การพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวเพื่อใช้สำหรับการโคลนและคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมา

Development of Semi-Solid Media for Cloning and Screening of Hybridoma Cell Line

จิตกร ทองนันท์ และ มณฑล เลิศวรปรีชา*

Jittakorn Thongnan and Monthon Lertworapreecha*

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขต พัทลุง

Microbiology Program, Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung

Received : 29 April 2019

Revised : 14 August 2019

Accepted : 14 November 2019

บทคัดย่อ

เทคนิคการสร้างเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (hybridoma technology) เป็นกระบวนการสำคัญสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมาทำได้โดยวิธีการ limiting dilution แต่วิธีการ limiting dilution มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น กระบวนการที่ยุ่งยาก และต้องการบุคลากรที่มีความชำนาญสูง ในปัจจุบันมีวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็วกว่าการทำ limiting dilution คือ วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวโดยสารเมทิลเซลลูโลส (methylcellulose) ที่จำหน่ายมีราคาที่ค่อนข้างสูง นอกจากนี้การทดลองพบว่าการใช้เมทิลเซลลูโลสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ (3D) ได้ แสดงให้เห็นว่าต้องมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่จำเป็นและไม่ได้เปิดเผย ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวโดยอาศัยเมทิลเซลลูโลส, คอลลาเจน ชนิด I และเจลาติน ที่เหมาะสมสำหรับช่วยในการเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ ของเซลล์ไฮบริโดมา สูตรที่ดีที่สุดของอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ช่วยให้เซลล์สามารถเจริญและรวมกลุ่มเป็นโคโลนี 3 มิติ คือ อาหารที่ประกอบด้วย 1.5% เมทิลเซลลูโลส, 0.25% เจลาติน และ 1% คอลลาเจน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม 10% fetal bovine serum

คำสำคัญ : การเลี้ยงเซลล์ในระบบ 3 มิติ, อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว, เซลล์ไฮบริโดมา

*Corresponding author. E-mail : worapreecha@gmaill.com

Abstract

Establishment of the hybridoma cell line is an important step for monoclonal antibody production. The screenings of a candidate hybridoma cell clone by limiting dilution is a laborious method and require highly skilled personnel. Currently, a method of easier, faster and more convenient than limiting dilution is cultured in semi-solid culture media was developed. Although, the methylcellulose based semi-solid media kit have available, the culture media kit is very expensive. Moreover, we found that using media based methylcellulose alone unable to generate a 3D colony of the hybridoma cell suggests that there must be other substances in media that are not disclose. In this study, we aimed to develop in-house semi-solid based methylcellulose for generating of 3D colony of the hybridoma cell. The various viscosity substances such as cellulose, methylcellulose, type I collagen and gelatin is used to determine the optimal combination and proportion for semi-solid media to generate 3D colony of the hybridoma cell. The best recipe of the semi-solid media that allow hybridoma cell survival, proliferate and form 3D colonies that remain physically separated from other colonies was 1.5 % methylcellulose, 0.25%gelatin, 1% collagen, in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum.

Keywords: 3D cell culture, semi-solid medium, hybridoma cell line

บทนำ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) เป็นแอนติบอดีที่สร้างจาก B-cell clone ที่จำเพาะต่อ single epitope เพียงชนิดเดียว ทำให้ทุกโมเลกุลมีคุณสมบัติเหมือนกัน และมีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูง (Brezski *et al*., 2014) หลักการสำคัญในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ การสร้างเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งเกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์พลาสมาและเซลล์มัยอิโลมา (Laurino *et al*.,1999; Lipman *et al*.,2005; Mechetner, 2007) จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในอาหาร HAT medium (Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine medium) นำเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงได้มาคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการด้วยวิธี ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) หรือการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunoassay) รูปแบบต่าง ๆ เช่น dot-blotting, western blotting, immunohistochemistry ตามแต่ความเหมาะสม (Kusnezow *et al*., 2002) โดยเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้สามารถเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไปได้ไม่จำกัด วิธีการอีกวิธีหนึ่งในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นจำนวนมาก คือ เลี้ยงใน bioreactor ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ standard static หรือ agitated suspension cell cultures, membrane-based หรือ matrix-based culture systems และ high cell-density bioreactors (Birch *et al*.,2006; Kelley *et al*., 2007) แต่ข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้ คือ เป็นเทคโนโลยีที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง รวมทั้งอาหารและสารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์มีราคาสูงเช่นกัน

ในอดีตหลังจากกระบวนการหลอมรวมระหว่างสปีนโนไซต์ (spenocytes) กับเซลล์มัยอิโลมา กระบวนการคัดเลือกไฮบริโดมาสามารถทำโดยการเจือจางเซลล์ (limiting dilution) ใน 96 well plate เพื่อแยกเซลล์ให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ จากนั้นคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ต้องการ แต่การเจือจางเซลล์มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ คือ ใน 1 well plate อาจไม่ได้มาจาก 1 เซลล์ รวมถึงมีกระบวนการทำที่ยุ่งยาก และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็วกว่าการทำ limiting dilution คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Li *et al*., 2018) การใช้อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เช่น เพื่อเลี้ยงเซลล์ Mesenchymal stem cells (MSCs) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิด

เปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสามารถเจริญเป็นโคโลนี ซึ่งทำให้ง่ายต่อการคัดเลือก และคุณสมบัติในการสร้างโปรตีนไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เลี้ยงในระบบอาหารเหลวปกติ (Gu *et al*., 2016) การวิจัยศึกษาคุณสมบัติและการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell) ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยเปรียบเทียบการสร้างโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว กับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว พบว่าคุณสมบัติต่าง ๆ ของ อาหารทั้งสองรูปแบบ ให้ผลไม่ต่างกัน แต่การเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ง่ายต่อการศึกษาลักษณะ รูปร่างและการเจริญของเซลล์ (Zhu *et al*., 2018) ปัจจุบันอาหารสำเร็จรูปกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับการเลี้ยงเซลล์มีจำหน่ายจำนวนมาก รวมทั้งอาหารสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และการคัดเลือกโคลน ซึ่งอาหารดังกล่าวมีราคาที่สูงมาก โดยราคาอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลว 90 มิลลิลิตร ราคา 32,000 บาท และ 1 ชุดของอาหารเลี้ยงเซลล์ใช้ได้แค่ 1 ครั้ง งานวิจัยส่วนหนึ่งจึงให้ความสำคัญสำหรับการพัฒนาอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวเพื่อให้ต้นทุนต่ำลง การพัฒนาส่วนใหญ่ใช้เมทิลเซลลูโลส (methylcellulose; MC) เป็นพื้นฐานสำหรับการให้ความหนืด อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ MC เป็นส่วนประกอบเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจจะต้องมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้เปิดเผย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ใช้สำหรับการเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา โดยพยายามค้นหาองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จะช่วยให้การเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติของเซลล์ไฮบริโดมาเกิดขึ้นได้

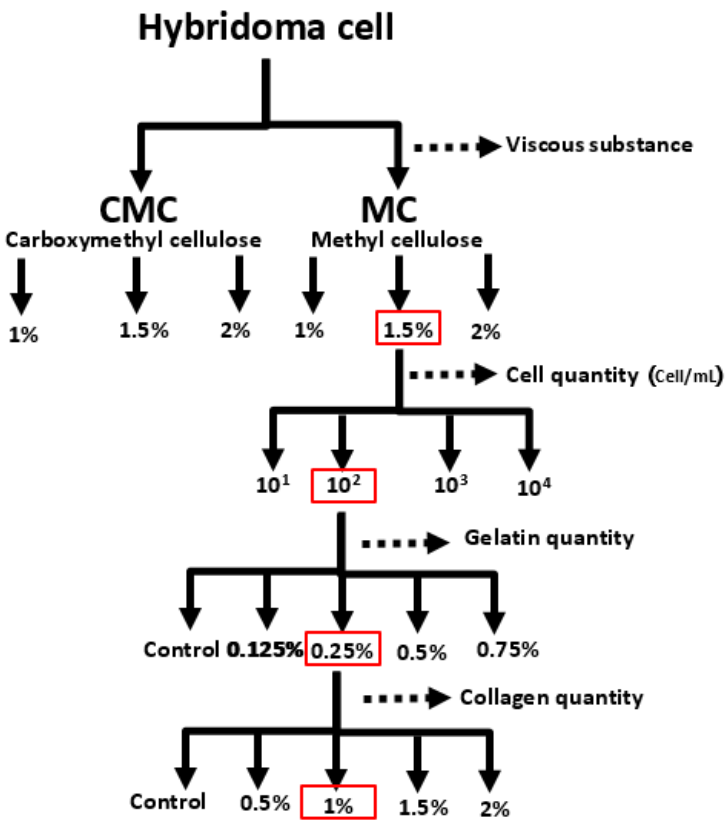
วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมาสำหรับการศึกษานี้ เตรียมขึ้นจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ การเตรียมและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลน ทำโดยใช้อาหารสำเร็จรูป ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (Canada) โดยเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาทดสอบเป็นโคลนซึ่งผ่านการตรวจสอบยืนยันว่าสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแฟลเจลลาแอนติเจนของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ด้วยเทคนิค Western blot (Lertworapreecha *et al*., 2019) แผนการดำเนินการศึกษาเพื่อหาสัดส่วนต่าง ๆ ของสารที่ให้ความหนืดเพื่อให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ แสดงดังภาพที่ 1

การเปรียบเทียบการเจริญเป็นโคโลนีในสารให้ความหนืดที่ต่างกัน

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (Gibco, USA) ซึ่งใช้เป็นอาหารพื้นฐานตลอดการศึกษานี้ ประกอบด้วย10% FBS, 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Bio basic inc, Canada), 100IU/100 µg/mL penicillin-streptomycin (Bio basic inc, Canada) แบ่งอาหาร DMEM เป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดแรกประกอบด้วย MC (methylcellulose) (Sigma, USA) 3 ความเข้มข้น คือ 1%, 1.5% และ 2% และชุดที่ 2 ประกอบด้วย carboxy-methylcellulose (CMC) (Himedia, India) 3 ความเข้มข้น คือ 1%, 1.5% และ 2% จากนั้นเติมเซลล์ไฮบริโดมา 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 10-15 วัน เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละชุดการทดลอง



ภาพที่ 1 แผนการดำเนินการศึกษาเพื่อหาสัดส่วนต่าง ๆ ของสารที่ให้ความหนืดเพื่อให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ

การศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับอาหารทดสอบ

นับเซลล์ด้วย hemocytometer เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM และแบ่งอาหารออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ควบคุมปริมาณของเซลล์ต่อจานอาหารเลี้ยงเซลล์ (45 ตารางมิลลิเมตร) เป็น 10^1, 10^2, 10^3 และ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่ม 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 10-15 วัน

ความเข้มข้นของเจลาตินและคอลลาเจน ที่มีผลต่อการเจริญเป็น 3 มิติ

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 4 ชุดการทดลอง โดยผสม 0.125%, 0.25%, 0.50% และ 0.75% เจลลาติน (food grade) ใน 1.5% MC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM จากนั้นเติมเซลล์ไฮบริโดมา 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 10-15 วัน

สำหรับคอลลาเจนทำการทดสอบโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 4 ชุดการทดลอง โดยผสม 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 1.75% คอลลาเจน (Himedia, India) ใน 0.25% เจลลาติน, 1.5% MC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยเติมเซลล์ไฮบริโดมา 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10-15 วัน

การเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป (ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (StemcellTM technologies, Canada))

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยผสม 0.25% เจลลาติน, 1% คอลลาเจน 1.5% MC, ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM จากนั้นเติมเซลล์ไฮบริโดมา 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10-15 วัน เปรียบเทียบการเจริญกับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (StemcellTM technologies, Canada) ใช้เซลล์ไฮบริโดมา 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 10-15 วัน

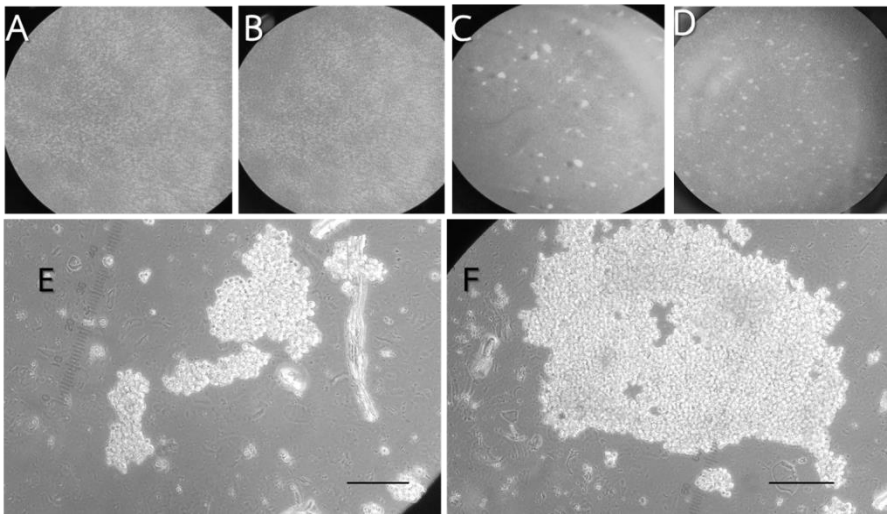
ผลการวิจัย

การเปรียบเทียบการเจริญเป็นโคโลนีในสารให้ความหนืดที่ต่างกัน

จากการทดลองพบว่าการผสมอาหารด้วย CMC ที่ระดับความเข้มข้น 1%, 1.5% และ 2% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่การใช้ MC ที่ระดับความเข้มข้น 1.5% กับ 2% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในอาหารที่มี 1.5 และ 2% MC จะเจริญเป็นโคโลนี แต่ก็พบว่าเซลล์เจริญอยู่เพียงในระนาบ 2 มิติ โดยโคโลนีแผ่ออกด้านข้างและมีขนาดใหญ่ แต่ไม่เจริญและเซลล์ไม่เกาะกลุ่มเป็นลักษณะทรงกลม แบบ 3 มิติ การเจริญเป็นโคโลนีเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ประกอบด้วย 1.5 % MC เซลล์ไฮบริโดมาสามารถเจริญเป็นโคโลนีที่ใหญ่กว่า มีขนาด 1.32 X 1.76 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 2% MC มีเซลล์บางส่วนในโคโลนีตายไป ทำให้มองเห็นลักษณะโคโลนีที่เล็ก มีขนาดประมาณ 0.66 X 0.80 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดลองของอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละสูตร

สูตรอาหารเลี้ยงเซลล์	ความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนี	ขนาดของเซลล์ (กว้าง x ยาว) มิลลิเมตร
1% CMC	ไม่พบโคโลนี	-
1.5% CMC	ไม่พบโคโลนี	-
2% CMC	ไม่พบโคโลนี	-
1% MC	ไม่พบโคโลนี	-
1.5% MC	เจริญเป็น 2 มิติ, โคโลนีใหญ่, ไม่กลม	1.32 X 1.76
2% MC	เจริญเป็น 2 มิติ, และโคโลนีเล็ก,ไม่กลม	0.66 X 0.80



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีในอาหารแต่ละชนิด A คือ เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสม CMC ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายต่ำ B, C และ D คือ เซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสม 1% , 1.5% และ 2% MC ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอกำลังขยายสูง E และ F คือ ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่ผสม 1.5% และ 2% MC ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (scale bars 100 μm)

การศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับอาหารทดสอบ

จากการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 45 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าเซลล์เริ่มต้นที่ปริมาณ 10^1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เกิดจำนวนโคโลนีน้อย โคโลนีมีขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ เมื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าจำนวนโคโลนีเพิ่มมากขึ้น และมากเกินไปจนไม่สามารถแยกโคโลนีได้ ซึ่งยากต่อการคัดแยกเป็นโคโลนีเดียว จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ขนาด 45 ตารางมิลลิเมตร คือ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบเซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 170 โคโลนี ซึ่งทำให้ได้จำนวนโคโลนีที่เหมาะสมสามารถคัดแยกได้ง่าย ไม่แน่นจนเกินไป (ตารางที่ 2)

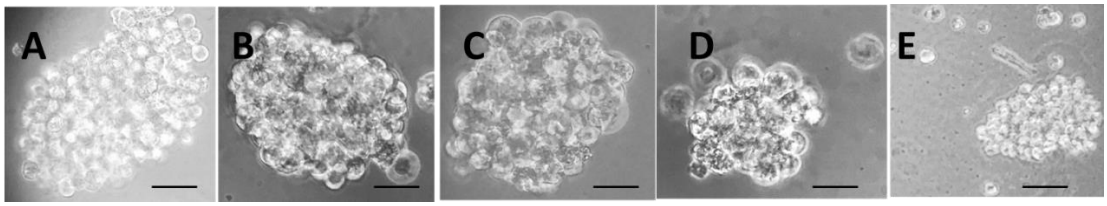
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเซลล์

จำนวนเซลล์เริ่มต้น (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	พบจำนวนโคโลนี			เฉลี่ย
	ชุดทดลองที่ 1	ชุดทดลองที่ 2	ชุดทดลองที่ 3	
10^1	18	23	27	23
10^2	156	182	171	170
10^3	> 300	> 300	> 300	-
10^4	ไม่สามารถนับได้	ไม่สามารถนับได้	ไม่สามารถนับได้	-

ความเข้มข้นของเจลาตินและคอลลาเจนที่มีผลต่อการเจริญเป็น 3 มิติ

การศึกษาความเข้มข้นของเจลาติน

เนื่องจากโคโลนีที่เกิดขึ้นเจริญเป็น 2 มิติ และไม่เป็นทรงกลม จึงใช้เจลลาตินเป็นตัวช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเป็น 3 มิติ โดยใช้ปริมาณของเจลลาติน 4 ความเข้มข้น คือ 0.125%, 0.25%, 0.50%, 0.75% พบว่าการใช้ 0.125% เจลลาติน ไม่เพียงพอที่ทำให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ และการใช้ 0.50% เจลลาตินขึ้นไปมีผลทำให้เซลล์ตาย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลลาติน ทำให้เซลล์สามารถเจริญเป็นทรงกลม 3 มิติ คือ 0.25% แต่โคโลนีจะมีขนาดเล็ก มีขนาดประมาณ 0.11 X 0.15 มิลลิเมตร มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 132 โคโลนี (ตารางที่ 3 และภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญเป็น 3 มิติในอาหารที่มีส่วนประกอบของเจลลาตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ A, B, C และ D คือ เซลล์ไฮบริโดมาในอาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.125%, 0.25% 0.50% และ 0.75% เจลลาติน ตามลำดับ E คือ ชุดควบคุมที่ไม่เติมเจลลาติน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (scale bars A-D: 50 μm, E: 100 μm)

ตารางที่ 3 แสดงผลการใช้เจลาตินเพื่อให้เซลล์เจริญเป็น 3 มิติ

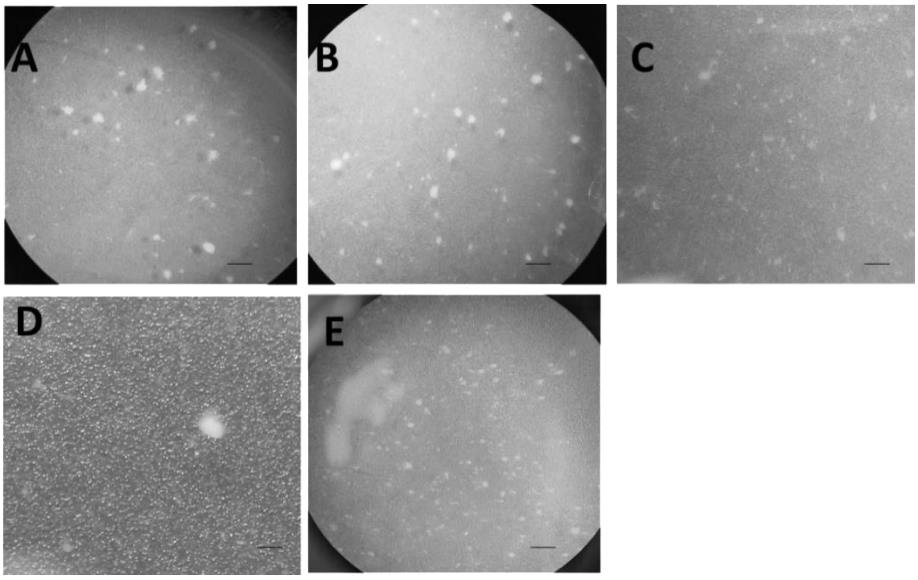
ความเข้มข้นของเจลาติน	จำนวนโคโลนี			จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	ขนาดโคโลนี (กว้าง X ยาว) มิลลิเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3		
ไม่เติมเจลาติน	133	126	139	133	0.71 X 0.94
0.125%	135	142	129	135	0.05 X 0.14
0.25%	126	132	138	132	0.11 X 0.15
0.50%	56	64	52	57	0.05 X 0.06
0.75%	16	22	19	19	0.02 X 0.02

การศึกษาความเข้มข้นของคอลลาเจน

จากการทดลองพบว่าการเติมคอลลาเจน สามารถช่วยกระตุ้นให้เซลล์เจริญดีขึ้น โดยทดลองใช้ปริมาณของคอลลาเจน 4 ความเข้มข้น คือ 0.5%, 1%, 1.5% และ 2 % พบว่าการใช้ 0.5% คอลลาเจน ไม่เพียงพอที่ทำให้เซลล์เจริญได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และการใช้ 1.5% คอลลาเจนขึ้นไป มีผลทำให้เซลล์เจริญได้ไม่ดีและเซลล์ตาย ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเจลลาตินทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ดี ได้โคโลนีใหญ่ ทรงกลมและเป็น 3 มิติ คือ 1% คอลลาเจน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 205 โคโลนี มีขนาดประมาณ 0.76 X 0.80 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงผลการใช้คอลลาเจนกระตุ้นการเจริญของเซลล์

ความเข้มข้นของคอลลาเจน	จำนวนโคโลนี			จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	ลักษณะโคโลนี	ขนาดของโคโลนี (กว้าง X ยาว) มิลลิเมตร
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3			
ไม่เติมคอลลาเจน	118	126	122	122	กลม ขนาดเล็ก	0.11 X 0.13
0.5%	166	156	169	164	กลม ขนาดกลาง	0.32 X 0.34
1%	211	205	198	205	กลม ขนาดใหญ่ เป็น 3 มิติ	0.76 X 0.80
1.5%	130	121	129	127	กลม ขนาดกลาง มีเซลล์ตาย	0.38 X 0.41
2%	86	70	77	78	กลม ขนาดเล็ก มีเซลล์ตายจำนวนมาก	0.15 X 0.16



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะเซลล์ไฮบริโดมาที่เจริญในสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของคอลลาเจน ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ A, B, C และ D คือ สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.5%, 1%, 1.5% และ 2% คอลลาเจน ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ส่วน E คือ สูตรอาหารชุดควบคุมที่ไม่มีส่วนประกอบของคอลลาเจน (scale bars 1mm)

<u>การเปรียบเทียบสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนากับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป (ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (StemcellTM technologies, Canada))</u>

สูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนา ควบคุมปริมาณของเซลล์ที่ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 14 วัน มีจำนวนเซลล์เฉลี่ย 197 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเซลล์ 45 ตารางมิลลิเมตร เซลล์มีขนาดประมาณ 0.62 X 0.70 มิลลิเมตร และอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปควบคุมปริมาณของเซลล์ที่ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C ในตู้บ่ม

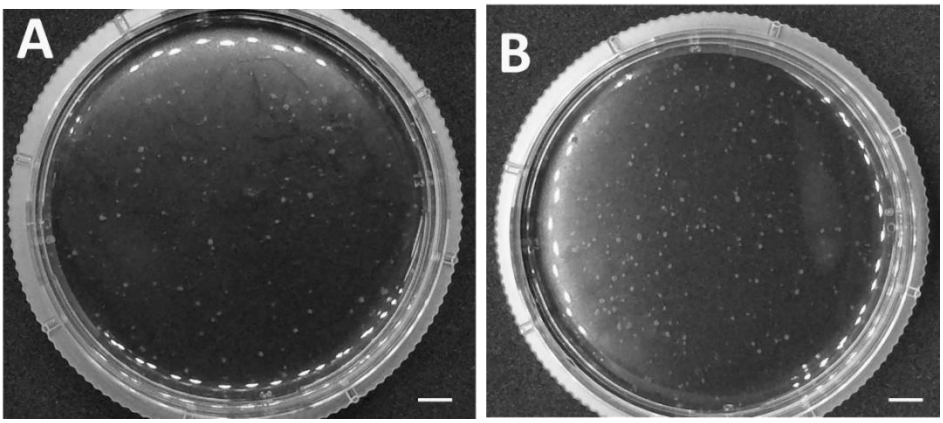
เลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 14 วัน พบ จำนวนเซลล์เฉลี่ย 206 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเซลล์ 45 ตารางมิลลิเมตร เซลล์มีขนาดประมาณ 0.81 X 0.88 มิลลิเมตร จากการทดลองพบว่า สูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนากับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 5 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนากับอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป

ชุดทดลอง	จำนวนโคโลนี			จำนวนโคโลนีเฉลี่ย	ขนาดโคโลนี
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3		(กว้าง X ยาว) มิลลิเมตร
A	187	208	197	197	0.62 X 0.70
B	196	217	206	206	0.81 X 0.88

A: สูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนา

B: อาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป



ภาพที่ 5 แสดงเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนากับอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป ตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ A คือ ลักษณะของเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่เกิดจากการพัฒนา เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน และ B คือ ลักษณะของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูป เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (scale bars 1 mm)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การสร้างเซลล์ลูกผสมไฮบริมาเป็นกระบวนการสำคัญสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในอดีตการคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมาทำได้โดยวิธี limiting dilution แต่วิธี limiting dilution มีข้อจำกัดหลายประการ เช่นใน 1 หลุมของจานอาหาร 96 หลุม อาจไม่ได้มาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว อีกทั้งการเจือจางมีกระบวนการทำที่ยุ่งยาก และต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง (Mechetner, 2007; Brezski *et al*., 2014) ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการที่ง่าย สะดวก และรวดเร็วกว่าการทำ limiting dilution คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยมีการพัฒนาชุดอาหารสำเร็จรูปทางการค้าแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามชุดอาหารเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีราคาที่ค่อนข้างสูง อาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวปริมาตร 90 มิลลิลิตร

ราคา 32,000 บาท และ 1 ชุดสามารถใช้ได้แค่ 1 ครั้ง คุณสมบัติที่สำคัญของอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว คือ สามารถทำให้เซลล์เจริญเกาะกลุ่มเป็นโคโลนี ซึ่งแต่ละโคโลนีเจริญมาจากเซลล์เดี่ยว โคโลนีสามารถมองเห็น และคัดแยกได้ด้วยตาเปล่า ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะพัฒนาสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ใช้สำหรับงานโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยคุณสมบัติของอาหารที่พัฒนาขึ้นทำให้เซลล์สามารถเกิดขึ้นเป็นโคโลนี 3 มิติ ทำให้ง่ายต่อการคัดแยก (Liu *et al*., 2014; Gu *et al*., 2016; Zhu *et al*., 2018) มีประสิทธิภาพใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีจำหน่าย เพื่อช่วยลดงบประมาณการวิจัย เนื่องจากมีต้นทุนที่ถูกกว่าชุดอาหารสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาสำเร็จรูป โดยอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่ผ่านการพัฒนา ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ราคาประมาณ 3,000 บาท จากผลการทดลองในการเปรียบเทียบความสามารถของการเจริญเป็นโคโลนีในสารความหนืดและความเข้มข้นที่ต่างกัน พบว่าการใช้เมทิลเซลลูโลสในความเข้มข้นที่เหมาะสมทำให้เซลล์สามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่ได้เป็นลักษณะโคโลนีเป็น 2 มิติ ซึ่งข้อเสียของโคโลนีที่เป็น 2 มิติ คือ มีลักษณะแบน แผ่ขยายออกทางกว้าง หากมีโคโลนีที่อยู่ใกล้กันจะทำให้คัดแยกได้ยาก แสดงว่าการใช้เมทิลเซลลูโลสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็น 3 มิติ จำเป็นต้องมีองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ การเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ ช่วยให้ง่ายต่อการคัดแยก เนื่องจากเซลล์จะเป็นโคโลนีเดียว กระจายอยู่ในอาหาร ไม่แผ่กว้างติดโคโลนีอื่น ซึ่งการเติมเมทิลเซลลูโลสในความเข้มข้นที่เหมาะสมช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติเป็นเจล ยืดหยุ่น กึ่งแข็งกึ่งเหลว เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ใช้ระยะเวลาที่นานจำเป็นต้องเติม mercaptoethanol เพื่อช่วยลดสารพิษจากเซลล์ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Liu *et al*., 2014) การใช้เจลาตินเป็นสารลดแรงตึงผิวช่วยให้อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวมีคุณสมบัติหนืดขึ้น ทำให้เซลล์เป็นทรงกลม 3 มิติ แบ่งตัวทุกระนาบ แต่จะได้โคโลนีที่ค่อนข้างเล็ก การเติมเจลาตินในความเข้มข้นที่มากเกินไปทำให้อาหารหนืดมากเกินไป ส่งผลให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีได้ยาก ส่วนการเติมคอลลาเจนที่มีคุณสมบัติเป็น extracellular matrix ซึ่งช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (Kubow *et al*., 2015) ทำให้เซลล์เจริญ มีลักษณะเป็นโคโลนีที่ใหญ่ สมบูรณ์ และสามารถมองเห็นได้ชัด และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนาขึ้น เช่น ความสามารถในการเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ การกระจายตัวของเซลล์ และขนาดของโคโลนี พบว่า มีคุณสมบัติและประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งแหลวสำเร็จรูปที่มีจำหน่าย แต่อาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนาขึ้นจะมีต้นทุนที่ต่ำกว่า ซึ่งในระยะยาวจะเป็นการช่วยลดงบประมาณการวิจัย รวมทั้งลดขั้นตอน ทำให้ง่าย สะดวก และรวดเร็วขึ้นในการทำวิจัยทางด้านการเลี้ยงเซลล์ และผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยการใช้สารให้ความหนืด และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พบว่า ความเข้มข้นของเมทิลเซลลูโลสที่ 1.5% และ 2% สามารถทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนีได้ แต่ลักษณะการเจริญของโคโลนีเป็น 2 มิติ หากมีโคโลนีที่เจริญใกล้กันส่งผลให้การคัดแยกเซลล์ไฮบริโดมายากยิ่งขึ้น การใช้เมทิลเซลลูโลสที่ 2% ลักษณะของอาหารจะมีความหนืดมากเกินไปส่งผลให้มีเซลล์บางส่วนตาย ทำให้ได้โคโลนีเล็ก ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เมทิลเซลลูโลสที่ความเข้มข้น 1.5% เป็นสารให้ความหนืด จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 10^2 เซลล์ต่อ 45 ตารางมิลลิเมตรของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ การใช้เจลาตินเป็นสารลดแรงตึงผิว พบว่าเจลาตินที่ความเข้มข้น 0.25% มีผลทำให้เซลล์ไฮบริโดมาเจริญเป็นโคโลนี 3 มิติ แต่โคโลนีของเซลล์จะมีขนาดเล็กสังเกตยาก สำหรับการเติมคอลลาเจน จะช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ พบว่าความเข้มข้นของคอลลาเจนที่เหมาะสม คือ 1% ส่งผลให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนีและมีขนาดใหญ่ และเป็น 3 มิติ ดังนั้นสูตรที่ดีที่สุดของอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลว

ที่พัฒนาขึ้นที่ช่วยให้เซลล์แพร่กระจาย และเจริญเป็น 3 มิติ คือ 1.5% เมธิลเซลลูโลส, 0.25% เจลาติน, 1% คอลลาเจน, 0.05 mM 2-mercaptoethanol ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม 10% FBS

จากการนำสูตรอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่พัฒนาขึ้น และใช้เซลล์ไฮบริโดมาที่ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์กึ่งแข็งกึ่งเหลวสำเร็จรูปที่มีจำหน่าย พบว่าอาหารทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Birch, J. R., Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *58*(5-6), 671-685.

Brezski, R. J., Kinder, M., Grugan, K. D., Soring, K. L., Carton, J., Greenplate, A. R., Jordan, R. E. (2014). A monoclonal antibody against hinge-cleaved IgG restores effector function to proteolytically-inactivated IgGs in vitro and in vivo. *Monoclonal Antibodies*, *6*(5), 1265-1273. doi:10.4161/mabs.29825

Gu, H., Ji, R., Zhang, X., Wang, M., Zhu, W., Qian, H., Xu, W. (2016). Exosomes derived from human mesenchymal stem cells promote gastric cancer cell growth and migration via the activation of the Akt pathway. *Molecular Medicine Reports*, *14*(4), 3452-3458. doi:10.3892/mmr.2016.5625

Kelley, B., (2007). Very large scale monoclonal antibody purification: the case for conventional unit operations. *Biotechnology Progress*. *23*(5), 995-1008.

Kubow, K. E., Vukmirovic, R., Zhe, L., Klotzsch, E., Smith, M. L., Gourdon,D., Vogel, V. (2015). Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. *Nature Communications*, *6*, 8026. doi :10.1038/ncomms9026

Kusnezow, W., Hoheisel, J. D., (2002). Antibody microarrays: promises and problems. *Bio Techniques*, Suppl *33*(6), S14-S23. doi.org/10.2144/dec02kusnezow

Laurino, J. P., Shi, Q., Ge, J., (1999). Monoclonal antibodies, antigens and molecular diagnostics: a practical overview. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, *29*(3), 158-166.

Lertworapreecha, M., Sudthimusic S., Tontikapong, K. (2019). Establishment of hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies against somatic (O) and flagella (H) antigens of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella weltevreden*. Research report. 42 p. Thaksin University. (in Thai).

Li, X., Bian, H., Yu, S., Xiao, W., Shen, J., Lan, C., Tang, Y. (2018). A rapid method for antigen-specific hybridoma clone Isolation. *Analytical Chemistry*, *90*(3), 2224-2229. doi:10.1021/acs.analchem.7b04595

Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F., (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, *46*(3), 258-268.

Liu, Y., Wang, Y., Liu, J., Zuo, W., Hao, L., Zhang, L., & Zhen, B. (2014). High throughput monoclonal antibody generation by immunizing multiple antigens. *Science China Life Sciences*, *57*(7), 710-717. doi:10.1007/s11427-014-4688-0

Mechetner, E. (2007) Development and characterization of mouse hybriodmas. In: Albitar M, (Ed.). *Monoclonal antibodies*: *methods and protocols*. (pp. 1-14). Totowa, N.J: Humana Press.

Zhu, Z. W., Chen, L., Liu, J. X., Huang, J. W., Wu, G., Zheng, Y. F., & Yao, K. T. (2018). A novel three-dimensional tumorsphere culture system for the efficient and low-cost enrichment of cancer stem cells with natural polymers. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(1), 85-92. doi:10.3892/etm.2017.5419