บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอแอนติบอดี

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 – Moues IgG-FITC (AP326F, Chemicon)
24. Goat anti-Mouse IgG (M-1131, Sigma)
25. Freund's complete adjuvant (E-5881, Sigma)
26. น้ำเชื้อโคนมแช่แข็ง จากสถานีการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ กรมปศุสัตว์ เชียงใหม่

สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1. ฮอร์โมน Progesterone (EAZI-BREED CIDR®, InterAg AD5131)
2. ฮอร์โมน Follicle stimulating (Folltropin-V®, Vetrepharm Ltd.)
3. ฮอร์โมน Prostaglandin (Estrumate®, Schering-Plough Ltd.)
4. น้ำยาชะล้างตัวอ่อน (Complete Flushing solution, ICP bio®)
5. น้ำยารักษาสภาพตัวอ่อน (Embryo holding solution, ICP bio®)
6. น้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน (Ethylene glycol, ICP bio®)
7. ยาชา (Lidocaine®, Union drug laboratories Ltd.)
8. Phosphate buffer saline (PBS)
9. 75 % Ethanol
10. ไนโตรเจนเหลว
11. น้ำยาทำความสะอาด (Dettol®)
12. น้ำยาหล่อลื่น (K-Y jelly®, Johnson and Johnson)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

1. 1X solution (วิธีเตียมอยู่ในภาคผนวก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

1. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate: dNTPs) (U1330, Promega)
2. Taq DNA polymerase ประกอบด้วย 250 unit taq, 10X PCR buffer และ $MgCl_2$ (201203, Qiagen)
3. Primer สังเคราะห์ที่ Bioservic (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประเทศไทย

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)
8. TAE buffer

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. หลอดแช่แข็งตัวอ่อน (Minitub, Abfull-u Lab.)
2. ท่อยางไฟเลย์ (foley catheter), ท่อเดินน้ำยาชะล้าง
3. ถ้วยกรองตัวอ่อน (Miniflush, Minitube of America Inc.)
4. Immuno-Plate 24 หลุม บริษัท Nalge Nunc International ประเทศเดนมาร์ก
5. จานเลี้ยงเชื้อขนาด 35 x 15 มิลลิเมตร.บริษัท Nalge Nunc International ประเทศเดนมาร์ก
6. จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร.บริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. ไมโครไปเปต (micropipet) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัท AB Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. ไมโครไปเปต (micropipet) ขนาด 2.5 และ 10 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน
9. หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Molecular Bioproducts ประเทศแคนนาดา
10. กระบอกฉีดยา ขนาด 5, 10, 20 และ 50 มิลลิลิตร บริษัท Nipro ประเทศญี่ปุ่น
11. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 และ 20 ความยาว 1.5 นิ้ว บริษัท Nipro ประเทศญี่ปุ่น
12. เครื่อง DNA thermal cycler PTC-100 บริษัท MJ Research ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่อง Gene genius biomage system บริษัท Sysgen ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. เครื่อง Gel Electrophoresis บริษัท Toyobo ประเทศญี่ปุ่น
15. กล้อง Stereomicroscope SZ-ST บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
16. เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer UV-visible) โมเดล DU บริษัทBeckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-500 GE บริษัท Labinco ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) โมเดล 6930 บริษัท Kubota ประเทศญี่ปุ่น
19. เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 3 ตำแหน่ง) โมเดล 2482 บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน
20. เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL3015 บริษัท Gesellschaff fur Labortechmik ประเทศเยอรมัน
21. ไดอะไลซิ่งทิว (dialysing tube) ไม่ให้สารที่มีโมเลกุลตั้งแต่ 12,000 ขึ้นไปผ่าน โมเดล CelluSep บริษัท Membrane filtration product ประเทศสหรัฐอเมริกา
22. เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader) โมเดล 2010 บริษัท Anthos ประเทศออสเตรีย
23. ไมโครเพลท 96 หลุม (microplate 96 well) โมเดล Nunc-Immuno™ บริษัท Nalge Nunc international ประเทศเดนมาร์ก
24. ตู้อบ (incubator) บริษัท memmert ประเทศเยอรมันนี
25. Column liquid chromatography ขนาด 1 x 30 เซนติเมตร บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) โมเดล 3194 บริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
27. เครื่องปรับ pH (pH meter) โมเดล678 บริษัท EP/KE ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
28. พาราฟิล์ม บริษัท American NationalCan ประเทศสหรัฐอเมริกา
29. กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverted microscope) โมเดลCK2 บริษัทOlympus ประเทศญี่ปุ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 สัตว์ทดลอง

3.1.3.1 หนูขาวตัวเล็ก สายพันธุ์ Balb/C เพศเมีย อายุ 4 – 8 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว จากสถาบันสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

3.1.3.2 โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนเพศเมียจำนวน 12 ตัว จากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และฟาร์มเกษตรกร อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่

3.2 วิธีการเตรียมแอนติเจน

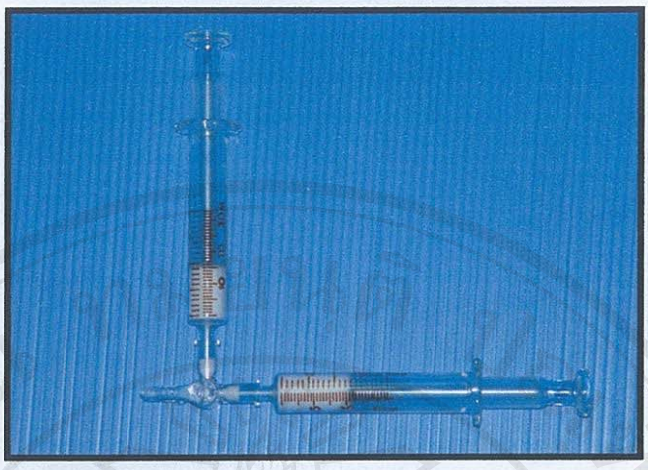
3.2.1 การเตรียมเอช-วายแอนติเจน

การเตรียมแอนติเจนของเอช-วายแอนติเจน โดยนำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาละลาย ก่อนนำไปปั่นล้างที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที จำนวน 5 ครั้งเพื่อนำเอาอาหารเลี้ยงสเปิร์มออกโดยใช้สารละลายPBSแช่ในการละลายแล้วนำมานับจำนวนสเปิร์มโดยใช้ hemacytometer โดยให้จำนวนเซลล์สเปิร์มประมาณ 2×10^6 เซลล์ ต่อ 100 ไมโครลิตร

