55361202 : MAJOR : PHARMACEUTICAL SCIENCES
KEYWORD : JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE / MONOCLONAL ANTIBODY / HYBRIDOMA

NUTTAPAT PISUTTINUSART : PRODUCTION AND PURIFICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE FROM HYBRIDOMA. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. WISIT TANGKEANGSIRISIN, PH.D. 82 pp.

Hybridoma cell is a hybrid cell, which is produced by fusion of an antibody producing cell with a tumor cell. It has been used to produce large quantity of monoclonal antibody that is specific to its antigen. Monoclonal antibody has been applied in many areas of biological, therapeutic and medical researches. Nowadays, several techniques for identification and quantification of biomolecules are based on immunoassay. Monoclonal antibody is often used for these purposes. The objective of this study is to produce, purify, characterize and conjugate a monoclonal antibody specific to Japanese Encephalitis (JE) vaccine from the hybridoma cultured medium. The growth and antibody production effect of Chemically Defined medium (CD medium) has been compared to RPMI supplemented with 5% serum medium (Serum containing medium). Serum medium gave a better antibody concentration than CD medium. Due to the disadvantages of serum medium, CD medium was used for large scale production. Monoclonal antibody was successfully produced by growing the hybridoma cells in CD medium and purified by protein G chromatography. SDS-PAGE was used to characterize molecular weight and purity of the purified antibody. The molecular weight of purified antibody was accurately compared to theory and the purity is about 98%. The *in vitro* binding analysis was characterized by dot blot and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) techniques. The results presented that purified antibody can bind to JE vaccine in both native and reduced forms but not denatured form. Afterwards, the purified antibody was conjugated to horseradish peroxidase enzyme. The effect of factors such as pH and molar ratio has been studied. High pH (pH 9.4) and molar ratio of enzyme to antibody (8:1) were the most optimal conditions. The efficiency of conjugated antibody were determined by direct ELISA. The conjugated antibody can detect the JE vaccine in a range of dilution 1:200 to 1:12800. In conclusion, native antibody and conjugated antibody was successfully prepared and could be potentially applied for quality control during the JE vaccine manufacturing processes.

Program of Pharmaceutical Sciences Graduate School, Silpakorn University
Student's signature.....Academic Year 2014
Thesis Advisor's signature .....

55361202 : สาขาวิชาวิทยาการทางเภสัชศาสตร์
คำสำคัญ : วัคซีนไข้สมองอักเสบเจอี/โมโนโคลนอลแอนติบอดี/ไฮบริโดมา

ณัฐพัฒน์ พิศูทธินุศาสตร์ : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อวัคซีนไข้สมองอักเสบเจอีจากไฮบริโดมาและการทำให้บริสุทธิ์. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ภก.ผศ.ดร.วิสิฐ ตั้งเคียงศิริสิน. 82 หน้า.

ไฮบริโดมาเซลล์เป็นเซลล์ที่เกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีและเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์ที่รวมกันนั้นจะมีความสามารถที่จะผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ถูกใช้อย่างกว้างขวางในงานวิจัยด้านชีววิทยา การรักษาโรคและการแพทย์ ในปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการตรวจและระบุสารชีวโมเลกุลอาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยา โมโนโคนอลแอนติบอดีถูกใช้อย่างแพร่หลาย ในงานวิจัยฉบับนี้ได้มีการผลิต, แยกบริสุทธิ์, วิเคราะห์คุณสมบัติและเชื่อมต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อวัคซีนไข้สมองอักเสบจากน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ในงานวิจัยได้มีการเปรียบเทียบผลของอาหารสองชนิดคือ Chemically defined medium (CD medium) และ RPMI +5% serum ต่อการเจริญและการผลิตแอนติบอดี ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร RPMI ให้ปริมาณแอนติบอดีมากกว่า อาหาร CD แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดของอาหาร RPMI จึงได้ใช้อาหาร CD ในกระบวนการผลิตแอนติบอดีแทน แอนติบอดีที่เตรียมได้ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Protein G โครมาโตกราฟี ผลจาก SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีมีความบริสุทธิ์ถึง 98 เปอร์เซ็นต์และมีขนาดตรงตามทฤษฎี ผลการศึกษาการจับกันอย่างจำเพาะต่อวัคซีนหลายรูปแบบ พบว่า แอนติบอดีสามารถจับกับวัคซีนในรูปแบบปกติและรีดิวซ์เท่านั้น แอนติบอดีที่เตรียมได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับเอนไซม์ horseradish peroxidase ด้วยสภาวะที่เหมาะสม เมื่อทำการศึกษาผลของ pH และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการเชื่อมต่อ พบว่าที่สภาวะ pH สูง (pH 9.4) และความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อแอนติบอดีที่สูง (8:1) ส่งผลต่อประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ ซึ่งแอนติบอดีที่เชื่อมต่อแล้วสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนในวัคซีนความเข้มข้น 1:200-1:12800 ได้ โดยสรุปแล้วงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสามารถเตรียมทั้งแอนติบอดีและแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ได้สำเร็จและสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับงานควบคุมคุณภาพระหว่างกระบวนการผลิตวัคซีนเจอี

วิทยาการทางเภสัชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....