รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารภูมิต้านทานแบบมอโนโคลนอลต่อมิตรากัยนีน

Production of monoclonal antibody against mitragynine

รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล **คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

รศ.ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน **คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**

ดร.สุพัตรา ลิ่มสุวรรณโชติ **คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556-2557 รหัสโครงการ PHA5600010S

กันยายน พ.ศ. 2557

1. ชื่อโครงการ (ไทย) การผลิตสารภูมิต้านทานแบบมอโนโคลนอลต่อมิตรากัยนีน

(อังกฤษ) Production of monoclonal antibody against mitragynine

2. คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผู้ร่วมโครงการ รศ.ดร.วราภรณ์ ภูตะลุน

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ดร.สุพัตรา ลิ่มสุวรรณโชติ

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

This study was supported by the Annual government statement of expenditure, the Prince of Songkla University, the National Research Council of Thailand (PHA560010S). We Thank the Royal Golden Jubilee Ph. D Program, the Thailand Research Fund (PHD/0311/2550) directly to S.L. for study grant. We thank to Assoc. Prof. Dr. Anuchit Plubrukarn for his advices on hapten synthesis and Associate Prof. Dr. Tripetch Kanajanaphoom for his kindness of providing mitraphylline, secoxyloganin, carbomethoxystrictosidine. The authors deeply thank to Associate Professor Dr. Hiroyuki Tanaka, Department of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan for his kindness and knowledge support on monoclonal antibody preparation.

4. บทคัดย่อ

(ภาษาไทย)

มิตรากัยนีนเป็นสารกลุ่มอินโดลแอลคาลอยด์ แยกได้จากใบกระท่อมโดยการหมักในเมธานอลที่ทำให้เป็นด่างด้วยแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ จากนั้นสกัดด้วยวิธีกรด-ด่าง และแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีตามลำดับ ในระหว่างการแยกมิตรากัยนีน สามารถแยกสารแอลคาลอยด์อีกสองชนิดคือ paynantheine และ speciogynine

ในการเตรียมสารกระตุ้นภูมิต้านทาน มิตรากัยนีนถูกออกแบบให้เชื่อมต่อกับโปรตีนตัวพา ได้แก่ bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA) และ keyhole limpet hemocyanin (KLH) โดยใช้ 3 วิธี คือ ใช้สาร 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) เดี่ยวๆ, ใช้ EDC ร่วมกับสาร *N*-hydroxysuccimide (EDC/NHS) และใช้ glutaraldehyde (GA) มิตรากัยนีนถูกเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชั่นให้กลายเป็น carboxylic acid โดยวิธีการไฮโดรไลซิสด้วยด่าง จะได้สารอนุพันธ์ที่เป็นกรด (MGA) ก่อนที่จะถูกเชื่อมต่อกับโปรตีนด้วยวิธี EDC หรือ EDC/NHS คอนจูเกต MGA-BSA-1 ถูกเตรียมด้วยวิธี EDC ส่วนวิธี EDC/NHS จะถูกใช้เพื่อเตรียมคอนจูเกต MGA-BSA-2, MGA-OVA และ MGA-KLH นอกจากนี้ ไนโตรเจนบนวงแหวนอินโดลจะถูกเชื่อมต่อกับหมู่เอมีนใน BSA และ OVA โดยใช้ GA เป็นตัวเชื่อม จะได้คอนจูเกตสองชนิดคือ MG-GA-BSA และ MG-GA-OVA ตามลำดับ คอนจูเกตที่ได้จะนำมาผลิตสารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนอล และมอนอโคลนอล สารภูมิต้านทานแบบโพลีโคลนอลที่ได้จากการฉีดกระตุ้นด้วย MGA-BSA-1 และ MGA-BSA-2 ไม่มีคุณสมบัติในการจดจำสารมิตรากัยนีน คอนจูเกตทุกชนิด ยกเว้น MGA-BSA-1 และ MG-GA-OVA ถูกนำไปฉีดกระตุ้นในหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c เพื่อเตรียมสารภูมิต้านทานแบบมอนอโคลนอล พบว่ามีเพียงคอนจูเกต MGA-BSA-2 และ MG-GA-BSA ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ในหนูเม้าส์ได้ดี จากนั้นจึงแยกเอาม้ามหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยคอนจูเกตสองชนิดนี้ไปใช้ในการเตรียมสารภูมิต้านทานแบบมอนอโคลนอลต่อไป

เซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถหลั่งสารภูมิต้านทานต่อมิตรากัยนีน ชื่อ 1A6 ได้จากการหลอมรวมเซลล์ม้ามหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย MGA-BSA-2 เข้ากับเซลล์มะเร็ง myeloma ชนิด SP2/0 ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrofusion) สารภูมิต้านทานแบบมอนอโคลนอลต่อมิตรากัยนีน (anti-MG MAb) แสดงปฏิกิริยาข้ามกลุ่มต่อสาร speciogynine (30.54%), paynantheine (24.83%) และ mitraciliatine (8.63%) การประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณมิตรากัยนีนด้วยวิธีอีไลซ่า สามารถวัดได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 32.9-250.0 µg/mL โดยมีความเที่ยงตรงชนิด intra-plate อยู่ในช่วง 2.43-3.53% และ ชนิด inter-plate 1.76-5.37% และมีค่าความถูกต้อง 94.88-107.20% และจากการหาปริมาณมิตรากัยนีนในตัวอย่างใบพืชกระท่อมด้วยวิธีอีไลซ่า พบว่า ได้ค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณด้วยวิธี HPLC โดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9938 สารภูมิต้านทานที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอลคาลอยด์จากกระท่อม กับตัวอย่างจำนวนมาก และรวดเร็ว

Abstract

Mitragynine (MG) is an indole alkaloid which accumulated in *Mitragyna speciosa* (kratom) leaves. To obtain MG, it was isolated by means of maceration with basified methanol, acid-base extraction and column chromatography, consecutively. Along with MG, paynantheine and speciogynine were additionally separated.

MG was designed to conjugate with bovine serum albumin (BSA), ovalbumin (OVA) and keyhole limpet hemocyanin (KLH) for immunogen preparation. The three coupling reactions were employed including 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), EDC and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (EDC/NHS) and glutaraldehyde (GA) methods. Initiation of the coupling reaction, the carboxylic acid was introduced to MG using alkaline hydrolysis to obtain the MG acid derivative (MGA) before coupling by EDC or EDC/NHS method. Using EDC, the MGA-BSA-1 conjugate was obtained. The EDC/NHS coupling reaction was used to prepare the MGA-BSA-2, MGA-OVA and MGA-KLH. Alternatively, an indole nitrogen was linked to an amine of BSA and OVA by GA cross-bridge yielding the MG-GA-BSA and MG-GA-OVA, respectively. The obtained conjugates were used to immunize for preparation of polyclonal and monoclonal antibodies against MG. The polyclonal antibodies produced from the MGA-BSA-1 and MGA-BSA-2 conjugates did not show the recognition to free MG. All conjugates, except MGA-BSA-1 and MG-GA-OVA, were injected to BALB/c mice to prepare the MAb. It was found that only MGA-BSA-2 and MG-GA-OVA could elicit high antibody responses. The spleens from these two positive mice were then separated for MAb production.

Hybridoma secreting anti-MG MAb, named 1A6, was established by the electrofusion between splenocytes of mouse immunized with MGA-BSA-2 conjugate and the SP2/0 myeloma cells. The anti-MG MAb displayed the cross-reactivity to speciogynine (30.54%), paynantheine (24.83%) and mitraciliatine (8.63%). Its application in the icELISA exhibited the working range of 32.9-250.0 µg/mL with satisfied precision (2.43-3.53% and 1.76-5.37% for intra-and inter-plate assay, respectively) and accuracy (94.88-107.20%). The quantitative analysis of MG content in kratom samples were in accordance with HPLC method (R^2=0.9938). With rapid and simple ELISA assay using the anti-MG MAb obtained from this study can be applied for *Mitragyna* alkaloid quantification.