Thesis Title	Production and Characterizations of Monoclonal Antibody to DDT and Its Derivatives
Author	Mr. Surat Hongsibsong
Degree	Master of Science (Health Sciences)
Thesis Advisory Committees	Dr. Tippawan Prapamontol Chairperson
	Dr. Chaisuree Suphavilai Member
	Dr. Jiraprapa Wipasa Member
	Dr. Mookda Pattarawarapan Member
	Assoc. Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Member

ABSTRACT

Dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) and its metabolites have been detected widely in the environment and biological fluids due to their persistence along the food chain. DDT and its metabolites are public health concern compounds due to their endocrine disruption activity. Although chromatographic-based methods have been standard methods of residue detection, rapid and simple methods i.e. immunoassay for massive screening of DDT are still lacking. The aim of the study was to produce and characterize DDT antibody by immunogens which prepared by using succinic anhydride and glutaric anhydride linked to 4, 4-dichlorobenzhydrol (DCBH) and then conjugated to bovine serum albumin (BSA), oval albumin (OVA), and keyhole limpet hemocyanin (KLH). Hapten density of 6 prepared immunogens, namely, DCBH-S-BSA, DCBH-S-KLH, DCBH-G-BSA, DCBH-G-KLH, DCBH-G-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

OVA and DCBH-S-OVA were 11, 378, 17, 1470, 13 and 17 haptens/molecule protein. Five female mice were subcutaneously immunized every 2 weeks for 3 injections and antibody (Ab) levels were monitored weekly after every immunization. DCBH-S-BSA immunized mice showed good Ab production. Hence, it was selected as a spleen donor for hybridoma production and received a final intravascular injection of 30 μg of DCBH-S-BSA in phosphate buffered saline (PBS), 4 days prior to cell fusion. Three weeks after performing myeloma and spleen cell fusion, hybridomas were screened for Ab to the haptens. Specificity and inhibition concentration at 50% (IC_{50}) of monoclonal antibody (mAb) were determined by competitive inhibition ELISA. Specific antibody from hybridoma clone called 3B8.10D9 was obtained. Purified mAb from culture supernatant was IgG1 (kappa) and inhibited by pre-incubating with DDT and its derivatives (8 compounds), namely, DCBH; 2,2-bis(4-chlorophenyl) acetic acid (*p,p'*-DDA); 1,1'-(2,2,2-trichloroethylidene)-bis(4-chlorobenzene) (*p,p'*-DDT); 1,1,1-trichloro-2(2-chloro-phynyl)-2-(4-chlorophenyl) ethane (*o,p'*-DDT); 1,1'-(2,2-dichloroethenylidene)–bis(4-chlorobenzene) (*p,p'*-DDE); 1,1'-(2,2-dichloroethenylidene)-bis (4-chloro benzene) (*o,p'*-DDE); 1,1'-(2,2-dichloroethylidene)- bis (4-chlorobenzene) (*p,p'*-DDD); and 4-chloro-alpha-(4-chlorophenyl)-alpha- (trichloromethyl) benzenem-ethanol (dicofol). The purified mAb showed IC_{50} of DCBH; dicofol, *p, p'*-DDD; and *p,p'*-DDA at 0.30, 0.36, 3.19, and 2.89 µg/ml, respectively. While *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, and *o,p'*-DDE inhibited less than 10% at concentration 25 µg/ml. Cross-reactivity of purified mAb to DCBH, dicofol, *p,p'*-DDD, and *p,p'*-DDA was 100, 80.33, 10.38 and 9.40 %, respectively. Human serum samples (n=8) added with DCBH of 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 µg/ml showed good range of % mean±SD recovery

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

of 91.01±13.34, 109.57±16.35, 118.61±23.72, 118.24±23.01 and 131.42±40.48, respectively. In summary, mAb was obtained with high cross-reaction to dicofol so it can be used for developing test kits for detection of dicofol in biological and environmental samples such as serum, soil, vegetables, and water.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตและวิเคราะห์คุณลักษณะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อดีดีทีและอนุพันธ์ของดีดีที	
ผู้เขียน	นายสุรัตน์ หงษ์สิบสอง	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.ทิพวรรณ ประภามณฑล	ประธานกรรมการ
	ดร.ฉายสุรีย์ ศุภวิไล	กรรมการ
	ดร. จิรประภา วิภายา	กรรมการ
	ดร. มุกดา ภัทราวราพันธ์	กรรมการ
	รศ.ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

มีการตรวจพบดีดีทีและอนุพันธ์ของดีดีทีได้โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและในของเหลวจากสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นกลุ่มสารที่สลายตัวยากในห่วงโซ่อาหาร ดีดีทีและอนุพันธ์ของดีดีทีเป็นกลุ่มสารเคมีที่ทางสาธารณสุขให้ความเอาใจใส่เนื่องจากมีฤทธิ์รบกวนการทำงานของฮอร์โมน แม้ว่าวิธีทางโครมาโตกราฟีจะเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์การตกค้าง แต่ยังขาดวิธีการที่ตรวจได้รวดเร็วและง่าย เช่น วิธีอิมมิวโนแอสเสย์สำหรับการตรวจหาดีดีทีในตัวอย่างจำนวนมาก ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตและวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติบอดีต่อดีดีทีและอนุพันธ์ของดีดีที โดยเตรียมสารอิมมิวโนเจนจากสารซัคซินิคแอนไฮไดรด์และกลูตาริคแอนไฮไดรด์ ที่ต่ออยู่กับ 4, 4 ไดคลอโรเบนซ์ไฮดรอล (ดีซีบีเอช) และจากนั้นเชื่อมต่อกับโปรตีนโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (บีเอสเอ) โอวัลบูมิน (โอวีเอ) และ คีโฮลลิมปีทฮีโมไซยานิน (เคแอลเอช) แฮพเทนเดนซิตีของสารอิมมิวโนเจ 6 ตัวที่เตรียมได้ซึ่งได้แก่ ดีซีบีเอช-เอส-บีเอสเอ ดีซีบีเอช-เอส-เคแอลเอช ดีซีบีเอช-จี-บีเอสเอ ดีซีบีเอช-จี-เคแอลเอช ดีซี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บีเอช-จี-โอวีเอ และดีซีบีเอช-เอส-โอวีเอ คือ 11 378 17 1,470 13 และ 17 แฮพเทนต่อโมเลกุลของโปรตีน ทำการฉีดอิมมิวโนเจนเข้าใต้ผิวหนังหนูตัวเมียจำนวน 5 ตัว ทุกๆ 2 สัปดาห์จำนวน 3 ครั้ง หลังการฉีดตรวจระดับแอนติบอดีในซีรัมของเลือดที่เก็บจากปลายหางทุกสัปดาห์ พบว่า หนูตัวที่ฉีดด้วยดีซีบีเอช-เอส-บีเอสเอสร้างแอนติบอดีได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ม้ามของหนูในกลุ่มนี้ไปใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก่อนการเก็บม้ามทำการกระตุ้นด้วยดีซีบีเอช-เอส-บีเอสเอ 30 ไมโครกรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อีก 1 ครั้งทางเส้นเลือดดำ ก่อนการทำฟิวส์ชั่นเป็นเวลา 4 วันเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีมากขึ้น เซลล์ม้ามของหนูถูกนำไปใช้ในกระบวนการทำฟิวส์ชั่นระหว่างเซลล์ไมอีโลมาและเซลล์ม้าม ทำการคัดกรองดูการสร้างแอนติบอในไฮบริโดมาหลังการทำเซลล์ฟิวส์ชั่นของหนูเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจหาความจำเพาะและความเข้มข้นในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (ไอซี50) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้วิธีคอมเพ็ททิทีฟ อินฮิบิชั่นอีไลซา และได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะจากเซลล์ที่ชื่อ 3บี8.10ดี9 แอนติบอดีที่ได้เป็นชนิดไอจีจีหนึ่ง (แคปปา) เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ให้บริสุทธิ์จากของเหลวในหลุมเลี้ยงเซลล์เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งโดยสารดีดีทีและอนุพันธ์ของดีดีที จำนวน 8 ชนิดประกอบด้วย ดีซีบีเอช พีพี-ดีดีเอ พีพี-ดีดีที โอพี-ดีดีที พีพี-ดีดีอี โอพี-ดีดีอี พีพี-ดีดีดี และไดโคฟอล พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีทำให้เกิดการยับยั้งร้อยละ 50 จากสารดีซีบีเอช ไดโคฟอล พีพี-ดีดีดี และพีพี-ดีดีเอ ที่ความเข้มข้น 0.30 0.36 3.19 และ 2.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่พีพี-ดีดีที โอพี-ดีดีที พีพี-ดีดีอี และ โอพี-ดีดีอี ยับยั้งได้น้อยกว่าร้อยละ 10 ที่ความเข้มข้น25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบคุณสมบัติในการจับกับสารอื่นของโมโนโคลนอลที่เตรียมให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถจับกับดีซีบีเอช ไดโคฟอล พีพี-ดีดีดี และพีพี-ดีดีเอ ร้อยละ 100 83.33 10.38 และ 9.40 ตามลำดับ การทดสอบหาร้อยละของการกลับคืนของสารดีซีบีเอชที่เติมลงไปในซีรัม จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 5.00 2.50 1.25 0.62 และ 0.31ไมโครกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิลิตร พบว่ามีร้อยละของค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการกลับคืนเท่ากับ 91.01±13.34 109.57±16.35 118.61±23.72 118.24±23.01 และ131.42±40.48 ตามลำดับ

คาดว่าจะสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการศึกษานี้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อใช้ตรวจหาการตกค้างของไดโคฟอลในตัวอย่างสิ่งมีชีวิตและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมได้ เช่น ซีรัม ดิน น้ำ และผัก เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved