บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

โคเนื้อพันธุ์ชาโลเลย์เพศผู้จำนวน 3 ตัว จากบริษัทเชียงใหม่เฟรชมิลล์จำกัด อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) (K29287204, Merck)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) (K19742898, Merck)
3. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, $NaHCO_3$) (31437, Riedel-de Haen)
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรท (Disodium phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$) (30414, Riedel-de Haen)
5. โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride, KCl) (31248, Riedel-de Haen)
6. แอมโมเนียซัลเฟต (ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$) (101217, Merck)
7. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminiopropyl) - carbodiimide (C7625, Sigma)
8. Fetal bovine serum (FBS) (10270-023, Seromed)
9. Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM) (1088539, GIBCOBRL)
10. 2-Mercaptoethanl (M-6250, Sigma)
11. Hypoxanthine Aminopetrin Thymidine (HAT) (F-0483, Biochrom)
12. Hypoxanthine Thymidine (HT) (F-0493, Biochrom)
13. Polyethylene glycol (PEG) (P-3640, Sigma)
14. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (802912, GIBCOBRL)
15. Thiophilic resin (T-gel) (T5787, Sigma)
16. Polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 80) (H0306, Sigma)
17. โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride, KCl) (31248, Riedel-de Haen)
18. โอ-ฟลีนิลลีล-ไดอามีน-เฮสซีแอล (O-phenylene-diamine-HCl, OPD) (80972, Zymed lab)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

19. ฮอสแรดิช เพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) (P6782, Sigma)
20. เจลาติน (gelatin) (K4988770, Merck)
21. ซัลฟูริคแอซิด (sulfuric acid, H_2SO_4) (J.T.Baker)
22. ซิตริคแอซิด (citric acid) (C2270, Sigma)
23. Anti – Mouse IgG-FITC (AP326F, Chemicon)
24. Goat anti-Mouse IgG (M-1131, Sigma)
25. Freund's complete adjuvant (E-5881, Sigma)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

1. 10X PCR buffer, *Taq* polymerase (Fermentas, USA)
2. Acetic acid (Merck, Germany)
3. Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
4. Agar-Agar (O.V. chemical, Thailand)
5. Agarose (Gibco/BRL, USA)
6. Ammonium persulfate (USB corporation, USA)
7. Ampicillin (Bio Basic Inc, Canada)
8. Bisacrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
9. Boric acid (Merck, Germany)
10. Chloroform (Lab Scan, Ireland)
11. DH5α *Escherichia coli* competent cell (Invitrogen, USA)
12. dNTPs (Fermentas, USA)
13. EDTA (Fisher Scientific,USA)
14. Ethanol (Merck, Germany)
15. Ethidium bromide (Bio Basic Inc, Canada)
16. Formaldehyde 37 % (Merck, Germany)
17. Glycerol (Merck, Germany)
18. Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (US Biological, USA)
19. Lambda DNA/AvaII (Fermentas, USA)
20. LB-Broth (US Biological, USA)
21. Isopropanol (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

22. Magnesium chloride (Merck, Germany)
23. Nitric acid (Merck, Germany)
24. N,N'-dimethylformamide (Bio Basic Inc, Canada)
25. Phenol (Merck, Germany)
26. Proteinase K (Invitrogen, USA)
27. Silver nitrate (Merck, Germany)
28. Sodium acetate (Merck, Germany)
29. Sodium bicarbonate (Merck, Germany)
30. Sodium chloride (Merck, Germany)
31. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
32. TEMED (USB corporation, USA)
33. Tris (USB corporation, USA)
34. X-Gal (USB corporation, USA)
35. Yeast extract (Scharlau, Spain)

3.2.3 สารเคมีสำหรับ Gel Electrophoresis

1. Acrylamide PAGE (CH_2:$CHCONH_2$) (UN2074, Plusone Pharmacia)
2. Bis – Acrylamide (N,N' – Methylene-bis-acrylamide, $C_7H_{10}N_2O_2$) (M7256, Sigma)
3. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl – ethylenediamine, $(CH_3)_2NCH_2N(CH_3)_2$) (17-1312-01, Plusone Pharmacia)
4. Ammonium persulphate ($(NH_4)_2S_2O_8$) (A3678, Sigma)
5. Bromophenol blue – Xylene cyanole (B3269, Sigma)
6. Ethidium bromide (E3269, Sigma)
7. 25 bp DNA Step ladder (G4511, Promega)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 สารเคมีในการเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

1. Tris-hydroxyl methyl aminoethane (Sigma)	30.28	g
2. D-Fructose(Sigma)	12.50	g
3. Citric acid(Sigma)	16.75	g
4. Glycerol(Sigma)	80.00	ml

5.	Antibiotic	4	ml
	เจือจางในน้ำกลั่น (18 MΩ)	920	ml

3.2.5 สารละลาย (รายละเอียดดังภาคผนวก)

1. 0.5M EDTA pH 8.0
2. 10X TBE buffer
3. 50X TAE buffer
4. Digestion buffer
5. Phosphate-buffered saline (PBS)
6. SSCP loading buffer
7. TE buffer

3.2.6 ชุดสารเคมีสำเร็จรูป

1. GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Germany)
2. GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit for Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
3. pGEM®-T easy vector System Kit (Promega, USA)
4. iQ™ SYBG Green Supermix (BioRad, USA)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA,USA)
2. Gel dryer, Model GD 2000, Amersham Bioscience, USA
3. Hot Air Oven, Model ULE 400, Memmert, Germany
4. Spectrophotometer, UV-VIS Biowave S2100, Germany
5. Magnetic Stirrer, Model HS115, HL Instrument, Thailand
6. Microcentrifuge tube 1.5 ml, Sorenson, Bioscience. Inc. USA
7. PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
8. pH meter, Model CG 842, Inc., USA
9. Immuno-Plate 24 หลุม บริษัท Nalge Nunc International ประเทศเดนมาร์ก
10. จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร.บริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

11. ไมโครไปเปต (micropipette) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัท AB Technology
12. ไมโครไปเปต (micropipette) ขนาด 2.5 และ 10 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf
13. หลอดทดลองขนาด 0.2 ml บริษัท Molecular Bioproducts ประเทศแคนนาดา
14. กระบอกฉีดยา ขนาด 5, 10, 20 และ 50 ml บริษัท Nipro ประเทศญี่ปุ่น
15. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 และ 20 ความยาว 1.5 นิ้ว บริษัท Nipro ประเทศญี่ปุ่น
16. เครื่อง DNA thermal cycler PTC-100 บริษัท MJ Research ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่อง DNA thermal cycler PTC-200 แบบ Real Timeบริษัท MJ Research
18. เครื่อง Gene genius biomage system บริษัท Sysgen ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. เครื่อง Gel Electrophoresis บริษัท Toyobo ประเทศญี่ปุ่น
20. กล้อง Stereomicroscope SZ-ST บริษัท Olympus 3611 ประเทศญี่ปุ่น
21. เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer UV-visible)โมเดล DU
22. บริษัทBeckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-500 GE บริษัท Labinco ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)โมเดล 6930 บริษัท Kubota
25. เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 3 ตำแหน่ง) โมเดล 2482 บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน
26. เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL3015 บริษัท Gesellschaff fur Labortechmik
27. ไดอะไลซิ่งทิว (dialysing tube) ไม่ให้สารที่มีโมเลกุลตั้งแต่ 12,000 ขึ้นไปผ่านโมเดล CelluSep บริษัท Membrane filtration product ประเทศสหรัฐอเมริกา
28. เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader) โมเดล 2010 บริษัท Anthos
29. ไมโครเพลท 96 หลุม (microplate 96 well) โมเดล Nunc-Immuno™
30. บริษัท Nalge Nunc international ประเทศเดนมาร์ก
31. ตู้อบ (incubator) บริษัท memmert ประเทศเยอรมันนี
32. Column liquid chromatography ขนาด 1 x 30 เซนติเมตร บริษัท Sigma
33. ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO2 incubator) โมเดล 3194 บริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
34. เครื่องปรับ pH (pH meter)โมเดล678 บริษัท EP/KE ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
35. พาราฟิล์ม บริษัท American NationalCan ประเทศสหรัฐอเมริกา
36. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverted microscope) โมเดล CK2 บริษัทOlympus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้และมีความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพศผู้ ผลิตขึ้นโดย วิวัฒน์ (2547) โคลนที่นำมาทดลอง คือเบอร์ 1F9-3B10 ในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจะใช้เซลล์ม้ามจากหนูขาวตัวเล็ก สายพันธุ์ Bala/C ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนซึ่งคือสเปิร์มของโคนมฟรีเชียน จำนวน 2 x 10^6 เซลล์ ต่อ 100 µl ผสมลงในสารละลาย PBS 100 µl ผสมรวมกับ freund's adjuvant 100 µl โดยใช้วิธีโฮโมจีไนเซชั่น (homogenization) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณกลางหลังตัวละ 200 µl ทุกๆ 2 สัปดาห์ นำซีรั่มของหนูตรวจวัดด้วยเทคนิค ELISA เพื่อดูความสามารถในการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจน แล้วจึงนำเซลล์ม้ามมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63–Ag8.653 ด้วยวิธีการ fusion จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในสารละลาย HAT เพื่อคัดเลือกเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมาซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างแอนติบอดี เมื่อเซลล์ขยายจำนวนมากส่วนหนึ่งเก็บไว้เลี้ยงขยายต่อ อีกส่วนเก็บแช่ไว้ที่อุณหภูมิ – 80 ^{O}C

3.4.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาออกมาเลี้ยง

นำเซลล์ไฮบริโดมา ออกจากตู้แช่แข็ง - 80 ^{O}C จากนั้นตั้งให้ละลาย นำเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml แล้วเติม IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) 10 ml ทำการ resuspend ให้เข้ากัน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเทส่วนใส (supernatant) ออก เติม 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) ประมาณ 5 ml ทำการ resuspend อีกครั้ง แล้วเทลงจานเลี้ยงเซลล์ นำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เพื่อรอดูการเจริญของเซลล์

3.4.2 การตรวจการตอบสนองแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

เคลือบเพลทด้วยม้ามของโคเพศผู้ และเพศเมีย อย่างละ 1 x 10^6 cell / 100 µl ในสารละลายสำหรับการเคลือบ (coating buffer) บ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้าง(washing buffer) แล้วเติมเจลาตินความเข้มข้น 2 % หลุมละ 200 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทแล้วเติมน้ำเลี้ยงเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทแล้วเติม goat anti - mouse ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ปริมาตรหลุมละ 10 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทและเติม substrate ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาสี ปริมาตรหลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 4N H_2SO_4 (stop solution) ปริมาณหลุมละ 100 µl นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การแยกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงไว้มานับให้ได้จำนวน 1,000 เซลล์ เติมลงใน tray ที่มี 10 % FBS ปริมาตร 30 ml ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัวมากที่สุด แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงในเพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ml จะเหลือ อาหารเลี้ยงเซลล์ ใน tray ประมาณ 10 ml เติม 10 % FBS 20 ml ลงใน tray ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัว จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในเพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตรจะเหลืออาหารเลี้ยงเซลล์ ใน tray ประมาณ 10 ml เติม 10 % FBS 20 ml ลงใน tray ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัว ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงในเพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ml สุดท้ายนำเพลททั้ง 6 เลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C

3.4.4 การเลี้ยงเซลล์ด้วย Celline AD 1000

เพื่อให้เซลล์ไฮบริโดมาขยายจำนวนและผลิตแอนติบอดีได้ปริมาณมาก มีความหนาแน่นของเซลล์สูงและเก็บรักษาเซลล์ที่จำเพาะไว้ได้นาน โดยเติม growth medium 50 ml ในส่วนของชั้นอาหาร และปล่อยให้เนื้อเยื่อ semi - permeable ปรับสภาพอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่จะนำไปเลี้ยงจำนวน 25 x 10^6 เซลล์ แล้ว suspend เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 15 ml เพื่อให้มีความเข้มข้นประมาณ 1.5 x 10^6 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml (ในชั้นเลี้ยงเซลล์) แล้วเติม 10% FBS ปริมาณ 1000 ml ในชั้นของอาหาร นำ Celline AD 1000 ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ทุก 7 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่

3.4.5 การตกตะกอนโปรตีนจี

โปรตีนจีที่ตกตะกอนได้เป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เป้าหมายที่ต้องการทดสอบ คือสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเหมาะสม (10 % FBS, 37 ^{O}C, 5% CO_2) สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเพศผู้ โดยสกัดแอนติบอดี จากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน และแยกแอนติบอดีด้วยการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน จี (immnoglobulin G, IgG) นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย column Hi Trap ^{TM} Protein G โดยใช้ syringe เติมสารละลาย binding buffer ลงใน column ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดันของเหลวให้ไหลผ่านในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อ 5 นาที นำสารผสมระหว่างแอนติบอดี และสารละลาย binding buffer อย่างละ 10 มิลลิลิตร เติมผ่าน column จนหมด แล้วล้าง column ด้วยสารละลาย binding buffer อีกครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ใน micro centrifuge

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร(vial) ที่เติมสาร neutralization buffer ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เก็บสารละลายนี้ประมาณ 500 ไมโครลิตร ประมาณ 20 vial ทำการล้าง column ด้วย 20 % ethanal ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้วัดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย (mg/ml)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm}}{1.4}$$

หากต้องการนำมาใช้ต้องนำเอาออกมาละลายก่อน และนำมาเจือจางในสารละลายสำหรับเลี้ยงสเปิร์ม ปริมาตรที่ใช้คือ 1 ml เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค

ภาพ 3-1 แสดงวิธีการการตกตะกอนโปรตีนในถุง dialyze ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่น และวิธีการใช้ Hi Trap® Protein G column ในขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.4.6 การตรวจสอบความแม่นยำของ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ ด้วย เทคนิค Immunofluorescence microscopy

นำเม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้จำนวน 8 ตัว และเพศเมียจำนวน 8 ตัว ปรับให้มีจำนวนเซลล์ในการเข้าศึกษาที่กันคือ $1x\ 10^6$ / 1 ml บ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพศผู้ที่ระดับความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 1:1,000 ปริมาตร 1 ml ในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย Goat anti mouse IgG ติดฉลากด้วย FITC ความเข้มข้น 1 : 2,000 ปริมาตร 1 ml ในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ml และนำไปตรวจสอบการเรืองแสงด้วยกล้อง Fluorescence microscopy

3.5 ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ชาโลเลย์

3.5.1 การรีดน้ำเชื้อสดเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งบรรจุหลอด

รีดน้ำเชื้อจากท่อส่งน้ำเชื้อของพ่อโค จำนวน 3 ตัว ด้วยอุปกรณ์รีดน้ำเชื้อโดยเติมน้ำอุ่นประมาณ 37 – 40 ^{O}C ในกระบอกสำหรับรีด และมีหลอดทดลองขนาด 15 ml รองรับน้ำเชื้ออยู่ปลายสุดภายในกระบอก นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจดูการเคลื่อนไหวหมู่และนับจำนวนน้ำเชื้อสดของพ่อโคแต่ละตัวด้วย Heamatocytometer คำนวณให้มีสเปิร์ม 120 x 10^{6} ตัว / ml ในอาหารสำหรับเลี้ยงสเปิร์ม (extender with glycerol) ลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อในอาหารสำหรับเลี้ยงด้วยการค่อยๆ เติมน้ำแข็งให้อุณหภูมิลงถึง 5 ^{O}C นำไปแช่ตู้เย็นต่อที่อุณหภูมิ 4 ^{O}C ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดเก็บน้ำเชื้อปริมาตรหลอดละ 250 µl โดยขั้นตอนการบรรจุจะทำในตู้เย็น เมื่อบรรจุเรียบร้อยนำไปแช่ในตู้เย็นต่ออีกประมาณ 60 นาที จากนั้นค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลง (cool down) โดยการนำหลอดน้ำเชื้อไปอังไว้บนไอของไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม ขนาดกว้าง 1 เมตร และยาว 1 เมตร ที่ดัดแปลงสำหรับลดอุณหภูมิ จนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ - 90 ^{O}C จึงเก็บไว้ในถังไนโตรเจนสำหรับเก็บน้ำเชื้อ (- 196 ^{O}C)

3.5.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับทดลองปฏิกิริยาไซโตทอกซิค

นำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนสำหรับเก็บน้ำเชื้อ ทำให้น้ำเชื้อในหลอดละลายด้วยน้ำอุณหภูมิ 40 ^{O}C ประมาณ 10 วินาที เติมน้ำเชื้อที่ละลายแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่มีอาหารเลี้ยงสเปิร์ม 5 ml จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 3 วินาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนออก สเปิร์มจะตกตะกอนอยู่ส่วนล่าง ค่อยๆ เติมอาหารเลี้ยงสเปิร์ม (extender without glycerol) ลงไปอีกครั้ง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C นาน 1 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกสเปิร์มที่แข็งแรงให้ว่ายขึ้นมา (swim up) จากนั้นค่อย ๆ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านบนที่มีสเปิร์มอยู่ออกมานับจำนวนเซลล์ด้วย Heamacytometer ปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาไซโตทอกซิค คือ 1 x 10^{6} cell / 250 µl (เจือจางในอาหารเลี้ยงสเปิร์ม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 แหล่งคอมพลีเมนต์และการเตรียมคอมพลีเมนต์

แหล่งคอมพลีเมนต์ที่ใช้คือ ซีรั่มหนูตะเภา จากสำนักสัตว์ทดลอง (ศาลายา) นำมาเจือจางในสารละลายสำหรับเลี้ยงสเปิร์ม ความเข้มข้นที่อัตราส่วน 1:1, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 และ 1:250 เพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค โดยปริมาตรที่ใช้คือ 250 µl

3.7 การทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค

เตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 1:100, 1:300, 1:500, 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000 และ 1:10,000 ในหลอดทดลองขนาด 1,500 µl ปริมาตรละ 250 µl และนำหลอดน้ำเชื้อออกมาละลาย โดยใช้น้ำเชื้อ 1 x 10^6 cell /250 µl ที่ทำการ swim up แล้ว บ่มร่วมกัน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เติมซีรั่มของหนูตะเภา ที่ความเข้มข้น 1:50 ในปริมาตรละ 250 µl ของแต่ละหลอดทดลอง บ่มต่ออีก 30 นาที ที่ 37 ^{O}C จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 3 วินาที ค่อย ๆ ดึงส่วนใสด้านบนออกแล้วเติม อาหารสำหรับเลี้ยงสเปิร์ม 250 µl จากนั้นบ่มที่ 37 ^{O}C นาน 30 นาที ดูดส่วนใสด้านบนแยกส่วนที่เป็นตะกอนด้านล่างเก็บไว้ จากนั้นนำสเปิร์มทั้งสองส่วนมาเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ความเข้มข้น 1:500 บ่มที่ 37 ^{O}C นาน 30 นาที จากนั้นเติม fluorescein isothiocyanate (FITC) 250 µl ความเข้มข้น 1 : 2,000 บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่ 37 ^{O}C นำหลอดทดลองทั้งหมดมาปั่นล้างด้วย PBS หยดลงบนแผ่นสไลด์ส่องดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ เพื่อนับดูเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มทั้งหมดในแต่ละกลุ่มทดลองและนำสเปิร์มมาตรวจวัดความจำเพาะต่อเพศผู้จากการเรืองแสง สเปิร์มที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค นำมายืนยันผลด้วยเทคนิค Real time PCR

3.8 เทคนิค Real time PCR

สารละลาย DNA (100 ng / µl) ของน้ำเชื้อโคเนื้อ ใช้เป็น template ในปฏิกิริยา Real time PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน BOVM97 โดยใช้คู่ไพรเมอร์มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

1. Template DNA (100 ng/µl) 1.00 µl
2. iQ™ SYBG Green Supermix 10.00 µl
3. forward primer (10 pmol/µl) 0.20 µl
4. reverse primer (10 pmol/µl) 0.10 µl
5. ddH2O 8.70 µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา Real time PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รอบที่ 1	Denaturation:	95 °C	5 นาที
รอบที่ 2	Denaturation:	94 °C	15 วินาที
	Annealing:	61 °C	30 วินาที
	Extension:	72 °C	30 วินาที
	Plate Read	รอบการทำปฏิกิริยาทั้งหมด จำนวน 50 รอบ	
รอบที่ 3	Final extension:	72 °C	5 นาที
รอบที่ 4	Melting Cuve	65-95 °C	อ่านผลทุก 2 วินาที

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ทั้งหมด 7 treatment แบ่ง treatment ในการทดสอบปฏิกิริยาไซโตทอกซิค ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 แสดงสัดส่วนของแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิค

Treatment	Antibody dilution	Complement dilution
1	0	0
2	1:100	1:50
3	1:300	1:50
4	1:500	1:50
5	1:1,000	1:50
6	1:2,500	1:50
7	1:5,000	1:50
8	1:10,000	1:50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved