henriques, Rosário Oliveira, Pauline M Rudd, and Joana Azeredo. (2013). The impact of cell adaptation to serum-free conditions on the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by Chinese hamster ovary cells. *New biotechnology* 30 (5):563-572.
- Cruz, D. J. M., Koishi, A. C., Taniguchi, J. B., Li, X., Bonotto, R. M., No, J. H. and Windisch, M. P. (2013). High content screening of a kinase-focused library reveals compounds broadly-active against dengue viruses. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(2), e2073.

- De Wispelaere, MéliSSanne, Marie-Pascale Frenkiel, and Philippe Desprès. (2015). A Japanese encephalitis virus genotype 5 molecular clone is highly neuropathogenic in a mouse model: impact of the structural protein region on virulence. *Journal of virology* 89 (11):5862-5875.
- Dráber, Pavel, Eduarda Dráberová, and Martina Nováková. (1995). Stability of monoclonal IgM antibodies freeze-dried in the presence of trehalose. *Journal of immunological methods* 181 (1):37-43.
- Even, Megha S, Chad B Sandusky, and Neal D Barnard. (2006). Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *TRENDS in Biotechnology* 24 (3):105-108.
- Ferreira, Rosana BR, Yanet Valdez, Brian K Coombes, Subash Sad, Joost W Gouw, Eric M Brown, Yuling Li, Guntram A Grassl, L Caetano M Antunes, and Navkiran Gill. (2015). A Highly Effective Component Vaccine against Nontyphoidal Salmonella enterica Infections. *mBio* 6 (5):e01421-15.
- Gentry, MK, EA Henchal, JM McCown, WE Brandt, and JM Dalrymple. (1982). Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 31 (3 Pt 1):548-555.
- Gstraunthaler, Gerhard. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex* 20 (4):275-281.
- Henchal, E. A., M. K. Gentry, J. M. McCown, and W. E. Brandt. (1982). Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 31 (4):830-6.
- Ishikawa, Tomohiro, Atsushi Yamanaka, and Eiji Konishi. (2014). A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* 32 (12):1326-1337.
- Jarman, Richard G, Ananda Nisalak, Kathryn B Anderson, Chonticha Klungthong, Butsaya Thaisomboonsuk, Winai Kaneechit, Siripen Kalayanarooj, and Robert V Gibbons. (2011). Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84 (2):218-223.
- Kant Upadhyay, Ravi. (2013). Japanese encephalitis virus generated neurovirulence, antigenicity, and host immune responses. *ISRN Virology* 2013. 1-24.
- Köhler, Georges, and Cesar Milstein. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature* 256:495-497.
- Manna, Laura, Tiziana Di Febo, Gisella Armillotta, Mirella Luciani, Antonella Ciarelli, Romolo Salini, and Mauro Di Ventura. (2015). Production of Monoclonal Antibodies in Serum-free Media. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy* 34 (4):278-288.
- Mariam, SHS, CW Ooi, WS Tan, OA Janna, A Arbakariya, and BT Tey. (2015). Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and Purification Technology* 144:133-138.
- Mendelson, Carole R., Elizabeth E. Wright, Claudia T. Evans, John C. Porter, and Evan R. Simpson. (1985). Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 243 (2):480-491.
- Misra, Usha Kant, and Jayantee Kalita. (2010). Overview: japanese encephalitis. *Progress in neurobiology* 91 (2):108-120.
- Morgenthaler, Nils G, Joachim Struck, Christine Alonso, and Andreas Bergmann. (2006). Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clinical chemistry* 52 (1):112-119.

- Paschoal, Juliana F Beltran, Sandra S Patiño, Thaissa Bernardino, Alexandre Rezende, Marcos Lemos, Carlos A Pereira, and Soraia A Calil Jorge. (2014). Adaptation to serum-free culture of HEK 293T and Huh7. 0 cells. *BMC Proceedings*. 259.
- Petrovsky, Nikolai, and Julio Cesar Aguilar. (2004). Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 82 (5). 488-496.
- Peyrin, Jean-Michel, Corinne Ida Lasmézas, Stéphane Haïk, Fabrizio Tagliavini, Mario Salmona, Alun Williams, Diane Richie, Jean-Philippe Deslys, and Dominique Dormont. (1999). Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* 10 (4):723-729.
- Poonam Rajak, M. A. Vija yalakshmi and N. S. Jayaprakash. (2012). Purification of monoclonal antibodies, IgG1, from cell culture supernatant by use of metal chelate convective interaction media monolithic columns. *Biomedical Chromatography* 26 (12):1488-1493.
- Reddy, B Pulla, B Prsama Reddy, and D Jayasimha Rayulu. (2016). Effects of fetal bovine serum concentration on the growth and survival of BHK 21 cell lines. 123-127.
- Sambrook, J, and DW Russell. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. 594 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. 104-121.
- Saxena, Shailendra K, Asha Mathur, Madhavan PN Nair, Rakhi Saxena, and Sneham Tiwari. (2013). *Japanese encephalitis virus: the complex biology of an emerging pathogen*: INTECH Open Access Publisher. 161-180.
- Spriggs, Franklin, Poonam Aggarwal, Shibing Deng, Catherine Soderstrom, and Carol Donovan. (2011). Comparison of an antibody capture and a cell capture ligand-binding assay to quantify a monoclonal therapeutic in serum. *Bioanalysis* 3 (6):605-611.
- Unni, Salini Krishnan, Daniel Růžek, Chintan Chhatbar, Ritu Mishra, Manish K Johri, and Sunit K Singh. (2011). Japanese encephalitis virus: from genome to infectome. *Microbes and Infection* 13 (4). 312-321.
- Yang, Haiou, Patrick V. Gurgel, and Ruben G. Carbonell. (2009). Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216 (6):910-918.
- Zaidi, S. I. A., K. P. Singh, S. Raisuddin, A. Jafri, A. K. Saxena, S. Choudhary, and P. K. Ray. (1995). Modulation of Primary Antibody Response by Protein a in Tumor Bearing Mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 17 (4):759-773.



## ประวัติผู้เขียน และวิชาการ

ชื่อ	นางสาวปริยานุช สายบุญเรือน
วันเดือนปีเกิด	5 สิงหาคม พ.ศ. 2533
ทุนการศึกษา	พ.ศ. 2557: โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่อ อุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท รอบที่ 2 ประจำปี งบประมาณ 2557 สัญญาเลขที่ MSD57I0119

## ผลงานทางวิชาการ

**ปริยานุช สายบุญเรือน,** วาสนา วิจักขณาลัญณ์, บุษยา ไทยสมบุญรสสุข, และวิภา ตั้งคนานนท์.  
(2558). การผลิตโปรตีนชนิดผิวของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช. *RRi TU Forum 2016*. ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต (**นำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า**)

**ปริยานุช สายบุญเรือน,** วาสนา วิจักขณาลัญณ์, บุษยา ไทยสมบุญรสสุข, และวิภา ตั้งคนานนท์.  
(2559). การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช. *การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 8* (หน้า 122). พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา (**บทคัดย่อ & นำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า**)

**ปริยานุช สายบุญเรือน,** วาสนา วิจักขณาลัญณ์, บุษยา ไทยสมบุญรสสุข, และวิภา ตั้งคนานนท์.  
(2559). การผลิตโปรตีนชนิดผิวของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช. ใน ประเสริฐ ภา  
สันต์ (บรรณาธิการ), *ประชุมวิชาการโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม  
ครั้งที่ 2* (หน้า 133). กรุงเทพมหานคร: ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ (**บทคัดย่อ &  
นำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์**)

**Sayboonruan, P., Wijagkanalan, W., Thaisomboonsuk, B., & Tangkananond, W.**  
(2016). *Comparison of adaptation methods for the production of monoclonal antibodies from clone D1-4G2-4-15 in serum-free media*. Poster session presented at 11<sup>th</sup> International Symposium of the Protein Society of Thailand (pp. 119-127). Bangkok: Chulabhorn Research Institute. (**Proceedings & Poster Presentation**)

Sayboonruan, P., Wijagkanalan, W., Thaisomboonsuk, B., & Tangkananond, W. (2017). Purified monoclonal antibody of ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 for using in the development of Japanese encephalitis virus surface proteins in plants. Naresuan University Journal: Science and Technology (*preparation publication*) (ภาคผนวก ฉ)

#### ประสบการณ์ทำงาน

พ.ศ. 2555: เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวินิจฉัยโรค  
บริษัท ชายอาคควาสยาม (SyAqua Siam Ltd.) เลขที่  
733/8 หมู่ 8 ตำบลคูคต อำเภอลำลูกกา จังหวัด  
ปทุมธานี 12130 ได้รับรางวัลการวิจัยและพัฒนา  
ผลิตภัณฑ์ดีเด่น เนื่องจากพัฒนาชุดทดสอบสำหรับการ  
ตรวจโรค covert mortality nodavirus (CMNV) ใน  
กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

พ.ศ. 2554: เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ  
บริษัท พรวิไล อินเตอร์เนชั่นแนล กรุ๊ป เทรตติ้ง จำกัด  
เลขที่ 55/5 หมู่ 1 ซอย ถนนท่าเรือ-วังแดง ตำบลศาลา  
ลอย อำเภอนครหลวง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13130

พ.ศ. 2550: เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพการผลิต  
บริษัท คาร์กิลล์มีทส์ (ไทยแลนด์) จำกัด  
เลขที่ 23/1 หมู่ 2 ถนนหน้าพระลาน-บ้านครัว ตำบล  
เขาวง อำเภอมะขาม จังหวัดสุพรรณบุรี 18120

RRi TU Forum 2016

วันพฤหัสบดีที่ 19 พฤศจิกายน 2558 เวลา 08.30 – 12.00 น.

ห้องประชุมสำนักงานอธิการบดี 1 ชั้น 2 อาคารสำนักงานอธิการบดี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

## RRI TU Forum 2016

วันพฤหัสบดีที่ 19 พฤศจิกายน 2558 เวลา 08.30 – 12.00 น.

