บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1. อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1. สารเคมี

สารเคมี	Lot number	บริษัท	เกรด
เจลาติน (gelatin)	K4988770	Merck	Analytical
ซัลฟูริคแอซิด (sulfuric acid, H_2SO_4)	-	J.T. Baker	Analytical
ซิตริคแอซิด (citric acid)	C2270	Sigma	Analytical
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl)	K29287204	Merck	Analytical
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	K19742898	Merck	Analytical
โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate,$NaHCO_3$)	31437	Riedel-de Haen	Analytical
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรท (disodiumphosphatemonohydrate, Na2HPO4.12H2O)	30414	Riedel-de Haen	Analytical
ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-Dimethyl-formamide)	D4254	Sigma	Analytical
ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (dihydrogen phosphate, KH2PO4)	4873	Merck	Analytical
ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)	9268-05	J.T. Baker	Analytical

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	Lot number	บริษัท	เกรด
1-ethyl-3 (3-dimethylaminiopropyl)-carbodiimide	C7625	Sigma	Analytical
Fetal calve bovine serum (FBS)	10270-023	Seromed	Cell culture
Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM)	1088539	GIBCOBRL	Analytical
Polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 80)	H0306	Sigma	Analytical
Progesterone	P0130	Sigma	Analytical
โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, KCl)	31248	Riedel-de Haen	Analytical
แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$)	101217	Merck	Analytical
โอ-ฟรีนิลลีล-ไดนามีน-เฮสซีแอล (O-phenylene-diamine-HCl, OPD)	80972	Zyme lab	Analytical

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer UV-visible)	DU	Beckman	อเมริกา
เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer)	K-500 GE	Labinco	อเมริกา
เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (refrigerate centrifuge)	6930	Kubota	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 3 ตำแหน่ง)	2482	Sartorius	เยอรมันนี
เครื่องเขย่า(shaker)	GFL3015	Gesellschaff fur Labortechmik	เยอรมันนี
ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 5,000 และ 1,000 ไมโครลิตร	-	Eppendoff	เยอรมันนี
ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 200 และ 100 ไมโครลิตร	Pipetman	Gilson	ฝรั่งเศส
ไดอะไลซิ่งทิวป์ (dialyzing tube)	CelluSep	Membrane filtration product	อเมริกา
เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader)	2010	Anthos	ออสเตรีย
ไมโครเพลท 96 หลุม	Nunc-Immuno™	Nalge Nunc International	เดนมาร์ก
ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร	-	-	ไทย
ตู้อบ (incubator)	-	memmert	เยอรมันนี
ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator)	3194	Forma Scientific	อเมริกา
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	678	EP/KE	สวิสเซอร์แลนด์
พาราฟิล์ม	-	American NationalCan	อเมริกา
กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverse microscope compound)	CK2	Olympus	ญี่ปุ่น
กระดาษกรองชนิด polyvinylidene fluoride (PVDF)	Immobilon P-Transfer	Immobilon™	อเมริกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2. สัตว์ทดลอง

โคนมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชียนพันธุ์แท้ 8 ตัว และโคนมลูกผสม 8 ตัว โดยเลือกโคนมที่เพิ่งคลอดได้ไม่เกิน 15 วัน ระยะเวลาในการเก็บนาน 135 วัน/ตัว หรือจนกระทั่งโคตั้งท้อง เก็บตัวอย่างโดยตรงจากถังเก็บน้ำนมของโคแต่ละตัว หลังจากรีดนมเสร็จ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมีนาคม – พฤษภาคม 2547 และ เดือนพฤศจิกายน 2547- มกราคม 2548

3.3. การเก็บตัวอย่างน้ำนม

เก็บตัวอย่างน้ำนมจากโครีดนมที่ฟาร์มโคนมศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ใส่ในขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร ซึ่งมีโปแตสเซียมไดโครเมท 0.3 กรัม ในช่วงเวลา 16:00 – 18:00 น. ทุกวันจันทร์และวันศุกร์ เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจวัดฮอร์โมนต่อไป

3.4. การเก็บข้อมูล

3.4.1. วันผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด

3.4.2. วันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอด

3.4.3. ระยะเวลาระหว่างวันคลอดจนถึงวันผสมติด

3.4.4. จดบันทึกอุณหภูมิ

3.4.5. ปริมาณน้ำนม

3.4.6. วันคลอดลูก

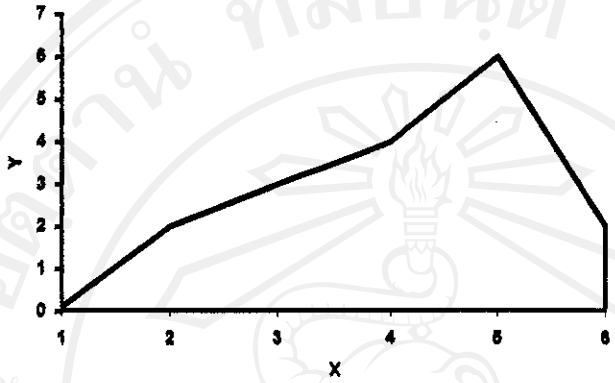
3.5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.5.1. รวบรวมปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดโดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟโดยโปรแกรม AUTOCAD R.14 โดยมีวิธีการคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป AUTOCAD R.14 for Windows มีวิธีการตามตัวอย่างดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

: ตัวอย่าง การหาพื้นที่ใต้กราฟที่มีจุด (x,y) คือ

X	0	1	2	3	4	5
Y	0.1	2	3	4	6	2



Command : point (Enter)

Point : 0,0 (Enter)

Command : area (Enter)

< first point>/Enter/Add/Subtract : nod (Enter)

of : 0,0 (Enter)

Next point : 0,0.1 (Enter)

Next point : 0,2 (Enter)

Next point : 2,3 (Enter)

Next point : 3,4 (Enter)

Next point : 4,6 (Enter)

Next point : 5,2 (Enter)

Next point : 5,0 (Enter) (Enter)

Area = 16.0500

∴ จะได้พื้นที่ใต้กราฟ = 16.0500 ตารางหน่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2. วิเคราะห์ผลของการทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอด, ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน, คลื่นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน, แอมพริจูด (amplitude) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และจำนวนครั้งของการผสมเทียมต่อการผสมติด เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ในฤดูร้อนและหนาว ด้วยวิธี *t* – test

3.5.3. วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด วันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอดระหว่างโคนมที่ให้ปริมาณน้ำนมต่ำและสูง ด้วยวิธี *t* - test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6. ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.6.1. การเตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

ใช้แอนติเจนชนิด Progesterone3(O-Carboxymethyl) Oxime bovine serum albumin (P_4-3CMO-BSA) วิธีเตรียมแอนติเจนมีดังนี้: เติมสารละลายที่มีแอนติเจน 50 ไมโครกรัม ต่อ PBS 50 ไมโครลิตร ลงในกระบอกฉีดยาขนาด 2 มิลลิลิตร ที่เตรียมเข้ากับ 3 ทาง (3-Way Stopcock) จากนั้นเติม Freund's Complete Adjuvant (FCA) อีก 100 ไมโครลิตร สำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในครั้งแรก และครั้งต่อไปจะเปลี่ยนเป็น Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) แล้วดันของเหลวจากกระบอกฉีดยาด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่ง กลับไปกลับมา 50-100 ครั้ง ให้ของเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) นำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังของหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 6 – 8 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัวๆละ 200 ไมโครลิตร ทำการฉีด 4 ครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1. แสดงขั้นตอนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Progesterone-3CMO-BSA ในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c

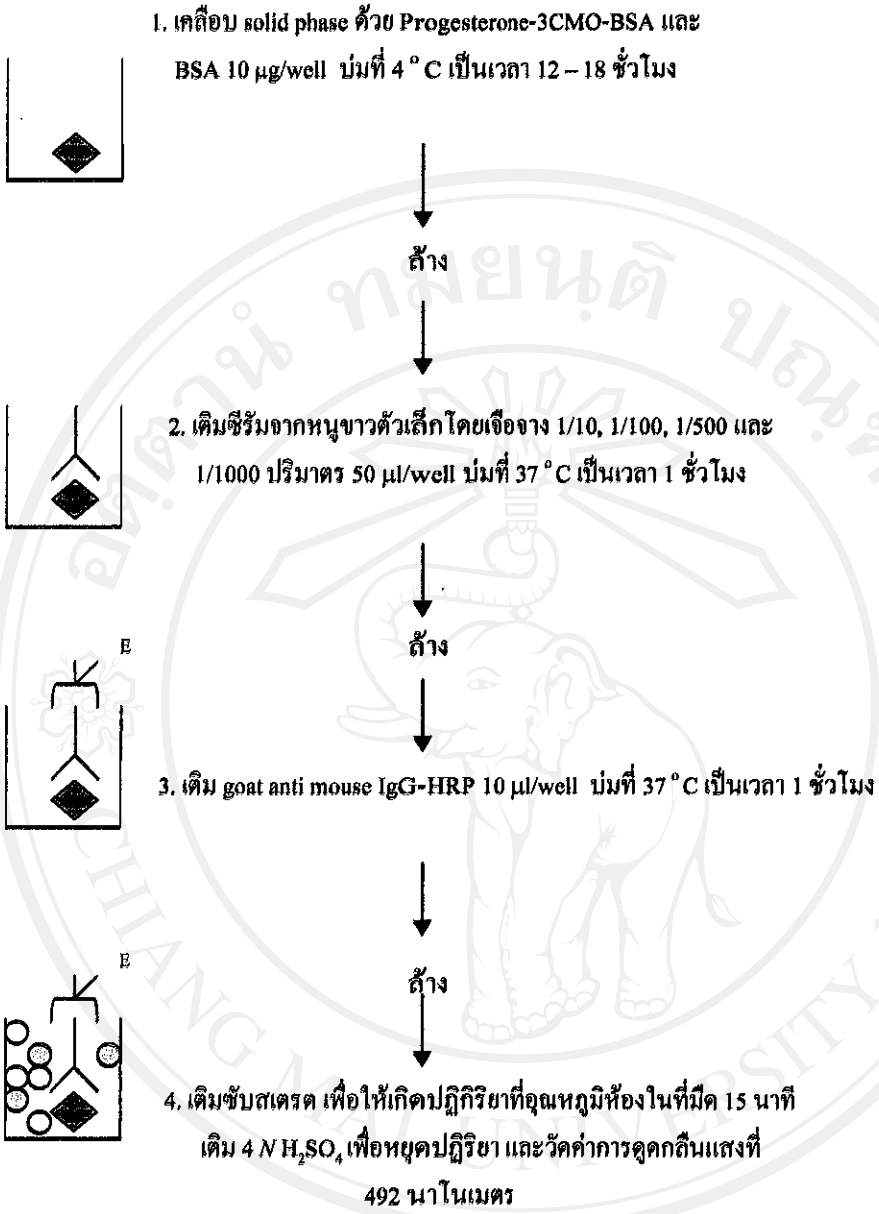
วันที่ 0	immunization ครั้งที่ 1 และกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่เตรียมตามข้อ 1
วันที่ 14	immunization ครั้งที่ 2 และกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนเช่นเดียวกับครั้งแรก แต่แทนที่ FCA ด้วย FIA
วันที่ 28	immunization ครั้งที่ 3 และกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนเช่นเดียวกับครั้งแรก แต่แทนที่ FCA ด้วย FIA
วันที่ 42	immunization ครั้งที่ 4 และกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนเช่นเดียวกับครั้งแรก แต่แทนที่ FCA ด้วย FIA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.2. การวัดระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

ก่อนการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างเลือดโดยการกรีดเส้นเลือดจากบริเวณหาง เพื่อตรวจหาแอนติบอดีไตเตอร์ (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect ELISA) โดยมีหลักการทดสอบคือ เคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน เติมซีรัมที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีลงไป ตรวจดูแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนด้วยแอนติเจนต่ออิมมูโนโกลบูลินซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยอาศัยดูการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตที่เติมลงในขั้นตอนสุดท้าย (ภาพที่ 3-1) การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจสอบนั้น (นภาธร, 2536)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-1. การตรวจหาแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี Indirect ELISA .

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.3. การผลิตไฮบริโดมา (Hybridoma)

3.6.3.1. การผลิตไฮบริโดมาต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในหนูขาวตัวเล็ก

3.6.3.1.1.สัตว์ทดลองเป็นหนูที่ตรวจพบแล้วว่าสามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนได้ดีที่สุด ส่วนหนูที่ใช้เตรียม Feeder cells เป็นหนูขาวตัวเล็ก สายพันธุ์ BALB/c ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่อย่างใด

3.6.3.1.2. สารเคมีที่ใช้

3.6.3.1.2.1. การเตรียม serum free media : ผสม Iscove' s Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 17.7 กรัม, $NaHCO_3$ 3.024 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย 1N HCl หรือ 1 N NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน filter membrane ขนาดรูที่ของเหลวกรองผ่าน 0.2 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางกระดาษกรอง 47 มิลลิเมตร ที่ประกอบเข้ากับ ขนาด 1 ลิตร ต่อเข้ากับเครื่อง Vaccuum

3.6.3.1.2.2. 2-Mercaptoethanol: เตรียมสารละลาย 2-ME (1000X) 0.035 มิลลิลิตร เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เวลาใช้นำสารละลาย 2-ME 1 มิลลิลิตร เติมใน IMDM 1 ลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

3.6.3.1.2.3. 10 % Fetal Bovine Serum (10 % FBS) 10 % FBS ใน IMDM ประกอบด้วย FBS 10 มิลลิลิตร เติม IMDM 90 มิลลิลิตร ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้อุ่นในอ่างน้ำร้อน (water bath) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.6.3.1.2.4. สารละลาย Hypoxanthine, Aminopterine และ Thymidine (HAT) ความเข้มข้น 100 เท่า: โดยใช้ HAT ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเติมลงใน 10 % FBS ใน IMDM 99 มิลลิลิตร ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้อุ่นใน Water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.6.3.1.2.5. สารละลาย Hypoxanthine และ Thymidine (HT) ความเข้มข้น 100 เท่า : โดยใช้ HT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน 10 % FBS ใน IMDM 99 มิลลิลิตร ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้อุ่นใน Water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.3.1.2.6. สารละลายที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์ (Fusion solution) : โดยใช้สารละลาย 50 % Polyethylene glycol (PEG) ประกอบด้วย Polyethylene glycol 2 กรัม เติม IMDM 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autocave)

3.6.3.1.2.7. สารละลาย 7.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) ประกอบด้วย DMSO 7.5 มิลลิลิตร เติม IMDM ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ดังนั้น Fusion solution จะประกอบด้วยสัดส่วน 50 % PEG : 7.5 % DMSO เท่ากับ 1 : 2

3.6.3.1.3. การเตรียมเซลล์ :

3.6.3.1.3.1. การเตรียมเซลล์ไมอิโลมา : เตรียม 1-2 สัปดาห์ก่อน Fusion เป็น cell line ชนิด X63/Ag8.653 สามารถใช้สำหรับผลิตไฮบริโดมา ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ โดยจุ่ม vial ที่มีเซลล์แช่แข็งลงในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ปลอดเชื้อ จุ่ม vial ลงในสารละลาย 70 % แอลกอฮอล์ จากนั้นจึงเปิดฝาแล้วย้ายเซลล์ลงในหลอดทดลองสำหรับงานเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นล้างด้วย serum free media ด้วยเครื่อง centrifuge จำนวน 2 ครั้ง เพื่อขจัดสาร DMSO ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับแช่แข็งเซลล์ (freezing media) จากนั้นย้ายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง (petri dish) โดยเลี้ยงใน 10 % FBS ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ ตรวจนับจำนวนเซลล์และสุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

3.6.3.1.3.2. การเตรียม Feeder Cell โดยนำหนูขาวตัวเล็กที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำการสลบด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วแช่ใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางลงบนแผ่นกระดานผ่าตัดในสภาพนอนหงาย ดึงหนังบริเวณหน้าท้องออกให้เหลือเยื่อหุ้มผนังช้องท้อง ฉีดสารละลาย IMDM เข้าไปในช่องท้อง 5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มเบอร์ 21G เข้าตรงตำแหน่งกลางท้อง ระวังไม่ถูกบริเวณลำไส้ นวดส่วนท้องประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้ media กระจาย จากนั้นดูดสารละลาย IMDM กลับจากช่องท้องใส่ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัว เทลงในถาด (tray) เติมสารละลาย HAT อีก 30 มิลลิลิตร ดูดสารละลายใส่ลงในไมโครเพลท 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปใช้ต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อน

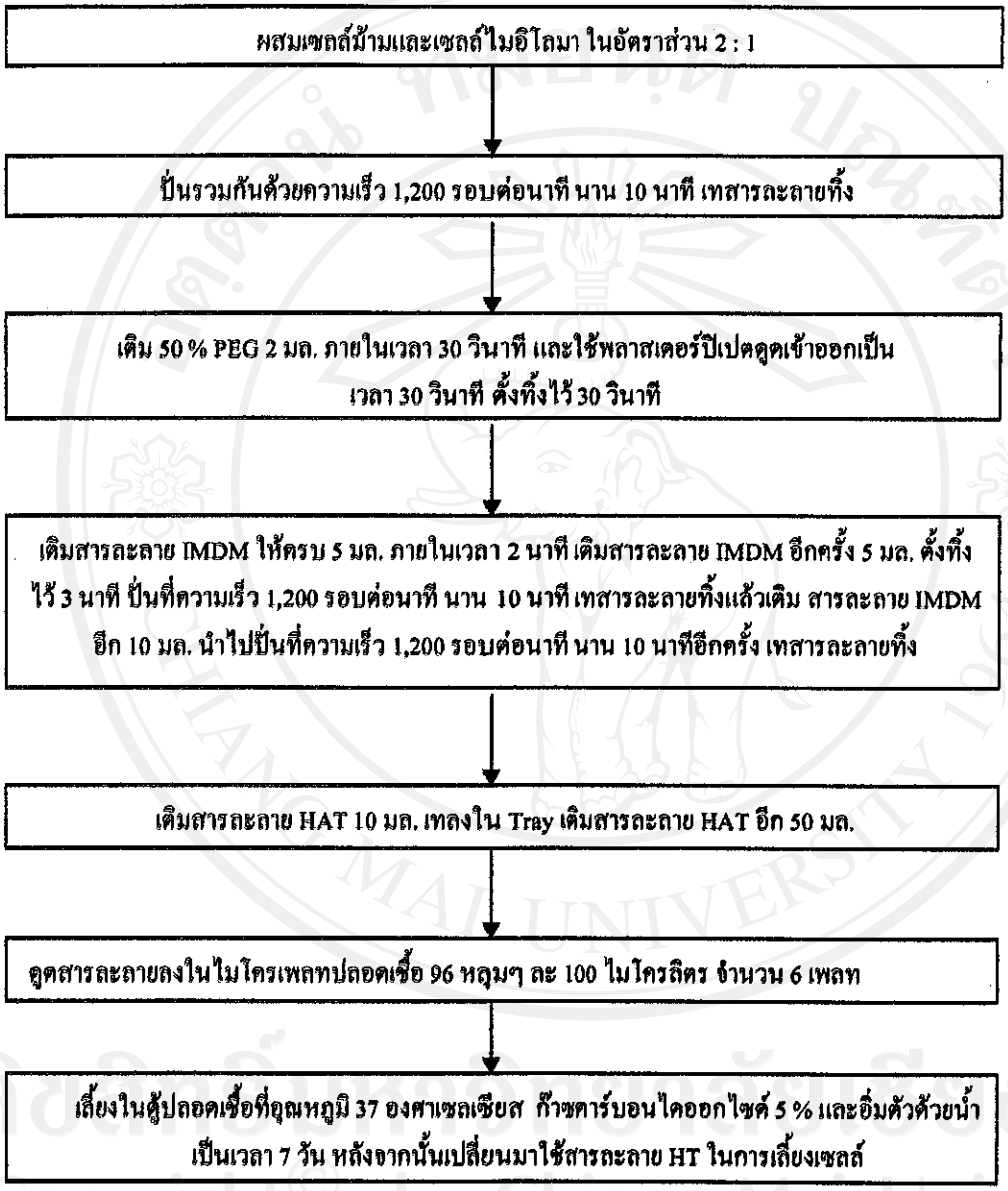
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.3.1.3.3. การเตรียมเซลล์ม้ามหนูขาวตัวเล็กนำหนูขาวตัวเล็กที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำการสลบหนูด้วยการรมคลอโรฟอร์มแล้วฆ่าเชื้อโดยการแช่ลงใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางลงบนแผ่นกระดานผ่าตัดในสภาพนอนหงาย เปิดช่องท้องเพื่อตัดม้าม นำม้ามที่ได้ใส่ลงใน petri dish ที่มีสารละลาย IMDM และฉีดชะล้างเซลล์โดยใช้ไซริงซ์ (syringe)ขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีด media เข้าไปในถุงม้าม แล้วแยกเซลล์ออกจากถุงม้ามด้วยฟอร์เซพ (Forceps) จากนั้นถ่าย media ที่มีเซลล์กระจายอยู่ทั่วไปลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร โดยกรองผ่านตะแกรงลวดทองแดง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 % 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย IMDM 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง เติมสารละลาย IMDM 5 มิลลิลิตรใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว ตรวจนับจำนวนเซลล์ และสุขภาพเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์ก่อนการเชื่อมเซลล์

3.6.3.1.3.4. การเชื่อมเซลล์ (Fusion) โดยการปั่นเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง แล้วเติมสารละลายอีก 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัว นับจำนวนเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาก่อนที่จะผสมเซลล์ทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยให้สัดส่วนของเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเป็น 2 : 1 นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง เติมสารละลาย 50 % PEG ซึ่งเป็นสารเชื่อมเซลล์ (Fusion Solution) ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดสารดังกล่าวจนครบ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เวลาภายใน 30 วินาที จากนั้นใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดสารเข้าออกผสมให้เข้ากันมากที่สุด ใช้เวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที เติมสารละลาย IMDM ให้ครบ 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดสารเข้าออก 2 นาที เติมสารละลาย IMDM อีกครั้ง 5 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเป็นการล้าง PEG ออก เทสารละลายทิ้งแล้วเติม สารละลาย IMDM อีก 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีอีกครั้ง เทสารละลายทิ้งจากนั้นเติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตรใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดสารเข้าออกเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายตัว เทลงใน tray เติมสารละลาย HAT อีก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 มล. ดูดสารละลายลงในไมโครเพลทปลอดเชื้อ 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้สารละลาย HT ในการเลี้ยงเซลล์ดัง ภาพที่ 3-2



ภาพที่ 3-2. ขั้นตอนการเชื่อมเซลล์ในการผลิตไฮบริโดมาต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7. การแยกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution

เริ่มจากการนำเซลล์จากหลุมที่มีไฮบริโดมาที่ผ่านขั้นตอนการตรวจแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี ELISA จำนวน 1,000 เซลล์ โดยการดูดจากน้ำเลี้ยงเซลล์ นำน้ำเลี้ยงเซลล์ใส่ลงใน tray เติม 10 % FBS 30 มิลลิลิตร ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัวมากที่สุด แล้วดูดมีเดียลงในเพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะเหลือมีเดียใน tray ประมาณ 10 มิลลิลิตร เติม 10 % FBS 20 มิลลิลิตร ลงใน tray ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัว จากนั้นดูดมีเดียลงในเพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จะเหลือมีเดียใน tray ประมาณ 10 มิลลิลิตร เติม 10 % FBS 20 มิลลิลิตร ลงใน tray ใช้พลาสเตอร์ปิเปตดูดเข้าออกเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัว ดูดมีเดียลงในเพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร สุดท้ายนำเพลททั้ง 6 เลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % และอิ่มตัวด้วยน้ำ

3.8. การตกตะกอนโปรตีน

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน ปริมาตร 100 มล. ปั่นแยกที่แรง 10,000 x g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บส่วนของเหลว แล้วเติม Na_2SO_4 18 กรัม บ่มไว้ในตู้อบที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นที่แรง 5,000 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากนั้นเติม Na_2SO_4 16 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไป 33 มล. บ่มไว้ในตู้อบที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นที่แรง 5,000 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากส่วนที่เป็นตะกอนเติมน้ำกลั่นลงไป 2 มล. นำไป dialyze ในสารละลาย 50 mMNaCl 3 วัน โดยเปลี่ยนสารละลายวันละครั้ง จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย (มก./มล.)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm}}{1.4}$$

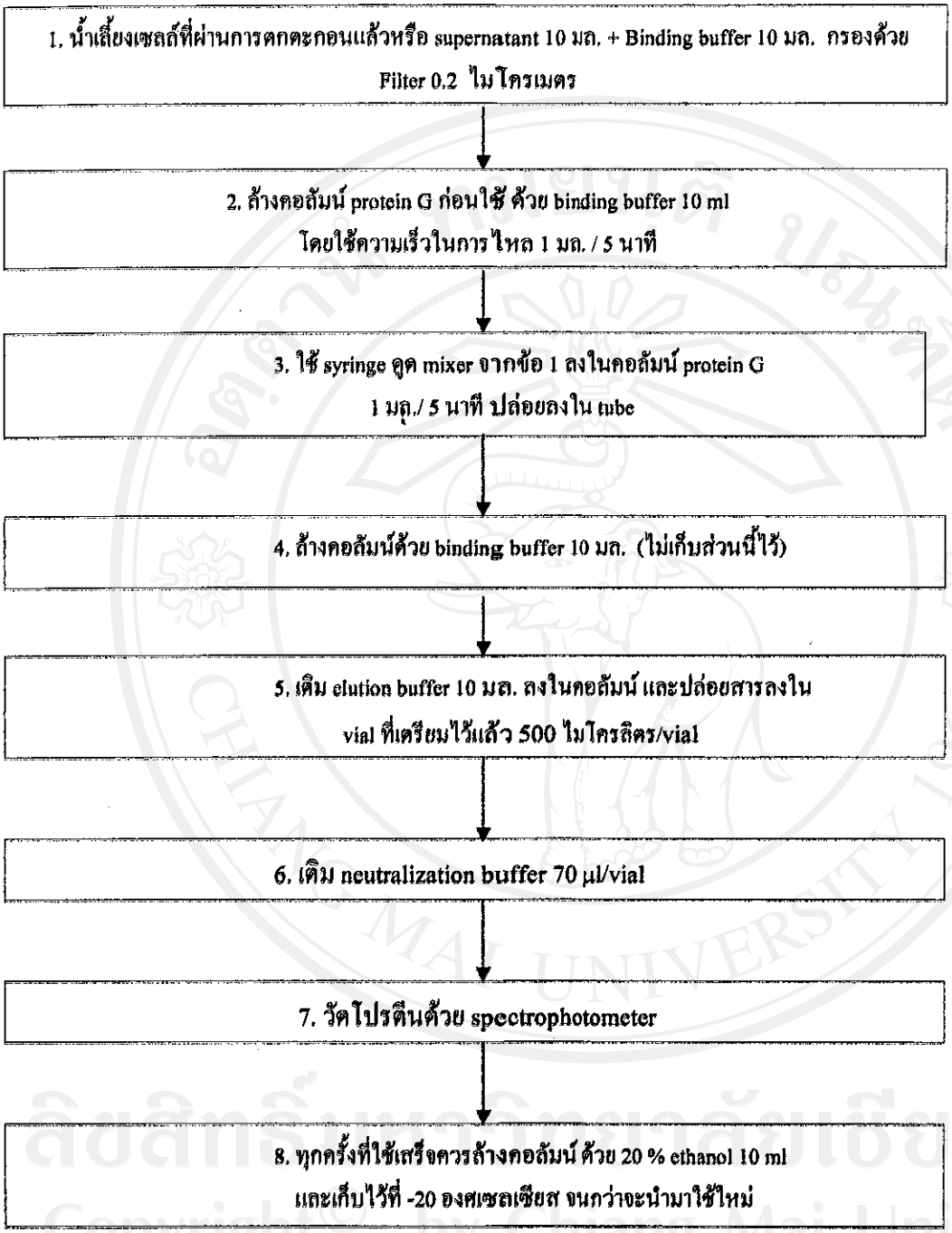
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9. การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน จี (protein G)

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน ทำให้บริสุทธิ์ด้วย column Hi Trap™ Protein G (ภาพที่ 3-3) ใช้ syringe เติมสารละลาย binding buffer ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดันของเหลวผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ 5 นาที แล้วนำสารผสมระหว่างแอนติบอดี 10 มิลลิลิตร และสารละลาย binding buffer 10 มิลลิลิตร เติมผ่านลงในคอลัมน์จนหมด แล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย binding buffer อีกครั้งหนึ่ง และเติมสารละลาย elution buffer 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใน vial ที่เติมสาร neutralization buffer 70 ไมโครลิตร เก็บสารละลายนี้ประมาณ 20 vials vial ละประมาณ 500 ไมโครลิตร เติม 20 เปอร์เซ็นต์ ethanol 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างคอลัมน์แล้วเก็บคอลัมน์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ใหม่ นำสารละลายเก็บไว้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยวิธี ELISA แล้วรวมสารละลายที่มีค่าดูดกลืนแสงที่มากกว่าหรือเท่ากับ 3 นาโนเมตร เข้าด้วยกัน จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย มก./มล.} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm.}}{1.4}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



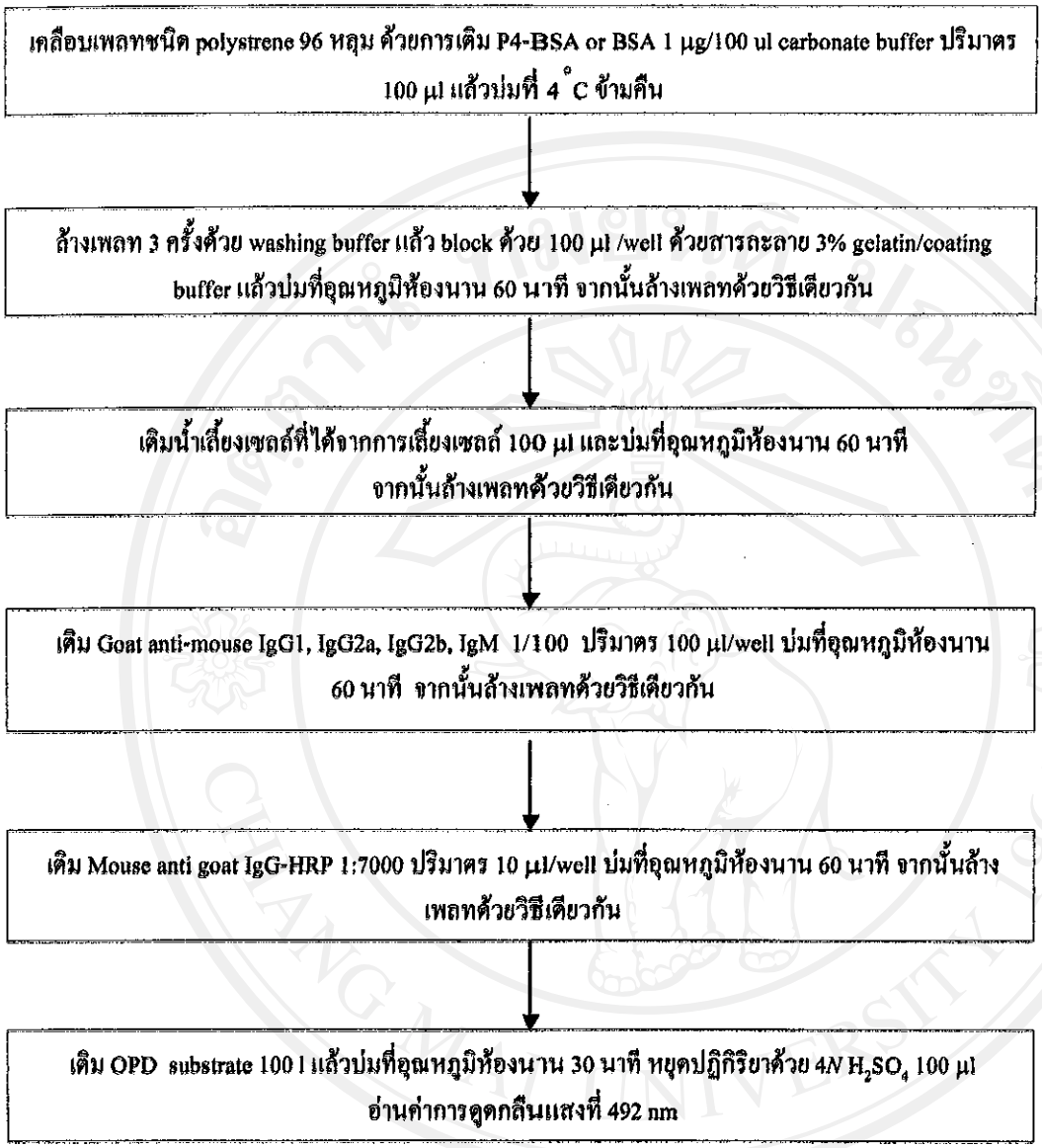
ภาพที่ 3-3. แสดงขั้นตอนการทำโมโนโคลนอลให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีน จี (protein G).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9. การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การตรวจชนิดของแอนติบอดีมีวิธีการดังนี้ : จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เติมสารละลาย P4-3CMO-BSA 1 ไมโครกรัมใน Carbonate/ Bicarbonate buffer 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมเจลาติน 3% ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีจากโคลนที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเพลทและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง ต่อมาเติม Goat anti-mouse IgG1, Goat anti-mouse IgG2a, goat anti-mouse IgG2b และ Goat anti-mouse IgM ในอัตราส่วน 1:10 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าเพลทและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย Horseradish peroxidase conjugate mouse anti-goat IgG 10 ไมโครลิตรเขย่าเพลทและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสีหลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 25 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายหยุดการเปลี่ยนสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (ภาพที่ 3-4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-4. แสดงขั้นตอนการตรวจ Isotype แอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ด้วยวิธี ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.10. การหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำ ELISA เพื่อใช้ในการหากราฟมาตรฐาน

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 4B2 ใน Carbonate/ Bicarbonate buffer อัตราเจือจาง 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1:190 และ 1:200 ตามลำดับโดยเติม 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติม 3 % เจลาติน ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติม Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 1:150,000 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. ล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสีหลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 25 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายหยุดการเปลี่ยนสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.11. การสร้างกราฟมาตรฐาน

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 4B2 ใน Carbonate/ Bicarbonate buffer อัตราเจือจาง 1:150 โดยเติม 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติม 3 % เจลาติน ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนความเข้มข้น 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 และ 0 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชม. จากนั้นเติม Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เจือจาง 1:150,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติม OPD substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 25 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายหยุดการเปลี่ยนสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (แสดงดังภาพที่ 3-5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เคลือบเพลทด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน
ใน Carbonate/ Bicarbonate buffer อัตราเจือจาง 1:150 ตามลำดับ
ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง

↓

เติม 3 % gelatin ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม
บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

↓

เติมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนความเข้มข้นไมโครลิตร 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1
และ 0 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชั่วโมง

↓

เติม Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เจือจาง 1:150,000
ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชั่วโมง

↓

เติม OPD substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม
เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

↓

เติม 4 *N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหลุม
อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ภาพที่ 3-5. แสดงวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยวิธี Competitive ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.12. การวัด cross reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 4B2 ใน Carbonate/ Bicarbonate buffer อัตราเจือจาง 1:150 ตามลำดับ โดยเติม 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติม 3% เจลาติน ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติมสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดต่างๆ ดังนี้ คือ progesterone, 17β-Estradiol, Testosterone, Androstenedione, Pregnenolone, Hydrocortisone, 11α-hydroxyprogesterone และ 17α-hydroxyprogesterone ความเข้มข้น 10,000, 5,000, 2,500, 1,000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5 และ 1 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร และ 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 และ 0 พิโคกรัม/50 ไมโครลิตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชม. จากนั้นเติม Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เจือจาง 1:150,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลายทำให้เกิดสีหลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 25 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายหยุดการเปลี่ยนสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณ % binding โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่สเตียรอยด์ 0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เป็น 100 % จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของสเตียรอยด์ 50 % binding แล้วคำนวณค่า % cross reactivity จากสูตร :

$$\% \text{ Cross reactivity} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนที่ 50 \% binding}}{\text{ความเข้มข้นของสเตียรอยด์ที่ 50 \% binding}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.13. การตรวจปริมาณโปรเจสเตอโรนในน้ำนมด้วยวิธี Competitive ELISA

จากไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เคลือบเพลทด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 4B2 ใน Carbonate/ Bicarbonate buffer อัตราเจือจาง 1:150 โดยเติม 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติม 3 % เจลาติน ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง จากนั้นเติมตัวอย่างน้ำนม ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชม. จากนั้นเติม Horseradish peroxidase conjugate ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เจือจาง 1:150,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชม. จากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติม OPD substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 25 นาที เมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายหยุดการเปลี่ยนสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3-6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เคลือบเพลทด้วยไมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน
ใน Carbonate/ Bicarbonate buffer อัตราเจือจาง 1:150 ตามลำดับ
ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12-18 ชั่วโมง

↓

เติม 3 % gelatin ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม
บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

↓

เติมจากนั้นเติมตัวอย่างน้ำนม ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชั่วโมง

↓

เติม Horseradish peroxidase conjugate P_4 เจือจาง 1:150,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม
บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชั่วโมง

↓

เติม OPD substrate หลุมละ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม
เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที

↓

เติม 4 N H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรหลุม
อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

ภาพที่ 3-6. แสดงวิธีการตรวจหาปริมาณโปรเจสเตอโรนในน้ำนมด้วยวิธี Competitive ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved