บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

เทสทอสเตอร์โรน (testosterone, Sigma T-1500),ซีรั่มอัลบูมิน (human serum albumin, HSA, Sigma A1653), โซเดียมเอ็ททิลเมอร์คิวรีไธโอซาลิไซเล็ท (sodium ethylmercurithiosalicylate, thimerosal, Sigma T-5125), พี-เทอร์ฟีนิล [p-terphenyl, Sigma T-1250), พีโอพีโอพีโอ (POPOP, 2,2-p-phenylene-bis (5-phenyloxazole), Sigma P-3754], โปรเจสเตอร์โรน (progesterone, Sigma 0130), 11-อัลฟา-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอร์โรน (11-α-hydroxyprogesterone, Sigma A-5502), เพรกโนนีโลน (pregnenolone, Sigma P-9129), 17-อัลฟา-อะซีโตโปรเจสเตอร์โรน (17-α-acetoxyprogesterone, Sigma A-4125),ไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone, Sigma H-4001), แอนโดรสตีนไดโอน (androstenedione, Sigma A-9630), 11-บีต้า-แอนโรสตีนไดโอน (11-β-androstenedione, Sigma A-3009), 17-บีต้า-อีสตราไดออล (17-β-estradiol, Sigma E-8875), อีสโตรน (estrone, Sigma E-9750), Tris(Hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride (TRIZMA® Hydrochloride, Sigma T-3253), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDPC, Sigma E-6383), N,N-dimethyl formamide (Sigma D-4254), โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท (sodium dihydrogen phosphate dihydrate,NaH2PO4.H2O , Merk, Art.6345), โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, Merk, Art. 6404), เจลาติน (gelatin, Merk, Art. 9728), ผงถ่านมันตคาร์บอน (charcoal activateed, Merk, Art. 2186), โทลูอิน (toluene, Merk, Art.-8325), ไดโซเดียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate, $Na_2HPO_4.12H_2O$, May and Baker), เมธานอล (methanol Absolute, J.T. Baker), โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous, BDH Chemical), โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, Riedel-deHaen 31437), แด็กซ์แตรนโซเดียมซัลเฟต (Dextran sodium sulfate, Fluka Biochemical), Freund's complete adjuvant (Sigma,E-5881), horseradish peroxidase conjugate monoclonal anti-goat/sheep IgG (Sigma A-9452), goat anti-

rabbit IgA (α-chain specific, Sigma R-9380), goat anti-rabbit IgG (Whole molecule, Sigma R-1131), thiophilic resin (T-gel, Sigma T-5787), UltraDOMA-PF (BioWhittaker), Iscove's Modified Dulbecco's medium (GIBCOBRL, Cat. no.71P9654, Life Technology), Fetal Bovine Serum (GIBCOBRL,Cat. no. 10270-023,Life Technology), Normal Rabbit serum (GIBCOBRL, Life technology), 2-Mercaptoethanol (Sigma M-6250), Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (GIBCOBRL, Cat. no. 31062-011, Life Technology), Hypoxanthine (Sigma H-9377), Thymidine (Sigma T-5018), Polyethylene glycol (PEG, Sigma P-3640), Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Art. 802912), Polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 80, Sigma P-1754), *O*-phenylene-diamine-HCL (Zymed Laboratoriees, Inc. USA), Estradiol-Peroxidase-Labelled (Sigma E-8883), 2, 6, 10, 14-tetramethyl Pentadecane (Pristane, Sigma T-7640), heparin sodium (GIBCOBRL,Cat. no. H-4898,Life Technology), gentamycin injection (Roussel Laboratories.)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer) แบบ UV-Visible โมเดล DU®Series 7000 บริษัท Beckman Instruments, Inc. ประเทสสหรัฐอเมริกา, เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-550 GE บริษัท Labinco, เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (centrifuger) โมเดล Mistral 3000 บริษัท MSE Co. ประเทศอังกฤษ, เครื่อง lyphilized Model TDS-3D-DP-O บริษัท FST Sytem,Inc.ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่องวัดพลังงานรังสีชนิดบีตา แบบ liquid scintillation counter (1209 RACKBETA) บริษัท LKB WALLAC ประเทศฟินแลนด์, เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 4 ตำแหน่ง) โมเดล 2842 บริษัท Sartorius GmBH ประเทศเยอรมัน, เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL Type 3015 บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik m.b. H&Co. ประเทศเยอรมัน, ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 1000, 200, 100, 20 และ 10 ไมโครลิตร Pipetman บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส, Dialysing tube (ไม่ให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 12,000-14,000 ขึ้นไปผ่าน) บริษัท Viskase ประเทศสหรัฐอเมริกา, หลอดทดลองขนาด 10x75 ,100x150 มม., จานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. (Plate), เครื่อง microplate reader (Multiscan,MCC/340 P version 2.33, Titertek muitiscan,)บริษัท ICN ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่อง microperpex® Peristaltic Pump 1 เครื่อง, Column สำหรับ liquid chromatography ขนาด 1x30 ซม. 1 อัน (Sigma.), เครื่อง fraction collector 1 เครื่อง, 3 –way stopcock บริษัท Nipro Medical Industry

Ltd. ประเทศญี่ปุ่น, แผ่นกรองสาร (filter mambrane) แบบ Supor membrane โมเดล Supor-200 บริษัทGelmanScience ประเทศเยอรมัน ขนาดรูที่กรองของเหลว 0.2 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มม., กรวย fitration assembly บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ประกอบเข้ากับ side-arm flask (Sigma Z29,048-3) ขนาด 1 ลิตรต่อเข้ากับเครื่องสูญญากาศ (vacuum) ชนิด MEDI-PUMP Model 1132D บริษัท Thomas Industries Inc.ประเทศสหรัฐอเมริกา, ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) Model 3194 S/N 35305-397 บริษัท Forma Scienctific Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา, หลอดทดลองขนาด 15, 50 มล.(Polypropylene tube), ไมโครเพลท 96 หลุม (Microplate) แบบ Nunc-Immuno™ Plate บริษัท Nalge Nunc International.ประเทศเดนมาร์ก, กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Olympus, CK2)

3.1.3. สัตว์ทดลอง

3.1.3.1. หนูตัวเล็ก อายุ 4-8 สัปดาห์ทั้งเพศและเมีย ประมาณ 30 ตัว

3.1.3.2. กระต่าย พันธุ์แคลิฟอร์เนีย อายุ 1-2 ปี เพศเมีย 3 ตัว

3.1.3.3. โคนมที่กำลังรีดน้ำนม 18 ตัว

3.2. วิธีการเตรียมแอนติเจน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.2.1. การเตรียม 17β–estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA (ดัดแปลงจาก Lindner *et al.*, 1972) โดยชั่ง 17β–estradiol-6-(o-carboxymethyl)-oxime 50 มก.ละลายใน N,N dimethylformamide 4.5 มล. เติมสารละลาย 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 50 มก. ในน้ำกลั่น 5 มล. ปั่นรวมกันนาน 20 นาที เติมสารละลาย HSA 100 มก. ในสารละลายพีบีเอส 5 มล. ปั่นสารละลายทั้งหมดที่ 4 °ซ นาน 3 วัน นำสารละลายที่ได้ใส่ใน dialyzing tube นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 0.05 โมล, pH 8.0 ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในน้ำกลั่น 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 วัน (เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกวัน) นำสารละลายที่ได้จากข้างใน dialyzing tube ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำภายใต้สภาพสูญญากาศ แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 200-300 นาโนเมตร เพื่อนำค่าไปคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมติดระหว่าง E2-6-CMO กับ HSA ตามวิธีการของ Erlanger และคณะ (1957) จากนั้นเก็บรักษา E2-6-CMO-HSA ที่อุณหภูมิ 4°ซ หรือ -20°ซ.

3.2.2. วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลและการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ละลาย E2-6-CMO-HSA 500 ไมโครกรัม ในสารละลายพีบีเอส 250 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ FCA 250 ไมโครลิตร ใส่สารทั้งหมดลงในกระบอกฉีดยาที่ต่อกับ 3 ทาง (3-way stopcock) และกระบอกฉีดยาอีกอันหนึ่ง หลังจากนั้นดันกระบอกฉีดยาไปกลับประมาณ 50 ครั้ง จนได้สารละลายสีขาวขุ่น แล้วจึงนำไปฉีดในกระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย ตัวละ 500 ไมโครลิตร จำนวน 3 ตัว โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณกลางหลัง ทุกๆ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดกระต่ายตัวละ 10 มล.นำมาปั่นแยกได้พลาสมา (โพลีโคลนอลแอนติบอดี) เก็บไว้ที่ –20 °ซ นำพลาสมาส่วนหนึ่งไปตรวจระดับไตเตอร์ต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล โดยวิธี RIA

ภาพที่ 7. แสดงการต่อระหว่าง 3 ทางกับ กระบอกฉีดยาเพื่อโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ระหว่าง FCA กับแอนติเจน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3.2.3. การวัดระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลด้วยวิธี RIA (ดัดแปลงจาก ศุภมิตร, 2539)

โดยผสมฮอร์โมนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม (Tritium, ^3H) ^3H-estradiol มี activity ประมาณ 6,000 cpm ใน 100 ไมโครลิตร เติมพลาสมาของกระต่ายที่อัตราการเจือจาง 1:1 1:10 1:100 1:1000 1:10000 ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 1 คืน และเติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน 200 ไมโครลิตรต่อหลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 4°ซ ทิ้งไว้ นาน 20 นาที นำเข้าเครื่องปั่นแยกที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 4°ซ ปั่นที่ความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นแยกส่วนของเหลวลงในขวด (vial) สำหรับวัดพลังงานจากรังสีเบต้า แล้วเติมสารละลายซินทิลเลเตอร์ 1 มล. ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืนในที่มืด แล้วจึงนำเข้าเครื่องวัดรังสี 1209 RACKBETA นำค่าพลังงานจาก ^3H-estradiol มาเขียนกราฟกับค่าอัตราการเจือจางของแอนติบอดี

3.3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล

3.3.1. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

3.3.1.1. การเตรียมเซลล์ไมอิโลมา

ใช้เซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63-Ag8.653 โดยเลี้ยงใน 10% FBS ที่ 37°ซ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (5% CO_2) ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ แล้วทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ สุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ก่อนการเชื่อมเซลล์

3.3.1.2. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่าย

เก็บเลือดกระต่ายที่มีระดับภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลสูง โดยเตรียมกระบอกฉีดยาขนาด 10 มล. ภายในมี heparin 200 ไมโครลิตร และเข็มเบอร์ 20 ในสภาพปลอดเชื้อ เก็บเลือดบริเวณใบหูจากกระต่ายหมายเลข 4 และ 5 ตัวละ 10 มล. ปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.83% 10 มล. นาน 9 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดังนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วจึงเติม IMDM 10 มล. นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งเติม IMDM 10 มล. ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที อีกครั้ง ต่อจากนั้นจึงเติม 2% FBS 10 มล. แล้วย้ายเซลล์ลงจานเลี้ยงเซลล์ นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °ซ 5% CO_2

และความชื้นสูง เลี้ยงเซลล์ 2 วันโดยตรวจดูการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ และตรวจสุขภาพเซลล์ พร้อมที่จะทำการเชื่อมเซลล์

3.3.1.3. การเตรียม feeder cell

ฆ่าหนูเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 70%แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางบนโฟม ดึงหนังหน้าท้องออก ให้เห็นเยื่อที่คุมท้องอยู่ ฉีด IMDM เข้าไปในช่องท้อง 5 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที ดูด IMDM กลับจากช่องท้อง ใส่ลงในหลอดที่ปลอดเชื้อ ปิดฝา ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/นาที เท IMDM ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย HAT 10 มล. ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาให้เซลล์กระจายโดยทั่ว เทลงใน Tray เติมสารละลาย HAT อีก 30 มล. ดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม(ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่37°ซ 5% CO_2 และมีความชื้น ก่อนนำไปใช้ ต้องมีการตรวจการปนเปื้อน

3.3.2 ขั้นตอนการเชื่อมเซลล์ระหว่าง เซลล์ไมอิโลมากับเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่าย

การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่ายกับเซลล์ไมอิโลมาจะต้องทำการทดลองในตู้ปลอดเชื้อ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่ายต่อเซลล์ไมอิโลมา (X63Ag8.653) เท่ากับ 2.5 : 1 ซึ่งหลังจากทำการนับเซลล์แล้วใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวเท่ากับ $9.5x10^6$ เซลล์ต่อเซลล์ไมอิโลมาเท่ากับ $3.8x10^6$ เซลล์ ทำการปั่นร่วมกันด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อให้เซลล์ทั้งหมดตกอยู่บริเวณก้นหลอดทดลอง จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารละลายในการเชื่อมเซลล์ (fusion solution) 2 มล.โดยใช้เวลา 30 วินาที ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเข้าออกทำให้เซลล์กระจาย ใช้เวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที เติม IMDM 5 มล.ใช้เวลา 2 นาทีแล้วเติม IMDM อีก 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/นาที นาน 8 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม IMDM 5 มล. ปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย HAT 10 มล.โดยไม่มี 10 % FBS เทลงใน tray เติมสารละลาย HAT อีก 30 มล. ดูดสารละลายใส่ลงในไมโครเพลทที่มี feeder cell อยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 4 เพลท นำไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°ซ 5%CO_2 และมีความชื้นสูง เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 วัน เปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์เป็นสารละลาย HT ใน 10 % FBS เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเห็นโคลนของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์

3.3.3. การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล (screening)

ใช้วิธี ELISA เตรียมสารเคมีตามที่ระบุไว้ในภาคผนวก วิธีมีดังนี้ เติมสารละลาย E2-6-CMO-HSA 10 ไมโครกรัม/ 100 ไมโครลิตรใน coating Buffer/หลุม โดยใช้ multichannel pipet ใส่ลงที่ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ในตำแหน่ง A1...H6 และที่ตำแหน่ง A7..H12 (ภาพที่ 8) เติม 1% BSA 100 ไมโครลิตร /1 หลุม บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หรือที่ 4°ซ นานข้ามคืน แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/1 หลุม จำนวน 3 ครั้ง เติม 1% BSA 150 ไมโครลิตร /หลุม บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเพลทด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงที่ได้จากหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมา 100 ไมโครลิตร/ 1หลุม ตัวอย่างน้ำเลี้ยง 1 ตัวอย่าง ทำ 2 ซ้ำในเพลท ทั้งด้านตำแหน่ง A1..H6 และด้าน A7..H12 บ่มไว้ที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-rabbit immunoglobulin 10 ไมโครลิตร/หลุม บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี(substrate) 100 ไมโครลิตร/หลุม รอปฏิกิริยาเกิดสี แล้วเติม 4 *N* H_2SO_4 50 ไมโครลิตร/หลุม อ่านค่าการดูดกลืนแสง (otical density, O.D.) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3.3.4. การแยกโคลนเดี่ยว (limiting Dilution)

เตรียม feeder cell ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) จำนวน 6 เพลท ใช้พลาสเจอร์ปีเปตดูดน้ำเลี้ยงเซลล์เข้าออก เพื่อให้เซลล์กระจายในน้ำเลี้ยง แล้วนับจำนวนเซลล์โดย haemocytometer มีเซลล์ heterohybridoma จำนวน $1.4x10^6$ เซลล์/มล. ฉะนั้นต้องการ 1,000 เซลล์ ต้องดูดน้ำเลี้ยง 67 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มล. เติมสารละลาย 10% FBS 30 มล. เทลงใน tray ใช้พลาสเจอร์ปีเปตทำให้เซลล์กระจายโดยทั่วดูดสารละลายใส่ลงในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตรเติมสารละลาย 10%FBS 20 มล.ลงใน tray แล้วใช้พลาสเจอร์ปีเปตทำให้เซลล์กระจายโดยทั่วดูดสารละลายใส่ลงในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10%FBS 20 มล.ลงใน tray แล้วใช้พลาสเจอร์ปีเปตทำให้เซลล์กระจายโดยทั่วดูดสารละลายใส่ลงในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือ 10 มล. ทิ้งเลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°ซ 5%CO_2 จนกระทั่งเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลอีกครั้ง

3.3.5 การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotyping)

การตรวจชนิดของแอนติบอดีดัดแปลงจากวิธีของ Rudbach และคณะ (1995) โดยนำเอาไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เติมสารละลาย E2-6-CMO-HSA 10 ไมโครกรัมใน carbonate/bicarbonate buffer 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 °ซ จากนั้นล้างด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติมแอนติบอดีจากโคลนที่ทำการทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าเพลทแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง ต่อมาเติม goat anti-rabbit IgG อัตราการเจือจาง 1:1000 และ goat anti-rabbit IgA อัตราการเจือจาง 1:1000 บ่มเพลทไว้ที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 3 ครั้ง ทำให้แห้งด้วยลมอุ่น แล้วเติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugate monoclonal anti-goat/sheep IgG อัตราการเจือจาง 1:2000 หลุมละ 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลายทำให้เกิดสีหลุมละ 100 ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 10-15 นาทีเมื่อเกิดสีแล้วหยุดปฏิกริยาด้วยสารละลายหยุดการเปลี่ยนสี 50 ไมโครลิตร/หลุม จึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3.3.6 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากที่ heterohybridoma ผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล ที่ได้จากการทำการแยกโคลนเดี่ยวแล้ว ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ผลิตแอนติบอดี เมื่อจำนวนเซลล์ในหลุมเต็ม นำมาขยายที่เพลทชนิด 24 หลุม เลี้ยงด้วย 7.5 % FBS และ 7.5 % NRS ใน IMDM ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37°ซ 5%CO_2 ,มีความชื้นสูง เมื่อเซลล์เจริญเต็มหลุมแล้ว จึงขยายสู่จานเลี้ยงเซลล์ จนกระทั่งมีจำนวนเซลล์จำนวน 10^6-10^7 เซลล์/มล. จึงนำเอาเซลล์ไปขยายต่อไป

3.3.7 การผลิตแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสม ทำได้ 2 วิธี

3.3.7.1. วิธี *in vivo* ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงเซลล์ในช่องท้องของหนูตัวเล็ก โดยของเหลวที่ได้จากช่องท้องหนู เรียกว่า ascitic fluid ตามวิธีของ Campbell (1984) โดยฉีด pristane 0.5 มล. เข้าช่องท้องหนู Balb/c 5-10 วัน แล้วจึงฉีดเซลล์ heterohybridoma ที่ผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล 10^6-10^7 เซลล์ /ตัว หลังจากนั้นประมาณ 14 วันจะเห็นการบวมพองที่ช่องท้องของหนูเมื่อขนาดของท้องโตเต็มที่ ทำการเก็บ ascitic fluid โดยฆ่าหนูด้วยการนำไปใส่ในขวดโหลที่มี

สำลีชุบคลอโรฟอร์มฝาปิดสนิท เมื่อหนูตายแล้วจึงนำออกมาแช่สารละลายแอลกอฮอล์ 70 % แล้วนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ แล้วดูด ascitic fluid ออกจากช่องท้องหนูประมาณ 10 มล. ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มล. นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ได้สารละลายที่มีแอนติบอดีแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

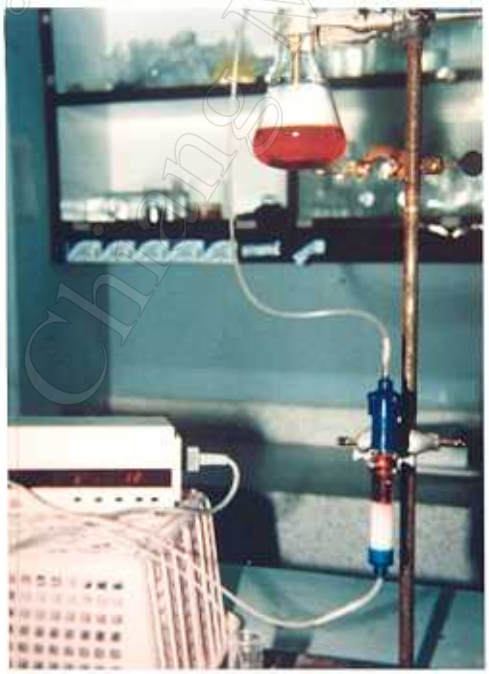
3.3.7.2. วิธี *in vitro* ซึ่งเป็นการเลี้ยงเซลล์ heterohybridomas ในตู้เลี้ยงเซลล์โดยอาศัยน้ำเลี้ยงที่ได้มีการเตรียมขึ้น ดัดแปลงจากวิธีของ Campbell (1984) โดยเริ่มจากในสภาพปลอดเชื้อเตรียมสารละลาย UltraDOMA-PF (ตามภาคผนวก) ใส่ลงไปในขวดสุราชนิดแบนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 20 มล. แล้วจึงเติมเซลล์ heterohybridomas ลงไปให้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^5-10^6 เซลล์ / 1 มล UltraDOMA-PF หลังจากเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่37°ซ 5%CO_2 ,มีความชื้นสูง ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 11 วันหรือสังเกตุจนเซลล์ไฮบริโดมาตายจนเกือบหมด จึงปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำเอาสารละลายที่ได้ที่มีแอนติบอดีแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.3.8 การทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ (purification)

การทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด จี ตามวิธีของ Arvieux และ Williams (1988) โดยนำเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดีในปริมาตร 100 มล. นำมาปั่นแยกที่ 10,000xg นาน 30 นาที แยกส่วนของเหลวออกมา เติม Na_2SO_4 18 กรัม (18% W/V) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่แรง 5,000xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากส่วนที่เป็นตะกอน เติม Na_2SO_4 16 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไป 33 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 30 นาที แล้วปั่นที่แรง 5,000xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25°ซ เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากส่วนที่เป็นตะกอน เติมน้ำกลั่นลงไป 25 มล. นำไป dialyze ในสารละลาย 50 mMNaCl 3 วัน โดยเปลี่ยนสารละลาย 50 mMNaCl วันละครั้ง จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร (Cold Spring Harbor Laboratory, 1980)

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

แล้วนำโมโนโคลแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยด้วย column chromatography ดัดแปลงจากวิธีของ Goding (1983) โดยใช้ thiophilic column chromatography ที่เตรียมได้จากการผสม thiophilic resin 10 มล. ในสารละลาย ก (ตามภาคผนวก) 10 มล. แล้วเทลงใน column (ภาพที่ 8) ที่มีสายท่อพลาสติคต่อจากด้านล่างของ column ต่อเข้ากับ peristaltic pump ส่วนปลายด้านบนของ column ต่อเข้ากับ flask ขนาด 250 มล. ที่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. เทสารละลาย ก ลงไป 100 มล. เดินเครื่อง peristaltic pump ให้ของเหลวไหลในอัตรา 0.5 มล./นาที เพื่อล้าง column หลังจากของเหลวหมดขวดรูปชมพู่ ทำการเติมเตรียมสารละลายโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากที่ผลิตด้วยวิธี *in vitro* หรือวิธี *in vivo* นำมาเติมให้มีความเข้มข้น 0.5 M K_2SO_4 เดินเครื่อง peristaltic pump ต่อไปจนกระทั่งสารละลายดังกล่าวหมด จากนั้นต่อท่อพลาสติคจาก peristaltic pump เข้าเครื่อง fraction collector ปรับเครื่องให้ของเหลวไหลเข้าหลอดเป็นเวลา 5 นาที/หลอด จากนั้นทำการล้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจาก column ด้วยสารละลาย ข ตรวจการดูดกลืนแสงของๆเหลวจากแต่ละหลอดที่ได้จาก fraction collector ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เก็บของเหลวจากหลอดที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงไว้เพื่อนำไปทำให้แห้งภายใต้แรงดันบรรยากาศต่ำ แล้วเก็บโมโนโคลนอลแอนติบอดีไว้ใช้ต่อไป ส่วน column จะถูกล้างด้วยสารละลาย ข ต่อไปจนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.005 จากนั้นจึงล้างด้วย Buffer A อีก 20-30 มล. ก่อนเก็บ column ไว้ใช้ในครั้งต่อไป



ภาพที่ 8. แสดงการติดตั้งอุปกรณ์การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์วิธี thiophilic column chromatography.

3.3.9. การวัดปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยว (Cross Reaction) ของแอนติบอดี (ดัดแปลงจาก Dobson, 1983) การวัด cross reaction เริ่มจากการเคลือบเพลทด้วย E2-6CMO : HSA โดยเติม E2-6CMO : HSA 10 ไมโครกรัมใน carbonate/Bicarbonate buffer 100 ไมโครลิตร /หลุม ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 °ซ จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง เตรียมแอนติบอดีในอัตราการเจือจางตรงจุดเริ่มต้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด จากนั้นทำการบ่มระหว่างแอนติบอดี 100 ไมโครลิตร กับสเตียรอยด์ความเข้มข้นต่างๆ ความสามารถของแอนติบอดีจากโคลน 3F5-6C6, 3F5-6D8, N73 ฮอร์โมนอีสตราไดออลชนิด 17-β-estradiol (1,3,5[10]-estriene-3,17β-diol) ละลายที่ความเข้มข้น 0, 100, 500, และ 1000 พิโคกรัม/มล. 2.5, 5, 10, 500 และ 1000 นาโนกรัม/มล. estrone (1,3,5[10]-estratrien-3-ol-17-one) ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. testosterone ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มล. progesterone ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. androstenedione (4-androstene-3,17-dione) ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. pregnenolone ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. progesteroneละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. hydrocortisone ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. 11α-hydroprogesterone ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. 17α.acetoxyprogesterone ละลายที่ความเข้มข้น 0, 10, 500, และ 1000 นาโนกรัม/มล. 10, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มล. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย washing buffer 3 ครั้ง เติมสารละลาย horseradish peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-rabbit immunoglobulin 10 ไมโครลิตร/1 หลุม บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างเพลทด้วย washing buffer 150 ไมโครลิตร/หลุม จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (substrate) 100 ไมโครลิตร/หลุม รอปฏิกิริยาเกิดสี แล้วเติม 4 N H_2SO_4 50 ไมโครลิตร/หลุม อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

3.4. การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนม

3.4.1. การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนม การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนมที่กำลังรีดนมจากฟาร์มทดลองฯ ตัวละ 30 มล. ใส่ในขวดพลาสติกขนาด 30 มล. ซึ่งมีโปรแตสเซียมไดโครเมท

0.3 กรัม เวลา 15:00-17:00น. ทุกวัน เป็นเวลา 2 เดือน (11 พย. 2541- 11 มค. 2542) เก็บไว้ที่ –20 °ซ นำไปสกัดฮอร์โมนอีสตราไดออลต่อไป

3.4.2. การสกัดฮอร์โมนอีสตราไดออล (Dobson, 1983 และ Marcus and Hackett, 1986)

เติมตัวอย่างน้ำนม 5 มล.ในหลอดทดลอง 2.3x15 ซม. เติมเมทานอล 10 มล. เขย่าด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex mixer) นาน 30 วินาที เก็บไว้อุณหภูมิ –20 °ซ ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 2.5x1.5 ซม. แล้วเติมไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) 5 มล. เขย่าด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ นาน 30 วินาที หลังจากนั้นสารละลายจะแยกชั้น ดูดเอาสารละลายส่วนบนทั้งหมดใส่ลงไปในหลอดทดลองแล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ 5 มล. อีกครั้ง ทิ้งสารละลายที่สกัดได้ไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลายพีบีเอส 1 มล. ทำการวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลที่สกัดได้จากน้ำนม

3.5. การวิเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออล โดยวิธี ELISA ในไมโครเพลท (ดัดแปลงจาก Crowther, 1995)

3.5.1.การหาปริมาณแอนติบอดีและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยการเคลือบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านอีสตราไดออล(โคลน 3F5-6D8) ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม อัตราการเจือจาง 1:4, 1:16, 1:32 และ 1:64 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง สลัดสารละลายในไมโครเพลททิ้ง จากนั้นเติม สารละลายน้ำนมที่มีฮอร์โมนอีสตราไดออลต่ำ (<0.1 นาโนกรัม/มล.) 2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปหลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายพีบีเอส หลุมละ 20 ไมโครลิตร และ estradiol-peroxidase labeled อัตราเจือจาง 1:100, 1:200 และ 1:400 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 5 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate 100 ไมโครลิตร/หลุม ประมาณ 10-20 นาทีจะเกิดสี จากนั้นหยุดปฏิกริยาสีด้วย 4 NH_2SO_4 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำผลไปสร้างกราฟ โดยเลือกอัตราการเจือจางแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 1.0 พบว่ามีอัตราเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.5.2.การหากราฟมาตราฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออล โดยการเคลือบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านอีสตราไดออล (โคลน 3F5-6D8) ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม อัตราการเจือจาง 1:16หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง สลัดสารละลายในไมโครเพลททิ้ง จากนั้นเติม สารละลายน้ำนมที่มีฮอร์โมนอีสตราไดออลต่ำ (<0.1 นาโนกรัม/มล.) 2 เปอร์เซ็นต์ ลง

ไปหลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายมาตราฐานอีสตราไดออล 0.05, 1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0, 125, 250, 500 และ1250 พิโครกรัม/มล. หลุมละ 20 ไมโครลิตร และ estradiol-peroxidase labeled อัตราเจือจาง 1:100 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 5 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate 100 ไมโครลิตร/หลุม ประมาณ 10-20 นาทีจะเกิดสี จากนั้นหยุดปฏิกริยาสีด้วย 4 NH_2SO_4 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490นาโนเมตร นำผลไปสร้างกราฟมาตราฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออล

3.5.3.การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลจากตัวอย่างสกัด โดยการเคลือบโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านอีสตราไดออล (โคลน 3F5-6D8) ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม อัตราการเจือจาง 1:16 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง สลัดสารละลายในไมโครเพลททิ้ง จากนั้นเติม สารละลายน้ำนมที่มีฮอร์โมนอีสตราไดออลต่ำ (<0.1 นาโนกรัม/มล.) 2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปหลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายมาตราฐานอีสตราไดออล 0.05, 1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0, 50.0, 125, 250, 500 และ1250 พิโครกรัม/มล. หลุมละ 20 ไมโครลิตร และตัวอย่างสกัด 20 ไมโครลิตรต่อหลุม และ estradiol-peroxidase labeled อัตราเจือจาง 1:100 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 5 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate 100 ไมโครลิตร/หลุม ประมาณ 10-20 นาทีจะเกิดสี จากนั้นหยุดปฏิกริยาสีด้วย 4 NH_2SO_4 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออล.

3.5.4. การวิเคราะห์ปริมาณอีสตราไดออลในน้ำนมโดยวิธี ELISA ที่ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) โดยเตรียมแผ่น Nitrocellulose โดยใช้ที่เจาะกระดาษให้ได้แผ่นทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. จากนั้นใส่กระดาษลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 1 แผ่นทั้งนี้สามารถใช้ไมโครเพลทที่ใช้แล้วมาใช้ซ้ำอีกได้ เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต้านอีสตราไดออลที่มีการเจือจาง 1:4, 1:8, 1:6 และ 1:32 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป จากนั้นเติมสารละลายที่มีน้ำนมอีสตราไดออลต่ำ (<0.5 พิโครกรัม/มล.) 2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปหลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง แล้วเติมสารละลายพีบีเอสหลุมละ 20 ไมโครลิตร และestradiol peroxidase labeled อัตราเจือจาง 1:1000, 1:2000 และ 1:4000 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 5 ครั้ง แล้วเติม

OPD substrate 100 ไมโครลิตร/หลุม ประมาณ 10-20 นาทีจะเกิดสี จากนั้นหยุดปฏิกริยาสีด้วย 4 NH_2SO_4 100 ไมโครลิตร/หลุม คีบกระดาษออก แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

การตรวจการเป็นสัด (estrus detection) จากปริมาณอีสตราไดออลในน้ำนม โดยสร้างกราฟมาตรฐานโดยเตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ที่เจาะกระดาษให้ได้แผ่นทรงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. จากนั้นใส่กระดาษลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 1 แผ่น เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านอีสตราไดออลที่มีการเจือจาง 1:16 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไป จากนั้นเติมสารละลายที่มีน้ำนมอีสตราได-ออลต่ำ (<0.5 พิโครกรัม/มล.) 2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปหลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง แล้วเติม สารละลายอีสตราไดออลมาตรฐานความเข้มข้น 0, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 125, 1250 และ 2500 พิโคกรัม /มล. หลุมละ 20 ไมโครลิตร อัตราเจือจาง 1:1000 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 °C นาน 1 ชม. ล้าง 5 ครั้ง แล้วเติม OPD substrate 100 ไมโครลิตร/หลุม ประมาณ 10-20 นาทีจะเกิดสี จากนั้นหยุดปฏิกริยาสีด้วย 4NH_2SO_4 100 ไมโครลิตร/หลุม คีบกระดาษออก แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3.6. การวิเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ

การวิเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออลโดย RIA ดัดแปลงจากรายงานของเพทายและทัศนีย์ (2533) และศุภมิตร (2539) โดยดูดสารละลายมาตราฐานอีสตราไดออลที่มีความเข้มข้น 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 25.0,50.0,125.0,250,500,1250,2500,5000 พิโครกรัม/มล. ความเข้มข้นละ 50 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างน้ำนมที่สกัดแล้ว 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 10 x75 ซม. เติมสารละลายแอนติซีรัม (เตรียมจากกระต่าย N 73 1:1,000) 100 ไมโครลิตร แล้วเติม ^{3}H-estradiol 100ไมโครลิตร [มีค่าพลังงานรังสีประมาณ 6,000 count per minute (cpm)]เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่ 4°ซ นานข้ามคืน แยกอีสตราไดออลที่อยู่ในรูปอิสระ (free form) ออกจากอีสตราไดออลที่อยู่ในรูปที่เกาะเกี่ยวกับแอนติบอดี (bound form) ด้วยการเติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นนำไปปั่นแยก ที่ความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที จากนั้นแยกส่วนที่เป็นของเหลวใส ใส่ขวดสำหรับวัดพลังงานรังสี

และเติมสารละลายซินทิเลเตอร์ 1 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืนในที่มืด หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องวัดพลังงานรังสี ค่า cpm ที่ได้มาแปลงให้อยู่ในรูป % binding [100x (cpm/cpm ของสารละลายมาตราฐานอีสตราไดออลที่ 0 พิโครกรัม)]นำค่า %binding ของสารละลายอีสตราไดออลมาตราฐาน มาสร้างกราฟโดยให้แกนตั้งอยู่ในมาตราเลขคณิต (arithmetc scale) แทน % binding และแกนนอนในมาตราลอกการิทึม (logarithmic scale) แทนระดับความเข้มข้นของสารละลายอีสตราไดออลมาตราฐาน เพื่ออ่านค่าความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมนอีสตราไดออลจาตัวอย่างน้ำนมสกัดได้

3.7. สถานที่ทำการทดลอง

1. ฟาร์มทดลอง สถานีวิจัย และฝึกอบรมทางการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการทางนิวเคลียร์และภูมิคุ้มกันวิทยา ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.8. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนธันวาคม 2540 และสิ้นสุดการวิจัยเดือนกรกฎาคม 2542.