สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	30
บทที่ 4 ผลการทดลอง	45
4.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c)	45
4.2 ผลการผลิต Hybridoma cells	45
4.3 ผลการตรวจหา Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR (Screening)	46
4.4 ผลการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution	46
4.5 ผลการจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotyping)	49
4.6 ผลการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจาก Hybridoma cells	51
4.7 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (purification) ด้วย Saturated ammonium sulfate และปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	51
4.8 ผลการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAbZR) และเอนไซม์ (anti-mouse IgG-AP)	52
4.9 ผลการวัดปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Cross reaction) ของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR	53
4.10 การหา Intra coefficient assay และ Inter coefficient assay	55
4.11 ผลการสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR	55

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.12 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน ZR โดยวิธี Indirect ELISA 57
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 61
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง 66
เอกสารอ้างอิง 67
ภาคผนวก 72
ประวัติผู้เขียน 79

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การเปรียบเทียบระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี	25
2	แสดงระยะเวลาและการเตรียมแอนติเจนกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ ZR-BSA ในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c	34
3	แสดงค่า Optical density (OD) ของ Media ที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนของ Hybridoma cells จากการ fusion ระหว่างเซลล์ม้ามที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ ZR-BSA และเซลล์ไมอิโลมา	47
4	แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ ZR-BSA และ BSA ของ Media ที่เก็บจากกลุ่มโคลน 1C10 ที่มีโคลนเดี่ยวภายหลังการทำ Limiting dilution	48
5	แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ ZR-BSA และ BSA ของ Media ที่เก็บจากหลุมโคลน 1G9 ที่มีโคลนเดี่ยวภายหลังการทำ Limiting dilution	49
6	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการทำปฏิกิริยากับ 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	50
7	แสดงค่า % Cross reactivity ของแอนติบอดีของโมโนโคลนอลแอนติบอดีฮอร์โมนชนิดอื่น	54
8	แสดงผลที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน	56
9	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในราก หลังกรรมวิธี	58
10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ใน xylem sap หลังกรรมวิธี	59
11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในใบ หลังกรรมวิธี	60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไซโตไคนิน	4
2	โครงสร้างของไซโตไคนินที่อยู่ในรูปของ Isoprenoid และ Aromatic	5
3	รูปแบบจำลองวิถีของการสังเคราะห์ไซโตไคนินในต้น *Arabidopsis* โดยผ่านวิถี methylerythritol phosphate (MEP) และ mevalonate (MVA)	6
4	โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี	22
5	(a) เป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี เปรียบเทียบกับ (b) เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี	24
6	หลักการสร้าง Monoclonal antibody	29
7	แสดงการต่อระหว่าง 3 ทางกับกระบอกฉีดยา เพื่อโฮโมจิไนซ์ระหว่าง adjuvant กับแอนติเจน	33
8	แสดงการฉีดแอนติเจนเข้าใต้ผิวหนังหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c	34
9	แสดงการเจาะเลือดจากหางหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c	35
10	แสดงโคลนของ Hybridoma cells ที่ได้หลังจากการ Fusion x100เท่า (A) และ x400 เท่า (B)	37
11	การบดและการสกัดตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน	42
12	การกรองสาร การระเหยแห้ง และการปั่นเหวี่ยงตัวอย่าง	43
13	ส่วนประกอบของคอลัมน์ที่ใช้ในการทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)	44
14	แสดงการจับ (affinity) ระหว่าง ZR-H^3 กับแอนติบอดี จากหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c จำนวน 3 ตัว หลังจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 14 28 และ 42 ตามลำดับ	45
15	แสดง Hybridoma cells หลังการทำ limiting dilution ได้ 10 วัน ของโคลน 1C10 (A) และโคลน 1G9 (B) (x 40 เท่า)	46
16	แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรของ media ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ผลิตแอนติบอดีของ 2 % FBS และ 10 % FBS	51
17	แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรของการทำให้บริสุทธิ์ด้วย saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20 %, 30 %, 40 % และ 50 %	52

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
18	แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ในการหาอัตราเจือจางของแอนติบอดีกับเอนไซม์ที่เหมาะสม	53
19	แสดงผลของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ทำปฏิกิริยากับ *trans*-Zeatin	54
20	แสดงผลของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ทำปฏิกิริยากับ *trans*-ZeatinRiboside-5'-monophosphate	55
21	แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มี อัตราเจือจาง 1:500 พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50% binding ได้ 38.5 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร	56
22	แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน ZR ที่ทำควบคู่กับการวิเคราะห์ปริมาณ ZR ในตัวอย่างพืช พบความไวของการทำปฏิกิริยาที่ 50% binding ได้ 37.85 นาโนกรัม/50 ไมโครลิตร	57
23	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในราก หลังกรรมวิธี	58
24	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ใน xylem sap หลังกรรมวิธี	59
25	การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ZR ในใบ หลังกรรมวิธี	60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved