# A comparison of monoclonal antibodies against human $C_3$ Complement (ant-$C_{3d}$) Using 2 different antigens by hybridoma technique

รัชนี พลเฑียร, อุดม ติ่งต้อย, กาญจนา เอี่ยมอัมพร, สุวิทย์ โพธิ์นิมิตร, พญ.สร้อยสอางค์ พิกุลสด

**เรื่องย่อ** จากการศึกษาผลผลิต monoclonal anti-$C_{3d}$ ที่ได้จากการทำ fusion จำนวน 4 ครั้ง โดยฉีดกระตุ้นหนู BALB/C ด้วย $C_{3b}$ ที่ดูดซับบนสาร Inulin จำนวน 2 ครั้งและด้วย 10% $C_{3b}$ ที่เกาะบนผิวเม็ดเลือดแดงจำนวน 2 ครั้ง ได้คัดเลือก anti-complement secreting clone ที่สร้างแอนติบอดี้จำนวน 15 clones โดยวิธี hemaglutination และพบว่า 8 clones เป็น anti-$C_{3c}$ เพราะให้ปฏิกิริยาบวกกับ $C_{3b}$ /$C_{4b}$ และ $C_{3b}$ coated red blood cells (rbc), 3 clones เป็น anti-C3d โดยปฏิกิริยาบวกกับ $C_{3b}$/$C_{4b}$, $C_{3b}$, $C_{3d}$/$C_{4d}$ และ $C_{3d}$ coated rbc และ 4 clones เป็น anti-$C_{4d}$ เพราะให้ปฏิกิริยาบวกกับ $C_{3b}$/$C_{4b}$, $C_{4b}$, $C_{3d}$/$C_{4d}$ และ $C_{4d}$ coated rbc ได้นำทั้ง 15 clones มาทดสอบ class และ subclass Immunoglobulin (Igs) โดย dot-ELISA technique พบว่า 8 clones (anti-$C_{3c}$) และ IgG, K และ 3 clones (anti-$C_{3d}$) เป็น IgM, K(2 clones) และ IgG, K(1 clone) ส่วน 4 clone (anti-$C_{4d}$) เป็น IgM, K จากผลการทดลองในครั้งนี้แอนติเจนชนิด $C_{3b}$ ที่ดูดซับบนสาร Inulin เหมาะที่จะเลือกเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง เพื่อที่จะผลิตโมโนโคนัล anti-$C_{3d}$ ในครั้งต่อไป

**Rachanee Poltian, Udom Tingtoy, Kanjana Aimamporn, Suwit Ponimit, Soisang Phikulsod**

**Abstract** 4 fusions were performed to obtain monoclonal anti-$C_{3d}$ by immunuzing Balb/C mice in 2 fusions with $C_{3b}$ adsorbed on Inulin particles and 2 fusions with 10% $C_{3b}$ coated red blood cells (rbc). Fifteen antibodies secreting clones had been selected by hemagglutination test. Eight of them were anti-$C_{3c}$ clones reacting wiht $C_{3b}$/$C_{4b}$ and $C_{3b}$ coated rbc and 3 of them were anti-$C_{3d}$ clones reacting with $C_{3b}$/$C_{4b}$,$C_{3b}$, $C_{3d}$/$C_{4d}$ and $C_{3d}$ coated rbe. While 4 of them were anti- $C_{3d}$ reacting with $C_{3b}$/$C_{4b}$, $C_{4b}$, $C_{3d}$/$C_{4d}$ and $C_{4d}$ coated rbc. All 12 clones were studied for class and subclass Igs using dot-ELISA technique. All 8 anti-$C_{3c}$ clones were IgG, K types, 3 anti-$C_{3d}$ clones were IgM, K type (2 clones), IgG, K type (1 clone) and all 4 anti-$C_{4d}$ clones were IgM, K type. From this experiment, $C_{3b}$ adsorbed on Inulin particles was suitable selected antigen to immunized mice for production of monoclonal anti-$C_{3d}$.

*ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย*

## คำนำ

เป็นเวลา 10 ปีมาแล้วที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้พัฒนาการผลิต Coombs' reagent (anti-human globulin serum, AHS) จากซีรั่มกระต่ายที่ถูกกระตุ้นไว้ประกอบด้วย anti-IgG และ anti-$C_{3d}$ ตามมาตรฐานสากล[1,2,3] โดยจะต้องนำซีรั่มกระต่ายที่ได้มาผ่านขบวนการดูดซับ non-specific antibodies ออกให้หมด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการเตรียม anti-$C_{3d}$ ที่ได้จากซีรั่มกระต่าย และรวมทั้งต้องดูดซับ anti-$C_4$ ซึ่งไม่ควรจะให้มีอยู่ใน AHS[4] ดังนั้นคณะรายงานจึงใช้ mouse hybridoma technique เพื่อเตรียม anti-$C_{3d}$[5,6,7,8] แทนการเตรียมจากวิธีเดิมเพื่อเป็นการพัฒนาและปรับปรุงการผลิต AHS ให้ดีขึ้นในด้านความจำเพาะเจาะจงความสม่ำเสมอในความแรงของแอนติบอดีและระยะเวลาการผลิตที่สั้นลง

ก่อนที่จะทำการผลิต monoclonal anti-$C_{3d}$ โดยเทคนิคไฮบริโดมานั้นได้ทำการศึกษาระบบคอมพลีเม้นท์ (Complement system) และแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนู BALB/c โดยได้เลือกใช้ 10% $C_{3b}$ coated rbc และ Inulin-adsorbed $C_{3b}$ particles และแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มตามชนิดของแอนติเจนที่ฉีด ในการทดลองครั้งนี้คณะผู้ทำงานได้แบ่งการศึกษาเป็น 3 ขั้นตอนคือ

1. ทดลองใช้แอนติเจน 2 ชนิดฉีดกระตุ้นหนูตามกระบวนการไฮบริโดมาเทคนิค
2. คัดเลือก hybridoma clone ที่สร้าง anti-$C_{3d}$
3. ตรวจหาชนิดของ class และ subclass ของ Igs โดย dot-ELISA technique

ผลการทดลองทั้ง 3 ขั้นตอนจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกแอนติเจนที่เหมาะสมในการเตรียม anti-$C_{3d}$ เพื่อใช้ในการผลิต AHS ของศูนย์บริการโลหิตฯ ต่อไป

## วัสดุและวิธีการศึกษา

### วัสดุ

สารและเซลล์ที่ใช้กระตุ้นหนู

- Inulin ($C_6H_{10}O_5$) N, Wako Pure Chemical)
- 10 % $C_{3b}$ coated red blood cells

### สัตว์ทดลอง

- Inbred BALB/c female mice 8-14 weeks old (ขอจากสถาบัน AFRIM-Armed Forces Research Institute of Medical Science, Bangkok)

### เซลล์สายพันธ์ myeloma

- x63 Ag8.653 mouse myeloma cell line (ขอจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

### Selective medium

- RPMI 1640+DMEM+10%FBS+HAT solution+2-ME

### Culture medium

- RPMI 1640+DMEM+10%FBS+HT solution+2-ME

### Fusing agent

- 50 % Polyethyleneglycol (PEG, M.W. 4000) ใน Serum Free RPMI 1640 medium

### Immunization procedure

(ก) การเตรียมแอนติเจน 2 ชนิดที่ใช้ :

1. $C_{3b}$ adsorbed on inulin particle[9]

สาร Inulin 50 มก. ล้างด้วย 10 มล. 0.01M $Na_2$ EDTA in PBS 3 ครั้ง แล้วนำมาอุ่นแช่ใน 10 มล. ของ fresh normal serum (AB serum) ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที แล้วนำมาล้างอีก 3 ครั้งด้วย 2M NaCl in PBS ครั้งสุดท้ายเติม PBS 0.5 มล. เพื่อใช้ฉีดกระตุ้นหนูได้ 2 ตัว (ตัวละ 0.2 มล.)

2. %$C_{3b}$ coated on rbc[10]

ล้าง fresh whole blood group 0 3 ครั้งด้วย NSS ผสม 0.5 มล. ของ PRC และ 0.5 มล. ของ diluted 1/50 fresh AB serum ใส่ลงใน 19.8 มล.ของ $C_{3b}$ coating buffer (Low ionic strength) pH 5.1 กระตุ้นตามตารางที่ 1 ที่มี 0.1 มล. ของ 0.4 M $MgC1_2$ ($Mg^{+2}$) และผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0°ซ นาน 30 นาที นำมาล้าง 3 ครั้งด้วย NSS และเตรียมเป็น 10% $C_{3b}$ coated on rbc เพื่อใช้ฉีดกระตุ้นหนู 0.2 มล./ตัว

(ข) การกระตุ้นหนู (Immunization)

ใช้หนู Balb/c จำนวน 4 ตัวฉีดแอนติเจนจากขั้นตอน (ก) โดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่มและแบ่งฉีดกระตุ้นตามตารางที่ 1

**ตารางที่ 1 Immunization and fusion schedule**

| Days | Route | Antigen | |
|---|---|---|---|
| | | Inulin-adsorbed $C_{3b}$ particle (มล./ตัว) | 10% $C_{3b}$ coated (มล./ตัว) |
| 0 | IP | 0.2 | 0.2 |
| 3 | IP | 0.2 | 0.2 |
| 7 | IP | 0.2 | 0.2 |
| 10 | IP | 0.2 | 0.2 |
| 20 | IP | 0.2 | 0.2 |
| 24 | IP | 0.2 | 0.2 |
| 28 | Fusion | | |

หมายเหตุ : ก่อนจะทำ fusion เจาะเลือดหนูทดสอบความแรงของ anti-$C_{3b}$ และ anti-$C_{3d}$ ด้วย $C_{3b}$ และ $C_{3d}$ coated rbc ถ้าได้ไตเตอร์น้อยกว่า 1024 หนูจะถูก booster ซ้ำอีกครั้งก่อนที่จะทำ fusion

## ขบวนการเชื่อมเซลล์ (Fusion)

แยกม้ามหนูเป็น 2 กลุ่มตามกลุ่มในขั้นตอน (ข) ทำการเชื่อมเซลล์ด้วย mouse myeloma cell line (.653X) ในอัตราส่วน 5:1 (spleen cell : myeloma cell) ใช้ 50% polyethylene glycol (PEG,M.W. 4000) เป็น fusing agent ประยุกต์จากวิธีของ Kohler & Milstein[5,6]

## การคัดเลือก hybrid clone

(ก) เก็บ culture supernatant มาทดสอบปฏิกิริยากับ 2% complement sensitized red cell ($EC_{3b}$, $EC_{3d}$, $EC_{3b}/EC_{4b}$, $EC_{3d}/EC_{4d}$,$EC_{4b}$,$EC_{4d}$) ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมเซลล์เหล่านี้แยกเตรียมตามวิธีแสดงในตารางที่ 2[10,11,12] โดยเซลล์ที่เตรียมได้เหล่านี้ได้ทดสอบปฏิกิริยากับน้ำยา commercial monoclonal antibodies ตามตารางที่ 3

(ข) หยด 20 ul 2% complement sensitized red cells ที่ทดสอบตาม (ก) แล้วแยกลงแต่ละ plate (V-plate) ผสมกับ 20 ul ของ supernatant จาก tissue culture ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง อ่านผล haemagglutination โดยไม่ต้องปั่น

(ค) ทำ supernatant หลุมที่ให้ผลบวกมาทดสอบหาไตเตอร์ด้วย tube technique โดย spin tube test และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วปั่นอ่านผล

## การตรวจหาชนิดของ class และ subclass ของ Igs

ใช้วิธี dot-ELISA technique[14] โดยใช้ rat monoclonal antibodies to mouse IgM, IgG, $IgG_{2a}$, $IgG_{2b}$, $IgG_3$, IgK light chain

**ตารางที่ 2** Low Ionic streght method for complement coating on red cells

| Authors | Coat | Sucrose M | $PO_4$ M | EDTA M | Diluent mls. | Whole Blood serum/cells | pH | °C | Time min. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Jenkins Modified by Voak & Downie | $C_{3b}/C_{4b}$ | 0.27 | 0.005 | Nil | 17 | 1 ml. serum 2 ml. 50% cell in NSS. | 6.1 | 37 | 30 |
| Jenkins II FDA | $C_{4b}$ | 0.27 | Nil | 0.2 | 10 | 0.5 ml. serum 0.5 ml. PRC. | 6.1 | 37 | 15 |
| Fruitstone Adding 0.1 ml. 0.4 M (0.002 M $Mg^{+2}$) $MgC1_2$ | $C_{3b}$ | 0.27 | 0.005 | 0.0042 | 19.8 | 0.5 ml. PRC. 0.5 ml. 1/50 dilution of serum or plasma in saline | 5.1 | 0 | 30 |
| FDA | $C_{3d}/C_{4d}$,$C_{3d}$,$C_{4d}$ | - as above then treated with 0.1% trypsin 30 min. | | | | | | | |

**ตารางที่ 3** Pre-test of Complement component coated on rbc

| Antibodies | Complement component coated rbc | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $EC_{3b}$ | $EC_{3d}$ | $EC_{4b}$ | $EC_{4d}$ | $EC_{3b}/EC_{4b}$ | $EC_{3d}$,$EC_{4d}$ |
| Anti-$C_{3b}$ | + | + | - | - | + | + |
| Anti-$C_{3d}$ | + | + | - | - | + | + |
| Anti-$C_4$ | - | - | + | + | + | + |
| Coombs'test | + | + | - | - | + | + |
| Anti-IgG | - | - | - | - | - | - |
| Anti-IgM | - | - | - | - | - | - |
| Anti-IgA | - | - | - | - | - | - |
| Medium | - | - | - | - | - | - |
| NSS. | - | - | - | - | - | - |

## ผลการศึกษา

จากการทดลองเพื่อผลิต monoclonal anti-$C_3$ (anti-$C_{3d}$) โดยแบ่งแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูออกเป็น 2 กลุ่ม พบว่า fusion ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนกลุ่มที่ 1($C_{3b}$ adsorbed on Inulin) เกิด hybridoma clone 70-80% โดยเป็น secreting clone 50-60% และเกือบทั้งหมดเป็น anti-$C_3$ ที่ต้องการ ส่วน fusion ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนกลุ่มที่ 2 (10% $C_{3b}$ coated rbc) เกิด hybridoma clones 40-65% ซึ่งเป็น secreting clone ประมาณ 40% และเกือบทั้งหมดเป็น anti-$C_4$ และ non-specific antibodies มีเพียง 3-4% เท่า

นั้นที่เป็น anti-$C_3$($C_{3c}$, $C_{3d}$) ดังแสดงบนตารางที่ 4

และได้นำ positive clone ทำการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ด้วย haemagglutination test (tube technique) โดยทดสอบด้วย 2% complement sensitized rbc ($EC_{3b}$, $EC_{3d}$, $EC_{3b}$/$EC_{4b}$, $EC_{3d}$/$EC_{4d}$,$EC_{4b}$,$EC_{4d}$) พบว่า 11 โคลนจากการใช้แอนติเจนในกลุ่มที่ 1 เป็น anti-$C_{3c}$ และ anti-$C_{3d}$ ส่วน 4 โคลนที่ได้จากใช้แอนติเจนกลุ่มที่ 2 เป็น anti-$C_{4d}$ แสดงบนตารางที่ 5

จากทั้ง 15 โคลนได้นำมาทดสอบความแรงและ chain composition โดย Dot-ELISA technique พบว่า monoclonal anti-$C_{3c}$ ซึ่งให้ความแรง 1024 จำนวน 7 โคลน ($2B_{10}$, $3A_5$, $3D_5$,$4C_7$,$7D_{11}$,$7H_3$,$8D_2$) และ 2048 จำนวน 1 โคลน ($9F_8$) และทุกโคลนเป็น Immunoglobulin ชนิด IgG,K light chain ส่วน anti-$C_{3d}$ จำนวน 3 โคลนซึ่งให้ความแรง 2048 จำนวน 1 โคลน ($8D_4$) และเป็น Immunoglobulin ชนิด IgG,K light chain และความแรง 4096 จำนวน 2 โคลน ($11B_4$,$3B_7$) เป็น Immunoglobulin ชนิด IgM,K light chain ส่วน anti-$C_{4d}$ มีความแรง 512 จำนวน 2 โคลน ($7F_7$,$8D_2$) และ 1024 จำนวน 1 โคลน ($5H_8$) และ 2048 จำนวน 1 โคลน ($4D_3$) และทุกโคลนเป็น Immunoglobulin ชนิด IgM,K light chain ดังแสดงบนตารางที่ 6

**ตารางที่ 4** เปรียบเทียบการเกิดจำนวนโคลนทั้งหมดกับจำนวนโคลนที่มีแอนติบอดีย์ที่ต้องการจากการใช้แอนติเจนต่างชนิดกัน

| Antigen No.of fusion | | % Clone growth (No.of clone/well) | % Secreting clone (No.of sec.clone/ all clones) | % Desired pos.clone (No.of pos.clones/ all clones) | Remark |
|---|---|---|---|---|---|
| I ($C_{3b}$ adsorbed on Inulin) | 1 | 71.6 (825/1152) | 50.9 (420/825) | 50.7 (418/825) | anti-$C_{3c}$, anti-$C_{3d}$, |
| | 3 | 82.5 (950/1152) | 60.5 (575/950) | 60 (570/950) | anti-$C_{3c}$, anti-$C_{3d}$, |
| II ($C_{3b}$ coated on rbc) | 2 | 40.5 (470/1152) | 42.1 (198/470) | 3.8 (18/470) | anti-$C_{4c}$,$C_{4d}$, plus non-spec. |
| | 4 | 65.1 (750/1152) | 37.1 (278/750) | 3.3 (25/750) | anti-$C_{3c}$,$C_{4b}$, and $C_{4d}$ plus non-spec. |

pos. = positive hemagglutination test with complement component coated rbc ($C_{3b}$,$C_{3d}$, or $C_{4b}$,$C_{4d}$)

sec. = secrete any kinds of antibody

non-spec = non-specific antibody

**ตารางที่ 5** การคัดเลือก specific antibody จากทั้ง 4 fusions ที่ให้ผลบวก

| Antigen | Fusion | Clone | 2% Complement component coated rbc | | | | | | Hemagglutination spec. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $EC_{3b}$ | $EC_{3d}$ | $EC_{4b}$ | $EC_{4d}$ | $EC_{3b}/EC_{4b}$ | $EC_{3d}/EC_{4d}$ | |
| I | 1 | $2B_{10}$ | + | - | - | - | + | - | Anti-$C_{3c}$ |
| | | $3B_5$ | + | - | - | - | + | - | " |
| | | $3D_5$ | + | - | - | - | + | - | " |
| | | $11B_4$ | + | + | - | - | + | + | Anti-$C_{3d}$ |
| | 3 | $4C_7$ | + | - | - | - | + | - | Anti-$C_{3c}$ |
| | | $7D_{11}$ | + | - | - | - | + | - | " |
| | | $7H_3$ | + | - | - | - | + | - | " |
| | | $8B_2$ | + | - | - | - | + | - | " |
| | | $9F_8$ | + | - | - | - | + | - | " |
| | | $3B_7$ | + | + | - | - | + | + | Anti-$C_{3d}$ |
| | | $8D_4$ | + | + | - | - | + | + | " |
| II | 2 | $4D_3$ | - | - | + | + | + | + | Anti-$C_{4d}$ |
| | 4 | $5H_8$ | - | - | + | + | + | + | " |
| | | $7F_7$ | - | - | + | + | + | + | " |
| | | $8D_2$ | - | - | + | + | + | + | " |

**ตารางที่ 6** แสดงผลการทดสอบความแรง (ไตเตอร์) ของ monoclonal anti-$C_{3c}$, anti-$C_{3d}$ และ anti-$C_{4d}$ โดย Direct agglutination และ chain composition โดย Dot-ELISA technique

| Direct agglutination titer (+) by spin tube test | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Coated | Anti-$C_{3c}$ | | | | | | | Anti-$C_{3d}$ | | | | Anti-$C_{4d}$ | | | |
| RBC | $2B_{10}$ | $3A_5$ | $3D_5$ | $4C_7$ | $7D_{11}$ | $7H_3$ | $8B_2$ | $9F_8$ | $11B_4$ | $3B_7$ | $8D_4$ | $4D_3$ | $5H_8$ | $7F_7$ | $8D_2$ |
| $C_{3b}$ | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 1024 | 2048 | 512 | 4096 | 2048 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $C_{3d}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4096 | 4096 | 2048 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $C_{4b}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2048 | 1024 | 512 | 512 |
| $C_{4d}$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2048 | 1024 | 512 | 512 |
| Chain composition | | | | | IgG,K | | | | | IgM,K | IgG,K | | IgM,K | | |

## สรุปและวิจารณ์

ในการศึกษาเปรียบเทียบแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้น 2 ชนิด ได้ทำการเชื่อมเซลล์ (Fusion) จำนวน 4 ครั้งพบว่า fusion ที่ได้จากการใช้แอนติเจน I จะให้ anti-$C_3$ secreting clone เป็นจำนวนมากและ non-specific clone จะเกิดน้อยมากหรือไม่มีเลย (จาก fusion 1 & 3) แต่อัตราส่วนของ anti-$C_{3c}$ secreting clone จะมีมากกว่า anti-$C_{3d}$ secreting clone ในส่วนของ fusion ที่ใช้ 10% $C_{3b}$ coated rbc เป็นแอนติเจนจะเกิด non-specific clone จำนวนมาก รวมทั้ง anti-$C_4$ secreting clone ด้วยและให้ไตเตอร์สูงโดยได้คัดเลือก anti-$C_4$ จำนวน 4 clones (จาก fusion 2 & 4) ซึ่งได้นำมาทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) แล้วพบว่าเป็น anti-$C_{4d}$ secreting clone และในส่วนของการเกิด anti-$C_3$ specific clone จะมี anti-$C_{3c}$ secreting clone มากกว่า anti-$C_{3d}$ secreting clone จากการทำการศึกษาเปรียบเทียบฉีดกระตุ้นหนูทดลองด้วยแอนติเจน 2 ชนิดนี้พบว่าเป็นไปตามการทดลองของ Dobbie และคณะ[15] ที่พบว่า $C_3$ เป็นโมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วย $C_{3c}$ มี 4 epitopes และ $C_{3d}$ มี 3 epitopes เป็นอย่างน้อย ดังนั้นเมื่อสัตว์ทดลองถูกกระตุ้นด้วย $C_{3b}$ antigen สัดส่วนของการสร้าง anti-$C_{3c}$ จะมีมากกว่า anti-$C_{3d}$

เนื่องจากการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ แอนติเจนในกลุ่มที่ I ($C_{3b}$ adsorbed on Inulin) เหมาะที่จะเลือกเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลองในการที่จะผลิตโมโนโคนัล anti-$C_{3d}$ ในครั้งต่อไป เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ในการเกิด anti-$C_3$ มากและ non-specific clone น้อยมากถึงแม้จะให้จำนวนโคลน anti-$C_{3d}$ ที่ไตเตอร์สูงจำนวนน้อยซึ่งจะต้องทำการศึกษาจำนวนครั้งและระยะเวลาของการฉีดกระตุ้นในการทดลองครั้งต่อไป ในส่วนของแอนติเจนในกลุ่มที่ II (10% $C_{3b}$ coated rbc) จะเกิด non-specific clone สูงมากซึ่งจะเป็นปัญหาต่อการทดสอบคัดเลือกโคลน จึงไม่ควรจะใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ส่วนการคัดเลือกโคลนจะใช้ hemagglutination test โดย microplate method และ tube method ด้วย 2%complement component coated rbc ($C_{3b}$,$C_{3d}$,$C_{3b}$/$C_{4b}$,$C_{3d}$/$C_{4d}$,$C_{4b}$,$C_{4d}$) โดยวิธี microplate นั้นจะเลือกใช้ในการทำ screening test เมื่อเก็บ tissue culture supernatant (TCS) จาก 96 well plate ส่วน tube method ใช้ทดสอบซ้ำและทดสอบความแรงของแอนติบอดีย์ (ไตเตอร์)

ส่วนการทดสอบ class และ subclass Igs ด้วย Dot-ELISA technique จะทำให้รู้คุณสมบัติของแต่ละโคลนและเป็นแนวทางในการนำไปแปรผลร่วมกับการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแต่ละโคลนสำหรับที่จะเลือกโคลนนั้นเตรียมเป็น Coomb's reagent

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ผู้ทำการศึกษาสามารถนำทักษะและประสพการณ์ที่ได้ไปใช้ในการทดลองครั้งต่อไป เพื่อจะให้ได้โคลนที่ไตเตอร์สูงและมี epitopes ที่สามารถจะ detect anti-$C_{3d}$ ได้ครบ โดยเฉพาะในกรณีที่เกิดปฏิกิริยา antigen-antibody ซึ่งบางครั้งมี IgG อยู่ปริมาณต่ำๆ ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ตรวจไม่พบหรืออ่อนมาก[16,17,18] และ 15 โคลน (8 anti-$C_{3c}$ secreting clone, 3 anti-$C_{3d}$ secreting clone และ 4 anti-$C_{4d}$ secreting clone) ที่ได้คัดเลือก ไว้ได้ทำโคลนเดียว (cloning) 2-3 ครั้ง/โคลนและเก็บแช่แข็งใน liquid $N_2$ สำหรับที่จะนำมาทำการศึกษาความจำเพาะเจาะจง (specificity) เพื่อที่จะนำมาเตรียมเป็น Coombs' reagent ต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Moore JA, Chaplin H. Anti-$C_{3d}$ antiglobulin reagents. I. Characteristics of the anti-$C_{3c}$ responsec during hyperimmunization in rabbits. Transfusion 1974;14:407-14.
2. Moore JA, Chaplin H. Anti-$C_{3d}$ antiglobulin reagents. II. Preparation of an antiglobulin serum monospecific for $C_{3d}$. Transfusion 1974;14:416-24.
3. Issitt PD, Issitt CH, Willsinson SL. Evaluation of commercial antiglobulin sera over a two-years period. Part I Anti-beta 1A, anti-alpha 2D, and anti-beta 1E levels. Transfusion 1974;14:93-102.

4. Garratty G, Petz LD. The significance of red cell ground complements in development of standards and quality assurance for the anti-complement components of antiglobulin sera. Transfusion 1974;16:297-306.
5. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature 1975;256:495-7.
6. Kohler G, Howe SC, Milstein C. Fusion between immunoglobulin secreting and non-secreting myeloma cell lines. Eur J Immunol 1975;65:292-5.
7. Lachann PJ, Oldroyd RG, Milstein C, Wright B. Three rat monoclonal antibodies to human $C_3$. Immunology 1980;41:305-15.
8. Holt PDJ, Donaldson C, Judson PA, Johnson P, Parsons SF, Anstee DJ. NBTS/BRIC 8:a monoclonal anti-$C_{3d}$ antibody. Transfusio 1985;25:267-9.
9. Corton JM, Dobbie D, Gardner B, Merry AhH, Sim RB. Monoclonal antibodies against complement component $C_3$. Biochem Soc Trans 1987;15:653-4.
10. Fruitstone MJ. $C_{3d}$ sensitized erythrocytes. Transfusion 1978;18:128.
11. Jenkins DE, Moore WM, Luthringer DG, Johnson RM. A rapid method for the production of erythrocytes in the state "$EC_4$" and $EC_3$". Transfusion 1975;15:402-7.
12. Chaplin HJr, Freeman J, Massey A, Monroe MC. Characterisation of red blood cells strongly coated in vitro by $C_3$ via the alternative pathway. Transfusion 1980;256:62.
13. Freeman J, Mollison PL. Preparation of red blood cells coated with $C_4$ and $C_3$ subcomponents and production of anti-$C_{4d}$ and anti-$C_{3d}$. Vox Sang 1976; 31:241-57.
14. MC. Dougal JS, Browning JW, Kennedy S, Moore DD. Immunoblot assay for determine and light chain type of murine monoclonal antibodies in unconcentrated hybridoma culture supernate. J. Immuno Meth. 1983;63:281-90.
15. Freedman J. The significance of complement on the red cell surface. Trans Med Rev 1987;1:58-70.
16. Gilliland BC, Leddy JP, Vaughan JH, The detection of cell-bound antibody on complement-coated human red cells. J. Chin Invest 1970;49:898-906.
17. Sherwood GK, Haynes BF, Rosse WF. Hemolytic transfusion reaction caused by failure of commercial antiglobulin reagents to detect complement. Tranafusion 1976;16:417-20.
18. Howard JE, Winn LC, Gottieb CE, Grumey FC, Garratly G, Petz LD. Clinical significance of the anti-complement component of antiglobulin antisera. Transfusion 1982;22:269-72.