บทความฟื้นวิชา

A Review : Monoclonal Antisera for Blood Group Serology

อุดม ติ่งต้อย

ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทนำ

หลังจาก Karl lansteiner[1] ได้ค้นพบหมู่โลหิต ABO ในปี คศ. 1900 ต่อมามีการค้นพบหมู่โลหิตอื่นๆ อีกมาก ความรู้เกี่ยวกับหมู่โลหิต การให้เลือด และการงานทางด้านธนาคารเลือดก็เจริญก้าวหน้ามาเป็นลำดับ ความต้องการที่จะได้ antiserum ของคนที่มีความจำเพาะต่อหมู่โลหิตเพื่อนำมาใช้เป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตมีมากขึ้นไปตามด้วย ต่อมาในปี คศ. 1975 George Kohler และ Caesar Milstein[2] ได้ตีพิมพ์วิธีการผลิต monoclonal antibody (mAb หรือ moAb) ลงในวารสาร Nature เรื่อง เซลล์สายพันธุ์ที่ผลิตแอนติบอดีจำเพาะ สามารถเลี้ยงให้มีอายุยืนยาวในหลอดทดลอง อาศัยหลักการ hybridization หรือการเชื่อมของเซลล์ โดยได้นำข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอนติบอดี ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วจากนักวิทยาศาสตร์หลายคน ที่ค้นพบดังแสดงในตารางที่ 1 ได้นำมาวิเคราะห์และทดลองเพิ่มเติม จนมาเป็นพื้นฐานของงาน moAb ในปัจจุบันถือว่าเป็นประโยชน์อย่างมากมายต่อวงการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทำให้ทั้งสองได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1984 ในสาขาการแพทย์ด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology) ตั้งแต่นั้นมานักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้นำเอาหลักการ การผลิต moAb ฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจน ให้เซลล์สร้างแอนติบอดี ซึ่งอยู่ในม้ามนำมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งชนิดหนึ่งที่เรียกว่า myeloma cells เพื่อไม่ให้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีนี้ตายและสามารถที่จะเจริญเติบโตแบ่งตัวสร้างแอนติบอดีได้ตลอด เรียกเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วว่า hybridoma cells ไปดัดแปลงเป็นพื้นฐานงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคและรักษาโรคที่ไม่สามารถรักษาได้[3] เช่นโรคติดเชื้อและโรคมะเร็ง[4-6] จนประสบความสำเร็จ แต่ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะ moAb ต่อหมู่โลหิต ใช้ในงานทางด้านการธนาคารเลือด การผลิต moAb ต่อหมู่โลหิต ได้เริ่มในปี ค.ศ. 1980 โดย Voak[7] และคณะ ผลิต moAb หมู่โลหิตชนิด A ได้สำเร็จ[8] ปี ค.ศ. 1990 Marjory Stroup[9] ได้สำรวจการใช้ moAb ในงานธนาคารเลือดและตีพิมพ์ในวารสาร Immunohematology ในหัวข้อ A review: the use of monoclonal antibodies in blood banking และได้นำเสนอ 2 ครั้งโดย John Case[10] ในปี ค.ศ. 1992 และ 1993 กล่าวว่าในภาพรวมการเตรียม moAb ดีมากมีความจำเพาะที่หลากหลาย ในปี 1990 เช่นเดียวกัน Douglas Voak[11] สรุปไว้ว่า การเตรียมน้ำยาตรวจตรวจหมู่โลหิตจำนวนมากๆ สำหรับตรวจหมู่โลหิตในระบบ ABO และ Rh(D) ที่มีหมู่ย่อยมากให้มีคุณภาพสูงสามารถเตรียมได้จาก moAb เพราะสามารถเตรียมได้ตามความต้องการที่จะตรวจจับ weaker subgroups ต่างๆ ได้ดีเช่น A_x, B_w, weak D เป็นต้น ปี ค.ศ. 2006 Moulds M.K.[12] ได้สำรวจน้ำยาตรวจหมู่โลหิตที่เตรียมจาก moAb ว่ามีโคลนอะไรบ้างที่ใช้ในการผลิต ซึ่งได้แสดงในตารางที่ 2 และได้สรุปไว้ว่าโดยทั่วไปในการเตรียมน้ำยาตรวจหมู่โลหิตจาก moAb มีโคลนที่แตกต่างกันหลากหลายให้ปฏิกิริยาเหมือนกับที่เตรียมจากซีรัมคน (human) สัตว์ (animal) และเม็ดถั่ว (lectin) ส่วนในประเทศไทยการผลิต moAb ต่อหมู่โลหิต ABO ได้เริ่ม ปี ค.ศ. 1987 (พ.ศ. 2530) ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยแพทย์หญิงสร้อยสองค์ พิกุลสด[13] เริ่มศึกษาค้นคว้าการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตในระบบ ABO จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี hybridomas technique จนประสบความสำเร็จ ได้ moAb anti-B[14,15] มาเป็นชนิดแรกในปี ค.ศ. 1991 (พ.ศ. 2534) และเจ้าหน้าที่ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทยรุ่นต่อมาได้แก่ นางสาวทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช[16] นางรัชนี แก้วมงคล[17] นายอุดม ติ่งต้อย[18,19] นางสาริกา เมฆฉาย นางสาวกาญจนา เอี่ยมอัมพร เป็นต้นได้วิจัยพัฒนา moAb anti-A[16,18], moAb anti-AB[17], moAb anti-D[16] moAb anti-A_1[19] จนประสบผลสำเร็จตามลำดับ สามารถใช้ทดแทน การเตรียมน้ำยาจากซีรัมของผู้บริจาคโลหิตได้ดี และผลิตแจกจ่ายน้ำยาชนิดนี้เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน จนเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง และโคลนต่างๆ ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ใช้ในการผลิตแสดงในตารางที่ 2

การพัฒนา moAb เป็นวิวัฒนาการสร้างแอนติบอดีที่ถูกควบคุมด้วยยีนส์ นำมาใช้เป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตในงานธนาคารเลือดอย่างกว้างขวาง ด้วยเหตุผลนี้ จึงควรทำความเข้าใจเกี่ยวกับ moAb และ polyclonal antibodies ผลิตมาจากอะไร เมื่อใช้แล้วได้ผล

ได้รับต้นฉบับ 28 มีนาคม 2554 ให้ลงตีพิมพ์ 1 เมษายน 2554

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ คุณอุดม ติ่งต้อย ฝ่ายผลิตน้ำยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 e-mail : domting2001@yahoo.com

Table 1 Landmarks in the history of antibody research[20]

1847	Urinary protein in myeloma	Bence Lones
1890	Discovery of antibodies	von Behring and Kitazato
1900	"Side-chain" theory formulated	Ehrlich
	Discovery of ABO blood groups	Landsteiner
1955-6	Allotypes	Grubb, Oudin
1956	Classification of Bence-Jones proteins into two group (now called κ and λ in honour of their discoverers)	Korngold and Lipari
1957	Clonal selection theory	Burnet
1958	One cell; one antibody	Nossal and Lederberg
	Cell fusion by Sendai virus	Okada
1959	Elucidation of disulphide-bonded chain structure of antibodies	Edelman
1960	Discovery of spontaneous cell fusion	Barski
1962	Demonstration that Bence-Jones proteins are antibody light chains	Edelman and Gally
	Induction of plasmacytomas by mineral oil	Potter and Boyce
1962-3	Controlled proteolytic cleavage of IgG, identification of Fab and Fc; topographic relationship between light and heavy chains	Porter, Fleischman, Pain and Press
1964	Use of mutant cells and selective media to isolate hybrids	Littlefield
1965	Amino acid sequencing reveals that N-terminal half of light chains is variable; C-terminal constant	Hilschmann and Craig
	Postulate of two genes; one polypeptide	Dreyer and Bennett
1969	First complete amino acid sequence of an immunoglobulin; concept of domains	Edelman and colleagues
1970	Hypervariable regions	Wu and Kabat
	Growth of plasmacytomas in continuous culture	Horibata and Harris
1973	Fusion of mouse and rat myeloma cells with preservation of secretion of both immunoglobulins sets the stage for production of monoclonal antibodies	Cotton and Milstein
1975	Construction of hybridomas secreting antibody of predefined specificity	Kohler and Milstein
1976	Demonstration of DNA rearrangements in antibody forming cells	Tonegawa and colleagues
	Use of polyethylene glycol for cell fusion	Pontecorvo
1977	Cloning and sequencing λ genes; J segments	Tonegawa and colleagues
1977-80	Multiple germ-line genes for V regions Discovery of D segments	Many authors Group of L. Hood
1980	Mechanisms of insertion of membrane Ig	Groups led by L. Hood and R. Wall

แตกต่างกันอย่างไร

การตอบสนองต่อการกระตุ้น (immune response)

อาศัยหลักการพื้นฐานตามทฤษฎีการสร้างแอนติบอดีของ Sir Frank Macfarlane Burnet[21] ที่รายงานไว้ใน ปี ค.ศ. 1975 ว่า B lymphocytes แต่ละตัวจะมียีนส์จำเพาะทำหน้าที่ตอบสนองการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่จำเพาะ 1 แอนติเจนเท่านั้น โดยมี receptor ที่จำเพาะต่อกัน เมื่อมีสารแปลกปลอมเรียกว่าแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย B lymphocytes ที่มีความจำเพาะ จะทำปฏิกิริยาตอบสนองด้วยการแบ่งตัว (proliferation) และเปลี่ยนแปลง (differentiation) เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ (clone cells) เหมือนกันทุกอย่าง รวมทั้งผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ ด้วย

การผลิต polyclonal antibodies

เริ่มจากการฉีดแอนติเจนที่เหมือนกันกระตุ้นทำให้ B lymphocytes จำนวนมากสร้างแอนติบอดี แต่แอนติบอดีที่ได้ไม่จำเป็นต้องเหมือนกับแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้น อาจจะมีการตอบสนองสร้างแอนติบอดีสลับกันไปมา (shuffling) ในแต่ละกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี บางกลุ่มเซลล์อาจมีโมเลกุล IgM หรือ IgG ในส่วน IgG อาจจะประกอบด้วย IgG1, IgG3 หรือ subgroup อื่นๆ ส่วน light chains อาจ

Table 2 Clones used in the manufacture of reagents[3]

	National Blood Centre, Thai Red Cross Societies		GAMMA		IMMUCOR		ORTHO		
							Tube		Gel card
	Clone	**Ig class**	**Clone**	**Ig class**	**Clone**	**Ig class**	**Clone**	**Ig class**	**Clone**
Anti-A	16G4 6G4 LM103 3C4	IgM IgM IgM IgM	BIRMA 1	IgM	BIRMA 1 A26A2	IgM IgM	MH04 3D3	IgM IgM	BIRMA
Anti-A_1	6C10	IgM							
Anti-B	1C12 6H3	IgM IgM	GAMA110	IgM	ES4 B95.3 LB–2	IgM IgM IgM	NB10.5A5 NG10.3B1 NB1.19	IgM IgM IgM	LB-2
Anti-A,B	16G4 3C4 18C6 18F8	IgM IgM IgM IgM	BIRMA 1 ES4 ES15	IgM IgM IgM	BIRMA 1 ES4 ES15	IgM IgM IgM	MH04 3D3 NB10.5A5 NB1.19	IgM IgM IgM IgM	ES4 ES15
Anti-D	LDM2 LHM77	IgM IgG	GAMA401 GAMA401 F8D8	IgM IgM IgG	Series 5 TH28 MS26 Series 4 MS201 MS26	 IgM IgG IgM IgG	MAD2 HUMAN	IgM IgG	MS201
Anti-C			MS24	IgM	MS24	IgM	MS24	IgM	MS24
Anti-E	DEM1	IgM	GAMA402	IgM	MS12	IgM	C2	IgM	MS258 MS260
Anti-CDE					MS201 MS258 MS24	IgM IgM IgM			
Anti-c	H48	IgM	951	IgM	MS33	IgM	MS42	IgM	MS33
Anti-e			MS16 MS21 MS63	IgM IgM IgM	MS16	IgM	MS16	IgM	MS16 MS21 MS63
Anti-Le^a			GAMA701	IgM	LM112/161	IgM	LM112/161	IgM	
Anti-Le^b			GAMA704	IgM	LM129/181	IgM	LM129/181	IgM	
Anti-Jk^a							MS15	IgM	
Anti-Jk^b							MS8	IgM	
Anti-K1			MS56	IgM	MS56	IgM			
Anti-M			M2A1	IgM	F23	IgM			
Anti-N			12E.A1	IgG1					
Anti-P1			OSK17	IgM					
Anti-IgG			16HB	IgM					
Anti-C3b			055A.305GA MA003	IgM			F7G3	IgG1	
Anti-C3d			053A.714GA MA004	IgG1			C4C7	IgG1	

จะเป็น kappa chain หรือ lambda chain แม้กระนั้นความแตกต่างเหล่านี้ อาจจะมีแอนติบอดีที่จำเพาะเหมือนกันทั้งหมด ในทางกลับกันอาจจะมีบางกลุ่มเซลล์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะหลากหลายจากความหลากหลายของ B lymphocytes แม้ว่าจะใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์มากๆ สำหรับฉีดกระตุ้นให้สร้างแอนติบดี ผลที่ได้อาจจะมี immunoglobulins ผสมกัน มีความจำเพาะ และคุณสมบัติแตกต่างกันไป

อัตราส่วนที่แตกต่างกันของแอนติบอดีในซีรัมจะเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ที่ใช้ฉีดกระตุ้น รวมทั้งการเจาะเก็บจากสัตว์ด้วย ดังนั้นมีวิธีเดียวที่จะควบคุมกระบวนการสร้างแอนติบอดีตามธรรมชาตินี้ โดยคัดเลือกเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือแอนติเจนที่บริสุทธิ์มากๆเท่าที่จะเป็นไปได้ และเลือกชนิดของสัตว์ที่จะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนดีที่สุด มาใช้ในการผลิตน้ำยาตรวจหมู่โลหิตให้มีคุณภาพดี เพียงพอ เหมาะสม และ

ควรใช้สัตว์หลายๆ ตัวสำหรับฉีดกระตุ้น เพื่อเป็นทางเลือก และเลือกเจาะเลือดสัตว์ที่ให้ผลตอบสนองดีที่สุด นำไป adsorbed และ diluted จนได้แอนติบอดีที่จำเพาะชนิดเดียวในซีรัม

การผลิต moAb จาก หนู (mouse)[3,20,22]

ขั้นตอนแรกการผลิต moAb เหมือนกับการผลิต polyclonal antibodies ในส่วนของการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะตามความต้องการ ส่วนมากทางเทคนิค moAb ใช้หนูเป็นสัตว์ทดลองฉีดกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะตามต้องการ ส่วนกระบวนการนำกลุ่มเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีไปใช้ขึ้นอยู่กับเทคนิคการเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวน เบื้องต้นการผลิต moAb จากหนูต้องตรวจกรองหากลุ่มเซลล์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเพียงเซลล์เดียว (monoclonal) ให้เพียงพอเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต ไม่เพียงแต่ความจำเพาะของแอนติบอดีทั้งหมดเท่านั้น แต่ยังรวมถึง IgG class, subclass และชนิดของ light chain ทั้งหมดอีกด้วยต้องเหมือนกัน

หลังจากฉีดกระตุ้นหนูจนได้แอนติบอดีที่ตอบสนองตามต้องการแล้วทำการฆ่าหนูแยกเอาเซลล์ม้าม (spleen cells) บดเซลล์ม้ามให้ละเอียดแยกเอา B lymphocytes ออกมาซึ่งเซลล์เหล่านี้เป็นเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี (plasma cells) ไม่สามารถเลี้ยงขยายได้ เนื่องจากเซลล์สร้างแอนติบอดีมีอายุจำกัดไม่สามารถเลี้ยงให้มีชีวิตยืนยาวได้ ดังนั้นจึงได้มีการเชื่อมเซลล์สร้างแอนติบอดีกับเซลล์มะเร็ง (myeloma cells) ของหนูเข้าด้วยกัน (cell fusion) โดยการใช้ sendai virus, lysolecithin, polyethylene glycol (PEG)[22] หรือ electrified induction (ใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวทำให้เกิดการเชื่อมเซลล์ เหมาะสำหรับเซลล์จำนวนน้อยๆ) แต่ในปัจจุบัน hybridomas technique นิยมใช้ PEG เป็นตัวเชื่อมเซลล์มากที่สุด สำหรับกลไกในการเชื่อมเซลล์ เริ่มจากการรวมตัวของเซลล์เมมเบรนเข้าด้วยกันก่อนที่จีโนมของเซลล์จะผ่านเข้าสู่ซัยโตพลาสของอีกเซลล์หนึ่ง เซลล์ที่รวมตัวกันจะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส หรือมากกว่า เมื่อเซลล์แบ่งตัวนิวเคลียสจึงรวมตัวกันและเกิดเป็นเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า hybrid cells หรือ hybridoma cells ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ ส่วนเซลล์มะเร็งแบ่งตัวเจริญเติบโตไม่ตาย และไม่สามารถควบคุมได้ เซลล์สายพันธุ์มะเร็ง (myeloma cells line) เป็นเซลล์พิเศษสามารถเปลี่ยนแปลงตัวได้ 2 รูปแบบ (two mutations) รูปแบบแรกตัวมันไม่สร้าง immunoglobulin และสองตัวมันขาดเอ็นไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) ซึ่งเป็นเอ็นไซม์จำเป็นสำหรับการสร้าง deoxyribonucleic acid (DNA) ในการจำลองแบบ (replication) ของเซลล์ เมื่อมี HGPRT จะมีการกระตุ้นปฏิกิริยาภายนอกเซลล์ (catalyzes the exogenous) ให้ใช้ hypoxanthine เพื่อผลิต purines ซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในการขัดขวางการสร้าง DNA แม้ว่าเซลล์จะขาดเอ็นไซม์นี้ แต่เซลล์ยังสามารถใช้ hypoxanthine จากภายในเซลล์ (utilized by an endogenous route) เองได้ ดังนั้นถ้านำเซลล์มะเร็งมาทำ fusion กับเซลล์สร้างแอนติบอดีปกติแล้วเพาะเลี้ยงต่อไป พบว่าเซลล์มะเร็งที่ยังไม่ fusion จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนปกคลุม hybridoma cells จากเหตุผลนี้จึงต้องหาวิธีคัดเลือกเฉพาะ hybridoma cells เท่านั้นให้เจริญเติบโตได้ในการเพาะเลี้ยง ในปี ค.ศ. 1964 Littlefield[20] ได้ค้นพบวิธีการคัดเลือกเซลล์ดังกล่าว โดยใช้ selective medium เรียกว่า HAT medium ประกอบด้วยสาร aminopterin, hypoxanthine และ thymidine มีคุณสมบัติยอมให้เฉพาะ hybridoma cells เท่านั้นเจริญเติบโต ส่วน aminopterin เป็นสาร folic acid analogue มีคุณสมบัติเกาะจับเอ็นไซม์ folic acid reductase ไปยับยั้ง coenzymes ในการสังเคราะห์ DNA ทาง “de novo” synthesis pathway ทำให้เซลล์มะเร็งตาย ส่วน B lymphocytes ซึ่งเป็นเซลล์ปกติจะตายตามอายุไขประมาณ 7-10 วัน ดังนั้นเซลล์ที่รอดชีวิตใน HAT medium ได้คือ hybridoma cells เพราะมีการสร้าง DNA ผ่านทาง “salvage pathway” ที่อาศัยเอ็นไซม์ที่สำคัญสองตัวคือ เอนไซม์ thymidine kinase (TK) และเอ็นไซม์ HGPRT

หลังจาก fusion นำ hybridoma cells มาคำนวณ เจือจางปรับให้มีเซลล์ประมาณ 1-2 เซลล์ต่อหลุม (well) นำไปเลี้ยงใน micro wells ประมาณ 10 วัน เซลล์ในแต่ละ well เจริญเติบโต นำไปตรวจกรองหาแอนติบอดีจำเพาะ เมื่อได้โคลนสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ นำโคลนไปเลี้ยงขยายและทำการ reclone เพื่อให้แน่ใจในความจำเพาะ ความคงทน เนื่องจาก hybridoma cells เป็นการผสมกันระหว่าง 2 เซลล์ทำให้มี chromosomes มากเกินบางครั้งอาจจะทำให้เสียหน้าที่ ดังนั้นต้องดูแล chromosomes ที่จำเป็นสำหรับผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะให้คงอยู่ตลอดไป

โคลน hybridomas ที่ได้สามารถเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มความแรงแอนติบอดีจำเพาะให้มีคุณภาพสูงขึ้นโดยการนำโคลนที่ได้ไปฉีดเข้าช่องท้องหนู ทำให้เซลล์ในช่องท้องหนูเป็นมะเร็งสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ เรียกน้ำแอนติบอดีที่ได้จากวิธีนี้ว่า ascites fluid หรือนำเซลล์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะไปเลี้ยงขยายให้มีปริมาณมากๆ โดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกันไป เทคนิคที่พบบ่อยๆคือเลี้ยงขยายในขวดหรือเลี้ยงในถัง fermentation

การผลิต moAb จาก คน (human)

การผลิต moAb โดยใช้หนูนั้นเหมาะสำหรับการผลิต moAb

anti-A,-B,-H,-M,-N,-Le[a] และ-Le[b] ใช้เป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิตได้ดีเทียบเท่ากับการได้มาของแอนติบอดีจากแหล่งหรือวิธีอื่นๆ และการใช้หนูยังเหมาะสำหรับงานการศึกษาวิจัยการผลิต moAb ต่อหมู่โลหิตที่มีความซับซ้อนได้ดีอีกด้วย แต่การใช้หนูสำหรับผลิต moAb anti-D ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ส่วนที่ประสบผลสำเร็จในการผลิต moAb anti-D ใช้คน (human) ในช่วงแรกใช้วิธีการเดียวกับการฉีดกระตุ้นหนู มาฉีดกระตุ้นในคนแล้วแยกเอาเฉพาะ B lymphocytes ของคนมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งของหนู โอกาสของเซลล์มะเร็งของหนูรอดชีวิตมีมากกว่า B lymphocytes ของคน ดูจาก chromosomes ของหนูมีชีวิตรอดแต่ chromosomes ของคนอาจจะตายหรือไม่ตาย ถ้าไม่ตายอาจจะผลิต immunoglobulin ได้น้อยมาก ความพยายามที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมระหว่างเซลล์มะเร็งของหนูกับ B lymphocytes จากคนยังไม่ประสบผลสำเร็จทำให้ hybridoma cells มีอายุสั้น ต่อมาความพยายามที่จะค้นหาวิธีทำใช้ B lymphocytes ที่สร้างแอนติบอดีไม่ตาย พบว่าใช้วิธีทำให้ตัว B lymphocytes เป็นเซลล์มะเร็งโดยใช้ Epstein-Barr Virus (EBV) และสามารถสร้างแอนติบอดีโดยตัวมันไม่ตาย[23,24] ส่วนใหญ่ B lymphocytes มี receptor ที่จำเพาะสำหรับ EBV ซึ่ง receptor เหล่านี้ไม่เห็นใน plasma cells หรือ pre-B cells ดังนั้นการใช้ B cells ที่อยู่ในระบบไหลเวียน (circulating B cells) ต้องเลือก infection กับ EBV เท่านั้นเพื่อให้เซลล์เหล่านี้ยังมีชีวิตอยู่ การเตรียมด้วยวิธีนี้ต้องเจาะเลือดจากคนที่ทราบว่ามีแอนติบอดีที่ต้องการมา 1 ถุงแล้วแยกเซลล์สร้างแอนติบอดี ด้วยการปั่นแยกเก็บเอาเฉพาะส่วน buffy coat โดยใช้ Ficoll-Hypague, Percoll และเม็ดเลือดแกะ หรือวิธีการอื่นๆตามคำแนะนำของบริษัทต่างๆที่ผลิตน้ำยาที่ใช้ในการแยก แต่มีเป้าหมายเดียวกันคือต้องการ B lymphocytes ที่สร้างแอนติบอดี

การ infection โดยใช้ไวรัส (malignant transformation) ให้เป็นเซลล์มะเร็งมี 2 เหตุผลคือ หนึ่งเพื่อต้องการเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะสามารถเพาะเลี้ยงขยายได้ไม่มีวันตาย และสองช่วยเซลล์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะไม่ให้เปลี่ยนแปลง B lymphocytes ที่ได้จากการ transform โดยการใช้ EBV เพื่อผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะนี้เรียกว่า Lymphoblastoid Cell Lines (LCLs)

แอนติบอดีที่จำเพาะจากเซลล์สายพันธุ์ LCLs จะมีความแข็งแรงอยู่ประมาณ 1 อาทิตย์ ความคงทน (stabilizes) อยู่ประมาณ 4 ถึง 8 อาทิตย์ ถึงแม้ว่าเซลล์ไม่ตายแต่แอนติบอดีที่จำเพาะที่สร้างออกมาจะค่อยๆ ลดลงจนถึงระดับตรวจไม่พบ บางครั้งวิธีการดังกล่าวอาจจะได้ผล เห็นได้จากโคลนแรกที่ได้ของ anti-D ใช้วิธีการนี้และยังสามารถผลิตใช้ได้ดี[25] Goossens และคณะทำงาน ยังใช้วิธีการนี้ในการผลิต moAb ได้ผล[26] เมื่อ B lymphocytes จากคนถูก transform ด้วย EBV ได้โคลนสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ ในจำนวนโคลนเหล่านี้พบว่ามี IgM มากกว่า IgG ด้วยวิธีการดังกล่าวนับว่าเป็นความโชคดีสำหรับงานธนาคารเลือดที่จะได้ใช้ค้นหาน้ำยาตรวจหมู่โลหิตมาใช้ในงานต่อไป

ด้วยเหตุผลที่ว่า B lymphocytes ที่ถูก transform ด้วย EBV แล้วสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะมีอายุสั้น และกระบวนการหรือวิธีการที่จะได้มาต้องใช้ความพยายามอย่างมาก[27] เมื่อ LCLs มีการแบ่งตัวได้ระดับหนึ่ง นำเซลล์ดังกล่าวผสมเชื่อมกับเซลล์มะเร็งของหนูอีกครั้งเพื่อให้เซลล์ที่ได้คงทนและแข็งแรง ด้วยวิธีการที่กล่าวข้างต้นแต่ใส่ ouabain ลงไปใน HAT medium เพื่อป้องกัน LCLs ที่ไม่ได้เชื่อมเซลล์เจริญเติบโตผิดไปจากเดิม

การผลิต moAb จำนวนมาก (large-scale production of monoclonal antibodies)

การผลิต moAb ทั้งจาก murine hybridomas และจาก human heterohybridomas ให้มีจำนวนมาก สามารถเพาะเลี้ยงขยาย hybridoma cells และ heterohybridoma cells ให้เจริญเติบโตสร้างแอนติบอดีตามที่ต้องการได้ในขวดเลี้ยงเซลล์ (roller bottle cultures) ประมาณ 10 ลิตรต่อครั้ง หรือสามารถเลี้ยงให้ได้จำนวนมากๆต่อครั้งที่เรียกว่า air life โดยเลี้ยงในถังลึกใหญ่ (deep tank fermentation) ได้มากถึง 2,000 ลิตรต่อครั้ง แต่ต้องหมุนถัง เขย่าเบาๆตลอดเวลา พร้อมกับให้คาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน การเขย่าไม่ต้องแรงมากเพราะ heterohybridoma cells บอบบางอาจจะทำให้เซลล์ฉีกขาดแตกสลายได้ ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 10 วัน แล้วนำไปปั่นแยกเก็บน้ำที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะทิ้ง heterohybridoma cells ถ้าแอนติบอดีที่ได้มีความแรงไม่พอนำไปเพิ่มความเข้มข้นตามที่ต้องการด้วยวิธี ultra filtration ทำให้บริสุทธิ์ และหาความจำเพาะต่อไป

ข้อดีของน้ำยา moAb (advantages of reagent made from monoclonal antibodies)

ความคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง (consistency)

ข้อดีที่เห็นได้ชัดของการใช้น้ำยา moAb ในงานธนาคารเลือดได้แก่ ความแน่นอน คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงของน้ำยา ทุกครั้งที่ผลิตต้องมีคุณสมบัติเหมือนเดิม บนพื้นฐานความจำเพาะของแต่ละแอนติบอดี ตัวอย่างเช่น ถ้า anti-IgG มี high protein แต่ anti-IgM มี low protein ในการผลิตอาจจะต้องปรับความไว (avidity) ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มตกตะกอน (agglutination) ของแอนติบอดีให้เหมาะสม โดยอาจจะเติมสารบ้างอย่างช่วยเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามที่ต้องการ ทั้งคุณภาพ ตามข้อกำหนด แล้ว

จัดเก็บเป็นสูตรการผลิต เมื่อต้องการผลิตเมื่อไรก็ใช้สูตรเดิมจะได้แอนติบอดีเหมือนเดิมทุกประการ

การเลือกโคลน (selected clones)

ข้อดีถัดมาของน้ำยา moAb คือมีโคลนจำนวนมากที่มีความจำเพาะเหมือนกัน ดังนั้นสามารถเลือกได้ตามความเหมาะสม กระบวนการคัดเลือกอาจจะยุ่งยากเนื่องจากมีแอนติเจนจำนวนมากรวมกันและมีความจำเพาะแต่ละแอนติบอดีแตกต่างกัน บางทีอาจจะจับไม่ได้ทั้งหมดทุกแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง เช่นแอนติเจน A บนผิวเม็ดเลือดแดงมีโครงสร้างน้ำตาลที่ตำแหน่งสุดท้ายเป็น N-acetyl galactosamine เหมือนกันทั้งหมดของแอนติเจน A แต่ตำแหน่งบนสายน้ำตาลสายเดียวนี้อาจจะมีโครงสร้างไม่เหมือนกัน บางสายน้ำตาลแตกสาขาออกไปอาจจะมีโครงสร้างอย่างน้อย 4 รูปที่ไม่เหมือนกันของแอนติเจน A[28] ซึ่ง anti-A ไม่ได้จับที่ตำแหน่งสุดท้ายเท่านั้นแต่จะต้องจับทุกตำแหน่งในส่วนต่างๆ ของทุกสายแอนติเจน A ด้วยเหตุนี้ คนหมู่โลหิต B อาจจะสร้าง anti-A หรือ anti-A_1 ได้ทั้งนั้น ในทางกลับกันบางที anti-A นี้อาจจะเหมือน anti-A_1 ในซีรัมของคนหมู่โลหิต O แต่จะไม่เหมือน anti-B (anti-A,B) ที่พบในซีรัมคนหมู่โลหิต O ดังนั้นโคลนที่สร้างแอนติบอดีจะต้องดีที่สุดที่สามารถแยกแอนติเจนได้ถูกต้องจึงจะถูกเลือกมาใช้งาน อีกตัวอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญในการคัดเลือกโคลนเพื่อการตรวจหาแอนติเจน D ในแอนติเจน D มีแอนติเจนที่อยู่รวมกันหลายส่วนหรือหลายตำแหน่ง (epitopes) moAb anti-D ที่ใช้อยู่อาจจะไม่สามารถจับตำแหน่งของแอนติเจน D ได้ทั้งหมด เพราะมีบางตำแหน่งขาดหายไป เรื่องนี้ Connie M Westhoff[29] ได้รายงานการแยกชนิดแอนติเจน D ไว้ว่าเซลล์ partial D หรือ weak D ส่วนมาก moAb anti-D จะทำปฏิกิริยาที่ categories III และ VII หรือบางทีทำปฏิกิริยาที categories IV และ V แต่ทำปฏิกิริยาได้น้อยกับ category VI คุณสมบัติอีกอย่างหนึ่งของ moAb ที่แตกต่างจาก polyclonal antibodies ถึงแม้จะมีความจำเพาะเหมือนกัน ซึ่งในความเป็นจริงการผลิตแอนติบอดีจากหลายโคลน อาจจะเหมาะสมถ้าจะพิจารณาดูที่ความจำเพาะเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม moAb ส่วนมากจะมีความไวในปฏิกิริยาจับกลุ่มตกตะกอนช้า (poor avidity) มีความเข้มข้นของแอนติบอดีน้อย (low titer) ปฏิกิริยาถูกจำกัดที่ค่า pH (react over narrow pH) หรือมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่ moAb ไม่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ครบเหมาะสำหรับเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต ดังนั้นควรจะเลือกโคลนดีที่สุด มีความสำคัญเป็นอันดับแรกมาเป็นน้ำยาตรวจหมู่โลหิต

แอนติบอดีที่ไม่ต้องการ (unwanted antibodies)

ความจริงมีปัญหาอย่างหนึ่งในการเตรียมน้ำยา polyclonal antibodies ได้แก่การแยกเอาแอนติบอดีที่ไม่ต้องการออก ซึ่งทำให้น่าเบื่อ เสียเวลาในการ adsorption แอนติบอดีที่ไม่ต้องการออก ในบางตัวอย่างไม่สามารถแยกแอนติบอดีที่ไม่ต้องการออกโดยการ adsorption เนื่องจากความคุ้มค่าในการลงทุน (cost/benefit) เช่นแอนติบอดีที่เกิดตามธรรมชาติ (naturally occurring), cold-reaction polyagglutinins anti-T, anti-Tn และ anti-Sd^a ที่พบใน polyclonal anti-A และ anti-B มีโอกาสทำให้สับสนกับผลจากการทดสอบ อาจจะมีวิธีการอื่นๆอีกมากที่จะทำให้แน่ใจในความจำเพาะของน้ำยา polyclonal antibodies ที่เตรียมใช้ในการตรวจกรองหาแอนติเจนที่หายาก (rare cells) ถ้าสังเกตเห็นปฏิกิริยาอันไม่พึงปรารถนาก็ควรกำจัดออกหรือ adsorb ออกจากแอนติบอดีที่ต้องการ ถ้ากระบวนการ adsorb มันยุ่งยากหรือไม่มีเซลล์ที่จะใช้ adsorb ซีรัมนั้นก็ควรทิ้งไป มีซีรัมที่ดีๆจำนวนมากที่ไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากมีแอนติบอดีที่ไม่ต้องการปนอยู่ ปัญหาต่างๆทั้งหมดสำหรับ polyclonal antibodies จะหมดไปเมื่อมาใช้ moAb แต่อาจจะมีคำถามว่า มีข้อที่ไม่ดีสำหรับการใช้น้ำยา moAb บ้างไหม คำตอบคือไม่มี มีข้อแตกต่างบ้างในข้อดี และความแตกต่างเหล่านี้จะต้องทำความเข้าใจ และสามารถอธิบายได้ทั้งหมด ดังนั้น moAb เหมาะมากที่จะนำมาใช้ในปัจจุบัน

น้ำยาตรวจหมู่โลหิต ABO

ปัจจุบัน moAb anti-A และ moAb anti-B จากบริษัทต่างๆ ที่นำมาใช้ เตรียมจากการผสมของแอนติบอดีมากกว่าหนึ่งโคลน moAb anti-A สามารถตรวจพบ subgroup A และ weak A antigen ของ cord blood ได้ ดังนั้นการผสมกันของ anti-A ที่ได้จากหลายๆโคลนจะทำให้มีความไว และเห็นปฏิกิริยาแรงขึ้นเมื่อปั่นอ่าน หลังจากน้ำยา moAb ได้ถูกนำมาใช้ พบว่าหมู่โลหิต B บางคน มี A antigen[30] ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า B(A) สามารถอธิบายได้ว่าปรากฏการณ์ที่พบนี้เป็น A และ B transferases คือไม่มีความจำเพาะ[31] A และ B transferases เป็นยีนส์ที่ถูกควบคุมด้วยเอ็นไซม์สามารถพาน้ำตาล immunodominant ส่งไปถึง H-chain receptor บนผิวเม็ดเลือดแดง เมื่อ B transferase แสดงตัวออกมา อาจจะส่งน้ำตาล A บางตัวไปอยู่ที่ผิวเม็ดเลือดแดง การแสดงเซลล์ A ที่เป็นปรากฏการณ์ B(A) จะไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำยา polyclonal anti-A แต่อาจจะทำปฏิกิริยาอ่อนๆกับ moAb anti-A บางตัว ในคนหมู่โลหิต B บางคน เพราะเซลล์เหล่านี้มียีนส์เป็นหมู่โลหิต B ถ้านำซีรัมมาตรวจ (serum grouping) อาจจะพบเป็น

$A_{sub}B$ และ B(A) phenomenon ควรจะใช้ grad agglutination ของเซลล์ B(A) ช่วยด้วย ในกรณีถ้าเห็นปฏิกิริยาอ่อนๆและสลายได้ง่าย ปรากฏการณ์นี้พบน้อยมากๆ บางทีประมาณ 1:1000 ในคนหมู่โลหิต B[31] เมื่อก่อนมีรายงานพบ 1:100 แต่ยังไม่มีการยืนยัน[32] ส่วนมากธนาคารเลือดยังไม่เคยพบเซลล์ B(A) คุณสมบัติอีกอย่างหนึ่งของ moAb anti-A คือสามารถทำปฏิกิริยา subgroup A ได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพเท่ากับ polyclonal anti-A,B

น้ำยาตรวจหมู่โลหิต Rh

ปัจจุบัน moAb anti-D เตรียมจากการผสมกันระหว่าง moAb anti-D จากคนและ polyclonal anti-D(IgM) มีความไวมาก เห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มหลังจากปั่นอ่านที่อุณหภูมิห้องเนื่องจากน้ำยามี low-protein ไม่ต้องมี negative control น้ำยาที่ใช้ใน ABO cells grouping เป็นน้ำยา low-protein ด้วย ดังนั้นผลลบจากการทดสอบเหล่านี้ ช่วยเป็น negative control สำหรับ anti-D เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า anti-IgM ไม่ทำปฏิกิริยาที่ anti-human globulin test สำหรับ weak D positive cells ด้วยเหตุผลนี้ anti-D เตรียมจากการผสม polyclonal anti-D จากคน จึงผสม polyclonal anti-D(IgG) เข้าไปด้วยเพื่อช่วยการจับ weak D antigens เมื่อทำ indirect test และ immediate centrifugation เมื่อหลายบริษัทผลิตน้ำยาแอนติบอดีขึ้นมาใหม่ ทดสอบทำปฏิกิริยากับเซลล์ต่างๆ ความแรงของ agglutination อาจจะไม่เหมือนกัน แต่นั่นไม่ได้หมายความว่าเมื่อทดสอบกับทุกเซลล์จะให้ผลแรงเหมือนกันทั้งหมด สำหรับเซลล์ weak D positive เมื่อทดสอบกับน้ำยาที่ผลิตขึ้นใหม่ บางทีอาจจะเห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มด้วยการปั่นอ่านที่อุณหภูมิห้องหรืออาจจะไม่เห็นปฏิกิริยา แต่ถ้าเห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มที่ indirect antiglobulin test การสรุปของเซลล์ weak D positive รายนี้ ต้องรายงานเป็น D positive ถึงแม้จะไม่เห็นปฏิกิริยาจับกลุ่มที่อุณหภูมิห้อง แต่ต้องยอมรับผลของปฏิกิริยาจับกลุ่มที่ indirect antiglobulin test ว่าเป็น weak D[33]

น้ำยาสำหรับตรวจหมู่โลหิตอื่นๆ

moAb anti-M และ moAb anti-N ผลิตด้วย hybridomas technique มีคุณสมบัติเหมือนกับผลิตจากกระต่าย แต่ moAb anti-N ถ้าผู้ผลิตเจือจางไม่ถูกต้องอาจจะไม่มีความจำเพาะเพราะมีแอนติเจนคล้าย N ที่เรียกว่า N บนผิวเม็ดเลือดแดง ถ้ามี double dose ของ M แสดงว่าเป็น N-negative แอนติเจน M, N, S และ s เป็นน้ำตาลที่รวมกลุ่มกันกับลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะบนสายโปรตีนเดียวกันอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดงเรียกสายโปรตีนที่จับกับน้ำตาลนี้ว่า sialoglycoprotein (SGP) แอนติเจน M และ N อยู่บน SGP และ S กับ s อยู่ที่ตำแหน่งอื่น โครงสร้างสุดท้ายของสาย Ss มี SGP เหมือนกับโครงสร้างสุดท้ายของสาย MN เมื่อพาแอนติเจน N ไป และโครงสร้างสุดท้ายบนสาย Ss นี้ไม่ว่าจะมีอะไรก็เรียกว่า N

แอนติบอดีของระบบ Lewis ผลิตจาก moAb จากหนู มีข้อควรระวังเหมือนกับการผลิตแอนติบอดีระบบ MN เนื่องมาจากปัญหาของโครงสร้างในระบบ Lewis เอง ดังนั้นการคัดเลือกโคลน moAb anti-Lewis มาผลิตต้องดีที่สุด เช่น น้ำยา moAb anti-Le^b บางทีเรียกว่า moAb anti-Le^{bL} ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงทั้งหมดของคนหมู่โลหิต ABO บางทีเรียกว่า moAb anti-Le^{bH} ทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงหมู่โลหิต A_1 อ่อนมาก ความแตกต่างเหล่านี้เห็นได้ชัดในการเตรียม polyclonal anti-Lewis จากแพะ (goats) ได้ผลดีเท่ากับการผลิต moAb anti-Le^b การคัดเลือกโคลนให้ทำปฏิกิริยาที่จำเพาะทุกหมู่โลหิตต้องระวังในการผลิตน้ำยา moAb anti-Le^b ให้ดี เนื่องมาจากความเปลี่ยนแปลงของ moAb anti-Le^b ดังนั้นการใช้ moAb anti-Le^b จะต้องมีเซลล์หมู่โลหิต A_1 Le(b+) เป็นตัวควบคุม (quality control) แต่ปัญหาดังกล่าวข้างต้นไม่ปรากฏสำหรับการผลิต moAb anti-Le^a ข้อดีของการใช้น้ำยา moAb anti-Le^a และ moAb anti-Le^b ใช้ได้ดีถ้ามีการคัดเลือกโคลนที่ดี มีความจำเพาะ การใช้อาจจะมีอายุไม่นานขึ้นอยู่กับการตอบสนองสร้างแอนติบอดีของแพะ อาจจะไม่มีความแน่นอนในความแรงของแอนติบอดีจากการกระตุ้น ปัจจุบันน้ำยาที่ใช้ได้ดีผลิตโดย Gomma Biologics, Houston, Immucor, Ortho Diagnostic เป็นต้น

น้ำยา anti-human globulin reagents

น้ำยา polyspecific anti-human globulin ประกอบด้วย anti-IgG และ anti-complement (anti-C3b และ anti-C3d) anti-IgG เตรียมมาจากกระต่าย anti-C3b อาจจะเตรียมมาจากกระต่ายหรือจาก moAb ด้วยวิธี hybridomas technique เป็นการยากที่จะทำให้ anti-complement ซึ่งเตรียมจากกระต่ายนั้นบริสุทธิ์เพราะมี anti-C4 ปนอยู่ anti-human globulin ผลิตโดยการผสม anti-IgG จากกระต่ายกับ moAb anti-C3b และ moAb anti-C3d เนื่องจาก moAb anti-C3b และ moAb anti-C3d เป็น moAb ไม่มี anti-C4 จึงให้ผลการทดสอบถูกต้องสำหรับการตรวจกรองหาแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิกและไม่มีผลบวกปลอม น้ำยา moAb anti-C3b/anti-C3d และ moAb anti-C3d เพียงอย่างเดียวใช้สำหรับการตรวจกรองหาเซลล์บวกในขั้นตอน anti-globulin test ปัจจุบันมีหลายบริษัทผลิต moAb anti-IgG ออกมาใช้ มีคุณภาพดีเหมือน polyclonal antibodies

เตรียมจากกระต่าย อย่างไรก็ตาม moAb anti-IgG ผลิตด้วยวิธี hybridomas technique ยังมีคุณภาพไม่ดีเท่ากับเตรียมจากกระต่ายเพราะว่าเตรียมจากกระต่ายมีความแรงและความจำเพาะของ IgG ดีกว่า

ในสมัยแรกๆ ที่เริ่มทำ hybridomas technique เซลล์ myeloma ที่นำมาใช้งานส่วนมากมีคุณสมบัติสร้าง immunoglobulin ชนิดที่ไม่ต้องการ (nonspecific) อยู่ด้วย ทำให้แอนติบอดีที่ได้ มีคุณสมบัติไม่ดีมากนัก เช่นเซลล์ P3-X63-Ag8 สร้าง IgG1, Kappa ในตอนหลังจึงมีการคัดเลือกเซลล์ให้สร้างแต่ light chain จึงได้คัดเลือก myeloma cells ที่ไม่สร้าง immunoglobulin ชนิดที่ไม่ต้องการ มาใช้จนเป็นที่นิยมในการทำ fusion ในปัจจุบัน (ตารางที่ 3)

วัสดุ อุปกรณ์พื้นฐานที่ใช้ในการผลิต moAb ประกอบด้วยดังนี้

1. สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง (animal house)
2. ตู้ sterile cabinet เช่น Lamina flow hood
3. ตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) อุณหภูมิ 37°ซ
4. ถังแช่เย็นไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
5. สัตว์ทดลอง (experimental animal) ใช้หนู mouse สายพันธุ์ BALB/c
6. Myeloma cells line ที่นิยมใช้ ได้แก่ P3-X63-Ag8-653
7. การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน in vitro ต้องจัดเตรียมภาชนะที่ใช้ในการทำ cell culture อาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่ใช้ RPMI-1640 หรือ D-MEM ที่มี 5-10% fetal calf serum และ antibiotics
8. Polyethylene glycol (PEG) ใช้เป็น fusing medium
9. HAT medium เป็น selective medium
10. HT medium เหมือนกับ HAT medium เพียงแต่ไม่มี aminopterin
11. Freezing medium ใช้ 10% DMSO และ 50% fetal calf serum ใน RPMI 1640

จากการทบทวนการใช้น้ำยาตรวจหมู่โลหิต ที่ผลิตจาก moAb นำมาใช้แทนน้ำยาตรวจหมู่โลหิต ที่เตรียมจาก polyclonal antibodies เมื่อนำคุณสมบัติต่างๆมาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

การผลิต การใช้ polyclonal antibodies กับ moAb มีข้อควรระวัง และข้อจำกัดที่สำคัญ ได้แก่

1. การผลิต moAb ต้องอาศัยเทคนิคที่สะอาดปราศจากเชื้อทุกขั้นตอน เนื่องจากการฉีดกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีแต่ละครั้งอาจจะไม่ได้แอนติบอดีที่ต้องการ รวมทั้งการแยกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีแต่ละครั้ง ก็อาจจะไม่ได้โคลนที่ต้องการ ดังนั้นถ้าได้โคลนที่ต้องการมาแต่เกิดมีการปนเปื้อนของเชื้อโรค (contamination) จากเทคนิคที่ไม่สะอาด ก็เป็นการเสียเวลาไม่เกิดประโยชน์
2. การเตรียม polyclonal antibodies หรือ moAb anti-M และ moAb anti-N ต้องระวังการปรับ pH ให้ถูกต้อง เพราะ pH เปลี่ยนแปลงไป จะทำให้ปฏิกิริยาเปลี่ยนไป รวมทั้งความจำเพาะของ moAb anti-M ดีมาก แต่ moAb anti-N ส่วนมากต้องระวังในการเจือจางในการจับกับ MN heterozygotes ให้ดี มักจะเกิด cross-reaction กับเซลล์ S+ และ MM เนื่องมาจาก moAb anti-N ส่วนมากไม่ได้สร้างมาจากยีน N โดยตรง
3. เนื่องจาก moAb มีความจำเพาะสูงอาจจะไม่ครอบคลุมทุก epitope บนเม็ดเลือดแดง ดังนั้น ในการผลิตจะต้องมีการผสมหลายๆโคลนรวมกันที่ว่า cocktail เพื่อให้สามารถจับ epitope บนเม็ดเลือดแดงได้หมด
4. การใช้ทั้ง polyclonal antibodies และ moAb จะต้องปฏิบัติตามคู่มือหรือคำแนะนำที่แต่ละแหล่งผลิตเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง โดยเฉพาะ moAb มีโคลนหลากหลาย มีวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน จึงอาจมีวิธีการทดสอบที่แตกต่างกัน เช่นการใช้ moAb anti-Le^b จะต้องมีเซลล์หมู่โลหิต A_1 Le(b+) เป็นตัวควบคุม (quality control) เป็นต้น

Table 3 Plasmacytoma fusion partners[3,22]

Complete name	Short name	Mouse/rat strain origin	Ig produced	Reference
P3-X63-Ag8	X63	BALB/c mouse	IgG1, kappa	Kohler & Milstein(1975)
P3-NSI-Ag4-1	NS1	BALB/c mouse	Kappa*	Kohler & Milstein(1976)
NSO	NSO	BALB/c mouse	None	Galfre & Milstein(1981)
P3-X63-Ag8-653	653	BALB/c mouse	None	Galfre & Milstein(1981)
Sp2/0-Ag14	Sp2/0	BALB/c mouse	None	Shulman et al (1978)
210.RCY3.Ag123	Y3	Lou rat	kappa	Galfre et al (1979)
YB2/O	YO	Lou/AD rat	None	Kilmartin et al (1982)

Kappa light chain not secreted*

Table 4 Comparison of characters between polyclonal and monoclonal antibodies in blood group reagents[8,9,11,12,20,21]

คุณสมบัติ	Polyclonal antibodies	Monoclonal antibodies
1. ความจำเพาะ (specificity)	1. พบปฏิกิริยาไม่คงที่ในแต่ละ lot ขึ้นอยู่กับสัตว์ทดลองหรือน้ำเหลืองของผู้บริจาคโลหิตที่ได้และช่วงเวลาที่เจาะเลือด 2. แอนติบอดีจะ specific ต่อหลายๆ epitope ของแอนติเจนแต่ละชนิด	1. คงที่ สามารถผลิตที่มีลักษณะ homogeneous ที่มีมาตรฐาน 2. แอนติบอดี specific ต่อ 1 epitope หรือ 1 antigenic determinant ของแอนติเจนแต่ละละชนิดเท่านั้น
2. ความแรง (potency)	ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เจาะ เลือด สัตว์ทดลองหรือน้ำเหลืองของผู้บริจาคโลหิต	คงที่โดยสามารถคัดเลือกได้สูง หรือต่ำตามต้องการในระหว่าง ทำ cloning
3. ปริมาณ (quantity)	ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของลูกค้า	ผลิตได้ไม่จำกัดปริมาณ
4. มีปริมาณ immunoglobulin ปนเปื้อน	IgM หรือ IgG ในส่วน IgG ประกอบด้วย IgG1, IgG3 หรือ subgroup อื่นๆ ส่วน light chains อาจจะเป็น kappa chain หรือ lambda chain อาจมีมากถึง 100%	1. ไม่พบในแอนติบอดีที่ได้โดยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ 2. พบได้ในการผลิตโดยวิธีเจาะเก็บ ascitic fluid ประมาณ 10%
5. ความบริสุทธิ์ของแอนติเจนที่ใช้กระตุ้น	ต้องใช้แอนติเจนที่บริสุทธิ์มาก หรือต้องทำ serum absorption	ใช้แอนติเจนไม่ต้องบริสุทธิ์มาก
6. ปริมาณงานที่ทำ (work load)	กระบวนการทำงานไม่ยุ่งยาก	มีขั้นตอนในการทำงานมาก ละเอียดอ่อน ทำได้ยาก และใช้เวลานาน
7. ราคา (cost) ในการผลิต	ต่ำ	สูง โดยเฉพาะในช่วงเวลาเริ่มต้น

สรุป

ปัจจุบันน้ำยาตรวจหมู่โลหิต moAb สำหรับงานธนาคารเลือด ส่วนมากผลิตมาจาก murine hybridomas และ human heterohybridomas มีคุณสมบัติเที่ยงตรง คุณภาพสูง ใช้โคลนที่แตกต่างกันแต่ให้ผลไม่แตกต่างจากที่ผลิตมาจากคน สัตว์ และเม็ดถั่ว

ข้อดีของ moAb เหล่านี้มีความแน่นอน ความจำเพาะ ทุกครั้งที่ผลิต และสะดวกในการใช้

ในกรณีที่ผลิต moAb ต้องปฏิบัติงานภายใต้ระบบสะอาดปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันเมื่อมีโอกาสได้โคลนมาโดยไม่ตั้งใจจะได้ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อต่างๆ ที่ไม่ต้องการ

เอกสารอ้างอิง

1. *http://en.wikipedia.org/wiki/Karl_Landsteiner#cite_ref-2*
2. *Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.*
3. *Norman Grossblatt, Editor. Monoclonal Antibody Production: A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies Institute for Laboratory Animal Research National Research Council. Washington DC: National Academy Press; 1999.*
4. *Duck Cho and Dario Campana. Expansion and actvation of national killer cells for cancer immunotherapy. Korean J Lab Med 2009;29:89-96.*
5. *Yeh Ching Linn and Kam M. Hui. Review Article: Cytokine-Induced NK-Like T Cells: From Bench to Bedside. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010:1-8.*
6. *You-Shun Zhang, Fang-Jun Yuan, Guo-Feng Jia, et al. CIK cells from patients with HCC possess strong cytotoxicity to multidrug-resistant cell line Bel-7402/R. World J Gastroenterol 2005;11:3339-45.*
7. *Voak D, Sack S, Alderson T, et al. Monoclonal anti-A from a hybrid myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. Vox sang 1980;39:134-40.*
8. *Tasanee Sakuldamrongpanich. Monoclonal antibodies to blood group antigens. Printed in Antiserum and Standard Cells Preparation Section. 1993;1-4.*
9. *Stroup M. A review: the use of monoclonal antibodies in blood banking. Immunohematology 1990;6:30-6.*
10. *http://a1881.g.akamai.net/7/1881/26640/v0001/redcross.cownload.akamai.com/26640/pubs/immuno/22_2_06.pdr*
11. *Douglas Voak. Monoclonal antibodies as blood grouping reagents. Bailliere's Clinical Haematology 1990;3:219-42.*
12. *Mould MK. Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. Immunohematol 2006;22:52-63.*
13. *Soisa-ang Phikulsod, Rachnee Poltian, Kanchala Utid, Jintana Tubrod. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: I Mouse response to immunization with different quantity and sources of B antigen. Thai J Hematol Transf Med 1991;1:299-307.*

14. Soisa-ang Phikulsod, Rachnee Poltian, Kanchala Utid, Prapasri Kaewkitiroj, Udom Tingtoy, Jintana Tubrod. Monoclonal blood grouping reagents prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society: II The study of the efficacy of the monoclonal anti-B compared with commercial monoclonal reagents and conventional polyclonal anti-B. Thai J Hematol Transf Med 1992;2:295-302.
15. Soisa-ang Phikulsod, Rachnee Poltian, Prapasri Kaewkitiroj, Kanchala Utid, Udom Tingtoy, Jintana Tubrod. Monoclonal anti-A reagent using hybridoma technique prepared by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Thai J Hematol Transf Med 1992;2:373-81.
16. Tasanee Sakuldamrongpanich, Jintana Tubrod, Sarika Saengkla, Udom Tingtoy. Evaluation of anti-D reagents as Rh(D) blood typing. Thai J Hematol Transf Med 1999;9:39-48.
17. Rachnee Kaewmongkol, Udom Tingtoy, Tasanee Sakuldamrongpanich. Production of blood groupjng monoclonal anti-A,B reagent using hybridoma technique. Thai J Hematol Transf Med 2000;10:175-81.
18. Udom Tingtoy, Suwit Phonimit, Atchara Sirpongsanusit, Sarika Makechay, Tasanee Sakuldamrongpanich. Development of monoclonal anti-A production of National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Thai J Hematol Transf Med 2008;18:11-9.
19. Udom Tingtoy, Tasanee Sakuldamrongpanich, Rachnee Kaewmongkol. Production of monoclonal anti-A_1 blood group reagent by National Blood Centre, Thai Red Cross Society. Thai J Hematol Transf Med 2001;11:21-8.
20. James W Goding. Monoclonal antibodies: Principles and practice. London: Academic Press; 1983;1-4.
21. Kohler G, Howe SC, Milstein C. Fusion between immunoglobulin secreting and non-secreting myeloma cell lines. Eur J Immunol 1976;6:292-5.
22. Diane G Newell, Brian W McBride, Stuart A Clark. Making monoclonals: A practical beginners' guide to the production and characterization of monoclonal antibodies against bacteria and viruses. London: Public Health Laboratory Service 1988;1-43.
23. Boylston AW, Gardner B, Anderson RL, Hughes-Jones NC. Production of human IgM anti-D in tissue culture by EB-Virus-transformed lymphocytes. Scandinavian Journal of Immunology 1980;12:355-8.
24. Koskimies S. Human lymphoblastoid cell line producing specific antibody against Rh-Antigen D. Scandinavian Journal of Immunology 1980;11:73-7.
25. Crawford DH, Harrison J, Barlow MJ, Winger L, Huehns ER. Production of human monoclonal antibody to rhesus D antigen. Lancet 1983;1;386-8.
26. Goossens D, Champomier F, Rouger P, Salmon C. Human monoclonal antibodies against blood group antigens. Preparation of a series of stable EBV immortalized B clones producing high levels of antibody of different isotypes and specificities. J Immunol Meth 1987;101;193-200.
27. Thompson KM, Melamed MD, Eagle K, et al. Production of human monoclonal IgG and IgM antibodies with anti-D (rhesus) specificity using heterohybridomas. Immunology 1986;58:157-60.
28. Clausen H, Levery SB,Mckibbin JM, Hakomori S. Blood group a determinants with mono- and difucosyl type 1 chain in human erythrocyte membranes. Biochemistry 1985;24;3578-86.
29. Connie MW. The Rh system. In: John D Roback, editors. Technical manual. 16th edition. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2008;387-409.
30. Stroup M, Treacy M, eds. A scientific forum on Blood Grouping Serum Anti-A (Murine Monoclonal Blend) Bioclone. Raritan, NJ Ortho Diagnostic Systems, 1987.
31. Greenwell O, Tates AD, Watkins WM. UDP-N-acetyl-D-galactosamine as a donor substrate for the glycosyltransferase encoded by the gene at the human blood group ABO locus. Carbohydr Res 1986;149:-70.
32. Beck ML, Hardman JT, Henry R. Reactivity of a licensed murine monoclonal anti-A reagent with group B cells (abstract). Transfusion 1986;26:572.
33. Choudhury N. Commercial anti-D reagents in Indian market & detection of partial D variants. Indian J Med Res 2007;125:615-17.