ห้องประชุมสำนักงานอธิการบดี 1 ชั้น 2 อาคารสำนักงานอธิการบดี

### มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

เวลา	รายละเอียด
08.30 – 09.00 น.	ลงทะเบียนและรับเอกสาร
09.00 – 09.10 น.	กล่าวเปิดงาน โดยผู้บริหารมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
09.10 – 09.30 น.	ประชาสัมพันธ์ทุนพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ ภาสันต์ ผู้อำนวยการโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ถ่ายภาพหมู่ ร่วมกัน
09.30 – 10.45 น.	นักศึกษาที่ได้รับการสนับสนุนทุน พวอ. นำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัยในรูปแบบปาก เปล่า (PowerPoint) <b>PHD5610060</b> นางสาวเครือวัลย์ วงศ์ปัญญา (ป.เอก ธรรมศาสตร์) เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพเชิงสนามของอุปกรณ์ถ่ายเทพลังงานชนิดสนามใกล้ โดยใช้วัสดุเม ตะสำหรับหัวอ่าน-เขียนแบบใช้ความร้อน <b>MSD5710114</b> นางสาววรรณศิริ ศรีวฤทธิ์ (ป.โท มทร.ธัญบุรี) เรื่อง การพัฒนาเทคนิคโฟโตอิเล็กโตรคะตะไลซิสเพื่อผลิตก๊าซไฮโดรเจนจากการแยกน้ำเพื่อ ใช้สำหรับกระบวนการไฮโดรจีเนชั่น <b>MSD5710115</b> นางสาวจิณห์จุฑา แป้นสุวรรณ (ป.โท มทร.ธัญบุรี) เรื่อง การพัฒนาการเตรียมพอลิเมอร์แคปซูลกักเก็บน้ำมันหอมระเหยด้วยกระบวนการ สังเคราะห์แบบแขวนลอย
10.45 – 11.00 น.	พักรับประทานอาหารว่าง
11.00 – 12.00 น.	นักศึกษาที่ได้รับการสนับสนุนทุน พวอ. นำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัยในรูปแบบ ปากเปล่า (PowerPoint) <b>MSD5710119</b> นางสาวปริยานุช สายบุญเรือน (ป.โท ธรรมศาสตร์) เรื่อง การผลิตโปรตีนชนิดผิวของเชื้อไวรัสใช้สมองอ๊กเสบเจอีในพืช
12.00 น.	ปิดงาน

ประมวลภาพกิจกรรม RRI TU Forum 2016

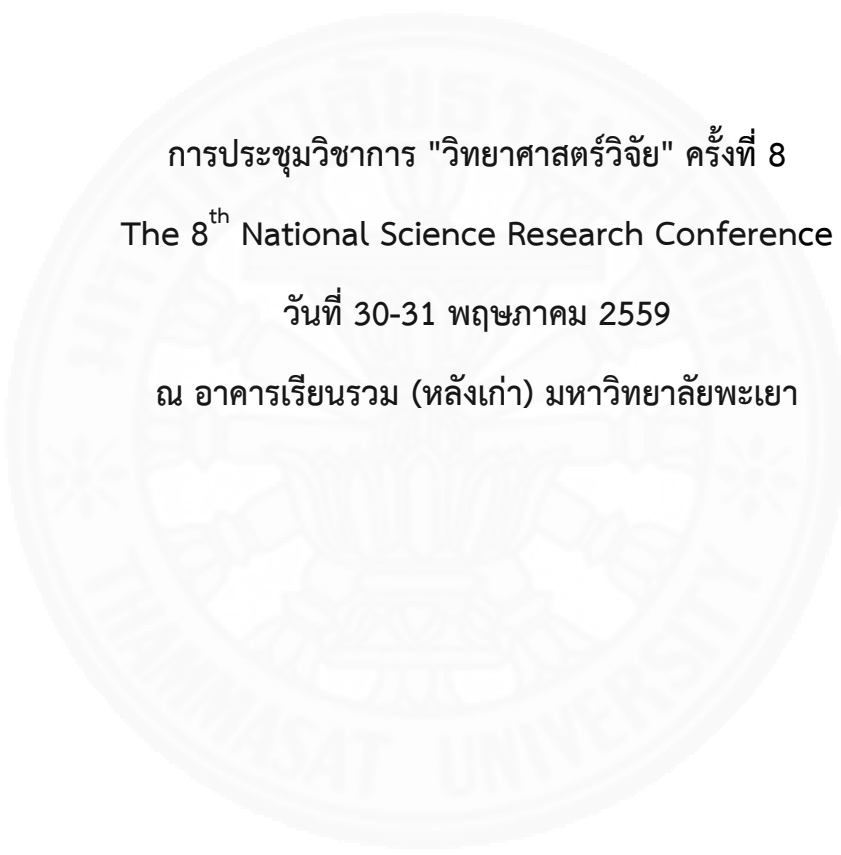
วันพฤหัสบดีที่ 19 พฤศจิกายน 2558 เวลา 08.30 – 12.00 น.

ห้องประชุมสำนักงานอธิการบดี 1 ชั้น 2 อาคารสำนักงานอธิการบดี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต







การประชุมวิชาการ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8  
The 8<sup>th</sup> National Science Research Conference  
วันที่ 30-31 พฤษภาคม 2559  
ณ อาคารเรียนรวม (หลังเก่า) มหาวิทยาลัยพะเยา

ที่ ศธ 0590.21/ว 130

คณะวิทยาศาสตร์



ตำบลแม่กา อำเภอเมืองพะเยา

จังหวัดพะเยา 56000

๒๖ มีนาคม ๒๕๖๑

เรื่อง ตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัย ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8”

เรียน นางสาวปริญานุช สายบุญเรือน

ตามที่ท่านมีความประสงค์เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัย ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8” ในระหว่างวันที่ 30-31 พฤษภาคม 2559 ณ หอประชุมพญาเงาเมือง มหาวิทยาลัยพะเยา โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ชื่อผลงาน: การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D14G2-4-15 เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช  
Purified monoclonal antibody of ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 for using in the development of Japanese encephalitis virus surface proteins in plants.

บัดนี้ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิฯ ได้พิจารณาผลงานของท่านเป็นที่เรียบร้อยแล้ว และมีความยินดีที่จะเรียนให้ท่านทราบว่าผลงานวิจัยของท่าน “ผ่านการพิจารณาคัดเลือกให้ นำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบ Oral Presentation ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8” และตีพิมพ์ในเล่มบทคัดย่องาน ประชุมวิชาการฯ (Abstracts Book)

จึงขอให้ท่านดำเนินการชำระเงินค่าลงทะเบียนจำนวนเงิน 1,000 บาท (หนึ่งพันบาทถ้วน) สำหรับนิสิต/นักศึกษา และจำนวนเงิน 1,500 บาท (หนึ่งพันห้าร้อยบาทถ้วน) สำหรับบุคคลทั่วไป/อาจารย์ ผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด(มหาชน) สาขา มหาวิทยาลัยพะเยา หมายเลขบัญชี 891243173-5 ชื่อบัญชี วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 8 และส่งหลักฐานการจ่ายเงินผ่านทางระบบการลงทะเบียน ก่อนวัน จันทร์ ที่ 11 เมษายน 2559

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และทางคณะกรรมการจัดการประชุมขอขอบพระคุณท่านที่เข้าร่วมการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 8” มา ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

งานธุรการ คณะวิทยาศาสตร์  
โทร. 0 5466 6666 ต่อ 1713  
โทรสาร 0 5466 6664

(รองศาสตราจารย์ปริญานันท์ แสนโพนัน)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์



กำหนดการและบทคัดย่อ

**การประชุมวิชาการระดับชาติ**  
**“วิทยาศาสตร์วิจัย”**  
**ครั้งที่ 8**  
*Science and Technology to Innovation*

**SCIENCE**  
**RESEARCH** **8<sup>th</sup>**  
**CONFERENCE**



30-31 พฤษภาคม 2559  
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ISBN: 978-616-7820-36-1

การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8

## กำหนดการประชุม "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8

วันที่ 30-31 พฤษภาคม 2559

ณ อาคารเรียนรวม(หลังเก่า) มหาวิทยาลัยพะเยา

ระหว่างวันที่ 28-29 พฤษภาคม 2559

08.30 น.-16.30 น. ลงทะเบียนเข้าร่วมประชุมวิชาการ/นำเสนอผลงาน/รับเอกสารการประชุม  
(เฉพาะบุคลากรและนิสิตหน่วยงานภายใน)

วันอาทิตย์ที่ 29 พฤษภาคม 2559

13.00 น.-18.00 น. ลงทะเบียน / รับเอกสารการประชุมฯ / ติดโปสเตอร์

วันจันทร์ที่ 30 พฤษภาคม 2559

08.00 น.-09.00 น. ลงทะเบียน / รับเอกสารการประชุมฯ / ติดโปสเตอร์

09.00 น.-09.30 น. พิธีเปิด ณ ห้องบรรยาย PKY1

กล่าวรายงาน โดย คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

กล่าวเปิดงาน โดย อธิการบดีมหาวิทยาลัยพะเยา

09.30 น.-10.30 น. ปาฐกถารับเชิญ ศ.ภญ.ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์ ณ ห้องบรรยาย PKY1  
"เรื่อง งานวิจัยกับการนำไปใช้ประโยชน์"

10.30 น.-10.45 น. รับประทานอาหารว่าง

10.45 น.-11.45 น. ปาฐกถารับเชิญ ผศ.ดร.วรวัฒน์ มีวาสนา ณ ห้องบรรยาย PKY1  
เรื่อง " การพัฒนางานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารที่มีค่า IF สูง"

11.45 น.-13.00 น. รับประทานอาหารกลางวัน

13.00 น.-14.00 น. ปาฐกถารับเชิญ ศ.ดร.เกตุ กรุดพันธ์ ณ ห้องบรรยาย PKY1  
เรื่อง " การบูรณาการงานวิจัย"

14.00 น.-15.20 น. การนำเสนอผลงานวิจัย

ประเภท Oral Presentation แยกตามกลุ่มสาขา (Parallel sessions)

กลุ่มที่ 1 สาขาฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ ฟิสิกส์ประยุกต์ และฟิสิกส์ศึกษา

กลุ่มที่ 2 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยาศึกษา

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา การจัดการกีฬา

## การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 8

	กลุ่มที่ 3 สาขาเคมี เคมีเชิงวัสดุ และเคมีศึกษา
	กลุ่มที่ 4 สาขาคณิตศาสตร์ สถิติ และคณิตศาสตร์ศึกษา
	กลุ่มที่ 5 สาขาวิทยาการคอมพิวเตอร์ และเทคโนโลยีสารสนเทศ
	เสวนากลุ่มย่อย “การพัฒนาศักยภาพของนักวิทยาศาสตร์”
15.20 น.–15.30 น.	รับประทานอาหารว่าง
15.30 น.–16.45 น.	การนำเสนอผลงานวิจัย
	ประเภท Oral Presentation แยกตามกลุ่มสาขา (Parallel sessions)
	กลุ่มที่ 1 สาขาฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ ฟิสิกส์ประยุกต์ และฟิสิกส์ศึกษา
	กลุ่มที่ 2 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยาศึกษา
	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา การจัดการกีฬา
	กลุ่มที่ 3 สาขาเคมี เคมีเชิงวัสดุ และเคมีศึกษา
	กลุ่มที่ 4 สาขาคณิตศาสตร์ สถิติ และคณิตศาสตร์ศึกษา
	กลุ่มที่ 5 สาขาวิทยาการคอมพิวเตอร์ และเทคโนโลยีสารสนเทศ
16.45 น.–18.30 น.	การนำเสนอผลงานวิจัย
	ประเภท Poster Presentation แยกตามกลุ่มสาขา (Parallel sessions)
18.30 น.–21.00 น.	งานเลี้ยงรับรอง

## วันอังคารที่ 31 พฤษภาคม 2559

8.30 น.–10.30 น.	การนำเสนอผลงานวิจัย
	ประเภท Oral Presentation แยกตามกลุ่มสาขา (Parallel sessions)
	กลุ่มที่ 1 สาขาฟิสิกส์ วัสดุศาสตร์ ฟิสิกส์ประยุกต์ และฟิสิกส์ศึกษา
	กลุ่มที่ 2 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ ชีววิทยาศึกษา
	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการกีฬา การจัดการกีฬา
	กลุ่มที่ 3 สาขาเคมี เคมีเชิงวัสดุ และเคมีศึกษา
	กลุ่มที่ 4 สาขาคณิตศาสตร์ สถิติ และคณิตศาสตร์ศึกษา
	กลุ่มที่ 5 สาขาวิทยาการคอมพิวเตอร์ และเทคโนโลยีสารสนเทศ
	การนำเสนอผลงานวิจัยพิเศษ (ภาคภาษาอังกฤษ)
10.30 น.–10.45 น.	รับประทานอาหารว่าง
10.45 น.–12.00 น.	พิธีปิด ณ ห้องบรรยาย PKY1 และมอบรางวัลนำเสนอผลงานดีเด่น
12.00 น.–14.00 น.	รับประทานอาหารกลางวัน / พักผ่อนตามอัธยาศัย

## การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8

วันจันทร์ที่ 30 พฤษภาคม 2559

Parallel Sessions 3 ห้องที่ 3 หัวข้อกลุ่มพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุล

เวลา 14.00 น.-16.30 น. ห้อง PKY4 อาคารเรียนรวม มหาวิทยาลัยพะเยา

ประธาน ดร.เนรัฐชลา สุวรรณคนธ์

ประธานรวม 1) ดร.สลิล ชันโรจน์ 2) นางสาวเสาวลักษณ์ บุญมา

ลำดับ	เวลา	รหัส	หัวข้อเรื่อง	ชื่อ-สกุล
1	14.00-14.20	BI-0-13	การประเมินและพัฒนาเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดข้าวเหนียวที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นพันธุ์ลูกผสมในพื้นที่สูงศูนย์พัฒนาโครงการหลวงปางคำจังหวัดพะเยา	นายบุญฤทธิ์ สินค่างาม
2	14.20-14.40	BI-0-14	การคัดเลือกและพัฒนาเชื้อพันธุกรรมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีศักยภาพ ในการปรับตัวเพื่อความสามารถในการพัฒนาเป็นพันธุ์ลูกผสมบนพื้นที่สูง	นายกิตติกร นามวงศ์
3	14.40-15.00	BI-0-15	การศึกษาลักษณะโมเลกุลซีดีเอ็นเอ และการผลิตโปรตีนลูกผสมเซสควิเทอร์ปีนซินเทสในพุล	น.ส.รัตติกานต์ บัวเวียง
4	15.00-15.20	BI-0-16	การแพร่กระจายของยีนดื้อยาคลาสติคาร์บาพีนิเมสและรูปแบบของพลาสมิดในเชื้อ <i>Acinetobacter baumannii</i> ที่แยกจากโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ประเทศไทย	น.ส.อุดม ลักษณ์ เหลือง ทองคำ
พักรับประทานอาหารว่าง 10 นาที				
5	15.30-15.50	BI-0-17	การทำปรีคูรีโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอักษะเบอซีในพืช	น.ส.ปริยานุช สายบุญเรือน
6	15.50-16.10	BI-0-18	ศักยภาพของอนุภาคนาโนพอลิเมอร์สำหรับนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนแบบกิน	ดร.ธนิวรรณ ชินอารมณ์
7	16.10-16.30	BI-0-19	การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อการคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณเซลลูโลสสูง	น.ส.ณัฐพร บุญเกิด

## การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8

BI-O-17

การทำไวรัสฮีโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE  
D1-4G2-4-15 เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอักเสบเจอีในพืช

Purified monoclonal antibody of ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15 for  
using in the development of Japanese encephalitis virus surface proteins in plants.

ปริยานุช สายบุญเรือน<sup>1</sup>, วาสนา วิจักขณาลัญญ์<sup>2</sup>, บุศยา ไทยสมบุญสุข<sup>3</sup> และ วิภา ตังคนานนท์<sup>1</sup>

*Preeyanuch Sayboonruan<sup>1</sup>, Wassana Wijagkanalan<sup>2</sup>, Butsaya Thaisomboonsuk<sup>3</sup> and Wipa Tangkananond<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

<sup>2</sup>บริษัท ไบโอมเทค-เอเชีย จำกัด (สาขา 1) นิคมอุตสาหกรรมบ้านหว้า(ไฮเทค) อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

<sup>3</sup>ภาควิชาไวรัสวิทยา หน่วยแพทย์ทหารบกสหรัฐอเมริกา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร

#### บทคัดย่อ

การศึกษาค้นสมบัติโปรตีนชนิดผิวของไวรัสใช้สมองอักเสบเจอี (ไวรัสเจอี) ในพืชต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสเจอี โดยทั่วไปใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี แม้ว่าซีรัมจะเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ก็มีข้อด้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ไม่มีซีรัม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการทำไวรัสของแอนติบอดี งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ D1-4G2-4-15 (ATCC 112HB) ที่มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนของ จีนัส *Flavivirus* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมสูงกว่า 10 % จากนั้นเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัม แบ่งเป็นวิธี direct adaptation และ sequential adaptation และเก็บ ของเหลวเหนือตะกอน ของอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งแบบไม่มีซีรัม และมีซีรัม มาทดสอบเปรียบเทียบปริมาณและความสามารถของแอนติบอดี หลังจากนั้นทำการตกตะกอนแอนติบอดีด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งสามารถตกตะกอนโปรตีนได้มากกว่า 95% ของทั้งสองวิธีและนำไปทำไวรัสโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ พร้อมทั้งทดสอบความสามารถของแอนติบอดีที่กอนนำไปใช้ สำหรับศึกษาค้นสมบัติโปรตีนชนิดผิวของไวรัสเจอีในพืชต่อไป

คำสำคัญ : การทำไวรัสฮี, D1-4G2-4-15, ไวรัสใช้สมองอักเสบเจอี, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม

#### Abstract

The study of the Japanese encephalitis virus (JEV) surface proteins in plants requires monoclonal antibodies specific to its antigen. In general monoclonal antibodies were produced in cell cultures by using media containing serum. Although serum is a main source of essential nutrients and growth factors, it has many disadvantages compared to serum-free medium especially in the process of antibody purification. In this study, we developed a serum-free medium system for cultivating D1-4G2-4-15 (ATCC 112HB) and producing specific monoclonal antibodies to various antigens of the genus *Flavivirus*. Cells were cultivated in a medium with 10 % fetal bovine serum and sub passaged to serum-free medium, which are divided into the direct adaptation and the sequential adaptation. Supernatants from serum-free and serum media were collected and compared by their amounts and activities. After one-step ammonium sulfate precipitation of the spent medium, more than 95% of protein recovered was antibody then purified by using affinity chromatograph. Finally, the antibody activity was tested before being used for the characterization of JEV surface proteins in plant.

**Keywords :** Purified, D1-4G2-4-15, Japanese encephalitis virus, Serum-free medium

\*Corresponding author. E-mail : w\_tangkananond@yahoo.com



ขอมอบเกียรติบัตรฉบับนี้เพื่อแสดงว่า

**ปรียานุช สายบุญเรือน**

ได้นำเสนอผลงานวิจัย ประเภทบรรยาย

เรื่อง การทำไวรัสภูมิโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ ANTI-FLAVIVIRUS GROUP ANTIGEN CLONE D1-4G2-4-15  
เพื่อใช้ในการพัฒนาโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจดีในพืช

ในการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 8  
30-31 พฤษภาคม 2559

ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

ขออำนาจพรให้มีความสุข ความเจริญ เป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศสืบไป

(รองศาสตราจารย์ปรียานุช สายบุญเรือน)  
คณาบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์พิเศษ ดร.มนาท มงวนเจริญศรี)  
อธิการบดีมหาวิทยาลัยพะเยา

การประชุมวิชาการ

โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม ครั้งที่ 2  
“วิทยาศาสตร์ประยุกต์กับกลไกขับเคลื่อนเศรษฐกิจเพื่ออนาคต”

วันที่ 1 สิงหาคม 2559 เวลา 8.00 – 17.00 น.

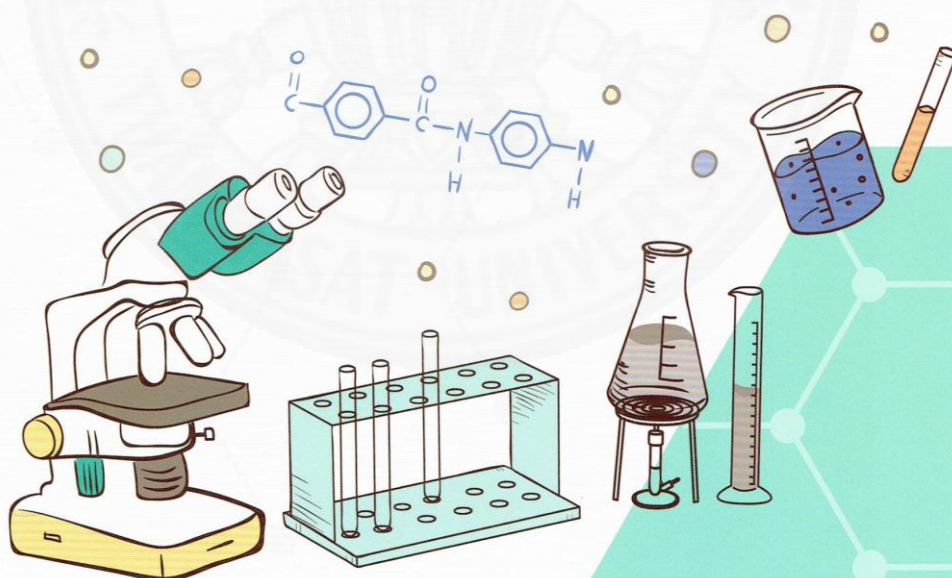
ณ ห้องบอลรูม โชนเอ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์

กรุงเทพมหานคร



ประชุมวิชาการโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัย  
เพื่ออุตสาหกรรม ครั้งที่ 2

# วิทยาศาสตร์ประยุกต์ กับกลไกขับเคลื่อนเศรษฐกิจเพื่ออนาคต : Applied Sciences to New Growth Engines





กำหนดการงานประชุมวิชาการ  
โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม ครั้งที่ 2  
“วิทยาศาสตร์ประยุกต์กับกลไกขับเคลื่อนเศรษฐกิจเพื่ออนาคต”  
APPLIED SCIENCES TO NEW GROWTH ENGINES  
วันจันทร์ที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2559 เวลา 08.00 – 17.00 น.  
ณ ห้องบอลรูม โซนเอ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร

ภาคเช้า สถานที่: ห้องบอลรูม

เวลา	รายละเอียด
08.00 - 08.45 น.	ลงทะเบียนเข้าร่วมงาน พร้อมรับประทานอาหารว่างและเครื่องดื่ม
08.45 - 09.00 น.	ประธานพร้อมคณะผู้จัดงานเดินชมบูธนิทรรศการและผลงานวิจัยโปสเตอร์ของนักศึกษาที่ได้รับทุนพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโทและปริญญาเอก
09.00 - 09.15 น.	กล่าวต้อนรับ
	* ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพันธ์ จิตพิมลมาศ ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
09.15 - 09.45 น.	ประธานกล่าวเปิดงาน พร้อมปาฐกถา
	* ดร. พิเชฐ ดุรงคเวโรจน์ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
09.45 - 10.20 น.	งานวิจัยดีต่ออุตสาหกรรมอย่างไร
	* คุณศานินทร์ ตรียานนท์ นายกสมาคมผู้ผลิตไบโอดีเซลไทย และกรรมการบริษัท น้ำมันพืชปทุม จำกัด
10.20 - 11.00 น.	การนำผลงานวิจัยมาใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์
	* ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญหา หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยชีวเคมีของสัตว์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์หอยทากสยาม

