บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

สารเคมี	Cat. No.	บริษัท
Albumin, Bovine	A-2153	Sigma
Ammonium chloride (NH_4Cl)	A31	Ajax
Ammonium sulphate [$(NH_4)_2SO_4$]	1.01217	Merck
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	-	Merck
Di-sodium hydrogen phosphate dehydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	1.06580	Merck
Di-sodium hydrogen orthophosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	-	-
Ethyl alcohol	1.00983	Merck
Fetal bovine serum (FBS)	-	Gibco
Freund's complete adjuvant	F-5881	Sigma
Freund's incomplete adjuvant	F-5506	Sigma
Gelatin	1.04070	Merck
Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-HRP)	62-6520	Zymed labG
Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-AP)	A3562	Sigma
Glycine	G-0800-50	Fisher
Hypoxantine aminopterine thymidine (HAT)	21060-017	Gibco
Hypoxantine thymidine (HT)	11067-030	Gibco
Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM)	12200-028	Gibco
2-Mercaptoethanol	M7522	Sigma
Mouse monoclonal antibody isotyping reagent		
IgG1	M5532	-
IgG2a	M5657	-
IgG2b	M5782	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

IgG3	M5907	-
IgM	M6157	-
IgA	M6032	-
O-phenylene-diamine-HCL (OPD)	P-1399	Zymed lab
Polyethylene glycol (PEG)	P-3640	Sigma
Potassium chloride (KCl)	1.04936	Merck
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	P-4800-60	Fisher
Potassium hydrogen carbonate ($KHCO_3$)	A397	Ajax
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	1.06392	Merck
Sodium chloride (NaCl)	1.06404	Merck
Sodium dihydrogen phosphate dehydrate	1.06345	Merck
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	1.06329	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	1.064988	Merck
Sulfuric acid (H_2SO_4)	1.00731	Sigma
Standard		
trans-Zeatin Riboside (ZR)	Z0375	sigma
trans-Zeatin (tZ)	Z0876	sigma
trans-Zeatin Riboside-5'-monophosphate (ZR5P)	001 0471	sigma
trans-Zeatin-9-glucoside (Z9G)	001 0471	sigma
trans-Zeatin-0-glucoside Riboside(ZR0G)	001 5131	sigma
Dihydrozeatin Riboside (DHZR)	-	-
Dihydrozeatin (DHZ)	-	-
N^6-(Δ^2-Isopentenyl) adenosine (iPA)	-	-
N^6-(Δ^2-Isopentenyl) adenine (iP)	-	-
cis-Zeatin (cZ)	-	-
cis-Zeatin Riboside (cZR)	-	-
Rabbit Anti-Goat IgG (H&L) Horseradish peroxidase conjugated	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท
ไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 24 หลุม	Nalge Nunc International
ไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม	Nalge Nunc International
จานเพาะเลี้ยง (Petri dish) ขนาด 35 x 15 มิลลิเมตร (มม.)	Nalge Nunc International
ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 5,000 ไมโครลิตร (มคล.) และ 1,000 ไมโครลิตร (มคล.)	Eppendorf
ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 200 และ 100 ไมโครลิตร	Gilson
กระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (มล.)	Nipro
เข็มฉีดยาเบอร์ 18, 20,21,23 และ 24	Nipro
เครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex mixer)	Labinco
เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (refrigerate centrifuge)	Kubota
เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 3 ตำแหน่ง)	Sartorius
เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader)	Anthos
ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)	Forma Scientific
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	EP/KE
พาราฟิล์ม	American National Can
กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverse microscope compound)	Olympus
กระดาษกรองชนิด polyvinylidene fluoride (PVDF)	Immobilon^{PM}
Magnetic Stirrer	HL Instrument
Nano drop	

3.1.3 สัตว์ทดลอง

3.2.1 หนูขาวตัวเล็ก (Mice) สายพันธุ์ Balb/c อายุ 6-8 สัปดาห์ เพศเมีย จำนวน 3 ตัว สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม

3.2.2 หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Swiss albino อายุ 4 สัปดาห์ เพศเมีย จำนวน 3 ตัว สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี .

3.2.1 การเตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง ดัดแปลงจาก Mentens *et al.* 1985

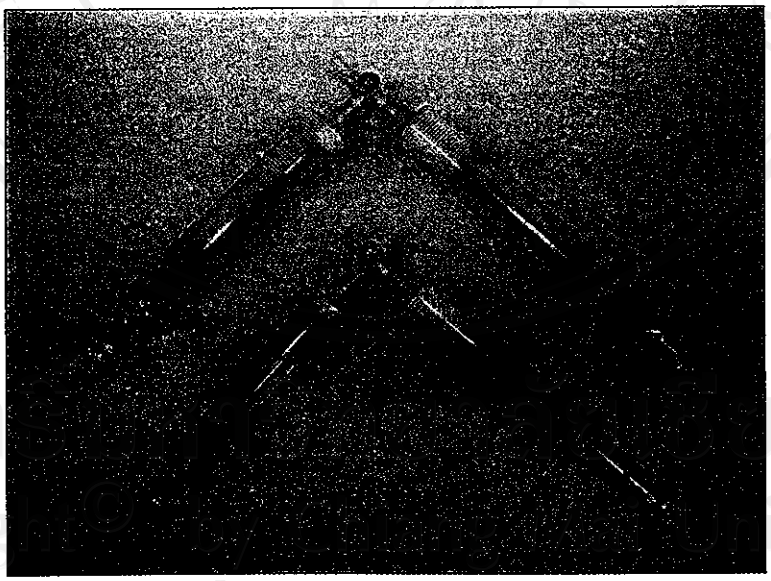
3.2.1.1 การเตรียมแอนติเจนในการกระตุ้นสัตว์ทดลอง

ใช้แอนติเจนชนิด Zeatin Riboside – Bovine Serum Albumin (ZR-BSA) ซึ่งได้ความอนุเคราะห์จาก Prof. K. F. Bangerth มหาวิทยาลัย Hohenhiem ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี วิธีการเตรียมแอนติเจนเพื่อการกระตุ้นสัตว์ทดลอง มีดังนี้ : ZR-BSA (ละลาย 10 มิลลิกรัม ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) pH = 7.4 1000 µl) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม PBS 80 ไมโครลิตร ลงในกระบอกฉีดยาขนาด 2 มิลลิลิตร ที่เตรียมเข้ากับ 3 ทาง (3-Way Stopcock) จากนั้นเติม

A : Freund's Complete Adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1

B : Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1

แล้วดันของเหลวจากกระบอกฉีดยาด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง กลับไปกลับมา 50-100 ครั้ง ให้ของเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงการต่อระหว่าง 3 ทางกับกระบอกฉีดยา เพื่อโฮโมจิไนซ์ระหว่าง adjuvant กับแอนติเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c

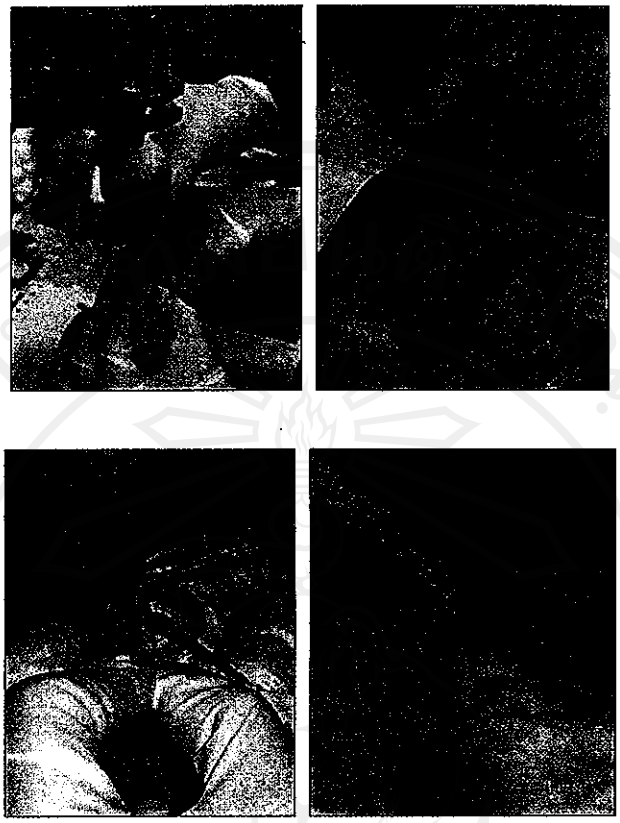
โดยนำแอนติเจนที่เตรียมไว้ฉีดบริเวณใต้ผิวหนังด้านหลังหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c อายุ 6-8 สัปดาห์ เพศเมีย จำนวน 3 ตัว ๆ ละ 200 ไมโครลิตร (ภาพที่ 8) ทำการฉีด 4 ครั้ง ทุก 2 สัปดาห์ ดังตาราง 2 หลังจากกระตุ้นแอนติเจนแล้ว 2 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดมาตรวจวัดระดับไตเตอร์ (ภาพที่ 9) ด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) จนกระทั่งได้ระดับไตเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเชื่อมเซลล์ (Fusion)

ตารางที่ 2 แสดงระยะเวลาและการเตรียมแอนติเจนกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ ZR-BSA ในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c

ครั้งที่	ระยะเวลา (วัน)	การเตรียมแอนติเจน
1	0	ตามสูตร A ในข้อ 3.2.1.1
2	14	ตามสูตร B ในข้อ 3.2.1.1
3	28	ตามสูตร B ในข้อ 3.2.1.1
4	42	ตามสูตร B ในข้อ 3.2.1.1

ภาพที่ 8 แสดงการฉีดแอนติเจนเข้าใต้ผิวหนังหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 9 แสดงการเจาะเลือดจากหางหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c

3.2.2 การผลิต Hybridoma cells ดัดแปลงจาก กนกวรรณ (2542) และมัลลิกา (2550)

3.2.2.1 การผลิตไฮบริโดมาต่อฮอร์โมน ZR ในหนูขาวตัวเล็ก

3.2.2.1.1 สัตว์ทดลองเป็นหนูที่ตรวจพบว่าสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมน ZR ส่วนหนูที่ใช้เตรียม Feeder cells เป็นหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Swiss albin อายุ 4 สัปดาห์ เพศเมีย ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่อย่างใด

3.2.2.1.2 การเตรียมเซลล์

3.2.2.1.2.1 การเตรียมเซลล์ไมอิโลมา

เตรียม 1 สัปดาห์ก่อนการเชื่อมเซลล์ (Fusion) เป็น cell line ชนิด X-63-Ag 8.653 สามารถใช้สำหรับผลิต Hybridoma cells ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ โดยเลี้ยงใน 10% Fetal Bovine Serum (10 % FBS) ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ ตรวจนับจำนวนเซลล์และสุขภาพของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อน fusion

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.1.2.2 การเตรียม feeder cells

เตรียมก่อนการ Fusion ประมาณ 2 วัน ซึ่ง feeder cell จะทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยงสำหรับเลี้ยงเซลล์ โดยนำหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Swiss albino ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำการสลบหนูด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วแช่ใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางลงบนแผ่นกระดานผ่าตัดในสภาพนอนหงาย ดึงหนังบริเวณหน้าท้องออกให้เหลือเยื่อหุ้มผนังช่องท้อง ฉีดสารละลาย IMDM เข้าไปในช่องท้อง 5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มเบอร์ 21 เข้าตรงตำแหน่งกลางท้อง ระวังอย่าให้ถูกบริเวณลำไส้ นวดส่วนท้องประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้ Media กระจาย จากนั้นดูดสารละลาย IMDM กลับจากช่องท้อง ใส่ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัว เท ลงในถาด (tray) เติมสารละลาย HAT อีก 30 มิลลิลิตร ดูดสารละลายใส่ลงในไมโครเพลทปลอดเชื้อ ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปใช้ต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อน

3.2.2.1.2.3 การเตรียมเซลล์ม้ามหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c

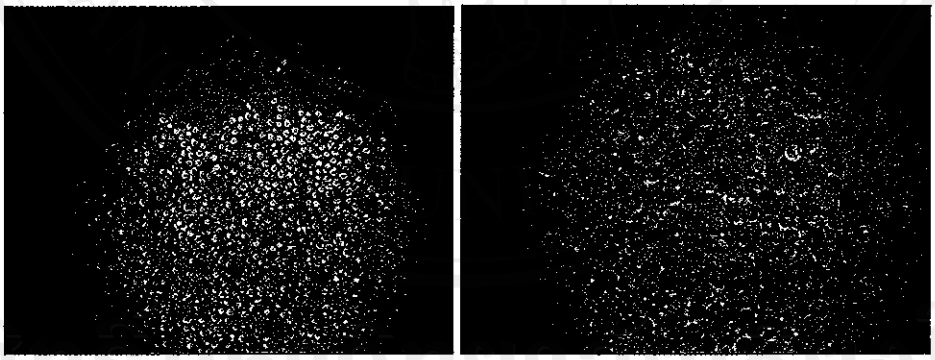
นำหนูขาวตัวเล็กที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำการสลบหนูด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วแช่ใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางลงบนแผ่นกระดานผ่าตัดในสภาพนอนหงายเปิดช่องท้องเพื่อตัดม้ามออก นำม้ามที่ได้ใส่ลงใน Petri dish ที่มีสารละลาย IMDM และฉีดชะล้างเซลล์ โดยใช้ Syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีด IMDM เข้าไปในถุงม้าม แล้วแยกเซลล์ออกจากถุงม้ามด้วยฟอร์เซพ (Forceps) จากนั้นถ่าย IMDM ที่มีเซลล์กระจายอยู่ทั่วไปลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร โดยกรองผ่านตะแกรงลวดทองแดง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 % 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย IMDM 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง เติมสารละลาย IMDM 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว ตรวจนับจำนวนเซลล์และสุขภาพเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ก่อน fusion

3.2.2.1.2.4 การเชื่อมเซลล์ (Fusion)

ทำการปั่นเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกตะกอนที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้งแล้วเติม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายอีก 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัว นับจำนวนเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมา โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเท่ากับ 2.5 : 1 ทำการปั่นร่วมกันด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง เติมสารละลายในการ fusion (Fusion Solution) ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดสารดังกล่าวจนครบ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เวลาภายใน 30 วินาที จากนั้น ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดสารเข้าออกผสมให้เข้ากันมากที่สุด ใช้เวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที เติมสารละลาย IMDM ให้ครบ 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดสารเข้าออก 2 นาที เติมสารละลาย IMDM อีกครั้ง 5 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเป็นการล้าง PEG ออก เทสารละลายทิ้งแล้วเติมสารละลาย IMDM อีก 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีอีกครั้ง เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดสารเข้าออกเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว เทลงใน Tray เติมสารละลาย HAT อีก 30 มิลลิลิตร ดูดสารละลายลงในไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้สารละลาย HT ใน 10 % FBS ในการเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเห็นโคลนของเซลล์



(A) (B)

ภาพที่ 10 แสดงโคลนของ Hybridoma cells ที่ได้หลังจากการ Fusion x100 เท่า (A) และ x400 เท่า (B)

3.3 การตรวจหา Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR (Screening)

การหา Hybridoma cells โดยวิธี Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect ELISA) โดยมีหลักการทดสอบ คือ เคลือบเพลท ZR-BSA และ BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใน Coating buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer) 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย gelatin ความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วยสารละลาย washing buffer 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์จาก Hybridoma cells ที่ต้องการตรวจวัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที ล้างเพลทด้วยสารละลาย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-HRP) ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ อัตราเจือจาง 1:1000 ลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที ล้างเพลทด้วยสารละลาย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (OPD substrate) ซึ่งประกอบด้วย substrate buffer 12 มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์รอกไซด์ (H_2O_2) 20 ไมโครลิตร และ orthophenylamine diamine (OPD) 0.018 กรัม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5- 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

3.4 การแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution

นำเซลล์จากหลุมที่มี Hybridoma cells ที่ผ่านขั้นตอนการตรวจวัดแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ด้วยวิธี Indirect ELISA จำนวน 1000 เซลล์ โดยการดูดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ใส่ลงใน tray เติม 10 % FBS 30 มิลลิเมตร ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัวมากที่สุด แล้วดูดมีเดียลงในเพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะเหลือมีเดียใน tray ประมาณ 10 มิลลิลิตร เติม 10 % FBS 20 มิลลิเมตร ลงใน tray ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัว จากนั้นดูดมีเดียลงในเพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะเหลือมีเดียใน tray ประมาณ 10 มิลลิลิตร เติม 10 % FBS 20 มิลลิเมตร ลงใน tray ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัวดูดมีเดียลงในเพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร สุดท้ายนำเพลททั้ง 6 เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ จนกระทั่งเห็นโคลนของ Hybridoma cells จึงทำการตรวจหา Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR อีกครั้ง

3.5 การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Isotyping)

การตรวจชนิดของแอนติบอดีมีวิธีการดังนี้ : เคลือบเพลทด้วยสารละลาย ZR-BSA 10 ไมโครกรัมใน Carbonate/Bicarbonate buffer 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย Gelatin ความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

buffer 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีจากโคลนที่ต้องการทดสอบ 20 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเพลทและทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง ต่อมาเติม Goat anti-mouse IgG1, Goat anti-mouse IgG2a, Goat anti-mouse IgG2b, Goat anti-mouse IgG3, Goat anti-mouse IgM และ Goat anti-mouse IgA ในอัตราเจือจาง 1:1000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าเพลทและทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย Rabbit anti-goat IgG (H&L) Horseradish peroxidase อัตราเจือจาง 1:1000 หลุมละ 10 ไมโครลิตรเขย่าเพลทและทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี (OPD substrate) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 10-15 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไป อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

3.6 การเพิ่มจำนวน Hybridoma cells

หลังจากได้ Hybridoma cells ที่ผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR จากการทำการแยกโคลนเดี่ยวแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ผลิตแอนติบอดีโดยนำเซลล์ที่เจริญเต็มหลุมไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 96 หลุมมาขยายเลี้ยงในไมโครเพลทปลอดเชื้อชนิด 24 หลุม เลี้ยงด้วย 10 % FBS นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ เมื่อเซลล์เจริญเต็มหลุมแล้ว จึงขยายสู่ Petri dish จนกระทั่งมีจำนวนเซลล์จำนวน 10^5-10^6 เซลล์/มิลลิลิตร จึงนำเซลล์ไปผลิตแอนติบอดีต่อไป

3.7 การผลิตแอนติบอดีจาก Hybridoma cells

เริ่มจากเตรียม 2 % FBS และ 10 % FBS ใส่ลงใน Flask ขนาด 175 มิลลิลิตร ปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม Hybridoma cells ลงไปให้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^5-10^6 เซลล์/1 มิลลิลิตร 2 % FBS, 10 % FBS หลังจากเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 30 วันหรือสังเกตจน Hybridoma cells ตายจนเกือบหมด จึงปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำเอาสารละลายที่ได้ ที่มีแอนติบอดีนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.8 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วย saturated ammonium sulfate

เตรียม saturated ammonium sulfate (ตามภาคผนวก) ข้ามคืน นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาปั่นแยกด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนของเหลวใส่ Erlenmeyer flask จำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4 flask ๆ ละ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าช้า ๆ ค่อย ๆ เติม saturated ammonium sulfate ช้า ๆ ในปริมาณดังนี้

Flask 1	ทดสอบ 20 %	ใส่ saturated ammonium sulfate	5.0	มิลลิลิตร
Flask 2	ทดสอบ 30 %	ใส่ saturated ammonium sulfate	8.6	มิลลิลิตร
Flask 3	ทดสอบ 40 %	ใส่ saturated ammonium sulfate	13.4	มิลลิลิตร
Flask 4	ทดสอบ 50 %	ใส่ saturated ammonium sulfate	20.0	มิลลิลิตร

จากนั้นปิด Erlenmeyer flask ด้วยพาราฟิล์ม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วปั่นแยกด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากส่วนที่เป็นตะกอนเติม Phosphate buffer saline (PBS) ลงไป 5 มิลลิลิตร นำไป dialyze ในสารละลาย PBS 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลาย PBS วันละครั้ง จากนั้นเก็บแอนติบอดีวัดหาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง Nano drop

3.9 การหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดี (MAbZR) และเอนไซม์ (anit-mouse IgG-AP) โดยวิธี Indirect ELISA

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วย ZR-BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุม ใน Coating buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.4 % BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีอัตราเจือจาง 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 ตามลำดับ โดยเติม 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-AP) ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัตราเจือจาง 1:1000, 1:5000, 1:10000 ตามลำดับ โดยเติมลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี (p-nitrophenylphosphate substrate) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 5*N* KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

3.10 การวัด cross reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วย ZR-BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุม ใน Coating buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.4 % BSA ปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นเติมฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ดังนี้ คือ *trans*-Zeatin Riboside, *trans*-Zeatin Riboside-5'-monophosphate, *trans*-Zeatin, Dihydrozeatin, *trans*-Zeatin-9-glucoside, DihydrozeatinRiboside, *cis*-Zeatin, *cis*-Zeatin Riboside, N^6-(Δ^2-Isopentenyl) adenosine, N^6-(Δ^2-Isopentenyl) adenine และ *trans*-Zeatin-0-glucoside Riboside ความเข้มข้น 100, 50, 25, 5, 2.5, 0.5, 0.05 และ 0 นาโนกรัม/ 50 ไมโครลิตร ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีอัตราเจือจาง 1:500 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ที่บ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-AP) ติดฉลากด้วยเอนไซม์ อัตราเจือจาง 1:5000 โดยเติมลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี (p-nitrophenylphosphate substrate) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 10-15 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 5*N* KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้มาคำนวณ % binding โดยให้ค่าการดูดกลืนแสง 0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็น 100 % จากนั้นหาค่าความเข้มข้น 50 % binding แล้วคำนวณค่า % Cross reactivity จากสูตร

$$\% \text{ Cross reactivity} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ ZR 50 \% binding}}{\text{ความเข้มข้นของฮอร์โมนแต่ละชนิดที่ 50 \% binding}} \times 100$$

3.11 การหากราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วย ZR-BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุมใน Coating buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.4 % BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นบ่มฮอร์โมน ZR ความเข้มข้น 100, 50, 25, 5, 2.5, 0.5, 0.05 และ 0 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีอัตราเจือจาง 1:500 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมฮอร์โมน ZR ที่บ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-AP) ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัตราเจือจาง 1:5000 โดยเติมลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี (p-nitrophenylphosphate substrate) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย *5N* KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

3.12 การทดสอบวัดปริมาณฮอร์โมนพืชในเนื้อเยื่อพืช

3.12.1 การเก็บตัวอย่าง (Sample Collection)

เก็บตัวอย่างจากต้นลำไย อายุ 2 ปี โดยเก็บ 3 ส่วน คือ ราก (Roots) ท่อน้ำ (Xylem sap) และใบ (Leaves) ในวันที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 หลังผ่านการราดสารโพแทสเซียมคลอเรต ($KClO_3$) และชุดควบคุม (Control)

3.12.2 การเตรียมเนื้อเยื่อพืช

เก็บตัวอย่างทั้งใบและราก โดยเก็บใส่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที เพื่อหยุดขบวนการเมทาบอลิสม จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย Freeze dryer จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส รอการนำมาวิเคราะห์

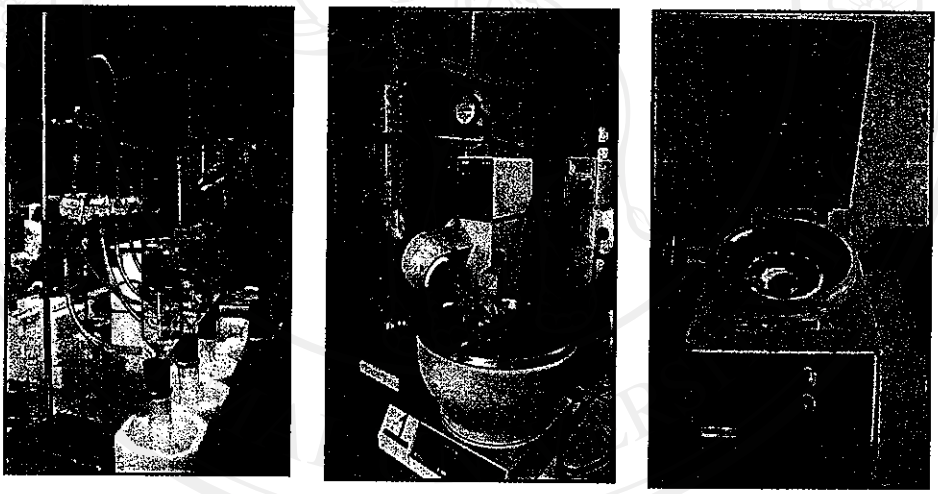
3.12.3 การสกัดฮอร์โมนจากเนื้อเยื่อพืช

3.12.3.1 การสกัดใบและราก นำตัวอย่างใบและรากที่เก็บไว้ไปทำให้แห้งด้วยความเย็นใต้สภาพสูญญากาศ ด้วยเครื่อง Free dry บดตัวอย่างทั้งใบและรากน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ให้ละเอียดด้วยโกร่งและเครื่องปั่น โดยเติมไนโตรเจนเหลวขณะทำการบดเพื่อรักษาสภาพความเย็น (ภาพที่ 11) เติมเมทานอลเย็น (เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดใส่ขวดปิดฝาไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ภาพที่ 11 การบดและการสกัดตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

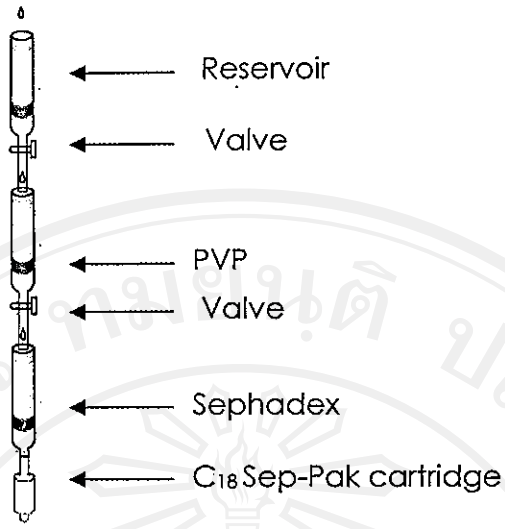
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.12.3.2 การทำให้บริสุทธิ์ กรองสารสกัดด้วย grassinter – filter ลงในขวดก้นกลม (Rotary flask) นำสารละลายไประเหยแห้งด้วย Rotary evaporator evaporator ล้างตะกอนสารสกัดในขวดก้นกลมด้วย 0.01 M Ammonium acetate 3 ครั้ง ๆ ละ 4 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrasonic bath เก็บสารละลายที่ได้ทั้ง 12 มิลลิลิตรรวมกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่เก็บไว้นำไปปั่นที่ 22000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที (ภาพที่ 12) หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาผ่านคอลัมน์ที่ประกอบด้วย 10 ml PVP (polyvinylpyrrolidone) 4 มิลลิลิตร DEAE-Sephadex A25 และ C_{18}-Sep-Pak cartridge (ภาพที่ 13) แล้วทำการชะ IAA และ GA_3 ออกจาก DEAE-Sephadex A25 ด้วย 2 M Acetic acid 20 มิลลิลิตร แล้วนำ C_{18}-Sep-Pak cartridge ไป ชะเอา IAA และ GA_3 ออกด้วย 65 % เมทานอล จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วย Vacuum centrifuge หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Indirect ELISA



ภาพที่ 12 การกรองสาร การระเหยแห้ง และการปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 13 ส่วนประกอบของคอลัมน์ที่ใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification) (พัชรินทร์, 2551)

3.12.4 การวัดปริมาณ ZR โดยวิธี Indirect ELISA

เคลือบเพลทด้วย ZR-BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุมใน Coating buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย 0.4 % BSA ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้น บ่มตัวอย่างเจือจางที่ 1:10, 1:50, 1:100 และ 1:200 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีอัตราเจือจาง 1:500 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมฮอร์โมน ZR ที่บ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างเพลท ด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-AP) ติดฉลากด้วยเอนไซม์ อัตราเจือจาง 1:5000 โดยเติมลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลท ด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสี (p-nitrophenylphosphate substrate) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เก็บเพลทไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 20-30 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยา ด้วย 5*N* KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved