



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**PENGHASILAN HIBRIDOMA YANG MEREMBESKAN
ANTIBODI MONOKLON TERHADAP HORMON TIROKSIN (T4)**

SITI ROMLAH BT YAHYA

FSMB 1994 3

PENGHASILAN HIBRIDOMA YANG MEREMBESKAN ANTIBODI MONOKLON
TERHADAP HORMON TIROKSIN (T_4)

oleh

SITI ROMLAH BT YAHYA

Tesis yang dikemukakan kepada Universiti Pertanian
Malaysia sebagai memenuhi syarat untuk
mendapatkan Ijazah Master Sains di Fakulti
Sains Makanan & Bioteknologi,
Universiti Pertanian Malaysia

Mei 1994



PENGHARGAAN

Segala puji-pujian bagi Allah s.w.t. yang telah memberikan kekuatan untuk menyempurnakan penyelidikan dan tesis ini.

Ribuan terima kasih kepada Dr. Abdul Manaf Ali di atas segala bimbingan dan tunjuk ajar yang telah diberikan sepanjang penyelidikan ini dijalankan.

Ucapan terima kasih juga kepada Dr. Shaharuddin Mohd daripada Unit Tenaga Nuklear, kerana banyak memberi sumbangan dari segi material dan nasihat yang berguna untuk penyelidikan ini.

Teristimewa ditujukan kepada suami tercinta En Ratuah Mohammed kerana dorongan dan kerjasama yang begitu banyak dicurahkan dalam menyiapkan tesis ini. Juga diabadikan tesis ini untuk anak-anak tersayang M. Amirul Haziq dan Nurul Hazimah . Tidak ketinggalan untuk keluarga yang turut mendoakan kejayaan ini.



ISI KANDUNGAN

Muka surat

PENGHARGAAN.....	ii
SENARAI JADUAL.....	v
SENARAI RAJAH.....	vi
SENARAI PLAT.....	viii
SENARAI SINGKATAN PERKATAAN.....	ix
ABSTRAK.....	x
ABSTRACT.....	xiii
BAB	
1 PENGENALAN.....	1
II KAJIAN BAHAN BERTULIS.....	7
Mekanisme penghasilan antibodi dalam haiwan.....	7
Kelemahan menggunakan antibodi poliklon sebagai reagen serologi.....	9
Kajian awal untuk mendapatkan antibodi homogenus serta konsep penghibridan sel somatik.....	10
Prinsip pemilihan barisan sel miloma.....	17
Agen-agen perlakuran.....	20
Prinsip pemilihan medium pemilih.....	22
Perbandingan di antara antibodi monoklon dan antibodi poliklon.....	24
Kespesifikan.....	27
Keafinan antibodi poliklon dan monoklon.....	28
Kebolehan dihasilkan semula.....	29
Hasil dan ketulinan.....	30
Kos.....	30
Perihal antigen yang dikaji.....	31
Fisiologi tiroid.....	31
Patologi tiroid.....	34
Pengesanan hormon tiroid dan masalahnya.....	37
III BAHAN DAN KAEDAH.....	41
Pengkongjugatan hormon 3,3'5, 5'-L- Thyroxine (T ₄).....	41
Haiwan ujian.....	42
Pengimunan mencit.....	42
Penghasilan antibodi monoklon.....	43
Pengkulturan sel miloma.....	43
Penyediaan ampaian sel limpa.....	44



Muka surat

Pengoptimuman parameter perlakuan sel.....	45
Perlakuan sel dengan polietilena glikol yang berbeza jenama dan berat molekul.....	45
Kesan suhu ke atas pembentukan koloni hibridoma.....	46
Kesan kepekatan PEG yang berbeza ke atas pembentukan koloni hibridoma.....	47
Kesan kepekatan sel selepas perlakuan ke atas pembentukan koloni hibridoma dan penghasilan koloni positif.....	47
Pemilihan sel hibridoma selepas perlakuan.....	48
Pengklonan hibridoma menggunakan teknik pencairan terhadap.....	48
Penyimpanan hibridoma positif.....	49
Pengasaan antibodi.....	50
Penentuan titer antiserum.....	50
Pengasaan antibodi monoklon dan penentuan titer supernatan hibridoma.....	51
Penentuan kelas dan subkelas imunoglobulin.....	52
IV HASIL DAN PERBINCANGAN.....	53
Pengkongjugatan antigen dan pengimunan haiwan.....	53
Titer antiserum.....	56
Pengkulturan sel miloma.....	58
Kajian pengoptimuman parameter penghasilan hibridoma.....	58
Koloni hibridoma yang menghasilkan antibodi monoklon terhadap hormon T ₄	70
Pengklonan hibridoma positif.....	76
Penentuan nilai titer supernatan klon 3HI dan 4HI.....	80
Pengkelasan imunoglobulin.....	80
V KESIMPULAN.....	84
RUJUKAN.....	87
APENDIKS.....	97
VITA.....	117



SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
1	Senarai barisan sel miloma yang digunakan dalam penghasilan hibridoma.....	19
2	Perbandingan di antara antibodi poliklon dan antibodi monoklon.....	26
3	Peratus viabiliti sel miloma NS-1 selepas 5 hari pengkulturan.....	60
4	Bilangan telaga yang positif terhadap anti T ₄ pada kepekatan sel yang berbeza selepas 12 hari pengkulturan.....	72
5	Bilangan sel per telaga yang mengandungi koloni yang positif terhadap protein pembawa ASM.....	75
6	Peratus koloni positif terhadap antibodi anti T ₄ dalam supernatan hibridoma selepas beberapa tahap pengklonan.....	78
7	Kesan berat molekul dan sumber polietilena glikol yang berbeza ke atas pembentukan koloni hibridoma.....	107
8	Kesan suhu ke atas pembentukan hibridoma.....	107
9	Kesan kepekatan PEG ke atas pembentukan koloni hibridoma.....	108
10	Keboleh ulangan kecekapan penghasilan hibridoma menggunakan PEG Merck (1000) pada suhu 37°C dan kepekatan PEG 50%.....	108
11	Ketumpatan optik supernatan T ₄ yang positif pada pengklonan pertama.....	109
12	Ketumpatan optik supernatan hibridoma T ₄ yang positif pada pengklonan kedua.....	111
13	Ketumpatan optik supernatan hibridoma T ₄ positif pada pengklonan ketiga.....	113
14	Nilai ketumpatan optik supernatan hibridoma T ₄ yang positif pada tahap pengklonan keempat.....	115



SENARAI RAJAH

Rajah		Muka surat
1	Skema ringkas kaedah penghasilan antibodi monoklon.....	15
2	Tapak jalan utama dan tapak jalan sisi biosintesis purina dan pirimidina dengan menunjukkan tapak-tapak perencatan oleh aminopterin.....	25
3	Peningkatan titer antibodi anti T ₄ pada cabaran berbeza dalam serum yang disuntik dengan konjugat T ₄ -ASM.....	57
4	Peningkatan titer antibodi anti ASM pada cabaran pertama dan ketiga dalam serum yang disuntik dengan konjugat T ₄ -ASM.....	59
5	Kepekatan sel/ml semasa pengkulturan di dalam tabung kultur 25 cm ³	62
6	Kesan berat molekul dan PEG berbeza ke atas pembentukan koloni hibridoma pada kepekatan 30% PEG dan suhu perlakuan 30°C.....	65
7	Kesan suhu ke atas pembentukan koloni hibridoma.....	67
8	Kesan kepekatan PEG berbeza ke atas pembentukan koloni hibridoma.....	69
9	Keboleh ulangan kecekapan penghasilan hibridoma menggunakan 50% PEG (Merck, 1000 dalton) pada suhu perlakuan 37°C.....	71
10	Titer supernatan klon 3H1 terhadap T ₄ , T ₃ dan ASM.....	81
11	Titer supernatan klon 4HI terhadap T ₄ , T ₃ dan ASM.....	82
12	Titer terhadap pengkelasan Imunoglobulin dalam supernatan klon 4HI.....	83



Rajah		Muka surat
13	Carta alir kaedah AIJBE tak langsung.....	104
14	Carta alir kaedah AIJBE tak langsung untuk penentuan molekul antibodi.....	105
15	Penentuan kelas dan subkelas imunoglobulin dengan kaedah AIJBE tak langsung.....	106



SENARAI PLAT

Plat		Muka surat
1	Barisan sel miloma NS-1 pada peringkat fasa log.....	61
2	Koloni hibridoma yang muncul selepas 5 hari perlakuran.....	64



SENARAI SINGKATAN PERKATAAN

HPT	: Hormon peransang tiroid
ASM	: Albumin serum manusia
ARI	: Asai radioimun
ELISA	: Enzyme-Link Immuno Absobent Assay
PEG	: Polietilina glikol
DMSO	: dimetilsulfoxida
HAT	: Hipoxantina, Aminopterina dan timidina
HPRT	: Hipoxantina Fosforibosil transferase
TK	: Timidina kinase
ANS	: 8-Anilino-1-Naphtalene sulfurik
AEI	: asai enzim imun
AIJBE	: Asai imun jerapan berpaut enzim
EDKH	: 1-Etil-3(3-dimetilaminopropil)-Karbodimida hidroklorida
SAL	: Serum anak lembu
PFS-T	: Penimbal fosfat salin-Tween
PNF	: p. nitrofenil fosfat



Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Pertanian Malaysia sebagai memenuhi syarat untuk mendapat Ijazah Master Sains.

PENGHASILAN HIBRIDOMA YANG MEREMBESKAN ANTI MONOKLON TERHADAP HORMON TIROID (T_4)

Oleh

SITI ROMLAH BTE YAHYA
MEI, 1994

Pengerusi : Dr. Abdul Manaf Ali

Fakulti : Sains Makanan & Bioteknologi

Pengimunan hormon T_4 yang dikongugatkan dengan molekul albumin serum manusia (ASM) telah dilakukan dengan menyuntik 100 $\mu\text{g/ml}$ hormon tersebut ke atas mencit balb/c. Didapati selepas cabaran kelima, mencit tersebut telah menghasilkan antibodi terhadap hormon T_4 dengan titer sebanyak 640. Sel limpa yang telah diimunkan dilakurkan dengan sel miloma NS-1.

Untuk mendapat parameter kecekapan perlakuran yang optimum, maka beberapa kajian telah dilakukan. Kajian tersebut meliputi kesan jenama dan berat molekul Polietilina glikol (PEG), suhu semasa perlakuran dan kepekatan PEG telah dilakukan. Hasil yang diperolehi



didapati parameter optima bagi proses perlakuan adalah menggunakan PEG jenama Merck yang mempunyai berat molekul 1000 (D) dalton yang berkepekatan 50% dan suhu semasa perlakuan adalah 37°C. Dengan menggunakan ketiga-tiga parameter tersebut, sebanyak lima kali perlakuan dilakukan dan didapati koloni hibridoma yang terhasil mencapai sehingga 95%. Oleh yang demikian, parameter yang optima ini digunakan untuk melakurkan sel miloma NS-1 dan limfosit B mencit yang telah diimunkan dengan T₄-ASM. Didapati pada kepekatan 2.7 x 10⁶ sel per telaga, hibridoma positif yang terhasil adalah sebanyak 2.5%, 5.4% dan 1.03% untuk setiap kali perlakuan. Sementara pada kepekatan sel 8.25 x 10⁵, 5.5 x 10⁵ dan 1.38 x 10⁵ per telaga hibridoma yang terhasil tidak menghasilkan antibodi terhadap hormon T₄.

Hibridoma yang positif telah diklonkan kepada 10, 3 dan 1 sel per telaga. Didapati kepekatan sel per telaga mempengaruhi kecekapan jangkamasa untuk mendapat hasil asai yang positif. Kepekatan 10 sel per telaga didapati memberi asai positif yang lebih cepat iaitu pada minggu pertama pengkulturan berbanding dengan kepekatan 3 dan 1 sel per telaga.

Pengklonan 1 sel per telaga telah dilakukan sebanyak empat kali dan didapati setiap kali pengklonan dapat menghasilkan 50%, 70%, 80% dan 70% koloni hibridoma yang positif. Kajian terhadap antibodi yang terhasil dalam supernatan hibridoma yang telah



diklonkan sebanyak tiga dan empat kali telah dilakukan dan pada pengklonan yang ketiga, titer supernatan terhadap hormon tiroksin (T_4), triiodotironin (T_3) dan ASM adalah 320, 80 dan 160. Walau bagaimanapun pada pengklonan yang ke empat didapati hibridoma ini tidak menghasilkan antibodi terhadap T_3 dan memberikan titer terhadap T_4 sebanyak 160 dan 80 terhadap ASM. Pengujian kehadiran kelas imunoglobulin juga telah dilakukan dan didapati supernatan klon 4H1 menghasilkan imunoglobulin jenis G kelas I.



Abstract of thesis submitted to the Senate of Universiti Pertanian Malaysia in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science.

**PRODUCTION OF HYBRIDOMA SECRETED MONOCLONAL ANTIBODIES
AGAINST THYROXINE HORMONE (T_4)**

By

SITI ROMLAH BTE YAHYA
MEI, 1994

Chairman : Dr. Abdul Manaf Ali

Faculty : Food Science and Biotechnology

Balb/c mice were immunised with 100 μ g/ml of human serum albumin (HSA) conjugated T_4 hormone. After the fifth booster shot, the mouse antibody titres reached a level of 640. The sensitized spleen cells were then fused with NS-1 myeloma cells.

Few studies regarding optimisation of fusion have been carried out; these included the brand, the molecular weight as well as the concentration of polyethylene glycol (PEG) that was being used during fusions. The optimum temperature for fusion was also studied. The results shown that best fusion was produced when using 50% PEG with a molecular weight of 1000 Dalton obtained from Merck at 37°C. A total of 95 % hybridoma clones were obtained when the above parameters were used during fusion.



Mouse lymphocytes which were sensitized with T₄-HSA were then fused with NS-1 myeloma cells three times. The percentage of positive hybridoma was 2.5 %, 5.4 % and 1.03 % for each fusion respectively, when the cell concentration is 2.7 x 10⁶ cells per well. However, for cell concentration of 8.25 x 10⁶, 5.5 x 10⁵ and 1.38 x 10⁵ cells per well, the hybridoma that was produced did not secrete any antibody that reacted against the T₄ hormone.

A positive hybridoma was then cloned at ten cells, three cells and single cell per well. The concentration of cells in each well during cloning influenced the duration for achieving positive screening.

Single cell cloning was performed four times. The percentages of positive hybridoma clones obtained were 50 %, 70 %, 80 % and 70 % for cloning steps 1, 2, 3 and 4. The antibody that produced during the third and fourth cloning were selected for further studies. For the third cloning, the antibody titres obtained when reacted against T₃, T₄ and ASM were 320, 80 and 160. For the fourth cloning, the titers against T₄ and ASM were 160 and 80. However, no cross reaction obtained was observed when they were screened against T₃. A determination of immunoglobulin classes was also being carried out for clone 4H1 and has been shown to secrete gamma immunoglobulin class 1.



BAB 1

PENGENALAN

Gerakbalas imun yang tipikal bagi suatu antigen tertentu menyebabkan penghasilan suatu spektra antibodi yang luas terdiri dari pelbagai kelas, afiniti dan spesifisiti bagi determinan yang terdapat pada antigen (Sinkovics & Dreeman, 1983; Brock dan Madigan, 1988). Antibodi yang diarahkan kepada suatu determinan yang khusus akan hanya mewakili suatu bahagian yang kecil jumlah takungan antibodi.

Antiserum yang mengandungi campuran antibodi begini bagi suatu antigen tertentu dipanggil antiserum poliklon. Antibodi poliklon ini telah digunakan dengan meluasnya terutama untuk tujuan diagnostik, mengesan mikroheterogenesiti sesuatu protin yang terhasil daripada rekombinan dan mutasi somatik dan juga penting dalam mengelaskan mikroorganisma (Yelton & Scharff, 1980; Scharff *et al.*, 1981; Campbell, 1984).

Walau bagaimanapun penggunaan antibodi poliklon menjadi terhad disebabkan terdapat berbagai-bagai masalah yang sukar diatasi seperti ketidakseragaman pada kuantiti, kualiti dan affiniti yang spesifik terhadap suatu antigen (Kohler & Milstein, 1975; Campbell, 1984). Keadaan ini berlaku disebabkan oleh antibodi yang terdapat di dalam antiserum adalah dirembeskan oleh klon sel B yang tidak



terhad jumlahnya. Walaupun kaedah penyediaan antigen dan kacukan haiwan yang sama digunakan, limfosit B masih mengecam tapak determinan antigenik yang berbeza (Pollock *et al.*, 1984). Ketidakteragaman yang berlaku diantara sel haiwan dengan satu haiwan akan menyebabkan pencerapan diantara satu makmal dengan makmal yang lain adalah tidak piawai (Yelton & Scharff, 1980). Walau bagaimanapun masalah yang paling utama berkaitan dengan antibodi poliklon adalah rangsangan untuk menghasilkan antibodi yang sama tidak boleh dihasilkan semula sekiranya antiserum tersebut telah kehabisan. Tambahan pula sekiranya determinan antigen yang dikenalpasti oleh satu daripada banyak antibodi itu hilang, maka kehilangannya tidak dapat dikesan disebabkan oleh sejumlah besar antibodi yang hadir masih boleh bergabung dengan antigen tersebut (Scharff *et al.*, 1981; Pollock *et al.*, 1984; Campbell, 1984).

Dengan ini, beberapa pengguna di dalam bidang perubatan dan penyelidikan amat mengharapkan supaya didapatkan antibodi yang mempunyai kespesifikan yang tunggal. Secara teori, ianya adalah mungkin untuk memencilkan suatu sel tunggal limfosit yang berupaya menghasilkan antibodi dan menumbuhkannya dalam kultur sel. Ini berdasarkan teori pemilihan klon yang dikemukakan oleh Burnet (1959) yang mengatakan bahawa sel khusus (di dalam suatu populasi sel) bergerakbalas terhadap suatu antigen yang spesifik dengan cara mengikat determinan antigen itu dengan reseptor permukaan permukaan sel spesifik pra-ujud. Pengikat ini menggalakan proliferasi sel ini untuk membentuk peningkatan sel yang bergerak balas terhadap antigen

spesifik tersebut. Sebahagiannya mensentesis antibodi manakala sebahagian yang lain bertindak sebagai sel ingatan yang boleh menghasilkan antibodi dengan pendedahan yang sama pada masa akan datang. Struktur tapak spesifik terhadap penentu antigen pada permukaan sel B hanya akan membenarkan perlekatan pada satu tapak antigen sahaja. Sel ini seterusnya akan membentuk sel-sel yang seiras. Begitu juga dengan sel-sel B yang lain. Setiap klon sel B akan mensentesis molekul antibodi yang mempunyai kespesifikan yang berbeza (Freshney, 1986). Namun begitu paras antibodi yang tinggi hanya akan terhasil terhadap tapak penentu antigen sahaja. Tapak penentu yang merangsang pembinaan populasi antibodi yang tinggi sekali ini dikenali sebagai kumpulan imunodominan (Ghazali, 1988).

Walau bagaimanapun, bagi sebab-sebab yang tidak diketahui, limfosit yang normal tidak mudah untuk ditumbuhkan dan dijaga dalam kultur sel kerana masa hayatnya adalah terlalu pendek.

Namun begitu, limfosit B boleh dilakurkan dengan sel miloma (tumor) untuk menghasilkan warisan sel B yang tumbuh di dalam kultur dan masih mengekalkan keupayaan menghasilkan antibodi. Teknik perlakuan sel B dan miloma ini dikenali sebagai teknik hibridoma (Kohler & Milstein, 1975).

Antibodi yang terhasil oleh satu klon hibridoma adalah seragam dan spesifik terhadap satu epitop antigen sahaja dan setiap hibrid berupaya untuk meningkatkan pengeluaran antibodi homogenus dalam

amaun yang tidak terhad. Antibodi homogenus merupakan suatu reagen serologi yang piawai dalam kegunaan imunoassai dan imunodiagnosa di makmal-makmal penyelidikan dan perubatan.

Oleh yang demikian, teknologi hibridoma banyak memperkembangkan kegunaan dan penggunaan imunoassai serta mempertingkatkan potensi imunodiagnostik secara *in vitro* (French et al., 1986).

Walaupun teknik hibridoma sudah berkembang dengan meluasnya tetapi penghasilan antibodi terhadap haptan atau molekul kecil masih terhad. Hormon tiroid 3,3',5-L-triiodotironin (T_3) dan 3,3',5,5'-tetraiodotironin (T_4) adalah contoh molekul haptan. Kedua-dua molekul hormon tiroid adalah merupakan iodotironin aktif yang dirembeskan oleh kelenjar tiroid. (Graham, 1977; Guyton, 1981; Thomson, 1981). Dari segi perubatan, hormon tiroid merupakan hormon yang penting dalam perkembangan fisiologi bermula dalam kandungan lagi (Greenspan & Rapport, 1983). Penilaian kepekatan hormon tiroid adalah satu pengukuran yang penting dalam menentukan gangguan fungsi tiroid. Ia membolehkan diagnosis penyakit-penyakit hipertiroidisma atau eutiroidisma dan hipotiroidisma (Chopra, 1972; Larsen et al., 1973, Soppi et al., 1990). Dalam hal ini antibodi terhadap hormon ini telah digunakan dengan meluas untuk diagnosis paras hormon T_4 dan T_3 dalam serum pesakit (Delves et al., 1993). Walau bagaimanapun ketidakseragaman yang disebabkan oleh kehadiran heteroantibodi dalam serum yang diperolehi secara konvensional menyebabkan sistem

penghasilan tidak piawai. Antibodi monoklon daripada hibridoma adalah satu cara untuk mengatasi masalah yang berkaitan (Campbell, 1984; Kohler dan Milstein, 1975). Oleh itu adalah sangat perlu diperolehi antibodi monospesifik terhadap hormon tiroid untuk menentukan kejayaan diagnosis penyakit-penyakit yang berkaitan dengan gangguan kelenjar tiroid.

Maka berdasarkan kepentingan tersebut, projek ini dijalankan dengan objektif yang disebut di bawah:

1. Penentuan kejayaan pengkonjugatan hormon T_4 dengan protein pembawa.
2. Mengkaji beberapa parameter yang sesuai untuk proses perlakuan dalam usaha untuk mendapatkan peratus penghasilan koloni hibridoma yang dikehendaki semaksima yang mungkin.
3. Mengklonkan hibridoma yang berpotensi menghasilkan antibodi yang dikehendaki dan dibekukan sebagai stok simpanan untuk rujukan.
4. Melakukan pencirian terhadap antibodi monoklon yang diperolehi daripada hibridoma dimana antibodi ini dimasa hadapan boleh digunakan sebagai satu reagen serologi di dalam mengdiagnosis penyakit yang berhubung dengan gangguan fungsi tiroid.

Apa yang menjadi harapan dalam projek ini ialah perlakuan untuk mendapatkan hibridoma yang menghasilkan antibodi monoklon terhadap hormon tiroid berjaya diperolehi dan seterusnya antibodi ini boleh digunakan sebagai satu sumber rujukan untuk menentukan keberkesanan diagnosa paras hormon tiroid dalam serum pesakit.

BAB 11

KAJIAN BAHAN BERTULIS

Mekanisme penghasilan antibodi dalam haiwan

Setiap haiwan berkebolehan untuk mengenali dan boleh membezakan molekul asing yang dipanggil antigen. Pengenalan dan pembezaan yang berlaku melibatkan gerakbalas imun yang terdiri daripada dua jenis iaitu tindakbalas humoral atau gerakbalas antibodi perantara dan tindakbalas selular atau gerakbalas perantara sel (Weir, 1984; Randerson et al., 1984). Keunikan dalam gerakbalas imun adalah sifat heterogen gerakbalas tersebut. Berbagai jenis sel dan hasil sel dikeluarkan oleh perumah semasa berlaku gerakbalas terhadap bahan asing yang memasuki tubuhnya. Sel-sel yang beraneka jenis pula akan bertindakbalas untuk menghasilkan hasil-hasil seperti antibodi dan limfosit sensitif yang bersifat heterogen. Sel limfosit terdiri daripada dua jenis iaitu limfosit B yang menghasilkan gerakbalas humoral dan limfosit T yang menghasilkan gerakbalas imun sel perantara. Kedua-dua jenis sel limfosit ini mengenali dan bertindakbalas dengan antigen melalui reseptor yang bersesuaian dengan antigenik determinan atau epitop yang berbeza. Terdapat juga limfosit yang telah sedia mempunyai reseptor bersesuaian daripada genetik dan limfosit ini dapat programkan gerakbalas imun terhadap

epitop dan dapat menghasilkan klon-klon yang seiras dengan melakukan pembezaan dan pembahagian (Brock & Madigan, 1984). Sel T berkepentingan dalam membebaskan protienpelarut seperti lymphokin dan interleukin yang mengaktifkan pembahagian limfosit B untuk membentuk klon sel B yang berupaya untuk menghasilkan molekul antibodi yang seiras (Roitt, 1980). Limfosit B berfungsi sepenuhnya dalam penghasilan antibodi. Antibodi adalah sejenis protien yang mempunyai ciri-ciri biokemikal yang berbeza yang kebanyakannya dijumpai di dalam darah iaitu 20% daripada berat keseluruhan protien plasma darah. Selain daripada itu antibodi juga sering dijumpai di atas permukaan sel B. (Randerson et al., 1984).

Kewujudan 'ingatan' imunologi dalam sel-sel limfosit juga merupakan satu ciri yang istimewa dalam gerakbalas imun di mana pembentukan antibodi terjadi apabila berlaku pertemuan dengan bahan asing yang sama bagi kali kedua dan seterusnya akan menyebabkan sel-sel limfosit membahagi dengan kadar yang cepat iaitu lebih cepat daripada pembahagian atau pembezaan yang dialami semasa pertemuan dengan bahan tersebut bagi kali pertama (Roitt, 1980). Sel B yang aktif membahagi, dalam beberapa hari akan bertukar menjadi sel plasma yang mempunyai kespesifikan yang tinggi yang mana setiapnya akan mensintesis dan membebaskan imunoglobulin yang berbeza dari segi kesensitifan dan keafinan dengan jumlah yang banyak secara genetik (Mc Connel et al., 1981). Sel plasma mempunyai masa hayat yang pendek iaitu kurang daripada satu minggu sebaliknya sel ingatan atau sel limfosit B mempunyai masa hayat yang panjang dan pendedahan

kedua kepada antigen menyebabkan sel tersebut mengalami transformasi dengan cepat kepada sel plasma dan mula mendedahkan antibodi ke dalam aliran darah. Penghasilan antibodi dengan keadaan semulajadi sebegini dalam sesuatu haiwan adalah penghasilan antibodi poliklon.

Kelemahan menggunakan antibodi poliklon sebagai reagen serologi

Memang tidak dapat dinafikan bahawa ahli-ahli serologi selalunya mengalami kesukaran apabila menggunakan antibodi poliklon. Kesukaran ini timbul pada tahap yang berbeza (Scharff et al., 1981). Pertamanya dari segi kebolehan untuk mendapatkan antibodi yang sama terhadap determinan antigenik yang sama apabila antiserum telah kehabisan (Pollock et al., 1984; Prince, 1985). Gerakbalas yang berlaku didapati terlalu sukar untuk diramalkan samada determinan antigenik yang diberikan akan menghasilkan gerakbalas imun yang kuat atau sebaliknya walaupun telah terbukti bahawa pendedahan terdahulu memberikan gerakbalas imun yang kuat (Yelton & Scharff, 1980). Keadaan ini berlaku adalah disebabkan oleh kuantiti dan kualiti antibodi yang dihasilkan selalunya berbeza daripada sel haiwan dengan haiwan yang lain dan juga berlaku perbezaan titer daripada satu pendarahan dengan pendarahan yang lain pada haiwan yang sama. Titer yang berbeza ini menyebabkan timbulnya perbezaan lapuran diantara satu makmal dengan makmal yang lain terhadap antigen yang sama. (Halk & De Boer, 1985). Kedua, walaupun antigen yang tulen digunakan, tetapi masih berlaku kontaminasi dengan imunoglobulin hos (Campbell, 1984) dan kompenan minor pada antigen (Scharff et al.,

1981; Prince, 1985). Ketiga, masalah penggunaan antibodi poliklon daripada antiserum semakin ketara disebabkan oleh antibodi tersebut adalah heterogenus iaitu antibodi yang terdiri daripada berbagai kelas dan subkelas yang berbeza terhadap sesuatu antigen. Keadaan ini menyebabkan antibodi didalam antiserum berbeza dari segi aglutinasi dan pemendakan dengan antigen atau komplemen juga menyebabkan berlakunya tindakbalas silang antara determinan antigeniknya (Campbell, 1984). Masalah juga timbul sekiranya determinan antigenik yang telah dicamkan oleh satu daripada jumlah takungan antibodi itu hilang, maka kehilangannya tidak dapat dikesan di sebabkan oleh sejumlah besar antigen masih boleh bergabung dengan antigen tersebut (Pollock et al., 1984). Masalah terakhir adalah disebabkan oleh antiserum yang mengandungi antibodi heterogenus yang terhad. Keadaan aaman antibodi yang terhad menjadi semakin ketara apabila antiserum terpaksa ditulinkan untuk mengeluarkan antibodi yang bertindakbalas silang (Campbell, 1984).

Kajian awal untuk mendapatkan antibodi homogenus serta konsep penghibridan sel somatik

Berikutan daripada berbagai masalah yang timbul akibat menggunakan antibodi poliklon maka ahli imunologi telah berusaha untuk mendapatkan antibodi monoklon yang dijangkakan dapat mengatasi masalah-masalah yang berkaitan dengan antibodi poliklon dan sebagainya.