เวลา	รายละเอียด
11.00 - 12.00 น.	นักศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาเอกนำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัยที่ได้รับทุนพวอ. ในรูปแบบโปสเตอร์ แบ่งตามกลุ่มอุตสาหกรรมเป้าหมาย

สถานที่: บริเวณพื้นที่โถงต้อนรับโซนเอ (หน้าห้องบอลรูม)

กลุ่มอุตสาหกรรมการเกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพ (Agriculture and Biotechnology)

- A01 ปัจจัยการเกิดการแตกในมะพร้าวน้ำหอมเจีย และการป้องกันการแตก
- A02 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปรับปรุงดินจากผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมผลิตน้ำยางข้น
- A03 การคัดเลือกแอนติเจนที่เหมาะสมในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ข้ามสายพันธุ์ในปลาเพาะเลี้ยง
- A04 การศึกษาบทบาทและหน้าที่ของโปรตีน WSSV134 และ WSSV322 จากไวรัสตัวแดงดวงขาวในการควบคุมกิจกรรมของโปรตีนแคสเปสจากกุงกุลาดำ
- A05 การใช้ประโยชน์จากสารมิโมซินและโปรตีนสกัดจากไบโกระถินทางการเกษตร

- B10 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ขนมกลาแม่โดยการทดแทนแป้งข้าวเหนียวบางส่วนด้วยแป้งกล้วยดิบ
- B11 กล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักทามาไรแบบเร็ว: การเตรียมและการประยุกต์ใช้
- B12 การพัฒนาระบบการวิเคราะห์เชิงภาพถ่ายเพื่อตรวจติดตามคุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ทุเรียนทอด
- B13 การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของเครื่องดื่มผงโยเกิร์ต

กลุ่มอุตสาหกรรมการแพทย์ครบวงจร (Medical Hub)

- C01 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีใช้ยาอมระเหยซึ่งมีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรียร่วมกับ

- G19 อิทธิพลของปัจจัยการผลิตที่ส่งผลต่อสมบัติของไส้แบบที่ละลายน้ำได้ที่ผลิตด้วยกระบวนการหล่อฉีดแรงดันสูง
- G20 การพัฒนาความใสของแก้วด้วยกระบวนการพอกสีโดยใช้เออร์เบียมออกไซด์และซีลีเนียม
- G21 การปรับปรุงกระบวนการทรีตผ้าฝ้ายและผ้าฝ้ายผสมพอลิเอสเตอร์ด้วยแอมโมเนียเหลวและวิธีการประเมินระดับความสมบูรณ์ของกระบวนการ
- G22 การพัฒนาการสร้างเม็ดแกรนูลของกากตะกอนจากระบบบำบัดน้ำเสียแบบยูเอเอสบีของน้ำกากส่า
- G23 อิทธิพลของการเปลี่ยนรูปถาวรรุนแรงต่อโครงสร้างจุลภาคและสมบัติทางเคมีของแอนโดสังเวยอะลูมิเนียม-สังกะสี-อินเดียม
- G24 โครงสร้างจุลภาคและพฤติกรรมการกักความร้อนของผิวพ่นเคลือบด้วยความร้อนโลหะผสมนิกเกิล
- G25 การพัฒนาการเตรียมพอลิเมอร์แคปซูลกักเก็บน้ำมันหอมระเหยด้วยกระบวนการสังเคราะห์แบบแขวนลอย
- G26 การศึกษาผลกระทบของการกระจายตัวของสารยึดเกาะต่อคุณสมบัติของแกรนูลในกระบวนการผสมเปียกด้วยเครื่อง high shear speed mixer โดยการใช้เทคโนโลยีวิเคราะห์ภาพถ่าย
- G27 การสังเคราะห์แคลเซียมออกไซด์ที่มีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงจากเศษเปลือกไข่ไก่
- G28 การเติบโตผิดปกติของเกรนในแท่งอะลูมิเนียม 6063
- G29 การปรับปรุงคุณภาพและกระบวนการผลิตไฟเบอร์ซีเมนต์ด้วยกระบวนการคาร์บอนขึ้น
- G30 ปัจจัยวิกฤตต่อการหล่อแบบ Direct Chill ในอะลูมิเนียมผสมเกรด 4032
- G31 สูตรรองพื้น สีอะคริลิก และพาสเทลแบบสีไทยโบราณ

เวลา รายละเอียด

12.00 - 13.00 น. พักรับประทานอาหารกลางวัน ณ ห้องอาหาร Retro Live Café

#### ภาคบ่าย สถานที่: ห้องประชุมย่อย 1 - 4 และห้องบอลรูม

เวลา รายละเอียด

13.00 - 15.30 น. นักศึกษาระดับปริญญาเอกนำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัยที่ได้รับทุน พวอ. ในรูปแบบปากเปล่า แบ่งตามกลุ่มอุตสาหกรรมเป้าหมาย (ลำดับการนำเสนอตามเลขที่สัญญา)

#### 1. กลุ่มอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์อัจฉริยะ (Smart Electronics)

##### ห้อง Meeting Room 1

- 1.1 การพัฒนาระบบควบคุมอุณหภูมิสำหรับเตารีดไฟฟ้า  
PHD5710020 นายเกียรติชัย บรรลุผลสกุล
- 1.2 การพัฒนาและทดสอบระบบวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเฟอโรแมกเนติกเรโซแนนซ์ในย่านความถี่สูง สำหรับตรวจสอบคุณภาพหัวอ่านฮาร์ดดิสก์ไดรฟ์ในยุคหน้า  
PHD5710033 นายอลงกรณ์ นมะหุต
- 1.3 ผลตอบสนองทางความถี่ของขดลวดเหนี่ยวนำแกนอากาศ  
PHD5710035 นายปิยะพล ถือทอง
- 1.4 การพัฒนาวิธีการจำแนกและตรวจจับการเกิดโคโรนาในระบบไฟฟ้ากำลังที่มีความแม่นยำสูงโดยวิธีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า  
PHD5710047 นายบุษยพล เพาพาน
- 1.5 ระบบควบคุมเซอร์โวรูปแบบใหม่สำหรับฮาร์ดดิสก์ไดรฟ์แบบความหนาแน่นการเก็บข้อมูลสูงเอสเอ็มอาร์  
PHD5710052 นายภูมิ คงห้วยรอด

<b>กลุ่มงานวิจัย</b>	การแพทย์ครบวงจร
<b>ชื่อโครงการ</b>	การผลิตโปรตีนชนิดผิวของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช Production of Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein in Plant
<b>ผู้ทำวิจัย</b>	นางสาวปริญญช สายบุญเรือน <sup>1</sup> รศ. ดร. วิภา วัฒนานนท์ <sup>1*</sup> ดร. นุชญา ไทยสมบูรณ์สุข <sup>2</sup> กญ. ดร. วาสนา วัจักษณ์ลาภย์ <sup>3</sup>

**คำสำคัญ (Keywords)**

การทำบริสุทธิ์, D1-4G2-4-15, ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี, อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม

**สรุปรายละเอียดงานวิจัย**

การผลิตโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืชจำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ Anti-Flavivirus Group Antigen Clone D1-4G2-4-15 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของจีนัส *Flavivirus* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม โดยใช้วิธี Direct adaptation ที่สามารถปรับเซลล์ให้เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมอย่างรวดเร็ว และทำบริสุทธิ์ของเหลวเหนือตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์หลังจากตกตะกอนด้วยร้อยละ 50 แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบไม่จำเพาะและจำเพาะ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจน โดยใช้วิธี typing ELISA ให้ผลทดสอบเป็นบวกกับ *Dengue virus type 1* และวัคซีนไข้สมองอักเสบเจอี ผลทดสอบความคงทนที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 สัปดาห์เมื่อตรวจหาความแรงของแอนติบอดีกับ *Dengue virus type 1* สามารถนำมาใช้ได้ด้วยความเจือจางสูงสุด 1:1,000 เท่า รวมถึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ถึงร้อยละ 93.06 เมื่อเปรียบเทียบกับราคาขายของบริษัท Absolute Antibody Ltd. ที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความคงทนและจำเพาะต่อแอนติเจนของจีนัส *Flavivirus* จึงสามารถนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช รวมทั้งงานวิจัยอื่นๆ ของจีนัส *Flavivirus*



**ที่อยู่ผู้ทำวิจัย** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยรัตนศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120  
ภาควิชาไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารผ่านศึก กรุงเทพมหานคร  
บริษัท ไบโอเนท-เอเชีย จำกัด w\_tangkananond@yahoo.com  
**หน่วยงานที่ร่วมให้การสนับสนุน** บริษัท ไบโอเนท-เอเชีย จำกัด

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 133



# การผลิตโปรตีนชนิดผิวของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช

(Production of Japanese Encephalitis Virus Envelope Protein in Plant) โดยนำเสนองานวิจัยเรื่อง  
 “การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ Anti-Flavivirus Group Antigen Clone D1-4G2-4-15  
 เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช  
 Purified Monoclonal Antibody of Anti-Flavivirus Group Antigen Clone D1-4G2-4-15 for  
 Using in the Production of Japanese Encephalitis Virus Surface Protein in Plant”

เลขที่สัญญา **MSD5710119**

ชื่อผู้ทำวิจัย **นางสาวปรียานุช สายบุญเรือน, รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา ตั้งคนานนท์,  
 ดร.บุษยา ไทยสมบุญนิสุข, เกษัชกรหญิง ดร.วาสนา วิจักขณาลัญจิ**

กลุ่มอุตสาหกรรม **การแพทย์ครบวงจร**

รหัส **C09**



คำสำคัญ การทำบริสุทธิ์ / D1-4G2-4-15 / ไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี / อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม

การผลิตโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช จำเป็นต้องใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอี ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ Anti-Flavivirus Group Antigen Clone D1-4G2-4-15 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของ จีนิส Flavivirus ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม โดยใช้วิธี Direct adaptation ที่สามารถปรับเซลล์ให้เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัมอย่างรวดเร็ว และทำบริสุทธิ์ของเหลวเนื้อตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์หลังจากตกตะกอนด้วย 50% แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบไม่จำเพาะ และจำเพาะ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการจับกับแอนติเจน โดยใช้วิธี typing ELISA ให้ผลทดสอบเป็นบวกกับ Dengue virus type 1 และวัคซีนไข้สมองอักเสบเจอี ผลทดสอบความคงทน ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 สัปดาห์ เมื่อตรวจหาความแรงของแอนติบอดี กับ Dengue virus type 1 สามารถนำมาใช้ได้ด้วยความเจือจางสูงสุด 1:1,000 เท่า รวมถึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ถึงร้อยละ 93.06 เมื่อเปรียบเทียบกับราคาขายของบริษัท Absolute Antibody Ltd. ที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ 0.2 มก./มล. ดังนั้น โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความคงทนและจำเพาะต่อแอนติเจนของ จีนิส Flavivirus จึงสามารถนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนชนิดผิวของไวรัสไข้สมองอักเสบเจอีในพืช รวมทั้งงานวิจัยอื่นๆ ของจีนิส Flavivirus



ที่อยู่ผู้ทำวิจัย **ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120**  
**ภาควิชาไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสรีรฯ กรุงเทพมหานคร 10400 บริษัท ไบโอบีโอเอเชีย จำกัด**  
**นิคมอุตสาหกรรมนิคมท่าอากาศยาน อ.พระนครศรีอยุธยา 13160 E-mail ของผู้ติดต่อ: w.tangkananond@yaho.com**

บริษัทที่ร่วมสนับสนุน **บริษัท ไบโอบีโอเอเชีย จำกัด นิคมอุตสาหกรรมนิคมท่าอากาศยาน อ.พระนครศรีอยุธยา 13160**





The 11<sup>th</sup> International Symposium of the Protein Society of Thailand

3-5 August 2016

Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand





24 Jun 2016

Dear Ms. Preeyanuch Sayboonruan,  
Biotechnology Science and Technology Thammasat university

Subject: Acceptance of Proceedings Submission (PP035)

Your proceedings (No. PP035) entitled **COMPARISON OF ADAPTATION METHODS FOR THE PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FROM CLONE D1-4G2-4-15 IN SERUM-FREE MEDIA.**, submitted to the Protein Society of Thailand (PST) for presentation at the 11<sup>th</sup> International Symposium of the Protein Society of Thailand to be held at the Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand during 3-5 August 2016 has been reviewed and recommended by the scientific committee. We are pleased to inform you that your proceedings was officially **ACCEPTED**.

Please prepare **POSTER** for your presentation according to the guidelines provided in the website at [http://www.proteinsocthai.net/symposium2016/guide\\_poster.php](http://www.proteinsocthai.net/symposium2016/guide_poster.php) and set your poster up at the symposium venue during 3-5 August 2016.

Thank you for your interest in the PST activities and looking forward to seeing you soon.



# COMPARISON OF ADAPTATION METHODS FOR THE PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FROM CLONE D1-4G2-4-15 IN SERUM-FREE MEDIA

Preeyanuch Sayboonruan<sup>1</sup>, Wassana Wijagkanalan<sup>2</sup>, Butsaya Thaisomboonsuk<sup>3</sup> and Wipa Tangkananond<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand  
<sup>2</sup>BioNet-Asia Co., Ltd, Hi-Tech Industrial Estate, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13160, Thailand  
<sup>3</sup>Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, U.S. Army Medical Directorate, Bangkok 10400, Thailand  
 \*E-mail: w\_tangkananond@yahoo.com

### ABSTRACT

Generally, cell culture media are supplemented with fetal bovine serum (FBS). The FBS disadvantages are contaminated with bacteria, viruses, etc. and expensive. Therefore researchers endeavor to grow cells in serum-free medium. The method for the production of monoclonal antibodies specific to antigen genus *Flavivirus* from clone D1-4G2-4-15 in serum-free media is described. The cells were cultivated in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated FBS and cells were adapted to serum-free media. Two adaptation methods of the immediate and sequential adaptations were compared. Cells were monitored and cultured for 3-5 passages until consistent growths were achieved and cell density, viability and antibody production were reported. Both immediate and sequential adaptations produced similar trends of cell density, viability and antibody production. The cells revealed similar patterns of lag, exponential and stationary growth phases using either 10% FBS or serum-free methods. The antibody production giving OD  $\geq 0.200$  were reported as positive and *Dengue virus type 1* was used as positive control in the test. The antibody production of cells growing in the complete RPMI 1640 medium and complete CD Hybridoma Medium methods showed the similar level of products which started from the first day. We can use the immediate adaptation method for producing monoclonal antibody from clone 4G2 as it consumed less time, lower cost and labor than the sequential adaptation method. Moreover, the antibody production of the immediate adaptation method was similar to the conventional culture method with 10% FBS-RPMI 1640.

**Keywords:** D1-4G2-4-15, serum-free media, monoclonal antibody, cell culture

### INTRODUCTION

In general, hybridoma cell lines are cultured in conventional tissue culture media supplemented with 10% FBS. Of these, serum is the most common ingredient to support and enrich hybridoma cell growth. However, owing to the regulatory and safety issues, serum need to be avoided in the biopharmaceutical industry [1] as the serum in hybridoma cell culture medium added to the fraction of immunoglobulins present in the culture media [2]. Consequently, hybridoma cells that typically grow in 10% FBS containing media (10%FBS-RPMI) need to go through a process of adaptation to culture in serum-free media conditions, usually consisting of reductions in serum concentration in the medium, and additional supplementation with serum substitutes, defined proteins, or small molecules such as amino acids or trace elements [3]. However, a serum-free adaptation is time consumed and can affect the genome stability, cell growth and product yield, as well as the product quality.

### RESULTS AND DISCUSSIONS

In this study, we cultured D1-4G2-4-15 in a serum-free cell culture system for the production of monoclonal antibodies specific to the genus *Flavivirus* antigen and compared the adaptation methods of serum free media in cell culture. Fig. 1 showed the number of cell density in serum free media by sequential adaptation method was greater than cells from the immediate adaptation method. The viability percentage of cell cultures in the sequential adaptation was higher than the immediate adaptation method as shown on Fig. 2. Both immediate adaptation and sequential adaptation methods can produce monoclonal antibodies specific to the genus *Flavivirus* antigen at the first day which showed the positive result on Fig. 3.

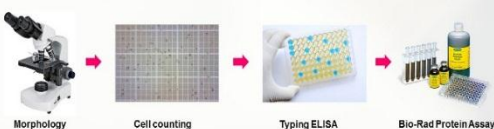
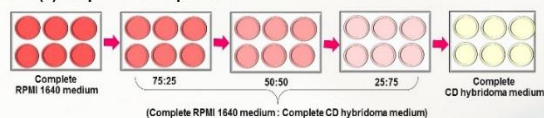
### MATERIALS AND METHODS

#### Adaptation of D1-4G2-4-15 to serum-free media

##### (I) Immediate adaptation



##### (II) Sequential adaptation



### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Research and Researchers for Industry Program, The Thailand Research Fund (TRF), Bangkok THAILAND and BioNet-Asia Co., Ltd, Hi-Tech Industrial Estate, Phra Nakhon Si Ayutthaya for funding this project. We would also thank the Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, US Army Medical Directorate, Bangkok and the Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani for the supporting materials and laboratories.

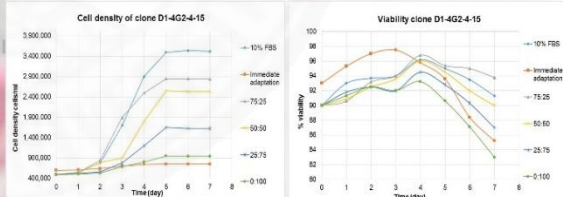


Fig. 1 Comparison of cell density of clone D1-4G2-4-15. Cells were cultured in the complete RPMI 1640 (+) and complete CD Hybridoma Medium which included immediate adaptation (+) and sequential adaptation containing various ratio of complete RPMI 1640: complete CD Hybridoma Medium [75:25 (-), 50:50 (-x), 25:75 (-o), 0:100 (-+)].

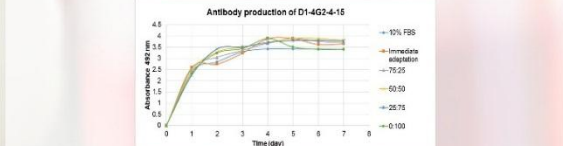


Fig. 2 Comparison of % viability of clone D1-4G2-4-15 cultured in the complete RPMI 1640 medium (+) and the complete CD Hybridoma Medium. The serum-free media included 2 methods: immediate adaptation (+) and sequential adaptation. The sequential adaptation had containing ratio of the complete RPMI 1640 medium: complete CD Hybridoma Medium [75:25 (-), 50:50 (-x), 25:75 (-o), 0:100 (-+)].

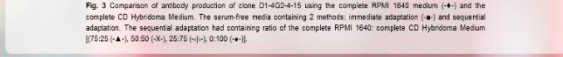


Fig. 3 Comparison of antibody production of clone D1-4G2-4-15 using the complete RPMI 1640 medium (+) and the complete CD Hybridoma Medium. The serum-free media containing 2 methods: immediate adaptation (+) and sequential adaptation. The sequential adaptation had containing ratio of the complete RPMI 1640: complete CD Hybridoma Medium [75:25 (-), 50:50 (-x), 25:75 (-o), 0:100 (-+)].

### CONCLUSIONS

D1-4G2-4-15 hybridoma cells can be cultured in 10% FBS-RPMI without compromising cell viability, density and antibody production. The hybridoma cells can be cultured in serum free media by immediate adaptation and sequential adaptation methods which showed similar trends of cell density, viability and antibody production. The best method was immediate adaptation method for producing monoclonal antibody from clone D1-4G2-4-15 as less time and labor consumed than by sequential adaptation. Both antibody productions were similar when compared to 10% FBS-RPMI. The immediate adaptation method can use serum free at the first passage, but the sequential adaptation method required 4 passages before gradually stepping into a serum-free medium. Therefore, the immediate adaptation culture method can reduce time, cost, and manpower.

### REFERENCES

- Oztek S, Hu WS (2008) Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. CRC Press, 439-440.
- Darby C, Hamano K, Wood K (1993) Purification of monoclonal antibodies from tissue culture medium depleted of IgG. J Immunol Methods 159, 123-9.
- Doyle A, Bryan GJ (1998) Cell and tissue culture: laboratory procedure in biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons, 92-8.





ABSTRACTS AND PROCEEDINGS

**The 11<sup>th</sup> International Symposium  
of the Protein Society of Thailand**

**3 – 5 August 2016**

Convention Center, Chulabhorn Research Institute

Bangkok, Thailand

**Protein Society of Thailand (PST)**

<http://www.proteinsocietythai.net>



## CONTENTS

### The 11<sup>th</sup> International Symposium of the Protein Society of Thailand

Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand

3 – 5 August 2016

Organizing Committee.....	i
Preface.....	v
Symposium Program.....	vii
Symposium Floor Plan.....	xi
Invited Lectures.....	xiii
Luncheon Lectures.....	xv
Oral Presentations.....	xvii
Abstracts.....	xix
Proceedings.....	xxiii
Exhibitors.....	223
List of Participants.....	227
PST Supporting Members (2016).....	241
Author Index.....	247

---

**4 August 2016**


---

**Chair: Assoc. Prof. Dr. Polkit Sangwanich**

09.00 – 9.30 **IL3:** Discovery of potential biomarkers for diagnosis and classification of well-differentiated thyroid carcinomas

Dr. N. Monique Paricharttanakul

09.30 – 10.00 **IL4:** Proteomics in microbiology: Identification, evolution and adaptation of *Burkholderia pseudomallei*

Assoc. Prof. Dr. Narisara Chantratita

10.00 – 10.30 **Coffee/tea break**

**Chair: Dr. Sittiruk Roytrakul**

10.30 – 11.00 **IL5:** Quantitative mass spectrometry for multidimensional proteome analysis of cells

Dr. Trairak Pisitkun

11.00 – 11.30 **IL6:** High-density nanoparticle pellicle method for enrichment of plasma membrane-associated proteins in suspension cells

Dr. Waeowalee Choksawangarn

11.30 – 11.50 **O6:** Phylogenetic and amino acid analyses of hnRNP A1 protein domain and partial DNA sequencing of Thai green turtle (*Chelonia mydas*) *hnRNP A1* gene

Assist. Prof. Dr. Thanaporn Chuen-Im

12.00 – 13.00 **Luncheon Lecture:** Alternative multi-omic strategies help to reveal a greater insight to biological understanding

Robin Philp (Agilent Technologies)

13.00 – 14.00 **Poster Session** (Even number poster presentations)

**Chair: Assoc. Prof. Dr. Palangpon Kongsaree**

14.00 – 14.30 **IL7:** Butelase 1: An Asn/Asp-specific ligase for all purposes

Prof. James P. Tam

14.30 – 15.00 **IL8:** Study of liver fluke-induced cholangiocarcinogenesis links to the discovery of the therapeutic targets and biomarkers of cholangiocarcinoma

Assoc. Prof. Dr. Watcharin Loilome

15.00 – 15.30 **Coffee/tea break**

**Chair: Assist. Prof. Dr. Dumrongkiet Arthan and Assist. Prof. Dr. Surapong Pinitglang**

15.30 – 15.50 **O7:** Model-based design of optimal feeding strategies toward apoptosis suppression for improving monoclonal antibody production in GS-NS0 cell culture

Dr. Chonlatep Usaku

15.50 – 16.10 **O8:** Pore-forming characteristics of *Bordetella pertussis* CyaA-hemolysin in various lipid membranes: Planar lipid bilayer, supported lipid bilayer, liposomes, erythrocytes

Dr. Panchika Prangkio

16.10 – 16.30 **O9:** Major capsid reinforcement by a minor protein in herpesviruses and phage

Dr. Udom Sae-Ueng

16.30 – 16.50 **O10:** Structural basis of microbial glycans recognition by intelectins

Dr. Kittikhun Wangkanont

## PROCEEDINGS

- Proceedings PP026-1** Rieofarng Dontumprai  
Identification and recombinant protein expression of putative mucinase enzyme of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*..... 83
- Proceedings PP027-2** Sirikanya Plumworasawat  
Cloning and expression of thioredoxin glutathione reductase (TGR) from *Opisthorchis viverrini*..... 88
- Proceedings PP028-3** Md Abu Reza  
Protein profiles, LD<sub>50</sub> of Bangladesh snake (*Naja naja*) venom together with its effect on mice tissues: study reveals the necessity for snake bite treatment in Bangladesh..... 94
- Proceedings PP030-4** Pornpimol Loeiyut  
Amino acid substitutions in a putative carbohydrate binding module of Vip3Ag2 affect its larvicidal activity.....102
- Proceedings PP034-5** Kantinan Chuensirikulchai  
Competitive antibody-based biosensor detecting secreted antigen 85 complex for tuberculosis diagnosis..... 110
- Proceedings PP035-6** Preeyanuch Sayboonruan  
Comparison of adaptation methods for the production of monoclonal antibodies from clone D1-4G2-4-15 in serum-free media..... 119
- Proceedings PP039-7** Worapol Tangkijthavorn  
Isolation and initial characterization of DDX6–RNA complex involved in dengue virus replication..... 128
- Proceedings PP040-8** Wannarat Jinathep  
Impairment of subcellular targeting of myristoylated protein derived from downstream of a “self-cleaving” 2A peptide..... 138
- Proceedings PP042-9** Manlika Wanmakok  
Construction and expression of L31-P113 hybrid anti-microbial peptide in *Escherichia coli*..... 147
- Proceedings PP049-10** Wan-angkan Poolsri  
Citrate transporter inhibitor inhibits de novo lipogenesis pathway and triggers apoptosis in HepG2 cells..... 156

Proceedings PP035-6

## Comparison of adaptation methods for the production of monoclonal antibodies from clone D1-4G2-4-15 in serum-free media

Preevanuch Savboonruan<sup>1</sup>, Wassana Wijagkanalan<sup>2</sup>, Butsaya Thaisomboonsuk<sup>3</sup> and Wipa Tangkananond<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120, Thailand

<sup>2</sup> BioNet-Asia Co., Ltd, Hi-Tech Industrial Estate, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13160, Thailand

<sup>3</sup> Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, U.S. Army Medical Directorate, Bangkok 10400, Thailand

**E-mail:** w\_tangkananond@yahoo.com

### ABSTRACT

Generally, cell culture media are supplemented with fetal bovine serum (FBS). The FBS disadvantages are contamination with bacteria, viruses, etc. and expense. Therefore researchers endeavor to grow cells in serum-free medium. The method for the production of monoclonal antibodies specific to an antigen of the genus *Flavivirus* from clone D1-4G2-4-15 in serum-free media is described. The cells were cultivated in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated FBS and cells were adapted to serum-free media. Two adaptation methods of the immediate and sequential adaptations were compared. Cells were monitored and cultured for 3-5 passages until consistent growth was achieved and cell density, viability and antibody production were reported. Both immediate and sequential adaptations produced similar trends of cell density, viability and antibody production. The cells revealed similar patterns of lag, exponential and stationary growth phases using either 10% FBS or serum-free methods. The antibody production giving OD  $\geq 0.200$  were reported as positive and *Dengue virus type 1* was used as positive control in the test. The antibody production of cells growing in the complete RPMI 1640 medium and complete CD Hybridoma Medium methods showed similar levels of products which started from the first day. We can use the immediate adaptation method for producing monoclonal antibody from clone 4G2 as it consumed less time, at lower cost and required less labor than the sequential adaptation method. Moreover, the antibody production of the immediate adaptation method was similar to the conventional culture method with 10% FBS-RPMI 1640.

**Keywords:** D1-4G2-4-15, serum-free media, monoclonal antibody, cell culture

### INTRODUCTION

D1-4G2-4-15 (ATCC<sup>®</sup> HB-112<sup>TM</sup>) was derived from the mouse after immunization with *dengue virus type 2* antigens and spleen cells were fused with P3X63Ag8 myeloma cells [1]. The monoclonal antibodies from clone D1-4G2-4-15 reacted specifically with the envelope protein of viruses in genus *Flavivirus* [2, 3]. This genus includes *Dengue virus*,

*West Nile virus, Tick-borne encephalitis virus, Zika virus, Yellow fever virus* and several other viruses which may cause encephalitis [4].

In general, hybridoma cell lines are cultured in conventional tissue culture media supplemented with 10% FBS. Of these, serum is the most common ingredient to support and enrich hybridoma cell growth. However, owing to the regulatory and safety issues, serum need to be avoided in the biopharmaceutical industry [5] as the serum in hybridoma cell culture medium added to the fraction of immunoglobulins present in the culture media [6]. Consequently, hybridoma cells that typically grow in 10% FBS containing media (10%FBS-RPMI) need to go through a process of adaptation to culture in serum-free media conditions, usually consisting of reductions in serum concentration in the medium, and additional supplementation with serum substitutes, defined proteins, or small molecules such as amino acids or trace elements [7]. However, a serum-free adaptation is time consumed and can affect the genome stability, cell growth and product yield, as well as the product quality.

In this work, we used 2 methods to adapt hybridoma cells to serum-free culture conditions; the immediate adaptation and sequential adaptation. The hybridoma cells exhibited viable growth with incessant production of monoclonal antibody in 10% FBS-RPMI 1640. The cell density, viability and antibody production from hybridoma cells in 10% FBS-RPMI 1640 and both serum-free media of immediate and sequential adaptations were compared. We aimed to improve the best method for growing clone D1-4G2-4-15 by using serum-free media and produce monoclonal antibodies specific to the genus *Flavivirus* antigens.

## MATERIALS AND METHODS

### D1-4G2-4-15 cell culture

Frozen cells of D1-4G2-4-15 were rapidly thawed in the 37°C water bath and were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco) and final concentration of 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 100 I.U./ml penicillin (Invitrogen) and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen) which was called the complete RPMI 1640 medium. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and grown for 5 days. Then cells were sub-cultured in the mid-logarithmic growth phase 3-5 days with the minimum of 3 passages before using in the further applications. The cells were seeded at  $2 \times 10^5$ - $3 \times 10^5$  viable cells/ml.

### Adaptation of D1-4G2-4-15 to serum-free media

D1-4G2-4-15 cells were sub-cultured by growing in the complete RPMI 1640 medium and cell growth were monitored until reaching  $1 \times 10^6$  viable cells /ml. Then cells were cultured by two methods using immediate and sequential adaptations which were described as follows.

### **Immediate adaptation**

D1-4G2-4-15 cells were washed 2 times by using CD Hybridoma Medium with supplement of final concentration of 8 mM L-glutamine (Invitrogen), 100 I.U./ml penicillin (Invitrogen) and 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen) which was called the complete CD Hybridoma Medium. The cells were centrifuged at 200g for 5 minutes, and sub-cultured to  $6 \times 10^5$  viable cells/ml in fresh pre-warmed complete CD Hybridoma Medium. Then cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in the air and grown for 5 days. Next cells were continuously monitored and passaged for 3–5 passages until consistent growth was achieved. After cells were sub-cultured, the supernatants were harvested from cell cultures by centrifugation at 200g for 10 minutes and they were stored at -20°C for testing their antibody production.

### **Sequential adaptation**

A seeding density of  $5 \times 10^5$  viable cells/ml was used during the adaptation procedure. Cells were sub-cultured stepwise by increasing the ratios of complete CD Hybridoma Medium to the complete RPMI 1640 medium with each subsequent passage as follows: (i) 25:75, (ii) 50:50, (iii) 75:25, (iv) 90:10 and followed by 100% complete CD Hybridoma Medium. After sub-culturing, the cells were harvested and the supernatants were collected by centrifugation at 200g for 10 minutes and were stored at -20°C for testing their antibody production.

### **Cell counting for cell density and viability assay**

A number of cells growing in culture flasks were sampling and determined by using a Neubauer hemocytometer and trypan blue dye. Dead cells were stained with trypan blue so that they could be outstanding from live cells.

#### Calculate the cell density

$$\text{Cell density (cells/ml)} = \text{Average of cells} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

#### Calculate cell viability

$$\% \text{ Cell viability} = \text{Average of live cells} / \text{Average of total cells} \times 100$$

### **Typing enzyme-linked immunosorbent assay (Typing-ELISA)**

The typing ELISA was performed according to the protocol established at Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) laboratory [8]. Briefly, 100 µl of 1:400 Goat anti-mouse IgG (KPL, A SeraCare Company) were transferred to a 96-well plate and incubated overnight at 4°C or 2-3 hours at room temperature. The plate was washed eight times with 0.5% BSA in PBS, pH 7.4±0.1 and later blocked for 1-2 hours in 1% BSA in PBS, pH 7.4±0.1 at room temperature. Then supernatants from cell culture at 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 and 1:3000 dilution were added to the wells and incubated 2-3 hours at room temperature. *Dengue virus type 1* antigen was transferred to each well of a 96-well plate and incubated overnight at 4°C. After washing the plate, human anti-flavivirus IgG-HRP

conjugate was added and incubated 2-3 hours at room temperature. The plate was washed and o-phenylenediamine (OPD) was added subsequently. The reaction was stopped by 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The plate was read on a microplate reader at an absorbance of 492 nm.

#### **Determination of protein concentration**

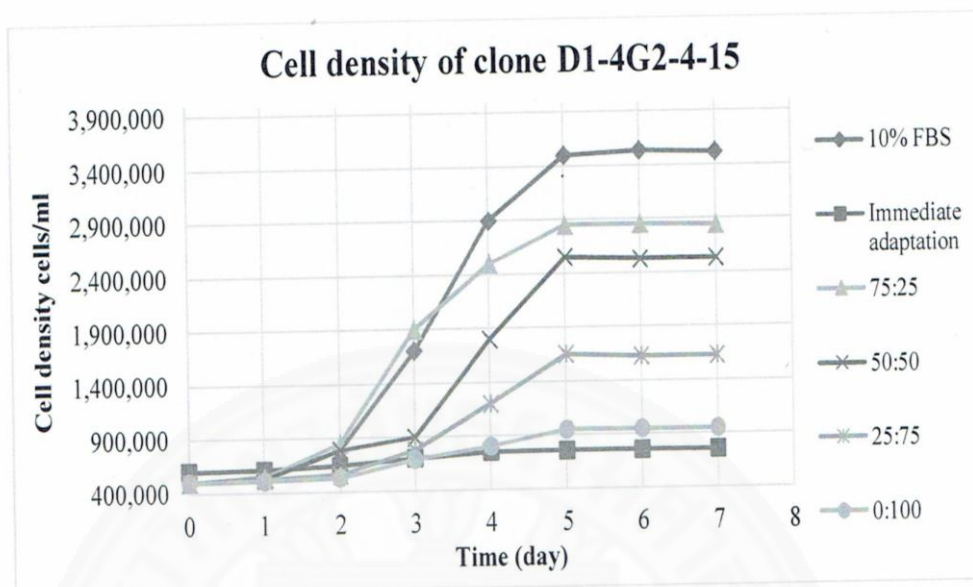
Bio-Rad Protein Assay can be used for the determination of total proteins in each supernatant by measuring OD at 595 nm with a microplate reader following Bradford [9]. The Mouse IgG protein standards (SIGMA, USA) were used for calculating protein concentrations.

#### **RESULTS**

The D1-4G2-4-15 cells were grown in complete RPMI 1640 medium and sub-cultured at the mid-logarithmic growth phase during day 3-5 post-thawing at a seeding density of  $5 \times 10^5$  viable cells/ml. Cells were sub-cultured using a minimum of 3 cell passages before adaptation to serum-free media. Cells were sub-cultured when viable cell density reached  $\geq 1 \times 10^6$  viable cells/ml into sterile flasks with fresh pre-warmed complete CD Hybridoma Medium. Two methods of adaptation in serum-free media have been used, i.e., immediate adaptation and sequential adaptation. It is critical that cell viability were greater than 90% and cells was in the mid-logarithmic growth phase prior to adaptation. Successful adaptation will depend on upon each particular hybridoma and the culture conditions employed. It is recommended that the backup cultures in the original medium were maintained until success with the new medium has been achieved.

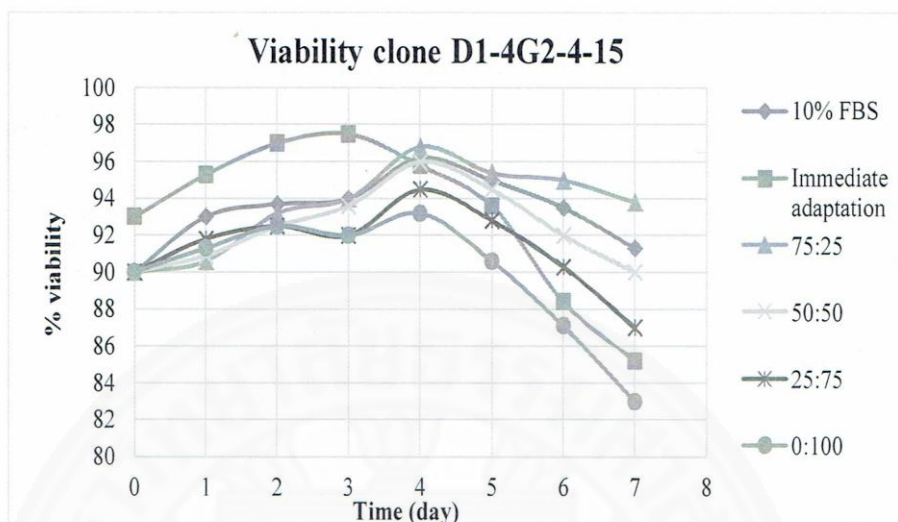
Comparison of cell density of clone D1-4G2-4-15 cultured in the complete RPMI 1640 medium and serum-free media were shown. The methods of serum-free media were immediate adaptation and sequential adaptation, of which contained the ratio of complete RPMI 1640 medium: complete CD Hybridoma Medium of 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100 and they were grown for 7 days. The number of cell density in the complete RPMI 1640 medium was greater than cells in the complete CD Hybridoma Medium. The number of cell density in serum free media by sequential adaptation method was greater than cells from the immediate adaptation method as shown on **Fig. 1**. The cell density of cell culture by the sequential adaptation method at ratio 75:25 had higher cell density than in other ratios. The comparison of cell density in serum-free media from both immediate adaptation and sequential adaptation methods were shown. The cell densities of both methods were quite similar but slightly higher in the sequential adaptation method than in the immediate adaptation method. The cells grew into the lag phase on 0-2 days and the exponential phase started on day 3 and ended on day 5. All these cells reached the stationary phase on day 6.





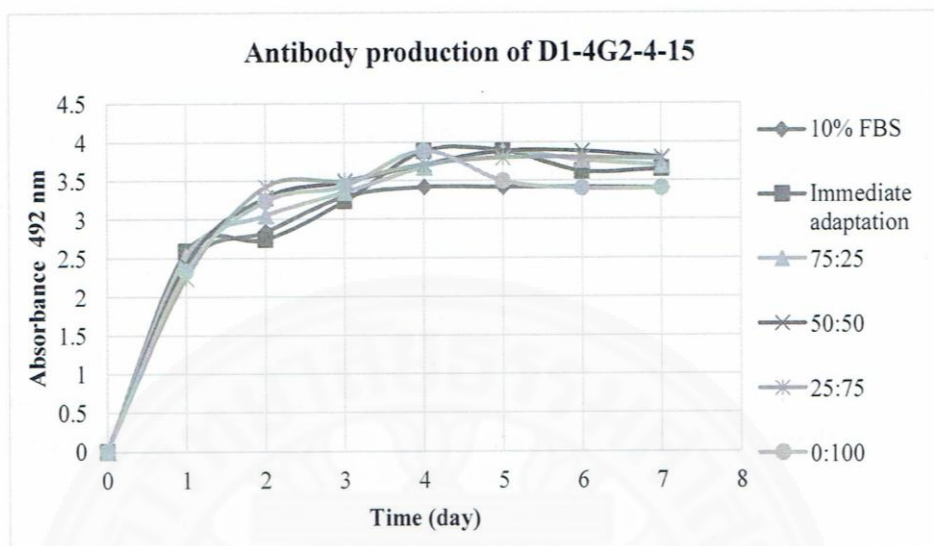
**Fig. 1** Comparison of cell density of clone D1-4G2-4-15. Cells were cultured in the complete RPMI 1640 (-♦-) and complete CD Hybridoma Medium which included immediate adaptation (-■-) and sequential adaptation containing various ratio of complete RPMI 1640: complete CD Hybridoma Medium [(75:25 (-▲-), 50:50 (-X-), 25:75 (-\*|-), 0:100 (-●-)].

Comparison of the percent viability of clone D1-4G2-4-15 cultured in the complete RPMI 1640 and complete CD Hybridoma Medium, the cell viability of seeding stock in the complete RPMI 1640 was greater than 90% then the cells were sub-cultured into serum free media. The viability percentage of cell cultures in the sequential adaptation was higher than the immediate adaptation method as shown on **Fig. 2**. The greatest viability percentage was shown by the sequential adaptation method at ratio of complete RPMI 1640 and complete CD Hybridoma Medium at 75:25 whereas the subsequent viability ratios were shown at the sequential adaptation method at ratio of 50:50 and 25:75. The cell viability of immediate adaptation method rapidly declined when compared to the sequential adaptation method.



**Fig. 2** Comparison of % viability of clone D1-4G2-4-15 cultured in the complete RPMI 1640 medium (-◆-) and the complete CD Hybridoma Medium. The serum-free media included 2 methods: immediate adaptation (-■-) and sequential adaptation. The sequential adaptation had containing ratio of the complete RPMI 1640 medium : complete CD Hybridoma Medium [(75:25 (-▲-), 50:50 (-X-), 25:75 (-\*)|(-), 0:100 (-●-)].

Antibody productions of clone D1-4G2-4-15 which were cultured in the complete RPMI 1640 and complete CD Hybridoma Medium produced similar titers and were positive at the first day. The positive cut-off optical density (OD) when measuring the absorbance at 492 nm was greater than or equal to 0.200. Cells were cultured in different conditions producing monoclonal antibodies specific to the genus *Flavivirus* antigen and *Dengue virus type1* which were used as a representative control of genus *Flavivirus*. Both immediate adaptation and sequential adaptation methods can produce monoclonal antibodies specific to the genus *Flavivirus* antigen at the first day which showed the positive result on **Fig. 3**. The yield was determined by antibody present in the supernatant of the complete RPMI 1640 was 19.73 mg/ml, while the yield of antibody in complete CD Hybridoma Medium was 0.335 and 0.357 mg/ml in immediate and sequential adaptations respectively. The antibody in the complete RPMI 1640 had the highest concentration because it contains calf's IgG with concentration of 3.5 to 47.0 mg/ml. Therefore antibody productions of D1-4G2-4-15 in the complete RPMI 1640 were composed of IgG of calf and D1-4G2-4-15 [10].



**Fig. 3** Comparison of antibody production of clone D1-4G2-4-15 using the complete RPMI 1640 medium (◆) and the complete CD Hybridoma Medium. The serum-free media containing 2 methods: immediate adaptation (■) and sequential adaptation. The sequential adaptation had containing ratio of the complete RPMI 1640: complete CD Hybridoma Medium [(75:25 (▲), 50:50 (×), 25:75 (✱), 0:100 (●)].

## DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, we cultured D1-4G2-4-15 in a serum-free cell culture system for the production of monoclonal antibodies specific to the genus *Flavivirus* antigen and compared the adaptation methods of serum free media in cell culture. As has been extensively reviewed [7, 11, 12] serum is the main source important of growth factors, hormones, and nutrient transporting molecules. However, the disadvantage of fetal bovine serum containing in culture medium is especially when the antibody purity and quality strictly required [13] and high amounts of diverse proteins introduction into the system. Many of the contaminating immunoglobulins have similar properties to the antibody of interest [14-16]. The purification of the antibody of these protein mixtures is extremely difficult and there are usually several steps to purify. The existing natural variability of sera, a purification protocol optimized for one lot of commercial serum may vary among batches of antibodies [17]. Moreover, the use of animal sera increases the risk of introducing infectious agents such as mycoplasma and viruses that may compromise the medical safety of the product in use [5]. Some hybridoma cells require serum of which may be reduced by maintaining the cells at high density, and antibody production is not ratio for the rate of cell proliferation, rather it depends on the total number of cells in culture. The first successful cultivation of hybridoma cells using a serum-free medium was described by Chang et al. [18].

The replacement of serum (10% FBS) media with serum free media provides important ethical and scientific advantages [19]. To improve cell culture techniques by switching to serum-free media has become imperative. The development of monoclonal antibodies producing hybridomas can be conducted without serum in the culture medium. Serum-free media are highly effective for the culture of splenocytes and myelomas before fusion and during the selection of hybridomas immediately after fusion [2, 3, 15]. Production of monoclonal antibodies from selected hybridoma cells is also greatly improved by the elimination of serum from culture media.

In conclusion, our data D1-4G2-4-15 hybridoma cells can be cultured in 10% FBS-RPMI without compromising cell viability, density and antibody production. The hybridoma cells can be cultured in serum free media by immediate adaptation and sequential adaptation methods which showed similar trends of cell density, viability and antibody production. The best method was immediate adaptation method for producing monoclonal antibody from clone D1-4G2-4-15 as less time and labor consumed than by sequential adaptation. Both antibody productions were similar when compared to 10% FBS-RPMI. The immediate adaptation method can use serum free at the first passage, but the sequential adaptation method required 4 passages before gradually stepping into a serum-free medium. Therefore, the immediate adaptation culture method can reduce time, cost, and manpower.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

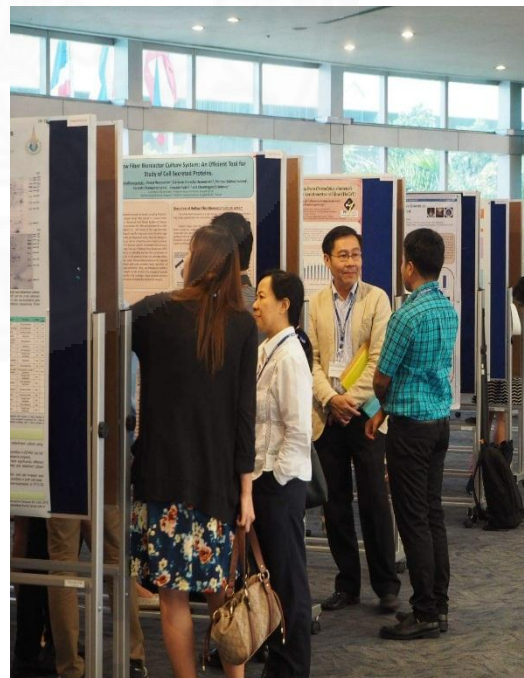
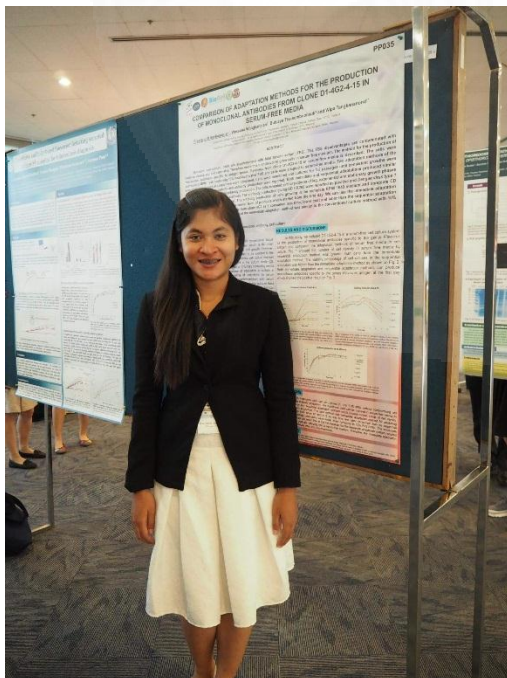
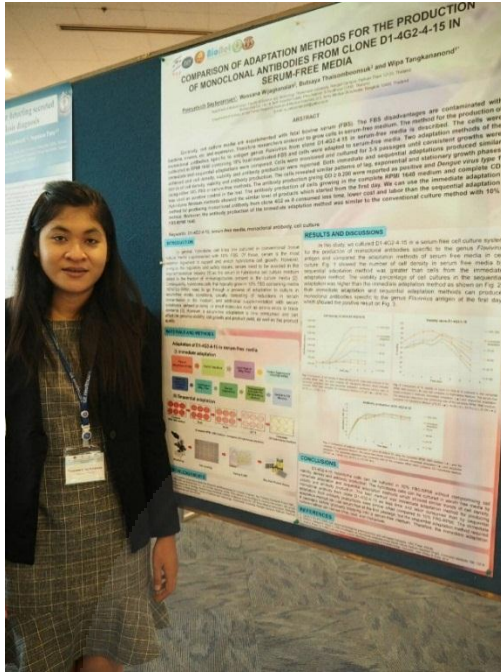
The authors would like to thank the Research and Researchers for Industry Program, The Thailand Research Fund (TRF), Bangkok THAILAND and BioNet-Asia Co., Ltd, Hi-Tech Industrial Estate, Phra Nakhon Si Ayutthaya for funding this project. We would also thank the Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, US Army Medical Directorate, Bangkok and the Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani for the supporting materials and laboratories.

#### REFERENCES

1. Henchal E, Gentry M, McCown J, Brandt W (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* **31**, 830-6.
2. Baker P, Knoblock K, Noll L, Wyatt D, Lydersen B (1984) A serum independent medium effective in all aspects of hybridoma technology and immunological applications. *Dev Biol Stand* **60**, 63-72.
3. Kawamoto T, Sato JD, Le A, McClure DB, Sato GH (1983) Development of a serum-free medium for growth of NS-1 mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridomas. *Anal Biochem* **130**, 445-53.
4. Shi PY (2012) *Molecular virology and control of flaviviruses*: Horizon Scientific Press. 1-9
5. Ozturk S, Hu WS (2005) *Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies*: CRC Press. 439-40.

6. Darby C, Hamano K, Wood K (1993) Purification of monoclonal antibodies from tissue culture medium depleted of IgG. *J Immunol Methods* **159**, 125-9.
7. Doyle A, Bryan GJ (1998) *Cell and tissue culture: laboratory procedure in biotechnology*: Chichester: John Willey & Sons. 92-8
8. Jarman RG, Nisalak A, Anderson KB, Klungthong C, Thaisomboonsuk B, Kaneechit W, Kalayanarooj S, Gibbons RV (2011) Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *Am J Trop Med Hyg* **84**, 218-23.
9. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
10. Morrill KM, Tyler HD (2012) Two methods to determine IgG concentration in calf serum. *Animal Industry Report* **658**, 40.
11. Barnes D, Sato G (1980) Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal Biochem* **102**, 255-70.
12. Geigert J (2013) *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics*: Springer. 160-8.
13. Sandstrom CE, Miller WM, Papoutsakis ET (1994) Serum-free media for cultures of primitive and mature hematopoietic cells. *Biotechnol Bioeng* **43**, 706-33.
14. Kaldjian EP, Chen GH, Cease KB (1992) Enhancement of lymphocyte proliferation assays by use of serum-free medium. *J Immunol Methods* **147**, 189-95.
15. Kovář J, Franěk F (1984) Serum-free medium for hybridoma and parental myeloma cell cultivation: a novel composition of growth-supporting substances. *Immunol Lett* **7**, 339-45.
16. Ozturk S, Kaseko G, Mahaworasilpa T, Coster H (2003) Adaptation of cell lines to serum-free culture medium. *Hybrid Hybridomics* **22**, 267-72.
17. Shacter E (1989) Serum-free media for bulk culture of hybridoma cells and the preparation of monoclonal antibodies. *Trends Biotechnol* **7**, 248-53.
18. Chang TH, Steplewski Z, Koprowski H (1980) Production of monoclonal antibodies in serum free medium. *J Immunol Methods* **39**, 369-75.
19. Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*, **20**, 275-81.





Diagnostic Laboratory, SyAqua Siam Co., Ltd  
733/8 M. 8, Phahon Yothin Soi 80  
Phahon Yothin Rd., Khu Khot, Lam Luk Ka  
Pathumthani 12130, THAILAND  
Tel. +(66)29989590, Fax.+(66)29989590  
www.goldcoin-group.com



### หนังสือรับรองประสบการณ์การทำงาน

10 กรกฎาคม 2558

#### เรียน บุคคลที่เกี่ยวข้อง

ข้าพเจ้านางสาวธนัชพร อุทัยรังษี ตำแหน่งผู้จัดการห้องปฏิบัติการ บริษัทช่ายอาคควา สยาม จำกัด ตั้งอยู่อาคารเลขที่ 733/8 หมู่ 8 ถนนพหลโยธิน ตำบลคูคต อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี มีเกี่ยวข้องโดยเคยเป็นผู้จัดการห้องปฏิบัติการ ในช่วงเดือนตุลาคม 2557 จนถึงเดือนเมษายน 2558 ของนางสาวปริยานุช สายบุญเรือน ซึ่งปัจจุบันเป็นนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต รหัสนักศึกษา 5609032080 สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ข้าพเจ้าขอรับรองว่านางสาวปริยานุช สายบุญเรือน ได้มีประสบการณ์ในการทำงานเป็นเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยมีลักษณะงานต่อไปนี้

1. มีความสามารถในการเก็บตัวอย่างกุ้ง สกัด DNA และ RNA จากกุ้ง และตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียไวรัสที่ก่อโรคในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และอาหารสำหรับใช้เลี้ยงกุ้งโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ gel electrophoresis
2. มีส่วนร่วมในการทดลองและเก็บข้อมูลของกุ้งที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งให้มีความต้านทานโรค
3. มีส่วนร่วมในการพัฒนาชุดตรวจโรคไวรัสและแบคทีเรียไวรัสในกุ้งขาวโดยใช้เทคนิค PCR เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้พัฒนาไปเป็นจำนวน 2 โรคด้วยกันคือ โรค Covert Mortality Nodavirus โดยประยุกต์และปรับปรุงจากผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ "A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp, J Gen Virol. 2014" และ โรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome: EMS) โดยประยุกต์และปรับปรุงจากข้อมูลงานวิจัยจากหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

SyAqua บริษัท ช่ายอาคควา สยาม จำกัด  
140 อาคารวันแปซิฟิกพหลฯ ชั้น 19  
ห้อง 1902-4 ถนนสุขุมวิท แขวงคลองเตย  
เขตคลองเตย กรุงเทพฯ 10110  
(นางสาวธนัชพร อุทัยรังษี)  
ผู้จัดการห้องปฏิบัติการ

วันที่ 10 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2558

Delivering Genetic Improvement to the Shrimp Industry



SyAqua Siam Co., Ltd.  
140 one Pacific Place 19th Floor,  
Unit 1902-4, Sukhumvit Road,  
Klongtoey District Bangkok 10110 Thailand  
Tel+662-6532048 Fax. +662-6532049

**SyAqua**

A member of the Gold Coin Group



PERSONAL & CONFIDENTIAL

Ref. HR: 009/2015

30 April 2015

TO WHOM IT MAY CONCERN;

This is to certify that Ms. Preeyanut Saiboonroen was an employee of SyAqua Siam Co.,Ltd. She worked with company since August14, 2012 to April 30, 2015 with the last position was Laboratory Technician.

I hereby certify that the above mentioned information is true and correct.

Yours sincerely,

*Manatsanant*

Manatsanant Yakaew  
Senior HR Executive



*Delivering Genetic Improvement to the Shrimp Industry*