



28 MAR 1989

**DOT-IMMUNOBINDING ASSAY FOR MONOCLONAL
ANTI-A AND ANTI-B**

WITON ARUNOSISAKUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIRMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)**

อภินิพนธ์การ

จาก

ภาควิชาโลหวิทยา ม.มหิดล

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1989**

13970

- ชื่อวิทยานิพนธ์ : การตรวจหาโมโนโคลนอล แอนติ-เอ และแอนติ-บี โดยวิธี ดอต-อิม มูโนบายติง
- ผู้วิจัย : วิทยุ อรุโณศรีสกุล
- ปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พยาธิวิทยาคลินิก)
- คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : นิมล เชี่ยวศิลป์ พ.บ.
เบญจ เพชรคล้าย พ.บ.
นิมลพรรณ รัตนศิริวานิช ภ.บ., วท.ม.
- วันสำเร็จการศึกษา : 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2532

บทคัดย่อ

น้ำยาแอนติ-เอ และแอนติ-บี ที่ใช้ในการตรวจหมู่เลือดเอบีโอ นั้น แหล่งใหญ่ได้มาจากพลาสมาของคน แต่มีคนจำนวนน้อยที่มีพลาสมาเหมาะสมที่จะนำมาเตรียมเป็นน้ำยามาตรฐาน และน้ำยาที่ผลิตขึ้นในแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่คงที่ จึงมีการพยายามหาแหล่งผลิตจากสารอื่น เช่น เมล็ดพืชเลคติน และสารสกัดจากต่อมอัลบูมินของหอย แต่น้ำยาจากแหล่งผลิตเหล่านี้ยังมีคุณสมบัติไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ต่อมาได้มีการผลิตโมโนโคลนอล แอนติ-เอ และแอนติ-บี ขึ้นมา ซึ่งให้ปฏิกิริยาที่มีความแรงและมีความจำเพาะเจาะจงดี นอกจากนี้ยังผลิตได้เป็นปริมาณมาก ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีขั้นนี้ขั้นตอน screening assay ซึ่งเป็นการเลือกกลุ่มเซลล์ที่เกิดจากเซลล์ ๆ เดียว (clone) ที่ผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ต้องการ ในขั้นตอนนี้ถ้าได้วิธีที่มีความไว จะทำให้ลดขั้นตอนและเวลาของการผลิต ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประยุกต์วิธี avidin-biotin DIA มาใช้ในขั้นตอน screening assay โดยใช้ส่วนของผิวเม็ดเลือดแดงที่นำเอาฮีโมโกลบินและสารภายในเซลล์ออกแล้วนำมาเคลือบติดอยู่กับแผ่นกระดาษกรองไนโตรเซลลูโลส ในลักษณะเป็นจุดบนกระดาษกรอง จากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีหรือสารละลายจาก hybridoma เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างและเติม anti-IgM ที่ติดสลาบ biotin ให้ทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง ล้างและเติม avidin-peroxidase ให้ทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างและเติม 4-chloro-1-naphthol ทิ้งไว้ 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างและนำไปอบให้แห้งแล้วอ่านผลด้วยตาเปล่า จากการเปรียบเทียบระหว่างวิธี avidin-biotin DIA กับวิธี haemagglutination ในการตรวจแอนติบอดี IgM พบว่าวิธี avidin-biotin DIA ให้ผลที่ไวกว่าประมาณ 16-32 เท่า ดังนั้นวิธีนี้จึงมีประโยชน์ที่จะนำไปใช้ในการ screening assay

Thesis Title : Dot-immunobinding assay for monoclonal anti-A
and anti-B

Name : Witoon Arunosisakul

Degree : Master of science (Clinical Pathology)

Thesis Supervisor Committee : Pimol Chiewsilp, M.D.
Bencha Petchclai, M.D.
Pimolparn Ratanasirivanich, B.Sc.(Pharm)
M.Sc.

Date of Graduation : 31 May B.E.2532 (1989)

Abstract

In ABO blood grouping, the main source of anti-A and anti-B reagents are human sera. There are few people whose sera are suitable for standard reagent and the quality of plasma derived reagents are varied from lot to lot. These lead to the attempts to find the other sources, e.g. lectin, albumin gland extract of snail but there are some limitation of their application in routine laboratories. Until recently monoclonal anti-A and anti-B have been produced to obtain the high quality reagents in term of potency and specificity as well as large quantities. Screening assay is one of the most important part of monoclonal antibody production. If the technique used for screening assay is sensitive, certain steps of procedure can be reduced, such as rapid detection of cell line to reduce time consuming and labour-intensive of production. The objective of the study was applied avidin-biotin DIA to the sensitive technique for screening assay. Red cell ghost dotted onto nitrocellulose filter disc as solid phase was incubated

with antibody or hybridoma supernates for 3 hours and washed. Anti-mouse IgM conjugated to biotin was added, incubated for 1 hour and washed. Then avidin-peroxidase was added, incubated for 1 hour and washed. Enzyme substrate, 4-choro-1-napthol was added and left for 15 minutes. The enzyme reaction was stopped with washing and the disc was dried for reading by naked eye. For comparison of IgM antibody detection, avidin-biotin DIA technique was more sensitive about 16-32 times than haemagglutination technique and it was useful for screening hybridoma producing antibody.