Original Article

Production of a monoclonal antibody against *Plasmodium* lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria

Pongwit Bualombai[1], Kanchana Aiem-Umporn[2], Chaiporn Rojanawatsirivet[1], Panadda Dhepaksorn[3], Tassanee Sakuldamrongpanich[2], Kanungnit Congpuong[1]

[1]Bureau of Vector Borne Disease, Department of Disease Control,

[2]National Blood Center, Red Cross Council, [3]Medical Biotechnology Center,

Department of Medical Science

Abstract

Malaria is still a major public health problem in Thailand especially along the border areas. Early diagnosis and prompt appropriate treatment has been the current successful control strategy. To succeed the early diagnosis strategy, malaria rapid diagnostic test (MRDT) is an appropriate alternative diagnostic tool. Some limitations of MRDT includes its high cost and quality variation. Locally developed MRDT could reduce these limitations. Specific monoclonal antibodies (MAbs) are the crucial components for the success of the MRDT kit production. In this study *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) was selected as a proteinomic antigen for the production of specific MAbs because it was a glycolytic enzymatic protein produced very specifically to each species of human Plasmodium with high amount. In addition, it was produced only by viable parasite; therefore, its detection would evidence the recent infection. The pLDH protein antigens originated from two sources, native and recombinant proteins. Native protein derived from *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum* K1 strain. Culture parasites were concentrated by passing through Cibacron blue column and pLDH was then harvested. Two recombinant pLDH proteins i.e. pLDH-GST and pLDH-His were produced. Female BALB/c mice, separated into three groups, were immunized with native pLDH or pLDH-GST or pLDH-His. After appropriate period, hybridromas were created by fusing the hyper-immunised mice's spleenic lymphocytes with myeloma cell, followed by screening and cloning the pLDH antibody secreting hybridomas. Two screening methods, ELISA and Dot-ELISA were used to test the hybridomas. Then, MAbs specific to *Plasmodium falciparum* and pan malaria species (*P. falciparum* and *P. vivax*) were chosen by using three techniques, indirect immunofluorescence (IFA), SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis. Totally, 269 MAbs were raised, mostly derived from recombinant pLDH hybridomas. Activitiy of the 118 MAbs were strong and stable. 1, 35 and 63 clones with stable and strong activity were derived from native pLDH hybridomas, pLDH-GST hybridamas and pLDH-His hybridomas, respectively. However, all MAbs produced by the first two hybridomas were IgM class. Some of them were then class switched to IgG to suit the conjugation with colloidal gold. After performing class switching, 19 strong and stable clones were derived. Specificity of MAbs determined by IFA and Western blot analysis showed that 61, 15 and 33 MAbs were specific to *P. falciparum*, *P. vivax* and PAN malaria species, respectively. Some MAbs were chosen for embedding test trips. The developed test strip was tested by using blood samples collected from malaria patients. High sensitivity of the developed test kit was found. The detection limit was 312 parasites per microlitre.

Key Words: Malaria, Monoclonal antibody, pLDH

นิพนธ์ต้นฉบับ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อเอ็นซัยม์ *Plasmodium* lactate dehydrogenase เพื่อใช้วินิจฉัยโรคมาลาเรีย

[1]พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, [2]กาญจนา เอี่ยมอัมพร, [1]ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช,
[3]ปนัดดา เทพอัคศร, [2]ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช, [1]ดนึงนิจ คงพ่วง

[1]สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค, [2]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
[3]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการแพทย์และสาธารณสุข

บทคัดย่อ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะท้องที่ห่างไกลและทุรกันดารบริเวณชายแดนของประเทศ มาตรการที่สำคัญที่สุดในการควบคุมไข้มาลาเรียในสถานการณ์แบบนี้คือ การให้บริการตรวจและรักษาอย่างรวดเร็ว การประยุกต์ใช้ชุดตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วที่เรียกกันง่าย ๆ ว่า dipstick เมื่อนำมาใช้เสริมวิธีตรวจปกตินับว่าเป็นมาตรการที่ดีและเหมาะสมมาตรการหนึ่ง แต่ปัญหาสำคัญคือ dipstick ในปัจจุบันมีราคาแพงและไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้ เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ดังนั้นความพยายามที่จะผลิต dipstick ได้เองในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งจำเป็น การผลิต dipstick เริ่มต้นจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อเชื้อมาลาเรีย ผู้วิจัยเลือก *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH) เป็นแอนติเจนที่จะนำมาใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ เนื่องจากเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียที่มีชีวิตอยู่ และถูกผลิตออกมาเป็นจำนวนมากในร่างกายผู้ป่วยที่กำลังติดเชื้อมาลาเรีย ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์เริ่มจากการเตรียมแอนติเจนซึ่งมาจาก 2 แหล่ง คือจากโปรตีนธรรมชาติและโปรตีนสังเคราะห์ ในส่วนของโปรตีนธรรมชาติได้จากการสกัดโปรตีน pLDH จากเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง แล้วนำมาผ่าน Cibacron blue column ส่วนโปรตีนอีก 2 ตัวเป็นโปรตีนสังเคราะห์ คือ pLDH-GST และ pLDH-His นำโปรตีนฉีดเข้าหนู BALB/c mices 3 กลุ่ม แบ่งตามที่มาของแอนติเจนดังกล่าว จากนั้นนำ mouse spleen มา fuse กับ myeloma cell line ทำ cloning แล้วเลือก hybridoma cells ที่ผลิตแอนติบอดีย์ต่อ pLDH โดยใช้วิธีคัดกรอง 2 วิธี คือ ELISA และ Dot-ELISA จากนั้นเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อเชื้อ *Plasmodium falciparum* และ PAN malaria antigen โดยวิธี indirect immunofluoresent assay (IFA), SDS-polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot analysis พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ส่วนใหญ่ได้มาจากการใช้โปรตีนสังเคราะห์ จำนวนโคลนที่ได้รวมทั้งสิ้น 269 โคลน แต่เป็นโคลนที่แข็งแรงและคงทน 118 โคลนซึ่งได้จากโปรตีนธรรมชาติ 1 โคลน โปรตีนสังเคราะห์ pLDH-GST 35 โคลน และโปรตีนสังเคราะห์ pLDH-His 63 โคลน แต่จากโคลนที่ผลิตจากกลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นชนิด IgM จึงต้องเปลี่ยน immunoglobulin class ของกลุ่มที่ 2 บางโคลนจาก IgM เป็น IgG เพื่อสะดวกต่อการนำมาเชื่อมกับ colloidal gold ให้ได้โคลนที่แข็งแรงและคงทนจำนวน 19 โคลน เมื่อวิเคราะห์ความจำเพาะโดยวิธี IFA และ Western blot ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. faciparum* 61 โคลน จำเพาะต่อเชื้อ *P. vivax* 15 โคลน และจำเพาะต่อ PAN malaria species 33 โคลน โคลนที่นำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ส่วนใหญ่ตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุด 312 ตัวต่อไมโครลิตร ในขั้นตอนต่อไปจะเลือกบางโคลนนำไปผลิต dipstick ต่อไป

คำหัส: มาลาเรีย, โมโนโคลนอลแอนติบอดีย์, เอ็นซัยม์ pLDH

บทนำ

มาลาเรียยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย โดยเฉพาะยังมีการระบาดในท้องที่ห่างไกลและทุรกันดาร ตามแนวชายแดนของประเทศ[1] มาตรการสำคัญที่สุดของการควบคุมไข้มาลาเรียในสถานการณ์แบบนี้คือการให้บริการตรวจและรักษาอย่างรวดเร็ว[2] การนำชุดตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วที่เรียกง่าย ๆ ว่า dipstick มาใช้เสริมวิธีตรวจปกติเป็นมาตรการที่ดีและเหมาะสม แต่มีอุปสรรคที่สำคัญคือราคาที่ยังคงแพงและ dipstick บางชนิดที่มีจำหน่ายอยู่มีข้อจำกัดเรื่องความถูกต้องของผลการตรวจที่ยังต่ำกว่าวิธีการตรวจฟิล์มเลือดหนาที่ย้อมด้วยสียิมซ่า[2] การผลิต dipstick ได้เองในประเทศไทยจึงเป็นสิ่งจำเป็น

การผลิต dipstick เริ่มจากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย ผู้วิจัยเลือกแอนติเจน *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH; L-Lactate, NAD^+-oxidoreductase) เพื่อนำมาใช้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ pLDH เป็นเอ็นซัยม์ตัวหนึ่งในขบวนการ glycolytic pathway ของเชื้อมาลาเรียซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเกิดสาร lactate จาก pyruvate ที่เป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ pLDH ถูกผลิตออกมาในปริมาณมากในเม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรีย[3] มีลักษณะจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียแต่ละสปีชีย์ที่พบในคน[4] pLDH ถูกผลิตโดยเชื้อตัวเป็นเท่านั้น ดังนั้นการพบ pLDH ในกระแสเลือดจึงสอดคล้องกับการพบเชื้อและจำนวนเชื้อในกระแสเลือดเช่นเดียวกับการตรวจหาเชื้อมาลาเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจพบ pLDH จึงแสดงถึงการที่ผู้ป่วยมีเชื้อมาลาเรียอยู่ในขณะนั้น[5]

ปัจจุบันมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อ pLDH จากเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ W2 และ D6 และได้นำมาผลิตเป็นชุดตรวจ immunocapture pLDH activity assay (ICpLDH assay) เมื่อนำมาตรวจเลือดผู้ป่วยมาลาเรียพบว่าผลการตรวจสอดคล้องกับการพบเชื้อมาลาเรียในผู้ป่วยเป็นอย่างดี[6] ปัจจุบันโมโนโคลนอลต่อ pLDH ได้ถูกนำมาผลิตเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปโดยบริษัทผู้ผลิตหลายบริษัท

จากความต้องการที่จะผลิตชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อมาลาเรียอย่างรวดเร็วได้เองในประเทศไทยโดยใช้เทคโนโลยีแบบพึ่งพาตนเอง เพื่อที่จะสามารถมีชุดตรวจเชื้อมาลาเรียราคาถูก และสามารถควบคุมคุณภาพได้อย่างใกล้ชิด ผู้วิจัยจึงได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อ pLDH โดยสกัดโปรตีน pLDH จากเชื้อฟัลซิปารัมสายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายในประเทศต่าง ๆ ที่พบเชื้อมาลาเรีย[7] การผลิตใช้ขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Goding[8] และ Harlow และคณะ[9]

วัสดุและวิธีการ

เชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1[7] ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์สดศรี ไทยทอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาเลี้ยงในหลอดทดลองโดยใช้ RPMI-1640 medium (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) ตามวิธีของ Trager และ Jensen[10] ทำให้เชื้อเป็นระยะเดียวกัน (synchronisation) ตามวิธีของ Lambros และ Vanderberg[11] เตรียมเชื้อมาลาเรียระยะไชซอนต์ให้มีความหนาแน่นของเชื้อตามที่ต้องการโดยใช้ Percoll-sorbitol discontinuous gradient ตามวิธีของ Kutner และคณะ[12] ปั่นล้างเชื้อมาลาเรียด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ที่ 5,000 รอบต่อนาที 2 ครั้ง เก็บเชื้อมาลาเรีย ที่ –70°ซ

การเตรียมและสกัด pLDH pLDH ถูกเตรียมเพื่อนำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ 2 แบบ คือ แบบโปรตีนธรรมชาติ (native protein) และแบบสังเคราะห์ (recombinant protein) การเตรียมโปรตีนธรรมชาติทำโดยนำเชื้อมาลาเรียที่เพาะเลี้ยงมาทำให้แตกเพื่อละลายเม็ดเลือดแดง โดยนำมาละลายใน 0.1 % saponin ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเชื้อมาลาเรีย อบบนเครื่องเขย่าผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำเชื้อมาลาเรียมาย่อยสลายด้วยคลื่นเสียง (ultrasonic disintegrator) ที่ 4°ซ, 20,000 รอบ 1 นาที วัดค่า pLDH activity โดยวัดค่า enzyme kinetic หลักการคร่าว ๆ คือใช้ sodium pyruvate เป็นสารตั้งต้นและใช้ NADH เป็น cofactor หาค่า LDH activity โดยใช้เครื่องมือของภาควิชาชีวเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ภายใต้

ความอนุเคราะห์ของศาสตราจารย์ ดร.วรชาติ สิรวราภรณ์ นำโปรตีนมาผ่าน HiTrapTM Blue HP Column (Amersham Biosciences AB, Uppsala Sweden) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัทผู้จำหน่าย นำโปรตีน pLDH ที่ผ่าน column มาวัดค่า enzyme kinetic อีกครั้ง จากนั้นนำ pLDH โปรตีนที่ได้มาวิเคราะห์โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และวัดโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ[13]

โปรตีน pLDH ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ปนัดดา เทพอัคศร ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีวิธีการเตรียมคร่าว ๆ ดังนี้ clone pLDH gene ใน plasmid *E. coli* ต่อด้วยการ express recombinant pLDH protein โดยใช้ Vector pGEX4T-1 และ transform ใน *E. coli* BL21 (DE3) แล้วเลี้ยงบน LB agar with ampicillin resistance จากนั้นทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จาก recombinant *E. coli* โปรตีน pLDH ที่ผลิตมี 2 แบบ คือ ชนิดที่เชื่อมกับโปรตีน glutathione S transferase (pLDH-GST) และชนิดที่เชื่อมกับ histidine (pLDH-His)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์

สถานที่ดำเนินการ 2 แห่ง คือ ศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการโรคติดต่อนำโดยแมลง สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธี native และ recombinant ทำโดยนำโปรตีนที่เตรียมได้ฉีดเข้าไปในช่องท้องหนู BALB/c เพศเมียซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มแรกฉีดโปรตีน pLDH ธรรมชาติ กลุ่มที่ 2 ฉีดโปรตีน pLDH สังเคราะห์ที่ติดฉลากกับ glutathione S transferase (pLDH-GST) และกลุ่มที่ 3 ฉีดโปรตีน pLDH สังเคราะห์ที่ติดฉลากกับ histidine (pLDH-GST) การฉีดใช้โปรตีนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม หลังจากนั้น 14 วัน ฉีดกระตุ้นซ้ำ (boost) 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 21 วัน ในการฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 3 จะฉีดเข้าทั้งในช่องท้องและเข้าเส้นเลือดดำ 3 วันหลังการฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งสุดท้าย ฆ่าหนู นำม้ามของหนูมาสกัดเซลล์ม้ามออกมาโดยใช้เข็มที่มรอบ ๆ ม้ามทำให้เกิดช่องให้เซลล์ม้ามออกมา นำเซลล์ม้ามมา fuse กับเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ X63.Ag8.653

หลังจากนั้นประมาณ 1-2 สัปดาห์ ตรวจคัดกรองเพื่อหาโคลนที่ให้ผลบวกโดยใช้วิธีการตรวจคัดกรอง 3 วิธี คือ enzyme linked immuosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescent assay (IFA) ตามวิธีของ Tharavanij และคณะ[14] และ dot-ELISA ของพงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ และคณะ[15] หาคุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์โดยการหา immmunoglobulin class และ sub-class ด้วยวิธี antibody capture on anti-Ig antibodies[9] และการย้อมติดสีระยะต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรีย โดยวิธี IFA โคลนที่ให้ผลบวกเหล่านี้จะถูกวัดความแรงโดยทั้งวิธี ELISA และ Dot-ELISA[15] และทดสอบโคลนเหล่านี้ทุก ๆ 3 เดือน โคลนใดที่ให้ผลบวกนานกว่า 6 เดือน จะนับว่าโคลนนั้นมีความคงทน

ทำโคลนเดี่ยว (single cell cloning) ตามวิธีของทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช[16] ตรวจคัดกรองหาโคลนที่ให้ผลบวกตามวิธีการ 3 วิธีดังกล่าวข้างต้น และตรวจยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์โดยวิธี SDS-PAGE และวิธี Western blot คัดเลือกโคลนที่จะผลิตแบบจำนวนมากในสัตว์ทดลอง โดยผลิตจากน้ำช่องท้องของหนู BALB/c แช่แข็งเก็บตามวิธีของ ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช[16] เพื่อนำไปใช้ผลิตชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อมาลาเรียต่อไป

การหาความหลากหลายของความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อมาลาเรียใช้วิธีของ Tranpradit และคณะ[17] โดยทดสอบโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์กับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียที่เก็บมาจากภาคต่าง ๆ ของประเทศ จำนวน 120 ตัวอย่างด้วยวิธี IFA โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่มีความหลากหลายของความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ จะต้องให้ผลบวกต่อตัวอย่างเลือดผู้ป่วยมาลาเรียเหล่านี้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 90

ผลการศึกษา

จากการเลี้ยงและเตรียมเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ K1 เชื้อมาลาเรียถูก synchronise 2 ครั้งด้วย 5% D-sorbitol โดยใช้เวลาห่างกันครั้งละ 30 ชั่วโมง หลังการ synchronize ครั้งที่ 2 เมื่อทำ enrichment เฉพาะส่วนของระยะ schizont ได้ค่า recovery rate เท่ากับร้อยละ 69.53 และได้จำนวนเชื้อรวมทั้งสิ้น 3.7 X 10^{10} เซลล์ เมื่อนำเชื้อมาสกัด pLDH โดยผ่าน HiTrapTM blue HP column ตรวจวิเคราะห์ native pLDH โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมสี Commassie brilliant blue, native pLDH แสดงน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa วัดค่า pLDH activity ได้ค่า Total activity เท่ากับ 11.1 μmole/นาที/มล. และ % yield เท่ากับร้อยละ 0.001 ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 2.69 ไมโครกรัม/มล. จำนวน 2 มล. สำหรับ recombinant pLDH (Rec pLDH) 2 ชนิด ที่ได้รับจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE pLDH แสดงน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60 kDa สำหรับ pLDH-GST และ 33.5 kDa สำหรับ pLDH-His ตามลำดับ และให้ค่า Total activity 40.8 μmole/นาที/มล. % yield เท่ากับร้อยละ 3.6 และ 86.6 μmole/นาที/มล. % yield เท่ากับร้อยละ 10.5 ตามลำดับ โปรตีนสังเคราะห์ทั้ง 2 ชนิด ได้โปรตีนเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มล.เท่ากัน

การผลิต hybridoma clones ต่อ pLDH ในหนู 3 กลุ่ม immunize ด้วยโปรตีนธรรมชาติ pLDH และโปรตีนสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ pLDH-GST และ pLDH-His หลังจาก fusion เมื่อได้โคลนแล้วพบว่ากลุ่มที่ 1 เกิด hybridoma clones ที่ผลิตแอนติบอดีย์ต่อ pLDH รวม 6 โคลน จากการตรวจคัดกรองโดยวิธี ELISA และ Dot-ELISA เมื่อตรวจซ้ำทุก 3 เดือน มีเพียง 1 โคลนที่ให้ผลแรงและคงทน ทุกโคลนเป็น IgM class กลุ่มที่ 2 เมื่อทำ fusion 2 ครั้ง ได้ hybridoma clones รวม 79 โคลน มี 15 โคลนที่ให้ผลแรงและคงทน ทุกโคลนเป็น IgM class เช่นเดียวกัน คัดเลือก hybridboma clones จำนวน 3 โคลนที่ให้ผลแรงและคงทนมาทำโคลนนิ่งครั้งที่ 1 ได้ hybridoma clones รวม 27 โคลน มี 13 โคลนที่ให้ผลคงทน ทุกโคลนเป็น IgM class จากนั้นเลือก hybridoma clone ที่ให้ผลแรงและคงทน จำนวน 3 โคลน มาโคลนนิ่งครั้งที่ 3 ได้ hybridoma clones รวม 15 โคลน พบมี 7 โคลนที่ให้ผลคงทน โดยทุกโคลนเป็น IgM class เช่นเดียวกัน การที่มีแต่ hybridoma clone ที่ผลิตแอนติบอดีย์ชนิด IgM class ทำให้ยากต่อการติดฉลากด้วยสี colloidal gold ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยน immunoglobulin class จาก IgM เป็น IgG ด้วยวิธีของ Faquet[18] โดยเลือก hybridoma clone ที่ผลิตโดยใช้โปรตีนสังเคราะห์ pLDH-GST หลังทำโคลนนิ่งครั้งที่ 2 จำนวน 7 โคลนมาเปลี่ยน Ig class โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ใช้ goat anti-mouse IgM antibody (Sigma) เจือจาง 1 ต่อ 4,000 ทำปฏิกิริยากับโคลนความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/100 เซลล์ของโคลน จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วย rabbit complement (Sigma) ที่เจือจาง 1:2,000 ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร/ 100 เซลล์ของโคลน ทำให้เซลล์แตก 2-3 รอบ จะพบมีเซลล์ลูกผสมบางเซลล์ถูกทำลายไป เซลล์ที่รอด immuglobulin class บนผิวเซลล์จะถูกเปลี่ยนจาก IgM เป็น IgG ผลการทดลองพบว่ามีเพียง 1 โคลนจาก 7 โคลนที่ประสบผลสำเร็จสามารถเปลี่ยน Ig class จาก IgM เป็น IgG คือ โคลน 5D6-B6-H6 โดยถูกเปลี่ยนเป็น IgG1 จากนั้นเลี้ยงขยายเซลล์และตรวจคัดกรองให้ได้โคลนที่แข็งแรงและคงทน จำนวน 5 โคลน ตั้งชื่อโคลนใหม่เพื่อป้องกันความสับสนกับกลุ่มโคลนที่ผลิตจากโปรตีนอื่น ได้โคลนแม่ที่แข็งแรงและคงทน 2 โคลน คือ 3D7-H2-B2 และ 3D7-D8-A7 เมื่อทดสอบความจำเพาะโดยวิธี IFA โคลน 3D7-H2-B2 แสดงความจำเพาะต่อเชื้อ *P. falciparum* (Pf) ส่วนโคลน 3D7-D8-A7 แสดงความจำเพาะต่อทั้งเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* (Pan Pf. Pv.)

นำโคลนมาโคลนนิ่งอีก 2 ครั้ง ได้โคลนรวมทั้งสิ้น 33 โคลน แต่มีความคงทนเพียง 14 โคลน จากการศึกษาความจำเพาะของโคลนที่ได้รับมา 33 โคลน มีความจำเพาะต่อเชื้อฟัลซิปารั่ม (Pf.) 16 โคลน จำเพาะต่อฟัลซิปารั่มและไวแวกซ์ (Pan Pf. Pv.) 11 โคลน และจำเพาะต่อไวแวกซ์ (Pv.) 6 โคลนเมื่อทดสอบความจำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อมาลาเรีย (genetic diversity) ด้วยวิธี IFA ต่อตัวอย่างเชื้อมาลาเรียจาก 4 ภาคของประเทศไทย จำนวน 120 ตัวอย่าง

เป็นเชื้อฟัลซิปารัมและไวแวกซ์จำนวน 80 และ 40 ตัวอย่าง ตามลำดับ สุ่มเลือกโคลนที่แข็งแรงและคงทนต่อเชื้อฟัลซิปารัม 2 clones และต่อ Pan Pf. Pv. 2 โคลน (ร้อยละ 10 ของโคลนทั้งหมด) พบว่าทั้ง 4 โคลน ให้ผลบวกต่อตัวอย่างเลือดมากกว่าร้อยละ 90

การทดลองในกลุ่มที่ 3 ใช้โปรตีนสังเคราะห์ pLDH-His หลังจาก fusion ได้โคลนลูกผสมรวม 23 โคลน เป็นโคลนที่แข็งแรงและคงทน 7 โคลน เลือกโคลนแม่หนึ่งโคลน คือ 9C4 มาโคลนนิ่ง 4 ครั้ง ได้โคลนรวม 81 โคลน เป็นโคลนที่แข็งแรงและคงทน 56 โคลน จากการทดสอบโดย IFA ได้โคลนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อฟัลซิปารัม 41 โคลน ต่อ Pan Pf. Pv. 22 โคลน และต่อเชื้อไวแวกซ์ 8 โคลน สุ่มเลือกโคลนที่แข็งแรงและคงทนต่อเชื้อฟัลซิปารัม 4 โคลน และต่อ Pan Pf. Pv. 4 โคลน (ร้อยละ 10 จากโคลนทั้งหมด) พบว่าทั้ง 8 โคลน ให้ผลบวกต่อตัวอย่างเลือดมากกว่าร้อยละ 90

เมื่อรวมโคลนทั้งหมดที่เป็น IgG class และที่ได้โคลนนิ่งมากกว่า 3 ครั้งขึ้นไปทั้ง 3 กลุ่ม รวม 76 โคลน นำมาหาความจำเพาะโดยวิธี IFA พบว่าสามารถแยกความจำเพาะออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งแสดงความจำเพาะระดับสูงต่อเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนและระยะโทรโฟซอยต์มี 15 โคลน กลุ่มที่สองแสดงความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียระยะวงแหวนและโทรโฟซอยต์ระดับปานกลาง มี 27 โคลน กลุ่มที่สามแสดงความจำเพาะระดับสูงต่อเชื้อมาลาเรียระยะไซซอนต์มี 23 โคลน และกลุ่มที่สี่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียระยะไซซอนต์ระดับปานกลาง มี 11 โคลน

จากนั้นเลือกโคลนที่แข็งแรงและคงทนจำนวน 8 โคลน ประกอบด้วยกลุ่มโคลนที่ได้จากการฉีดโปรตีนสังเคราะห์ pLDH-GST และเปลี่ยน Ig class จาก IgM เป็น IgG แล้ว จำนวน 4 โคลน มีความจำเพาะต่อเชื้อ Pf. 2 โคลน และต่อ Pan Pf. Pv. 2 โคลนตามลำดับ โคลนส่วนใหญ่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อระยะวงแหวนและระยะโทรโฟซอยต์ระดับสูง โคลนที่ได้จากการฉีดโปรตีนสังเคราะห์ pLDH-His จำนวน 4 โคลนมีความจำเพาะต่อเชื้อ Pf. 2 โคลน และต่อ Pan Pf. Pv.2 โคลนตามลำดับ โคลนส่วนใหญ่แสดงความจำเพาะต่อเชื้อระยะไซซอนต์ระดับสูง โคลนทั้ง 8 โคลนนี้เมื่อหาความไวในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุดโดยวิธี ELISA พบว่าโดยเฉลี่ยโคลนทั้งหมดสามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำสุด 312 ตัว/ไมโครลิตร โคลนทั้ง 8 โคลนนี้เมื่อตรวจยืนยันความจำเพาะต่อชนิดเชื้อมาลาเรียอีกครั้งโดยวิธี Western blot พบว่าให้ผลสอดคล้องกับวิธี IFA เป็นอย่างดี

วิจารณ์ผล

การวิจัยเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อโปรตีน pLDH ได้ใช้โปรตีนจาก 2 แหล่ง คือ โปรตีนธรรมชาติและโปรตีนสังเคราะห์ จุดมุ่งหมายของการวิจัยครั้งนี้เพื่อค้นหาและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมและต่อเชื้อมาลาเรียสปีชี่ย์อื่น ๆ (Pan malaria species) ผลการวิจัยพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่ใช้โปรตีนธรรมชาติเป็นแอนติเจนได้ผลผลิตค่อนข้างน้อยและเป็น IgM class ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่ใช้โปรตีนสังเคราะห์เป็นแอนติเจนได้ผลผลิตมากกว่าถึง 3 เท่า แต่โปรตีนที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ใช้โปรตีน pLDH ที่ติดฉลากกับ GST ให้ผลผลิตของโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์เป็น IgM class เช่นกัน ยกเว้นกลุ่มที่ใช้โปรตีน pLDH–His ที่ให้ผลเป็น IgG1 ทั้งหมด ความแตกต่างกันในลักษณะเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากลักษณะของแอนติเจนที่กระตุ้นให้ plasma cell ผลิต Ig class ที่แตกต่างกัน การวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จสามารถเปลี่ยน Ig class จาก IgM เป็น IgG ทำให้สามารถนำไปติดฉลากกับ colloidal gold ได้

หลังจากเลือกโคลนที่มี avidity และ affinity สูงมาทำ cloning อีก 3-4 รอบ โคลนส่วนใหญ่มาจากกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เมื่อทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ นอกจากได้โคลนที่จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารัมและชนิดอื่น (Pan malaria species) จำนวนหนึ่งแล้ว บางโคลนยังแสดงถึงความสามารถในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่ำกว่า 400 ตัว/ไมโครลิตร และบางโคลนสามารถย้อมติดสี Shuffner's dot ของเชื้อชนิดไวแวกซ์ได้อย่างชัดเจน

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อ pLDH ที่ผลิตได้แตกต่างจากที่ผลิตได้โดยวิธีของ Piper[6] ในส่วนความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อมาลาเรียที่นำมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย[6] และดื้อต่อยาต้านมาลาเรียหลายชนิดนอกเหนือไปจากขั้นตอนและวิธีการที่แตกต่างกันในรายละเอียดแล้ว จากการทดสอบหาความไวพบว่าปริมาณเชื้อมาลาเรีย 50-500 ตัว/ไมโครลิตรมีความไวใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 70)[6] คุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่ได้บางตัวมีลักษณะจำเพาะ เช่น มีความจำเพาะต่อ Shuffner's dot ของเชื้อมาลาเรียชนิดไวแวกซ์ และที่สำคัญที่สุดคือเป็นผลิตผลที่เกิดขึ้นภายในประเทศ สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ ลดการสูญเสียเงินตราซื้อผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศมาใช้ การวิจัยครั้งนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ที่ดีต่อเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิปารั่มและ Pan malaria spp. สามารถนำไปผลิตชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันคีนันแห่งเอเชียที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. วรชาติ สิรวรานรณ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และรองศาสตราจารย์ ดร. มยุนา ศรีสุภนันท์ ภาควิชาสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณที่ปรึกษาจากต่างประเทศ คือ Professor Dr. John E. Hyde จาก Department of Biomolecular Sciences, University of Manchester Institute of Science and Technology, Manchester, England, Professor Dr. Kelvin C. Kain จาก Division of Infectious Diseases, University of Toronto, Canada และ Professor Dr. Vergilio E do Rosario จาก Institute de Higiene e Medicina Tropica, Universidae Nova De Lisboa

เอกสารอ้างอิง

1. กองมาลาเรีย. กรมควบคุมโรคติดต่อ. รายงานประจำปี พ.ศ. 2546. น. 11-27.
2. World Health Organization. The revised malaria control strategy for Southeast Asia Region: Draft, Roll Back Malaria; 2006. pp. 3-25.
3. Vander JDL, Hunsaker LA, Campos NM, Baack BR. D- lactate production in erythrocyts infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 42: 277-84.
4. Makler MT, Ries JM, Williams JA, *et al*. Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 48: 739-41.
5. Makler MT, Hinrichs DJ. Measurement of lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 205-10.
6. Piper R, Lebras J, Wentworth L, *et al*. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 109-18.
7. Thaithong S, Suebinwong T, Beale GH. Enzyme typing of some isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981; 75: 268-70.
8. Goding JW. Antibody production by hybridroma. J Immunol Method 1980; 39: 285.
9. Harlow E, Lane D. Antibodies, a laboratory manual 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, 139-243.
10. Trager W and Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193: 673-5.

11. Lambros C and Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erytrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979; 65: 418-20.
12. Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Aley SB, Cabantchik ZI. Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum* : association with parasite development. *J Cell Physiol* 1985; 125: 521-7.
13. Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurment of the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
14. Tharavanij S, Tanpradist S, Chongsa-Nguan M, Prasertsiriroj V. Comparison of various serological test results using antigens from different strains of *Plasmodium falciparum*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1982; 13: 174-80.
15. พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ, คนึงนิจ คงพ่วง, ชัยพร โรจนวัฒน์ศิริเวช และคณะ การพัฒนาชุดตรวจ Dot–ELISA ในการทำ Sero-epidemiology เพื่อใช้เป็นระบบเตือนภัยการแพร่ระบาดของไข้มาลาเรียในประเทศไทย. เอกสารการสัมมนาทางวิชาการป้องกันควบคุมโรคแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549 ระหว่างวันที่ 21-23 มิถุนายน 2549 ณ โรงแรมปรินซ์พาเลส มหานาค กรุงเทพมหานคร, หน้า 147-8.
16. ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช. โมโนโคลนอลแอนติบอดีย์ต่อหมู่โลหิต. ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย 2541. หน้า 48–51.
17. Tanpradist S, Tharavanij S, Yamogkul P, Bualombai P, Wongchotigul V, Singhasivanon P. Comparison between microscopic examination, ELISA and quantitative buffy coat (QBC) analysis in the diagnosis of falciparum malaria in an endemic population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990; 21: 534-40.
18. Faquet GB, Agee JF. A simple technique for the rapid enrichment of class and subclass hybridoma switch variants. *J Immunol Meth* 1993; 165: 217-24.