3.2.2 วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน

นำเซลล์ที่ผ่านการล้างและทราบจำนวนเซลล์ที่แน่นอนแล้ว ในสารละลายพีบีเอส 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ Freund's complete adjuvant 100 ไมโครลิตร โดยใช้วิธีโฮโมจีไนเซชั่น (homogenization)ใส่สารทั้งหมดลงในกระบอกฉีดยาที่ต่อกับ 3 ทาง (3-way-stopcock) และกระบอกฉีดยาอีกอันหนึ่ง (รูปที่3-1) หลังจากนั้นดันกระบอกฉีดยาไปกลับประมาณ 50 –100 ครั้ง จนได้สารละลายสีขาวขุ่น จึงนำไปฉีดในหนูขาวตัวเล็ก ตัวละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ตัว โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณกลางหลัง ทุกๆ 2 สัปดาห์ ก่อนฉีดจะเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 300 ไมโครลิตร นำมาปั่นแยกพลาสมาและเก็บที่ –20 องศาเซลเซียสเพื่อนำมาตรวจสอบผลการตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

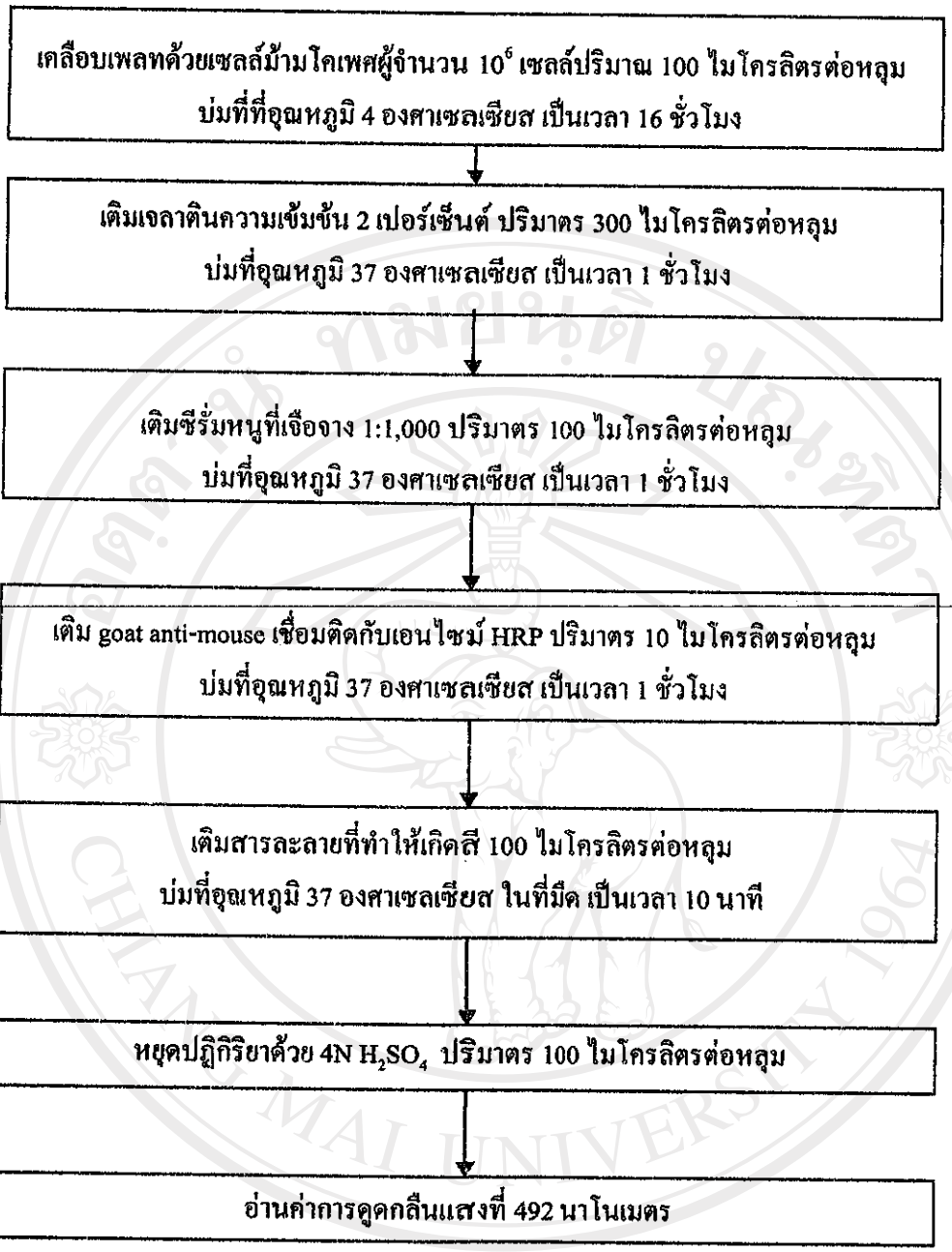


ภาพที่ 3-1. แสดงอุปกรณ์โฮโมจีไนซ์เพื่อเตรียมแอนติเจนในการกระตุ้น.

3.2.3 การวัดระดับแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนด้วยวิธี Indirect ELISA

เคลือบเพลทด้วยเซลล์ม้ามโคเพศผู้เนื่องจากความต้องการความจำเพาะต่อเอช-วายแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ จำนวน 10^6 เซลล์ในสารละลายสำหรับการเคลือบ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมซีรั่มหนูที่เจือจาง 1:1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม goat anti-mouse เชื่อมติดกับเอนไซม์ฮอสแรดิชเพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA – reader (แสดงดังภาพที่ 3-2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-2. แสดงขั้นตอนการวัดระดับแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนด้วยวิธี Indirect ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การผลิตโมโนโคลนอแอนติบอดีต่อต่านเอช-วายแอนติเจน

3.3.1. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

3.3.1.1. การเตรียมเซลล์ไมอิโลมา

ใช้เซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63–Ag8.653 โดยเลี้ยงใน 10 % FBS ที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ตรวจนับจำนวนเซลล์และสุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

3.3.1.2. การเตรียมเซลล์ม้ามหนูขาวตัวเล็ก

ฆ่าหนูขาวตัวเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 75 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อวางบนแผ่นโฟม เปิดช่องท้องเพื่อตัดม้าม นำม้ามที่ตัดมาแช่ในสารละลาย IMDM และฉีดชะล้างเซลล์ด้วยสารละลาย IMDM ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.83 % 10 มิลลิลิตร นาน 6 นาที นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย IMDM 10 มิลลิลิตรนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง เติมสารละลาย IMDM 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette) ดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว ตรวจนับจำนวนเซลล์ และสุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

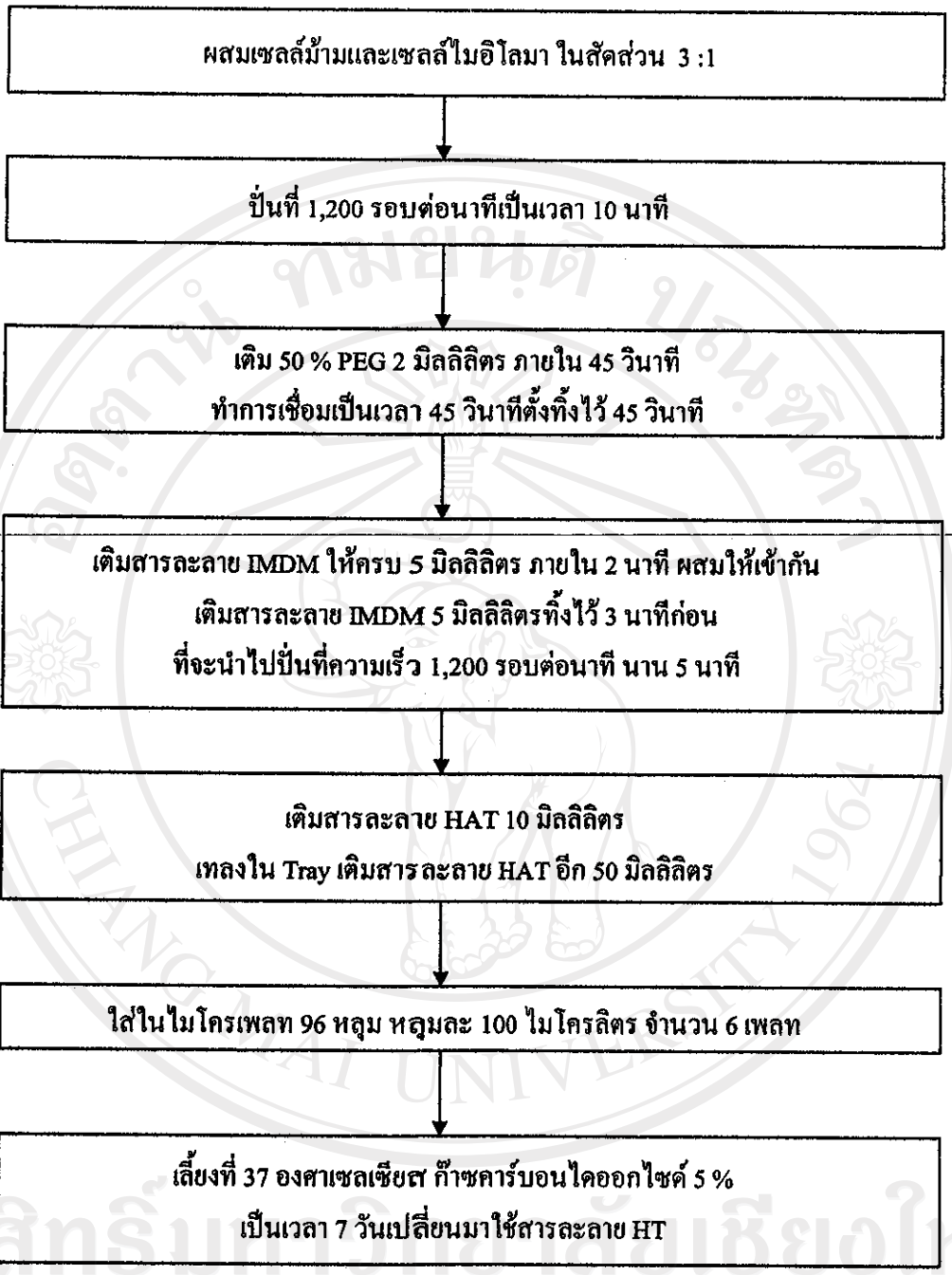
3.3.1.3 การเตรียม Feeder Cell

ฆ่าหนูขาวตัวเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 75 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางบนแผ่นโฟม ดึงหนังหน้าท้องออก ให้เห็นเยื่อบุช่องท้องอยู่ ฉีดสารละลาย IMDM เข้าไปในช่องท้อง 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1 – 2 นาที ดูดสารละลาย IMDM กลับจากช่องท้องใส่ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว เทลงในถาด (tray) เติมสารละลาย HAT อีก 50 มิลลิลิตร ดูดสารสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 6 เพลท นำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปใช้ ต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อน

3.3.2 การเชื่อมเซลล์

ปั่นเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย IMDM 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว นับจำนวนเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาก่อนที่จะผสมเซลล์ทั้งสองในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยให้สัดส่วนเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเป็น 3:1 นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 50 % PEG 2 มิลลิลิตรภายใน 45 วินาที ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เพื่อทำการเชื่อมเป็นเวลา 45 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที เติมสารละลาย IMDM ให้ครบ 5 มิลลิลิตร ภายใน 2 นาที ผสมให้เข้ากัน เติม IMDM 5 มิลลิลิตรและทิ้งไว้ 3 นาทีก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อเป็นการล้าง PEG ออก เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว เทลงในถาด เติมสารละลาย HAT อีก 50 มิลลิลิตร ดูดสารสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 6 เพลท นำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้สารละลาย HT ในการเลี้ยงเซลล์ (แสดงดังภาพที่ 3-3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-3. ขั้นตอนการเชื่อมเซลล์ในการผลิตไฮบริโดมาต่อเอช-วายแอนติเจน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

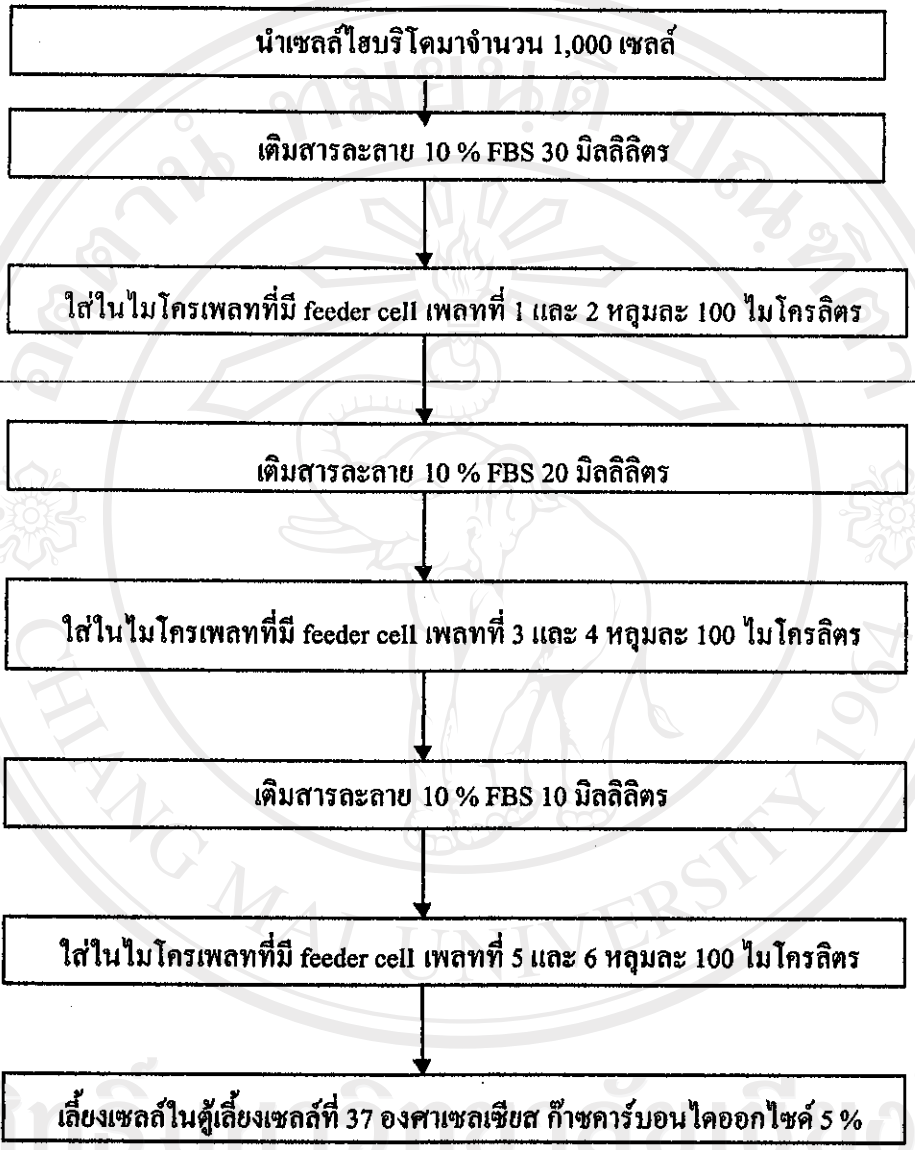
ใช้วิธี ELISA เช่นเดียวกับการตรวจวัดระดับแอนติบอดี คือเคลือบเพลทด้วยเซลล์ม้ามโคเพศผู้เนื่องจากความต้องการความจำเพาะต่อเอช-วายแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ จำนวน 10^6 เซลล์ ในสารละลายสำหรับการเคลือบ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมน้ำเลี้ยงที่ได้จากหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมา ปริมาตร 30 - 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม goat anti-mouse เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย $4NH_2SO_4$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA – reader

3.3.4 การแยกโคลนเดี่ยว โดยวิธี Limiting Dilution

เตรียม feeder cell ในไมโครเพลทแบบปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม จำนวน 6 เพลท ใช้พลาสเจอร์ปิ-เปตดูดน้ำเลี้ยงเซลล์เข้าออก เพื่อให้เซลล์กระจายในน้ำเลี้ยง นับจำนวนเซลล์โดยเครื่องนับเซลล์ (haemocytometer) ให้มีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวน $1.4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ต้องการเซลล์ 1,000 เซลล์ ต้องดูดน้ำเลี้ยง 67 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10 % FBS 30 มิลลิลิตร เทลงใน Tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดให้เซลล์กระจายโดยทั่วก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 % FBS 20 มิลลิลิตร เทลงใน Tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดให้เซลล์กระจายโดยทั่วก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 % FBS 10 มิลลิลิตร เทลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดให้เซลล์กระจายโดยทั่วก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เหลือ 10 มิลลิลิตรทิ้ง เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ จนกระทั่งพบโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนอีกครั้งหนึ่ง (แสดงดังภาพที่ 3-4)



ภาพที่ 3-4. ขั้นตอนการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting Dilution.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.5การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากที่ได้เซลล์ไฮบริโดมาผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน และแยกโคลนเดี่ยวแล้ว การเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ผลิตแอนติบอดี เมื่อจำนวนเซลล์ในหลุมเต็มนำมาขยายที่เพลทชนิด 24 หลุม เลี้ยงด้วย 10 % FBS เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เมื่อเซลล์เจริญเต็มหลุมแล้ว จึงขยายสู่จานเลี้ยงเซลล์ จนกระทั่งมีจำนวนเซลล์ $10^6 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงนำเซลล์ไปขยายต่อไป

3.3.6 การผลิตแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสมโดยวิธีเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ *(in vitro)*

เป็นการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมในตู้เลี้ยงเซลล์โดยอาศัยน้ำเลี้ยงที่ได้มีการเตรียมขึ้นจากวิธีของ กนกวรรณ (2542) โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เตรียมสารละลาย UltraDOMA-PF (ตามภาคผนวก ก) ใส่ลงใน tissue culture flask ขวดละ 20 มล. แล้วจึงเติมเซลล์ลูกผสมลงไปให้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^5-10^6 เซลล์/1มิลลิลิตรสารละลาย UltraDOMA-PF นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส 5 % CO_2 ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 11 วันหรือสังเกตจากเซลล์ลูกผสมตายเกือบหมด จึงปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำเอาสารละลายไปแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

3.3.7 การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์

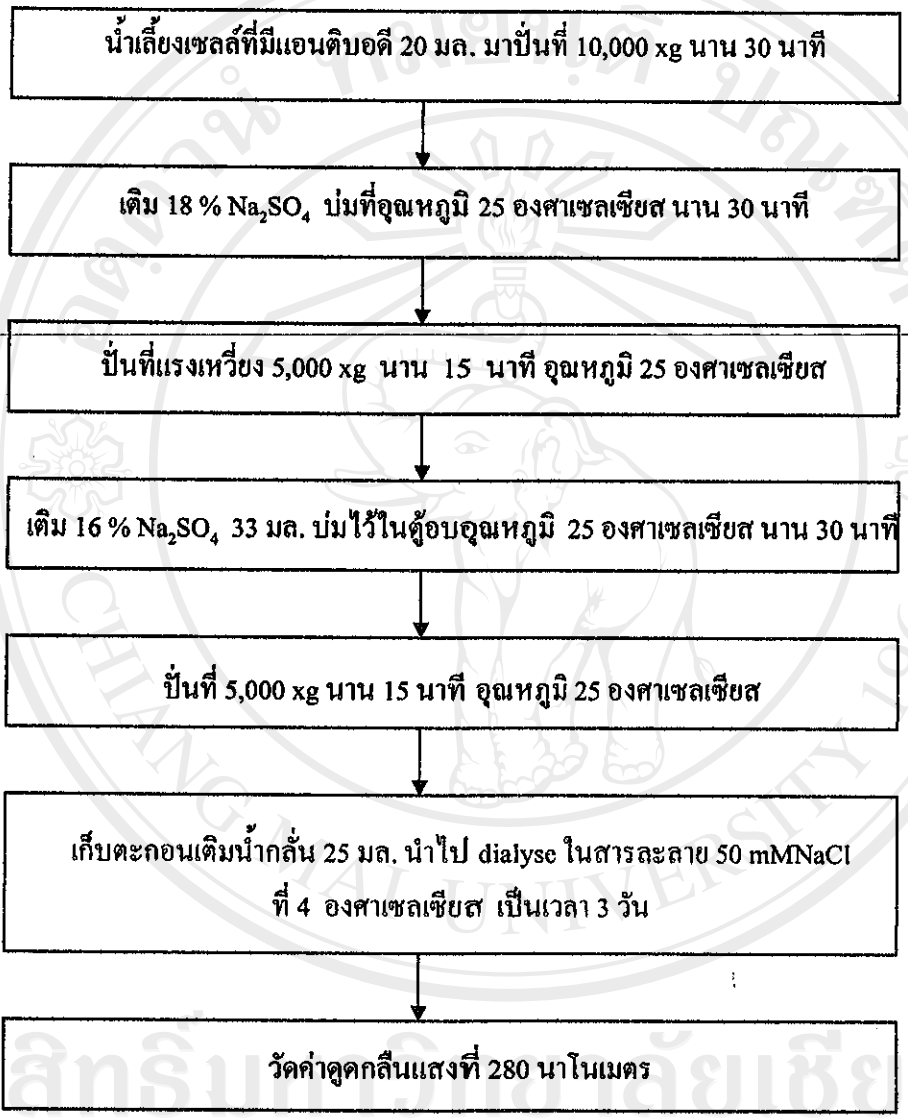
แยกแอนติบอดีด้วยการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน จี (immunoglobulin G, IgG) ตามวิธีของ Arvieux and Williams (1988) ดังนี้: นำเอาน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี 20 มล. มาปั่นแยกที่แรงเหวี่ยงมากกว่า 10,000 xg นาน 30 นาที เก็บส่วนของเหลว เติม 18 % Na_2SO_4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 5,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากส่วนที่เป็นตะกอน เติม 16 % Na_2SO_4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไป 33 มล. บ่มไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 5,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอน นำส่วนที่เป็นตะกอนเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไป dialyse ในสารละลาย 50 mMNaCl นาน 3 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน 50 mMNaCl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วันละครั้ง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน (ภาพที่ 3-5)

ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm. mg/ml.....(1)

1.4



ภาพที่ 3-5. การแยกแอนติบอดีออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.8 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย Column Chromatography

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย thiophilic column chromatography เทสารละลาย ก. (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ลงในคอลัมน์ปริมาตร 100 มล. ปล่อยให้ของเหลวไหลผ่านในอัตรา 1 มิลลิลิตร/ 5 นาที แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการตกตะกอน มาเติม K_2SO_4 ให้มีความเข้มข้น 0.5 M ค่อย ๆ หยดสารละลายลงในคอลัมน์จนหมด แล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย ก. ปริมาตร 50 มิลลิลตร แล้วล้างออกด้วยสารละลาย ข. (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บของเหลวที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงไว้เพื่อนำไปใช้ต่อไป และล้าง column ด้วยสารละลาย ข. ต่อไปจนได้สารละลายค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 0.005 ซึ่งแสดงว่าไม่เหลือส่วนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากนั้นจึงล้างด้วย สารละลาย ก. อีก 30 – 50 มิลลิลิตร ก่อนเก็บ column ไว้ใช้ในครั้งต่อไป

3.4 การกระตุ้นการตกไข่ (Superovulation)

การคัดแม่โคเพื่อเข้าโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่เพื่อให้แม่โคมีการตกไข่มากว่าหนึ่งใบ (ตารางที่ 3-1) ควรเลือกแม่โคที่มีพันธุกรรมการให้น้ำนมที่ดีและมีระบบสืบพันธุ์อยู่ในขั้นดี คือมีรอบการเป็นสัดที่แน่นอนมีการผสมติดดีเพื่อช่วยลดความเสี่ยงของการผสมไม่ติด และช่วงที่ทำการกระตุ้นควรอยู่ในช่วงที่อากาศมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เนื่องจากช่วงที่อากาศความชื้นสูงโคจะเกิดปัญหาการผสมไม่ติด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3-1. โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ

ตารางกำหนดเวลาย้ายฝากตัวอ่อน		
วันที่	รายการ	เวลา
0	ใส่ ฮอร์โมน Progesterone	เช้า
9	FSH 3.5 ml	เช้า
	FSH 3.5 ml	บ่าย
10	FSH 3.0 ml	เช้า
	FSH 2.5 ml	บ่าย
11	FSH 2.0 ml	เช้า
	$PGF_{2\alpha}$ 2 ml	เช้า
	FSH 1.5 ml	บ่าย
	ถอดฮอร์โมน Progesterone	บ่าย
12	FSH 1.0 ml	เช้า
	FSH 1.0 ml	บ่าย
14	สังเกตสัด/ AI	เช้า
	สังเกตสัด/ AI	บ่าย
15	สังเกตสัด/ AI	เช้า
	สังเกตสัด/ AI	บ่าย
21	COLLECT EMBRYO	เช้า

หมายเหตุ ฮอร์โมน Progesterone (EAZI-BREED CIDR®) ใส่ในช่องคลอด

ฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Vetrepharm Ltd.) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพก เวลาเช้า-บ่าย ห่างกัน 8 ชั่วโมง

ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ (Estrumate®, Schering-Plough Ltd.) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การเก็บตัวอ่อนและ การหาตัวอ่อน (Flushing Embryo and Collect Embryo)

การเก็บตัวอ่อนโดยการชะล้างด้วยน้ำยาชะล้างสำเร็จรูปโดยมีขั้นตอนดังนี้:

(1) ล้วงตรวจพยาธิสภาพของรังไข่ทั้ง 2 ข้างต่อการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่

(2) ทำความสะอาดโคทดลองโดยเฉพาะบริเวณสะโพกและอวัยวะสืบพันธุ์ ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ และเช็ดให้แห้ง

(3) ฉีดยาชาเข้าช่องกระดูกสันหลัง (Caudal articular process)บริเวณโคนหางข้อที่ 2 โดยใช้ 2 % Lidocaine® ปริมาณ 3 มิลลิลิตร สำหรับแม่โคที่น้ำหนัก 500 กิโลกรัม

(4) สอดท่อยางโฟเลย์ที่ได้เคลือบสารหล่อลื่นเพื่อให้สามารถผ่านเข้าสู่ปีกมดลูกได้ง่าย โดยวางตำแหน่งของท่อยางให้อยู่ส่วนต้นของปีกมดลูก และทำการบรรจุลมในลูกบัลลูนของท่อยางเพื่อยึดท่อกับผนังของปีกมดลูก โดยต้องระวังไม่ให้มีการขยายใหญ่มากเนื่องจากจะทำให้เกิดการฉีกขาดของผนังมดลูกและอาจมีเลือดปนออกมากับน้ำยาชะล้างหรือลูกบัลลูนแตกทำให้น้ำเข้าไปในมดลูกได้ หรือการที่บรรจุลมน้อยไปทำให้บัลลูนมีขนาดเล็กและเลื่อนหลุดได้

(5) ต่อท่อยางโฟเลย์เข้ากับท่อยางนำน้ำยาชะล้าง (flushing media) โดยแขวนถุงน้ำยาให้อยู่สูงกว่าตัวสัตว์ประมาณ 1 เมตร จากนั้นจึงเดินน้ำยาโดยปล่อยเข้าสู่ปีกมดลูกครั้งละ 60-90 มิลลิลิตร พร้อมกับการนวดปีกมดลูกเบาๆ จึงปล่อยออกสู่ที่กรองตัวอ่อนต่อไป โดยปกติจะทำการชะล้างปีกมดลูกแต่ละข้างโดยใช้น้ำยาประมาณ 500 มิลลิลิตรต่อปีกมดลูกหนึ่งด้าน

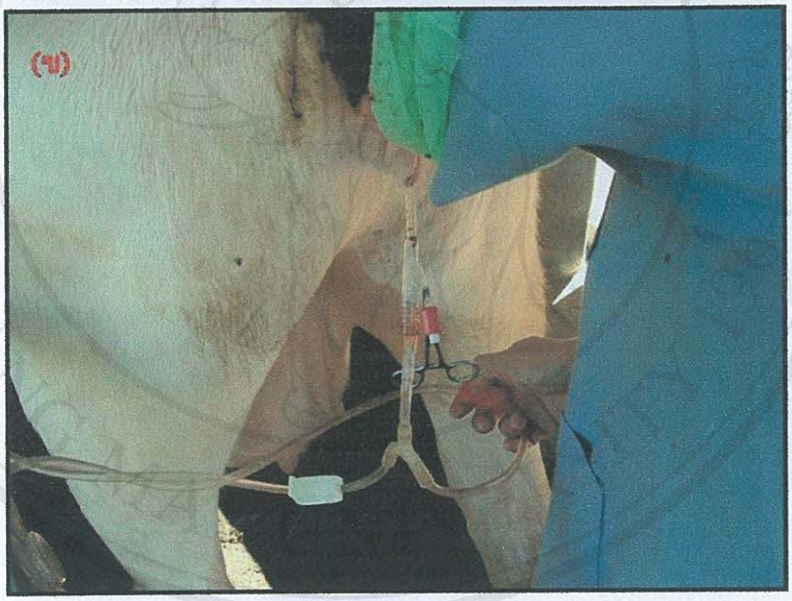
(6) หลังการเก็บตัวอ่อนจะทำการฉีดฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ 2 มิลลิลิตร เพื่อสลายคอร์ปัสลูเทียมของรังไข่ (ภาพที่ 3-6)

หลังการเก็บตัวอ่อนจะทำการย้ายตัวอ่อนจากที่กรองลงสู่จานเลี้ยงเชื้อ โดยมีขั้นตอนดังนี้:

(1) แกะที่กรองตัวอ่อนพร้อมทั้งฉีดล้างบริเวณกระดาษกรองด้วยน้ำยาชะล้างตัวอ่อน ลงสู่จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร

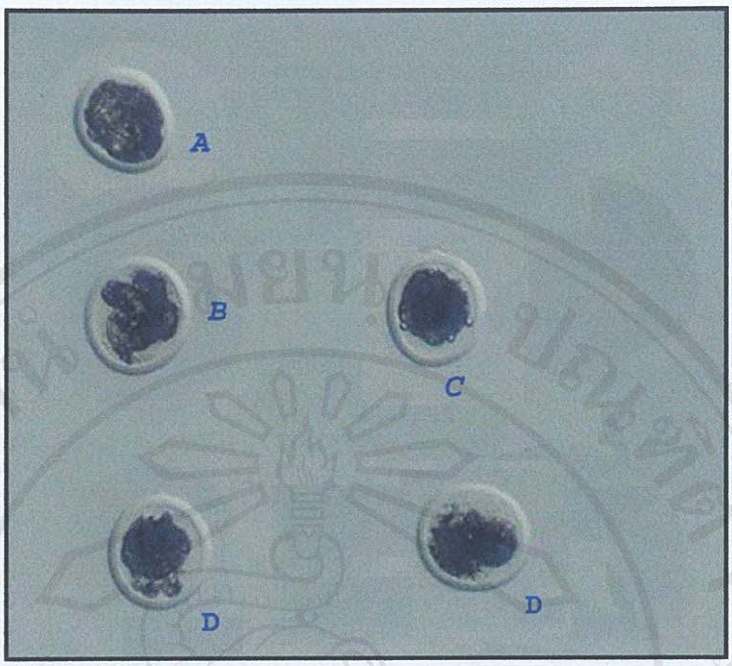
(2)หาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope) พร้อมกับประเมินคุณภาพตัวอ่อนก่อนย้ายตัวอ่อนลงสู่ จานเลี้ยงเชื้อขนาด 35 x 15 มิลลิเมตรซึ่งภายในบรรจุด้วยน้ำยารักษาสภาพตัวอ่อน (embryo holding solution) ซึ่งคุณภาพของตัวอ่อนแบ่งได้เป็นเกรด A, B, C และ D และตามระยะของตัวอ่อนคือ 4-8 เซลล์, 16–32 เซลล์ หรือระยะมอลลูล่า (morula), ระยะบลาสโตซิส (blastocyst) และบลาสโตซีสระยะแรก (early blastocyst) และอาจจะพบไข่ที่แสดงการสลายตัว (degenerated embryo) หรือไข่ที่ไม่มีการปฏิสนธิ (unfertilized ova) ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 3-7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-6. แสดงขั้นตอนการชะล้างตัวอ่อน ก) ฉีดยาชาเข้าช่องกระดูกสันหลัง (Caudal articular process) บริเวณโคนหางข้อที่ 2 ด้วย 2 % lidocaine®, ข) สอดท่อยางโฟเลย์ที่เข้าสู่ปีกมดลูกโดยต่อเข้ากับท่อยางนำน้ำยาชะล้าง.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

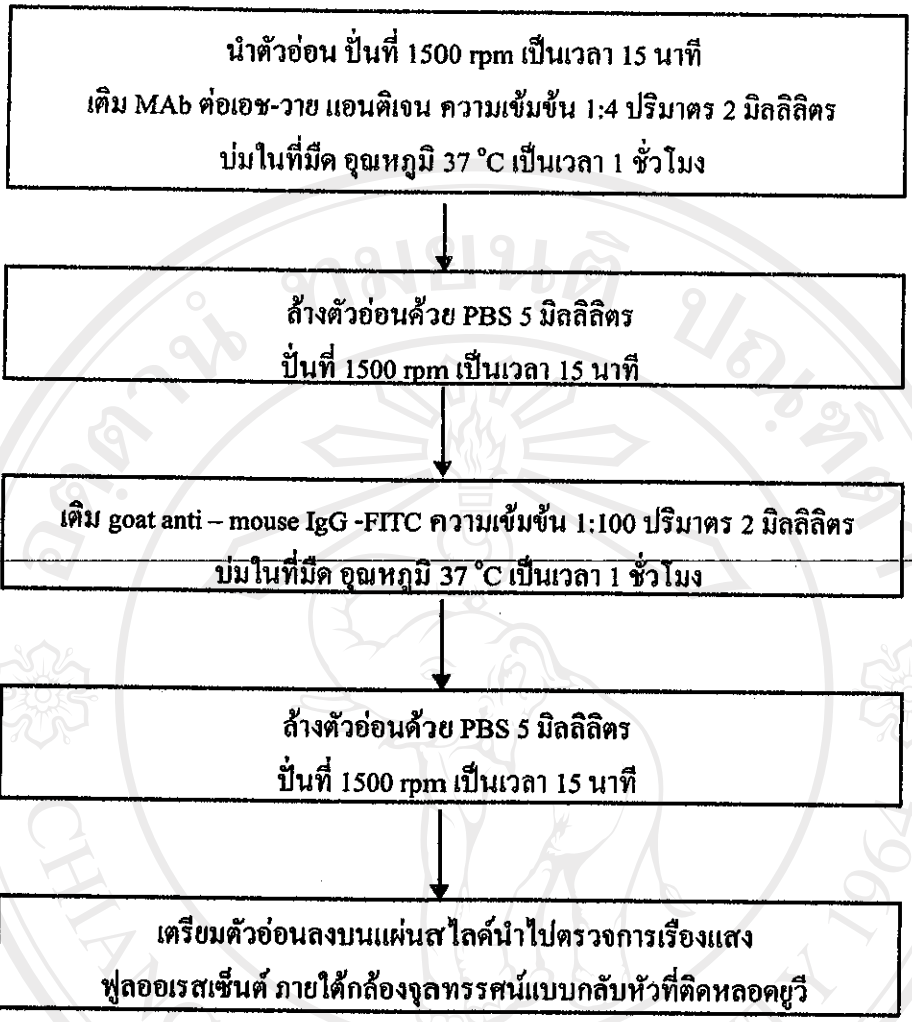


ภาพที่ 3-7. แสดงตัวอ่อนมีตรวจพบภายในห้องปฏิบัติการ: A.ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส B. ตัวอ่อนที่ตายในมดลูก C. ตัวอ่อนระยะมอรูล่า และ D. ไข่ที่ไม่มีการปฏิสนธิ.

3.6 การตรวจสอบเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

ใช้พลาสเจอร์ปิเปตที่ได้ทำการยืดปลายแล้วดูดตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิส เนื่องจากเป็นระยะที่มีความเหมาะสมในการตรวจสอบเพศเพราะสามารถเก็บเซลล์ได้มาก มาล้างในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปบ่มในสารละลายเลี้ยงตัวอ่อน M-199 200 ไมโครลิตร (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ที่ผสมแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนในสัดส่วน 2:1 เป็นเวลา 45 นาที ล้างตัวอ่อนในสารละลาย PBS 200 ไมโครลิตร 1 ครั้ง จึงนำไปบ่มในสารละลายเลี้ยงตัวอ่อน M-199 200 ไมโครลิตร ที่เจือจางสารละลาย goat anti – moues IgG-FITC ความเข้มข้น 1:1,000 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างตัวอ่อนในสารละลาย PBS 200 ไมโครลิตร นำไปตรวจการเรืองแสงฟูลออเรสเซ็นต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัวที่ติดหลอดยูวี (ภาพที่ 3-8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-8. แสดงขั้นตอนการตรวจสอบเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การผ่าแบ่งตัวอ่อน (Embryo Biopsy)

ขั้นตอนการผ่าแบ่งมีดังนี้:

(1) เตรียมจานเลี้ยงเชื้อขนาด 35 x 15 มิลลิเมตร. จำนวน 6 จานประกอบไปด้วย: (1.1) จานใส่ PBS จำนวน 3 จาน (1.2) จานใส่ 70 % แอลกอฮอล์ จานวน 1 จาน (1.3) จานใส่ embryo holding จำนวน 1 จาน (1.4) จานใส่ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 1 จาน ใช้สำหรับล้างใบมีดหลังการตัดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการตัดตัวอ่อนแต่ละใบ

(2) จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิเมตรที่หยด PBS ปริมาณ 20 ไมโครลิตรเพื่อใช้ในการตัดเก็บผิวหน้าเซลล์

(3) ดูดตัวอ่อนและทำการล้างจำนวน 3 ครั้งในสารละลาย PBS ก่อนย้ายลงในหยด PBS ของจานที่ใช้ในการตัด

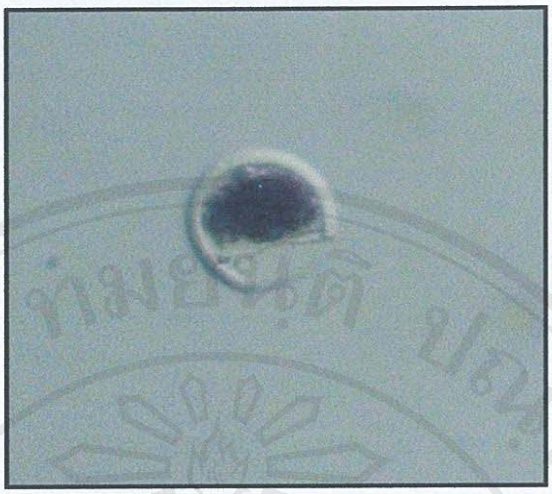
(4) ล้างใบมีดใน 70 % แอลกอฮอล์, น้ำกลั่นและ embryo holding media อย่างละ 1ครั้ง

(5) ตัดตัวอ่อนในลักษณะที่เฉือน ผ่านตัวอ่อนในส่วนของโทรโฟบลาสให้ได้เซลล์จำนวน 2-10 เซลล์

(6) ดูดเซลล์ส่วนที่ตัด (biopsied cells) ใส่ในหลอดPCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ที่บรรจุสารละลายในการสกัดดีเอ็นเอ (1X solution)

(7) ดูดตัวอ่อนที่เหลือกลับสู่จานเลี้ยงเชื้อที่มี embryo holding solution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 – 10. แสดงตัวอ่อนของโคลูกผสม พื้นเมือง-ฟรีเชี่ยน (Friesian) ที่เก็บจากการกระตุ้นการตกไข่ ณ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเซลล์บางส่วนถูกตัดไปคัดเพศด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอรเรส.

3.8 การตรวจสอบเพศด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ขั้นตอนการตรวจสอบเพศ

1.การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบ (template) โดยนำชิ้นส่วนที่ได้จากการผ่าแบ่งใส่ในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตรที่เติมสารละลาย 1X solution (วิธีการเตรียมจากภาคผนวก) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำไปใส่เครื่อง DNA thermal cycler โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เพื่อเป็นการสกัดดีเอ็นเอมาทำการตรวจสอบเพศ

2. การตรวจสอบเพศ ซึ่งจะใช้ Primer 2 คู่ในการตรวจสอบคือ primer bovine (F-5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3' และ R-5'-TGG TCA GAA ACC GCA CAC TG-3') ที่ใช้ยืนยันว่าดีเอ็นเอที่มาใช้เป็นของโคจริงโดยมีขนาด 210 bp และ primer BOVM97 (F-5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3' และ R-5'-GCT ATG CTA ACA CAA GCA CAC TG-3') เป็น primer ที่มีความเฉพาะกับโครโมโซม Y ของเพศผู้ มีขนาด 141 bp ซึ่งในหลอด ปฏิกิริยาจะประกอบไปด้วย 10X solution ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, primer bovine (forward และ reward) ความเข้มข้น10 พิโคโมล ปริมาตรอย่างละ 0.3 ไมโครลิตร, primer BOVM97

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(forward และ reward) ความเข้มข้น10 พิโคโมล ปริมาตรอย่างละ 0.3 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอแม่แบบ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 3.9 ไมโครลิตรและ Taq polymerase ความเข้มข้น 0.5 ยูนิต ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ซึ่งโปรแกมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณจะประกอบไปด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annaeling ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30วินาที จำนวน รอบ 35 รอบและในรอบสุดท้ายตัวอย่างจะถูกทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที และนำ DNA ที่ได้มาทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 2 % เป็นเวลา 20 นาที นำไปย้อมด้วย 5 % ethidium bromide และส่องใต้แสง UV ถ้าตัวอย่างเป็นเพศผู้จะพบแถบสีชมพูของโครโมโซม Y ปรากฏขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved