บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

โคเลสเตอรอล (Cholesterol, Sigma C1145)

โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA, Sigma A2153)

โซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต-12-ไฮเดรท (sodium hydrogen phosphate-hydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$, Riedel-de Haen 30414)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, KCl, Riedel-de Haen 31248)

ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, Merck Art.4873)

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, Fluka Biochemical)

โซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium hydrogen phosphate-7-hydrate, $Na_2HPO_4.7H_2O$, Fluka Biochemical)

Freund's complete adjuvant (Sigma, E-5881)

คลอโรฟอร์ม (chlorofrom, J.T. Baker)

อีเทอร์ (ether, J.T. Baker)

O-phenylene-diamine-HCL (Zymed Laboratoriees, Inc. USA)

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDPC, Sigma E-6383)

N,N-dimethylformamide (Sigma, D-4254)

เมธานอล (methanol Absolute, J.T. Baker)

โซเดียม ไฮโดรเจน คาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, Riedel-de Haen 31437)

เจลาติน (gelatin, Merck Art.4070)

ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต โมโนไฮเดรท (disodium hydrogen phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.H_2O$, Merck Art.6345)

ซิตริค แอซิด (citric acid, Sigma C2270)

เฟอริก คลอไรด์ (Ferric chloride-6-hydrate, $FeCl_3.6H_2O$, J.T. Baker)

เกลเชียล อะซีติค แอซิด (glacial acetic acid, J.T. Baker)

polyethylene sarbitan mionolaurate (Tween 80, Sigma P-1754)

ซัลฟูริค แอซิด (sulfuric acid, J.T. Baker)

Iscove 's Modified Dulbecco's medium (GIBCOBRL, Cat. No. 12200-028, Life Technology)

Fetal calf serum (Seromed, Cat. No. S0213)

2-Mercaptoethanol (Sigma, M6250)

Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (GIBGOBRL, Cat. No. 31062-011, Life Technology)

Hypoxanthine (Sigma, H9377)

Thymidine (Sigma, T5018)

Polyethylene glycol (PEG, Sigma P3640)

Dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Art. 802912)

2, 6, 10, 14-tetramethyl Pentadecane (Pristane; Sigma, T7640)

gentamycin injection (Roussel Laboratories)

Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Whole molecule, Sigma, A3673)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) แบบ UV-Visible โมเดล DU® Series 7000 บริษัท Beckman Instruments, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-500 GE บริษัท Labinco

เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (centrifuger) โมเดล Mistral 3000 บริษัท MSE Co. ประเทศอังกฤษ

เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 4 ตำแหน่ง) โมเดล 2842 บริษัท Sartorius GmBH ประเทศเยอรมัน

เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL Type 3015 บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik m.b. H&Co. ประเทศเยอรมัน

ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 5000, 1000, 200, 100 และ 50 ไมโครลิตร Pipetman บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส

Dialysing tube (ไม่ให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 12,000-14,000 ขึ้นไปผ่าน) บริษัท Viskase ประเทศสหรัฐอเมริกา

หลอดทดลองขนาด 10x75, 100x150 มม.

เครื่อง microplate reader (Anthos, vertion 2010) บริษัท Anthos Labtech Instument. ประเทศออสเตรีย

เครื่อง microperpex Peristaltic Pump 1 เครื่อง

Column chromatography ขนาด 1.6x30 ซม.

3-way stopcock บริษัท Nipro Medical Industry Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

ไมโครเพลท 96 หลุม (Microplate) แบบ Nunc-Immuno™ Plate บริษัท Nalge Nunc International. ประเทศเดนมาร์ก

Cavitator ultrasonic cleaner บริษัท Mettler Electronics Corperation ประเทศเยอรมัน; เข็มเบอร์ 20 (20G x 11/2 inch) Nipro®

หลอดฉีดยา ขนาด 5 มล; dryer National® ประเทศไทย

จานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5ซม.

เครื่อง fraction collector 1 เครื่อง

แผ่นกรองสาร (filter membrane) แบบ Supor membrane โมเดล Supor-200 บริษัท GelmanScience ประเทศเยอรมัน ขนาดรูที่กรองของเหลว 0.2 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มม.

กรวย filtration assembly บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ประกอบเข้ากับ side-arm flask (Sigma Z29, 048-3) ขนาด 1 ลิตรต่อเข้ากับเครื่องสูญญากาศ (vacuum) ชนิด MEDI-PUMP Model 1132D บริษัท Thomas Industries Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) Model 3194 S/N 35305-397 บริษัท Forma Scienctific Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

หลอดทดลองขนาด 15 และ 50 มล. (Polypropylene tube)

Culture plate 96 หลุม บริษัท Nalge Nunc International. ประเทศเดนมาร์ก

กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Olympus, CK2)

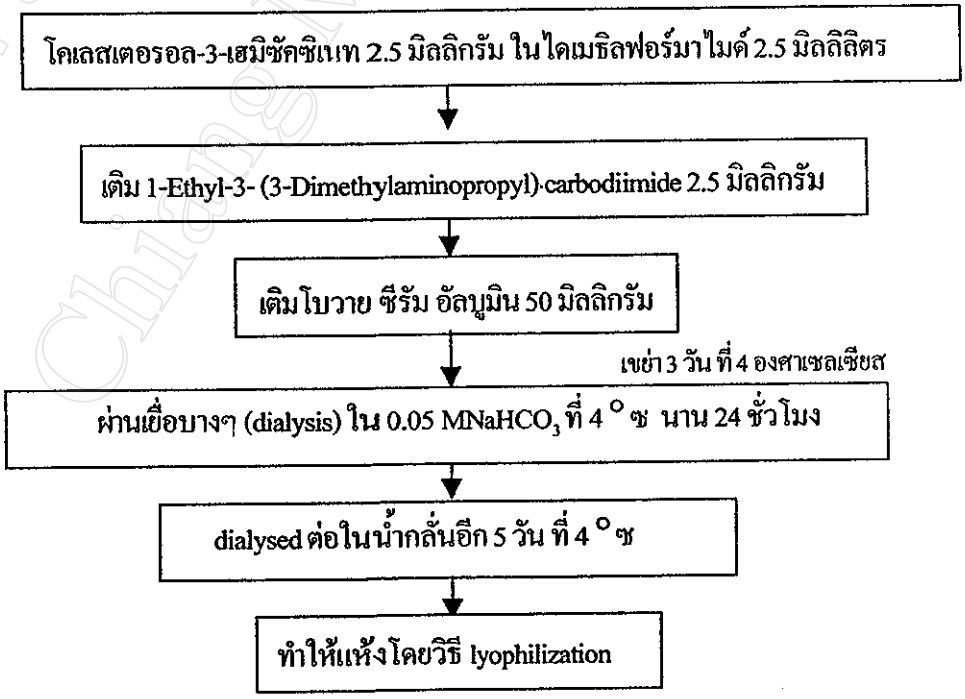
3.2 สัตว์ทดลอง

หนูตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c อายุ 6-8 สัปดาห์ ทั้งเพศผู้และเพศเมียประมาณ 30 ตัว

3.3 การเตรียมแอนติเจนและกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอล

3.3.1 การเชื่อมโคเลสเตอรอลกับโบวาย ซีรัม อัลบูมิน

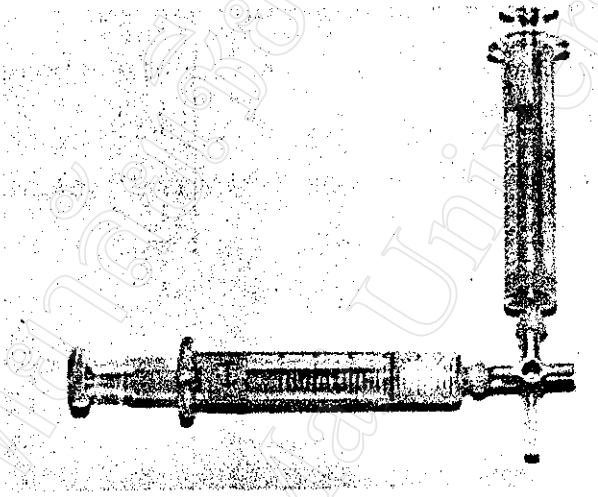
การเชื่อมโคเลสเตอรอลกับโบวาย ซีรัม อัลบูมิน (เตรียมโดย รศ.เพทาย พงษ์เพียจันทร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) โคเลสเตอรอล-3-เฮมิซัคซิเนท (Cholesterol-3-HS) 25 มิลลิกรัม ในไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-Dimethyl-formamide) 2.5 มิลลิลิตร ปั่นนาน 20 นาที เติม 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide 2.5 มิลลิกรัม ในน้ำ 2.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมโบวาย ซีรัม อัลบูมิน 50 มิลลิกรัมที่ละลายใน PBS 2.5 มิลลิลิตร เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นแยกสารที่ไม่ต้องการออกจากแอนติเจนที่เตรียมได้โดยผ่านเยื่อบาง ๆ (dialysis) ที่ไม่ให้สารน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 12,000 ดาลตัน ผ่านใน 0.05 M $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง dialysed ต่อในน้ำกลั่นอีก 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization คำนวณการเกาะติด Cholesterol-3-HS กับ BSA ตามวิธีการของ Erlanger *et al.* (1959) ได้เท่ากับ 17.3 : 1 (ภาพที่ 3-1.)



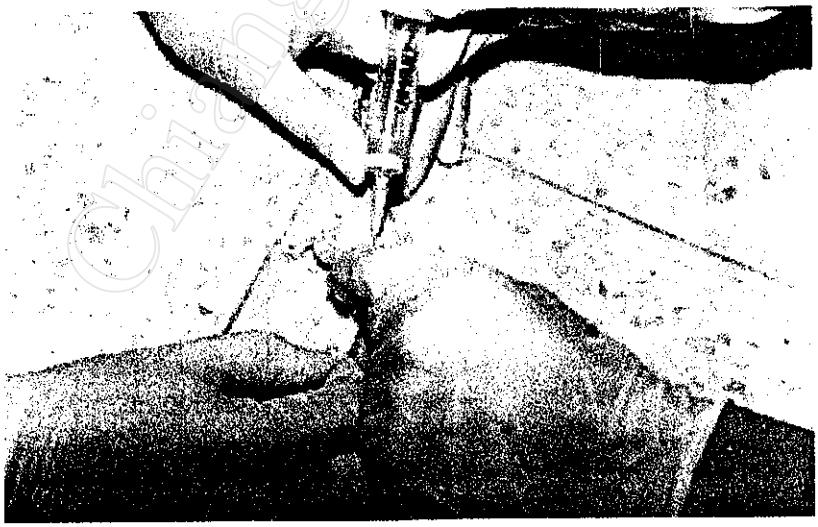
ภาพที่ 3-1. ขั้นตอนการเชื่อมโคเลสเตอรอลกับโบวาย ซีรัม อัลบูมิน.

3.3.2 กระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู

โคเลสเตอรอล-3-BSA 500 ไมโครกรัมละลายใน PBS 500 ไมโครลิตร ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) 100 ไมโครลิตรใส่สารทั้งหมดลงในกระบอกฉีดยาที่ต่อกัน 3 ทางและกระบอกฉีดยาอีกอันหนึ่ง ดันกระบอกฉีดยากลับไปมาประมาณ 100 ครั้ง จนได้สารละลายสีขาวขุ่นวิธีการนี้เรียกว่าการ homogenization แล้วจึงนำไปฉีดหนู Blab/c จำนวน 5 ตัว ตัวละ 200 ไมโครลิตร ทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งหนูมีภูมิคุ้มกันซึ่งสามารถตรวจสอบไตเตอร์ (titre) โดยวิธี ELISA (ภาพที่ 3-2 และ 3-3)



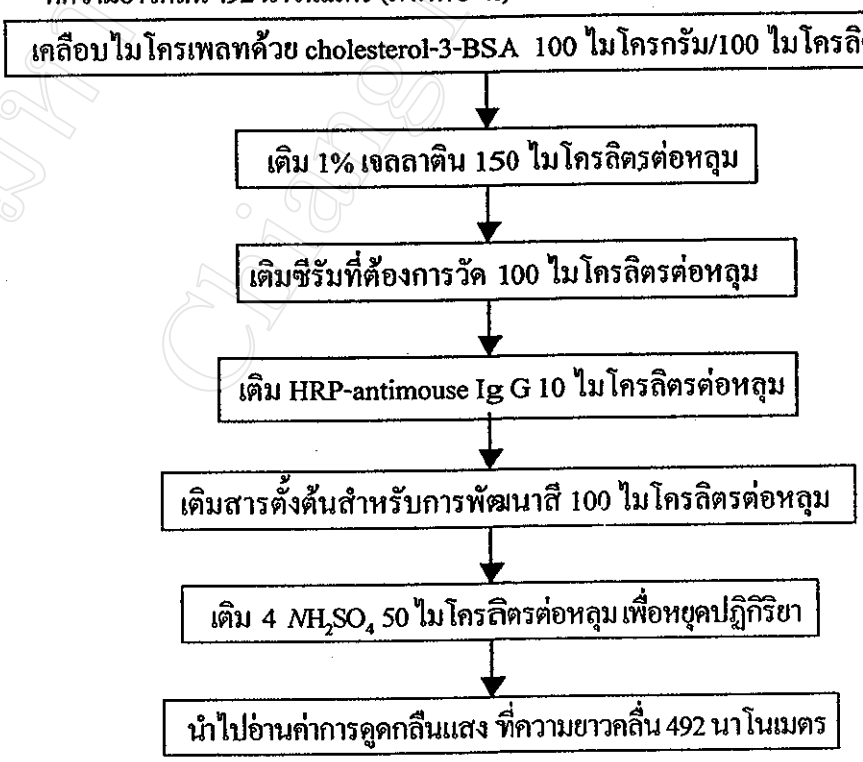
ภาพที่ 3-2. แสดงการเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยวิธี homogenization.



ภาพที่ 3-3. แสดงการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู Balb/c.

3.3.3 การวัดระดับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลด้วยวิธี Indirect ELISA

เริ่มจากนำไมโครเพลทมาแบ่งเป็น 2 ด้าน คอลัมน์ที่ 1-5 เติมโคเลสเตอรอล-3-BSA 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตรส่วนคอลัมน์ที่ 7-11 เติม BSA 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์บ่มไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer) 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุม 3 รอบใช้ dryer เป่าเพลทให้แห้ง เติม 1 % gelatine ทุกหลุม ในปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่า เพลทให้แห้ง เติม sample ที่ต้องการหาค่า จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำเข้าตู้อบ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 5 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมสารตั้งต้นการพัฒนาสี (ภาคผนวกที่1) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4*N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (ภาพที่ 3-4.)



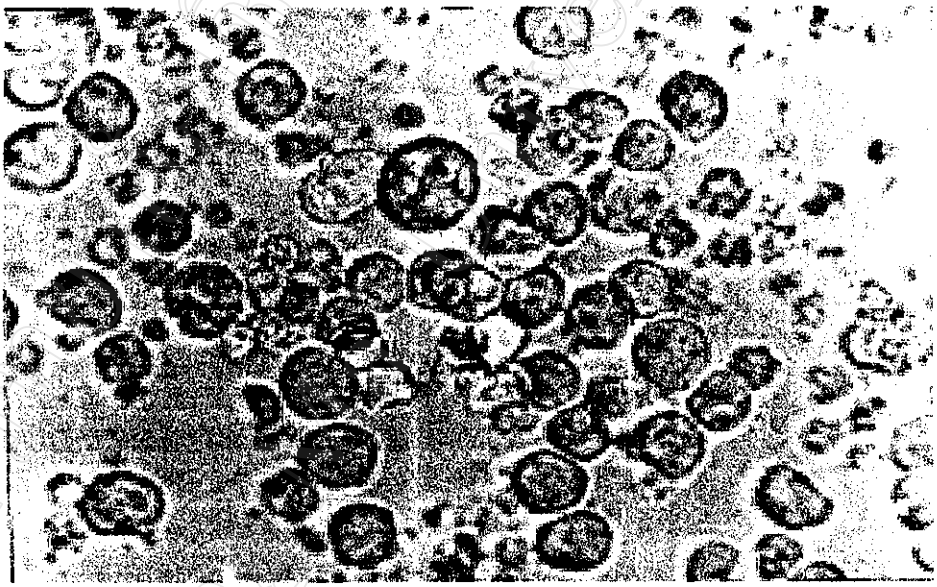
ภาพที่ 3-4. ขั้นตอนการทำ Indirect ELISA เพื่อตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีในหนู

3.4 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล

3.4.1 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

3.4.1.1 การเตรียมเซลล์ไมอิโลมา (myeloma)

ใช้ cell line ชนิด X63 Ag 8.653 โดยเลี้ยงใน 10 % FCS ที่ 37 °ซ, 5 % CO_2 ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ตรวจนับจำนวนเซลล์ สุขภาพเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ก่อนทำการ หลอมเซลล์ (fusion) (ภาพที่ 3-5)



ภาพที่ 3-5. เซลล์ไมอิโลมา (myeloma) สายพันธุ์ X 63 Ag 8.653 กำลังขยาย 60 เท่า.

3.4.1.2 การเตรียม feeder cell

feeder cell เป็นเซลล์ที่ผลิตสารบางอย่างที่จำเป็นในการเจริญเติบโตและมีชีวิตได้ของเซลล์ไฮบริโดมา โดยปกติมักใช้เซลล์จากช่องท้องของหนู (peritoneal cells) ซึ่งมีเซลล์ macrophages, lymphocyte, polymorphonuclear, mast cells และ eosinophils

การเตรียม feeder cell จากหนู Balb/c (Campbell, 1984) ควรทำก่อนการ fusion 1-2 วัน เพื่อตรวจการปนเปื้อนจากเชื้อโรคอื่นๆก่อนนำไปใช้เตรียมโดยนำหนูเล็กใส่ลงในขวดบรรจุสำลีชุบคลอโรฟอร์มปิดฝาให้สนิท เมื่อหนูตายแล้วนำมาแช่ใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางบนโฟม ดึงหนังหน้าท้องออกให้เห็นเยื่อที่คลุมท้องอยู่ ฉีด Iscove ' s

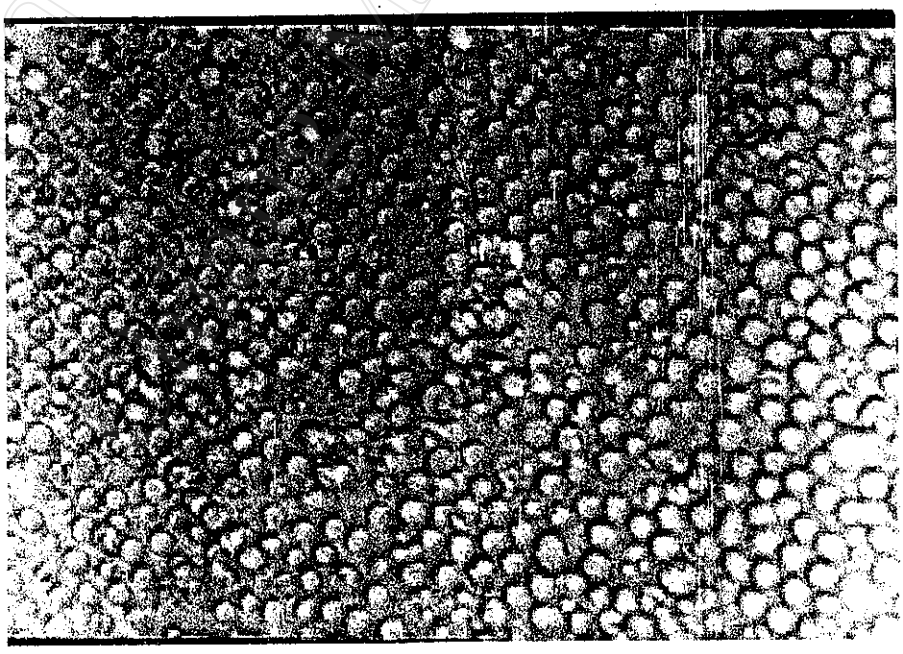
Modified Dulbecco's Medium (IMDM) เข้าไปในช่องท้อง 5 มล. (ภาพที่ 3-6) ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาทีดูดกลับ IMDM จากช่องท้องใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อ ปิดฝาปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1200 รอบ/นาที เท IMDM ทิ้ง แล้วเติม สารละลาย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT) 10 มล. ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเข้าออกเบาๆให้เซลล์กระจายทั่วเทลงในถาด เติมสารละลาย HAT อีก 30 มล. ดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °ซ, 5 % CO_2 มีความชื้น ตรวจการปนเปื้อนก่อนนำไปใช้

ภาพที่ 3-6. หนูที่ฉีด IMDM เข้าช่องท้องเพื่อเตรียม feeder cell.

3.3.1.3 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ม้าม (spleenocyte)

เก็บม้ามจากช่องท้องหนู (ภาพที่ 3-7) นำมาใส่ใน petri dish ที่มี IMDM ประมาณ 3 มล. ใช้กระบอก ฉีดยาดูด IMDM เข้าไปในม้ามแยกเซลล์ออกจากม้าม ถ่าย IMDM และเซลล์ไปในหลอดทดลองขนาด 15 มล. โดยกรองผ่านตะแกรงลวด นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เม็ดเลือดจากม้ามจะอยู่ด้านล่าง เทส่วนของเหลวทิ้ง เติมสารละลาย NH_4Cl (0.83 % NH_4Cl ในน้ำกลั่น) ประมาณ 3 มล. ทิ้งไว้ 6 นาที จึงปั่นที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วย IMDM เติม IMDM แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer (ภาพที่ 3-8)

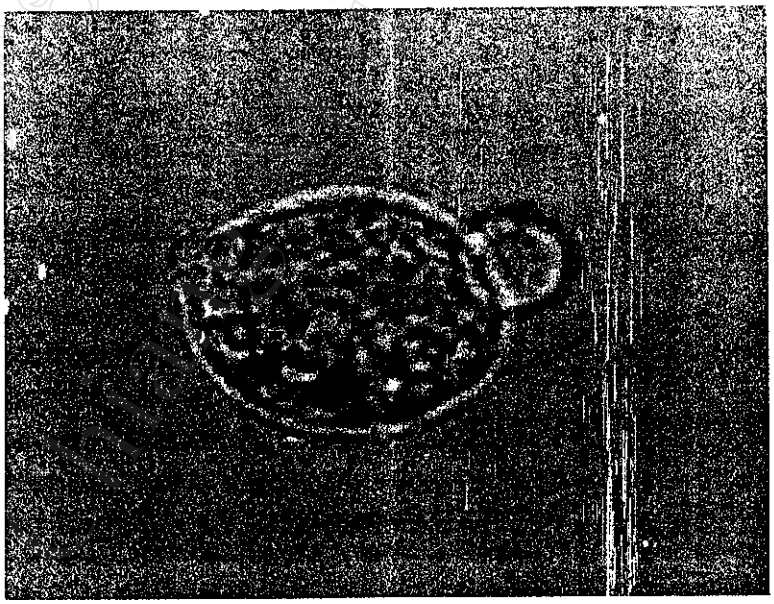
ภาพที่ 3-7. การเก็บเซลล์ม้ามในหนู balb/c ที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอล.



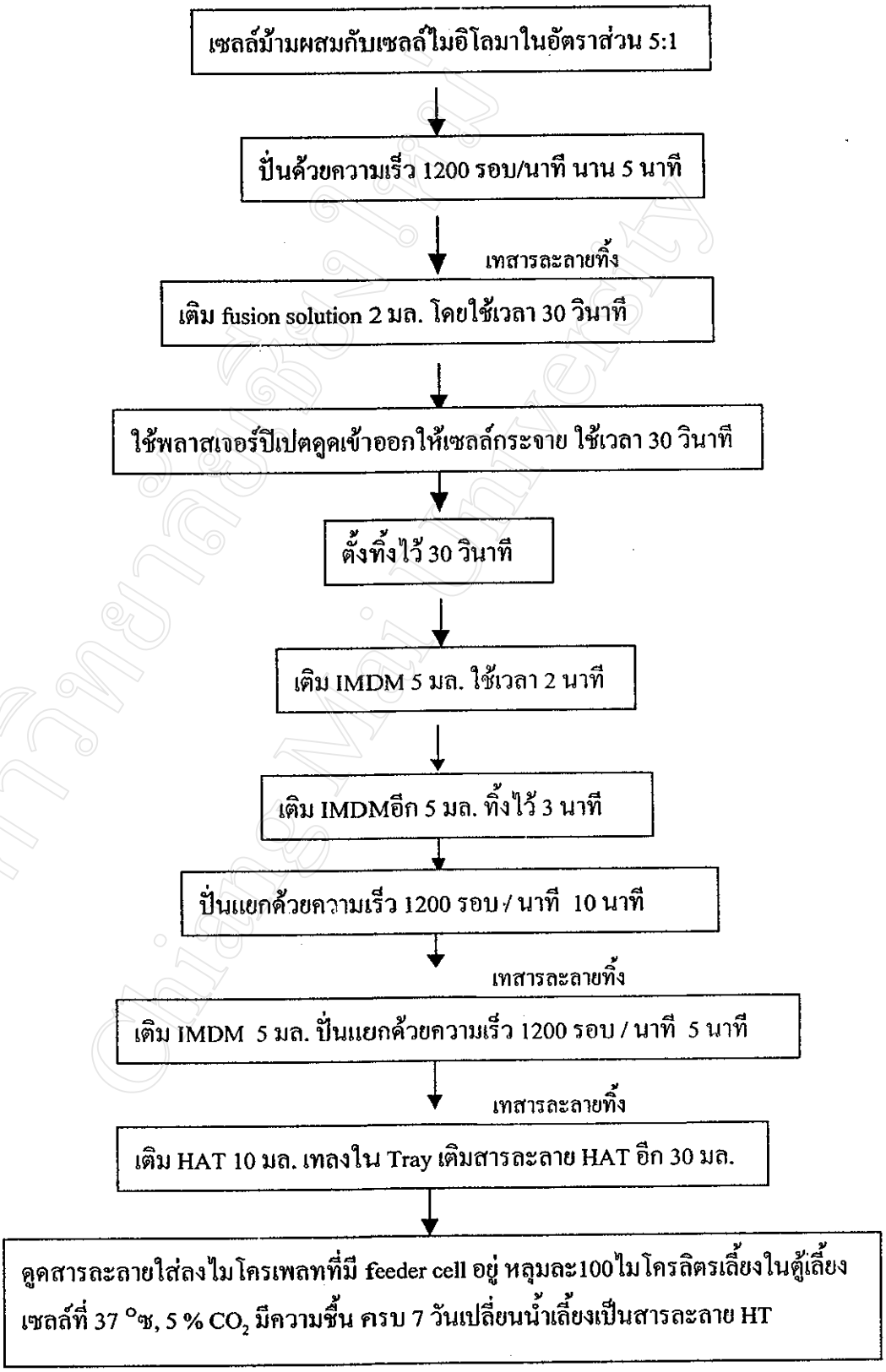
ภาพที่ 3-8. เซลล์ม้าม (spleenocyte)ที่กำลังขยาย 60 เท่า.

3.4.2 การเชื่อมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ไมอิโลมา (myeloma) กับเซลล์ม้าม (spleenocyte)

เตรียมเซลล์ม้าม 1.2 $x10^7$ เซลล์ผสมกับเซลล์ไมอิโลมา 2.3 x 10^6 เซลล์ (5:1) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1200 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม fusion solution 2 มล. โดยใช้เวลา 30 วินาที ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเข้าออกให้เซลล์กระจาย ใช้เวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที เติม IMDM 5 มล.ใช้เวลา 2 นาที แล้วเติมอีก 5 มล. ทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1200 รอบ / นาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม IMDM 5 มล. ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1200 รอบ / นาที 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย HAT 10 มล. เทลงในถาด เติมสารละลาย HAT อีก 30 มล. ดูดสารละลายใส่ลงไมโครเพลทที่มี feeder cell อยู่ หลุมละ100ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °ซ, 5 % CO_2 มีความชื้น เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์เป็นสารละลาย hypoxanthine และ thymidine (HT) เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเห็นเซลล์ไฮบริโดมา (hybridomas) (ภาพที่ 3-9 และภาพที่ 3-10)



ภาพที่ 3-9. แสดงการหลอมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาที่กำลังขยาย 150 เท่า.



ภาพที่ 3-10. ขั้นตอนการหลอมเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมา.

3.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล

ใช้วิธี ELISA เริ่มจากนำไมโครเพลทมาแบ่งเป็น 2 ด้าน คอลัมน์ที่ 1-6 เติมสารละลายโคเลสเตอรอล-3-BSA 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร ส่วนคอลัมน์ที่ 7-12 เติม BSA 100 ไมโครกรัม/100ไมโครลิตร ปิดเพลทด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ บ่มไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นสลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer) 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุม 3 รอบใช้ dryer เป่าเพลทให้แห้ง เติม 1 % gelatine ทุกหลุม ในปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ บ่มในตู้อบ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีไฮบริโดมา จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้อบ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม สารละลาย HRP conjugated goat anti-mouse Ig G 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 5 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมสารละลาย สำหรับพัฒนาสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4N H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA reader

3.4.4 การแยกโคลนเดี่ยว (limiting dilution)

เตรียม feeder cell ในไมโครเพลทชนิดปลอดเชื้อ 6 เพลท ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ เข้าออกเพื่อให้เซลล์กระจายในน้ำเลี้ยง นับจำนวนเซลล์โดย haemocytometer คำนวณว่าต้องดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ให้มีเซลล์อยู่ประมาณ 1000 เซลล์ ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มล. เติมสารละลาย 10 % FCS 30 มล. เทลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปตทำให้เซลล์กระจายดูดใส่เพลทที่มี feeder cell อยู่ เพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 % FCS 20 มล. ลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปตทำให้เซลล์กระจายดูดใส่เพลทที่มี feeder cell อยู่ เพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 % FCS 20 มล. ลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปตทำให้เซลล์กระจายดูดใส่เพลทที่มี feeder cell อยู่ เพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือ 10 มล. ทิ้ง เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมา จึงทำการตรวจการผลิตแอนติบอดีอีกครั้ง

3.4.5 การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจชนิดของแอนติบอดีทำโดยนำไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากหลุมที่มีไฮบริโดมา จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุมทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 ° ซ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม HRP conjugated goat anti-mouse Ig G และ HRP conjugated goat anti-mouse IgM 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่ 37 ° ซ 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 5 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมสารละลายสำหรับพัฒนาสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4*N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.4.6 การผลิตแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสม

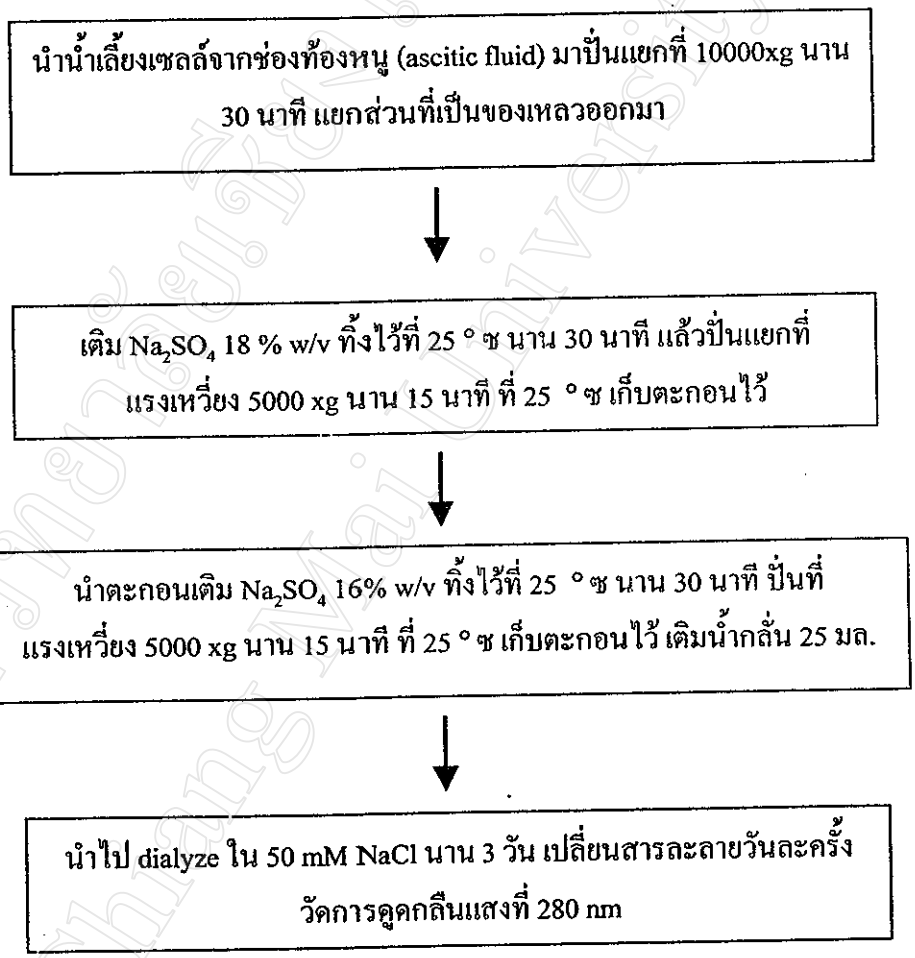
เป็นวิธีการแบบวิธี *in vivo* ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงเซลล์ในช่องท้องของหนูตัวเล็กโดยของเหลวที่ได้จากช่องท้องนี้เรียกว่า ascitic fluid ตามวิธีของ Campbell (1984) โดยฉีด pristane 0.5 มล. เข้าช่องท้องหนู Balb/c ทิ้งไว้ 5-10 วัน แล้วฉีดเซลล์ไฮบริโดมา ที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล ปริมาณ 1-5x10^6 เซลล์/ตัว หลังจากนั้นประมาณ 14 วัน จะเห็นการบวมพองที่ช่องท้องของหนู ทำการเก็บ ascitic fluid โดยการนำหนูใส่ขวดโหลที่มีสำลีชุบคลอโรฟอร์ม เมื่อหนูตายแล้วนำออกมาแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 % แล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ ดูดเอา ascitic fluid ออกจากช่องท้องหนูประมาณ 5 มล. ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มล. นำไปปั่นที่ 2500 รอบ/นาที นาน 15 นาที ได้สารละลายที่มีแอนติบอดีแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.7 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (purification)

การทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Arvieux และ Williams (1988) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากช่องท้องหนู (ascitic fluid) มาปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 10000 xg นาน 30 นาที แยกส่วนของเหลวออกมาเติม Na_2SO_4 18 กรัม (18 % น้ำหนัก/ปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 ° ซ นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่ 5000 xg 15 นาที ที่ 25 ° ซ เทของเหลวทิ้งเก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ เติม Na_2SO_4 16 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) 33 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25° ซ นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่ 5,000 xg 15 นาที ที่ 25 ° ซ เทของเหลวทิ้งเก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ เติมน้ำกลั่น 25 มล. นำไป dialyze ในสารละลาย 50 mMNaCl 3 วัน โดยเปลี่ยนสารละลาย 50 mMNaCl วันละครั้ง จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวนความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร (ภาพที่ 3-11.) (Cold Spring Habor Laboratory, 1980) :

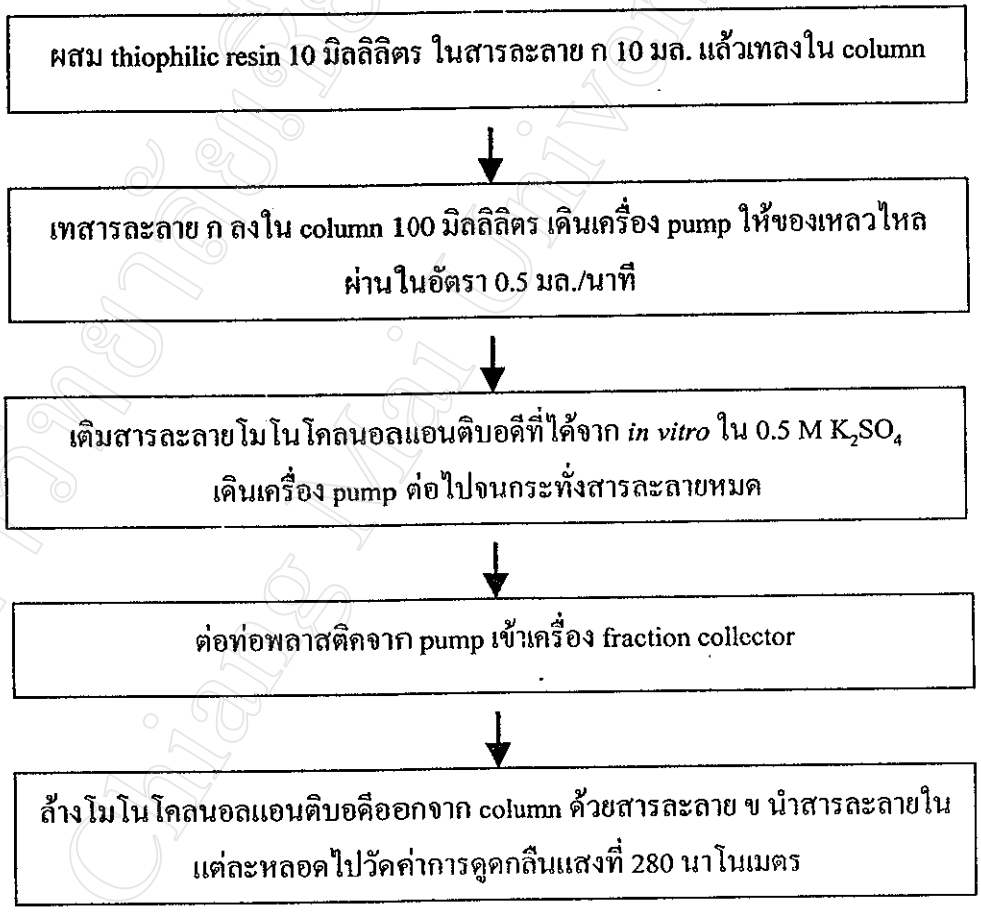
ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มก./มล.
1.4



ภาพที่ 3-11. ขั้นตอนการตกตะกอนแยก IgG จากน้ำเลี้ยงเซลล์จากช่องท้องหนู.

แล้วนำโมโนโคลนอลไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย column chromatography ดัดแปลงจากวิธีของ Goding (1983) โดยใช้ thiophilic column chromatography ที่เตรียมได้จากการผสม thiophilic resin 10 มล. ในสารละลาย ก. (ตามภาคผนวก) 10 มล. แล้วเทลงใน column ปลายท่อด้านล่างของ column มีสายน้ำเกลือต่ออยู่ เทสารละลาย ก. ลงไป 100 มล. เพื่อล้าง column ปรับการไหลของสารละลายให้อยู่ในอัตรา 0.5 มล./นาที ทำการเตรียมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จาก

การเตรียมโดยวิธี *in vivo* มาเติมให้มีความเข้มข้น 0.5 M K_2SO_4 ค่อยๆหยดสารละลายลงใน column จนหมด จากนั้นทำการล้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจาก column โดยการเติมสารละลาย ข. ตรวจการดูดกลืนแสงของของเหลวแต่ละหลอดที่ได้จากการ fraction ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เก็บของเหลวจากหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงไว้เพื่อนำไปใช้ต่อไป ส่วน column จะถูกล้างด้วยสารละลาย ข. ต่อไปจนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 0.005 จากนั้นจึงล้างด้วย สารละลาย ก. อีก 20-30 มล.ก่อนเก็บ column ไว้ใช้ในครั้งต่อไป (ภาพที่ 3-12)



ภาพที่ 3-12. ขั้นตอนการทำให้ Ig G จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย column chromatography.

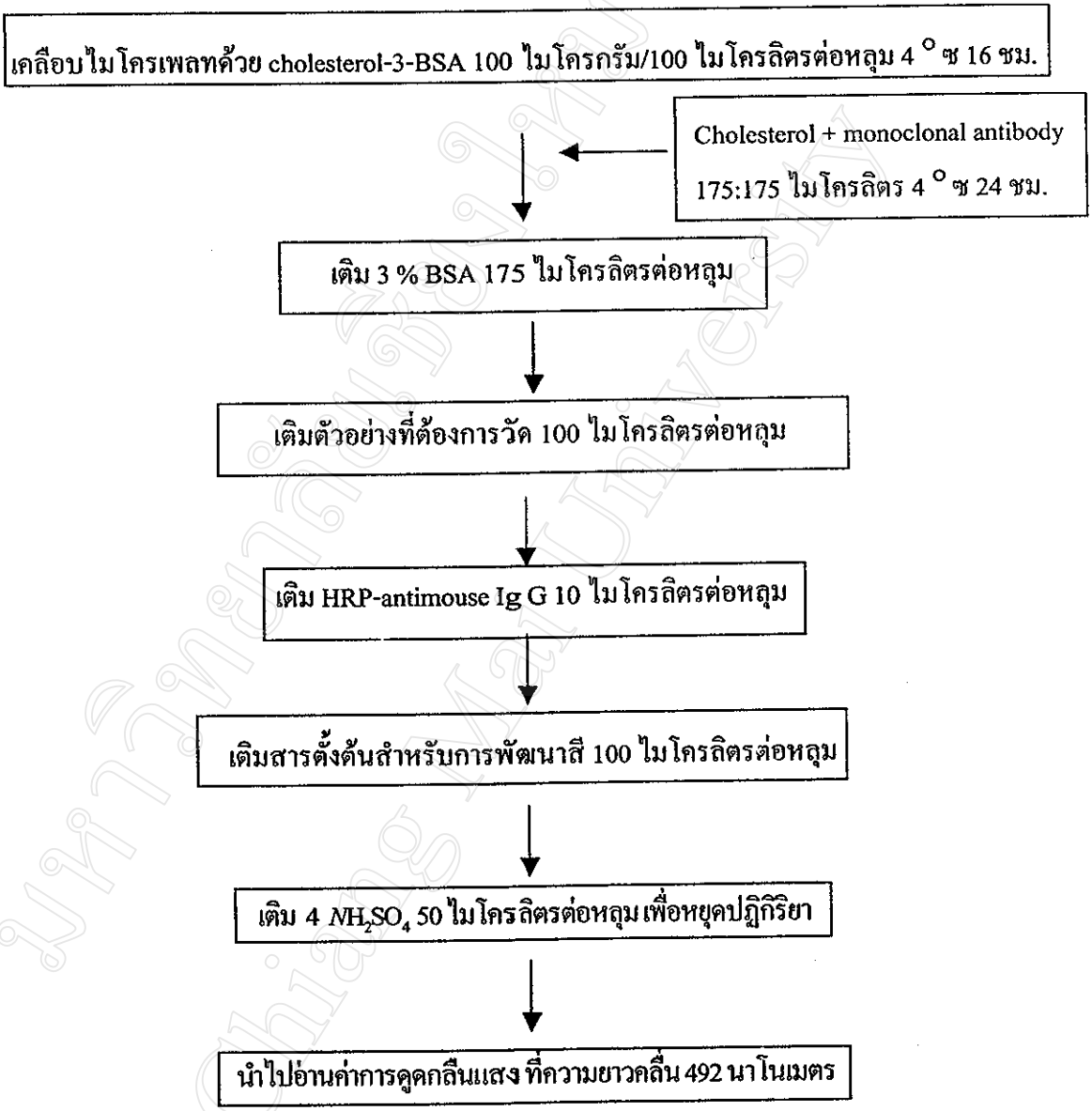
3.5 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการทำ ELISA เพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอล

3.5.1 การหาปริมาณที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เคลือบเพลทด้วยโคเลสเตอรอล-3-BSA ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม 100 ไมโครกรัม/ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 ° ซ 16 ชม. ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 3 ครั้งแล้วเป่าให้แห้ง เติมสารละลาย 3 % BSA 175 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ 1 ชม. ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 3 ครั้งแล้วเป่าให้แห้งเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000 อบที่ 37 ° ซ 1 ชม. ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 3 ครั้งแล้วเป่าให้แห้ง เติม HRP cojugated goat anti-mouse Ig G ที่ความเข้มข้น 1:500 บ่มที่ 37 ° ซ นาน 1 ชม. ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 5 ครั้งแล้วเป่าให้แห้ง เติมสารละลายสำหรับพัฒนาสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4*N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.5.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอล

เคลือบเพลทด้วยโคเลสเตอรอล-3-BSA ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม 100 ไมโครกรัม/ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 4 ° ซ 16 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตร 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม 3 % BSA ในปริมาตร 175 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมสารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอล 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 และ 5000 พิโคกรัม/มล. ซึ่งผสมรวมอยู่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ในอัตราส่วน 175:175 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 24 ชม. หลุมละ 100 บ่มไว้ที่ 37 °ซ 2 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม HRP conjugated goat anti-mouse IgG ที่ความเข้มข้น 1:500 บ่มที่ 37 ° ซ 1 ชม. เติมสารละลายสำหรับพัฒนาสี 100ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4*N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอล (ภาพที่ 3-13)



ภาพที่ 3-13. ขั้นตอนการหากราฟมาตรฐานโคเลสเตอรอลด้วยวิธี ELISA.

3.5.3 การหาปริมาณโคเลสเตอรอล

เคลือบเพลทด้วยโคเลสเตอรอล-3-BSA ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม 100 ไมโครกรัม/ 100ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 4 ° ซ 16 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตร 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม 3 % BSA ในปริมาณ 175 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมตัวอย่างที่ต้องการวัด ซึ่งผสมรวมอยู่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ในอัตราส่วน 175:175 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 24 ชม. หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 ° ซ นาน 2 ชั่วโมง สลัดสารละลายในไมโครเพลททิ้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม HRP conjugated goat anti-mouse IgG ที่ความเข้มข้น 1:500 บ่มที่ 37 ° ซ 1 ชม. เติมสารละลายสำหรับการพัฒนาสี 100ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4 *N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปอ่านค่าที่กราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอล

3.5.4 การวัดปฏิกิริยา cross reaction ของแอนติบอดี

เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจาก Dobson (1983) เริ่มจากเคลือบเพลทด้วยโคเลสเตอรอล-3-BSA ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม 100ไมโครกรัม/100ไมโครลิตร จำนวน 2 เพลท บ่มไว้ที่ 4 ° ซ 16 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตร 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม 3 % BSA ในปริมาตร 175 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ บ่มในตู้อบ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมสเตียรอยด์ฮอร์โมนได้แก่ โปรเจสเตอโรน (progesterone) หรือ อีสตร้าไดออล (estradiol) ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1000 และ 10000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผสมรวมอยู่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ในอัตราส่วน 175:175 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 24 ชม. หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 ° ซ 2 ชั่วโมง สลัดสารละลายในไมโครเพลททิ้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 150 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม HRP conjagated goat anti-mouse IgG ที่ความเข้มข้น 1:500 บ่มที่ 37 ° ซ 1 ชั่วโมง เติมสารละลายสำหรับพัฒนาสี 100ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4*N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 นาโนเมตร นำผลที่ได้

ไปสร้างกราฟมาตรฐานต่อ สเตียรอยด์ฮอร์โมนแต่ละตัว นำค่า 50 % binding มาเข้าสูตรคำนวนหา % cross reaction :

$$\% \text{ cross reaction} = \frac{\text{ค่า 50 \% binding ของสเตียรอยด์ฮอร์โมน}}{\text{ค่า 50 \% binding ของกราฟมาตรฐานโคเลสเตอรอล}} \times 100$$

3.5.5 การหา intra และ inter coefficient assay

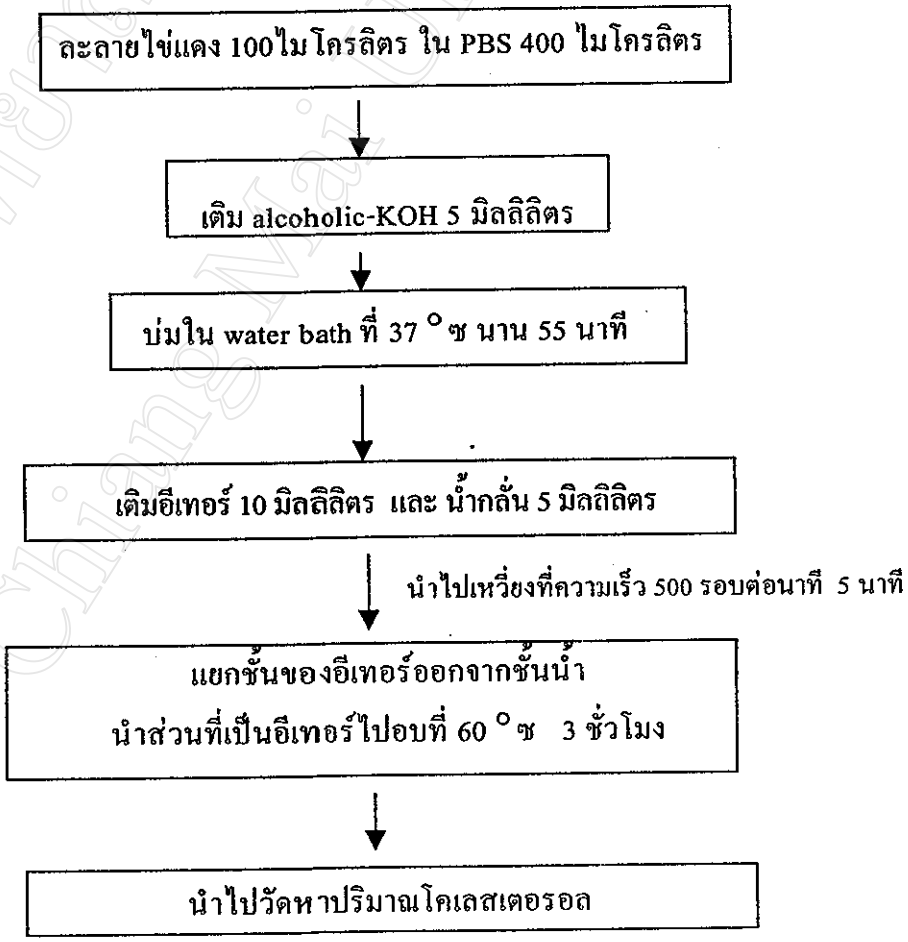
การหา intra และ inter coefficient assay ดัดแปลงจาก Butter *et al.* (2001) เคลือบเพลทด้วยโคเลสเตอรอล-3-BSAลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม 100 ไมโครกรัม/100 ไมโครลิตร 3 เพลท บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 150 ไมโครลิตร 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม 3 % BSA ในปริมาตร 175 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดเพลทด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำเข้าตู้อบ 37 ° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดน้ำในเพลททิ้งและล้างด้วย บัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติมตัวอย่างที่ต้องการวัด (ตัวอย่างเดียวกันทุกหลุม) ซึ่งผสมรวมอยู่กับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ในอัตราส่วน 175:175 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 24 ชม. หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 ° ซ 2 ชั่วโมง สลัดสารละลายในไมโครเพลททิ้งด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 รอบ เป่าเพลทให้แห้ง เติม HRP cojugated goat anti-mouse Ig G ที่ความเข้มข้น 1:500 บ่มที่ 37 ° ซ 1 ชม. เติมสารละลายสำหรับพัฒนาสี 100ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ใช้ 4*N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา อ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ 492 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิธี one-way ANOVA แล้วนำค่า MS_{error} ไปคำนวณหา coefficient of variance (CV) จากสูตร :

$$CV = \frac{\sqrt{\text{MS error}}}{\text{Grand mean}} \times 100$$

จะได้ค่า intra coefficient assay ส่วนการหาค่า inter coefficient assay หาได้โดยนำค่า $MS_{treatment}$ ไปคำนวณ แทนที่ MS_{error} ในสูตร

3.6 การสกัดโคเลสเตอรอลจากไข่แดง

ดัดแปลงจากวิธีของ Abell *et al.* (1951) มีวิธีโดยย่อดังนี้ ละลายไข่แดง 100 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง 400 ไมโครลิตร จากนั้น เติม alcoholic-KOH (33 % KOH 6 มิลลิลิตร:absolute alcohol 94 มิลลิลิตร) 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แอลกอฮอล์จะตกตะกอนสารประกอบโปรตีนโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์จะซาปอนนิไฟด์ (saponified) ไขมันและตกตะกอนในน้ำ นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37-40 °ซ 55 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมอีเทอร์ 10 มิลลิลิตร เพื่อละลายโคเลสเตอรอล ออกมา และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกชั้นของอีเทอร์ออกจากชั้นน้ำ แล้วนำส่วนที่เป็นอีเทอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ 3 ชั่วโมง เพื่อให้อีเทอร์ระเหยออก นำไปวัดหาปริมาณโคเลสเตอรอล (ภาพที่ 3-14)



ภาพที่ 3-14. ขั้นตอนการสกัดโคเลสเตอรอลจากไข่แดง.

3.7 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธีการคัลออร์ริเมตริก (colorimetric method) ของ Zak (1957)

วิธีการนี้ดัดแปลงจาก Zak (1957) สารเคมีที่ใช้ในการวัดประกอบด้วย :

1. Ferric chloride stock reagent เตรียมจาก 840 มิลลิกรัมของ $FeCl_3.6H_2O$ใน กรดอะซิติคเข้มข้น 100 มิลลิลิตร

2. Ferric chloride precipitating reagent เตรียมโดยเจือจาง stock reagent : กรดอะซิติคเข้มข้น ในอัตราส่วน 1: 10

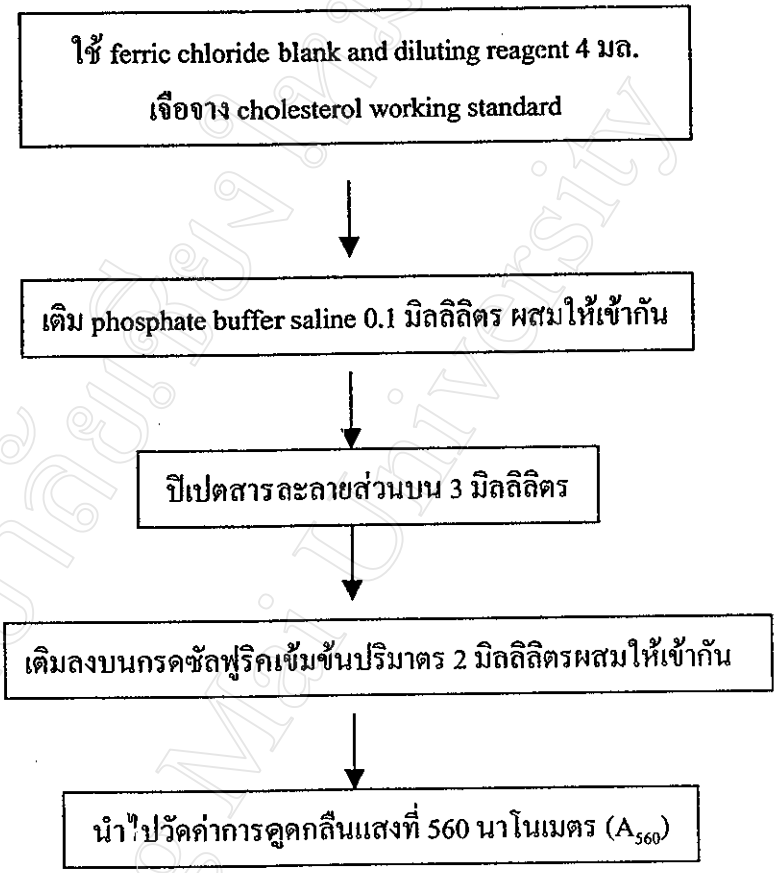
3. Ferric chloride blank and diluting reagent เตรียมโดยเจือจาง 8.5 มิลลิลิตรของ stock reagent ใน 100 มิลลิลิตรของ กรดอะซิติคเข้มข้น

4. Cholesterol stock standard เตรียมโดยละลาย 100 มิลลิกรัมของ pure dry cholesterol ในกรดอะซิติคเข้มข้น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5. Cholesterol working standard เตรียมโดยปีเปต 1.0 มิลลิลิตร ของ stock standard และ 0.85 มิลลิลิตร ของ stock reagent แล้วเจือจางด้วยกรดอะซิติคเข้มข้น ตามความเข้มข้นที่ต้องการ ใช้หลังจากเตรียมโดยทันที

3.7.1 การหาปริมาณสารละลายมาตรฐานโคเลสเตอรอล

ใช้ ferric chloride blank and diluting reagent 4 มิลลิลิตรสำหรับเจือจาง cholesterol working standard ปริมาตร 0, 0.5, 1, 2 ,4 และ 6 มิลลิลิตร แล้วเติม phosphate buffer saline 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปีเปตสารละลายส่วนบน 3 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ เติมลงบนกรดซัลฟูริคเข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (A_{560}) (ภาพที่ 3-15)

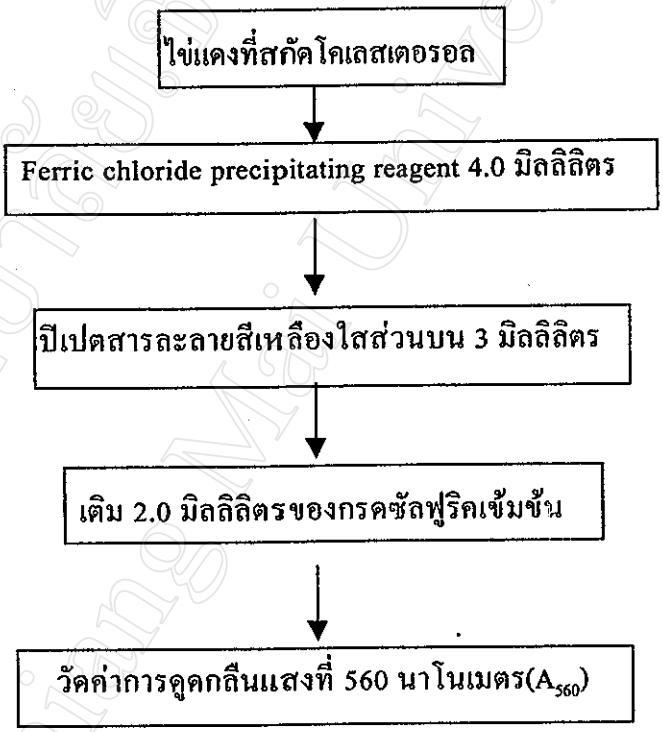


ภาพที่ 3-15. แสดงขั้นตอนการหากราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอลโดยวิธี Zak (1957).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3.7.2 การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดง

ปีเปต Ferric chloride precipitating reagent 4.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่สกัดไข่แดงไว้ เขย่าให้เข้ากัน ด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ถึง 3 นาที หรือจนกว่าเห็นตะกอนชัดเจน ปีเปตสารละลายสีเหลืองใสส่วนบน 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม 2.0 มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริคเข้มข้น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร (A_{560}) (ภาพที่ 3-16)



ภาพที่ 3-16. ขั้นตอนการวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธี Zak (1957).