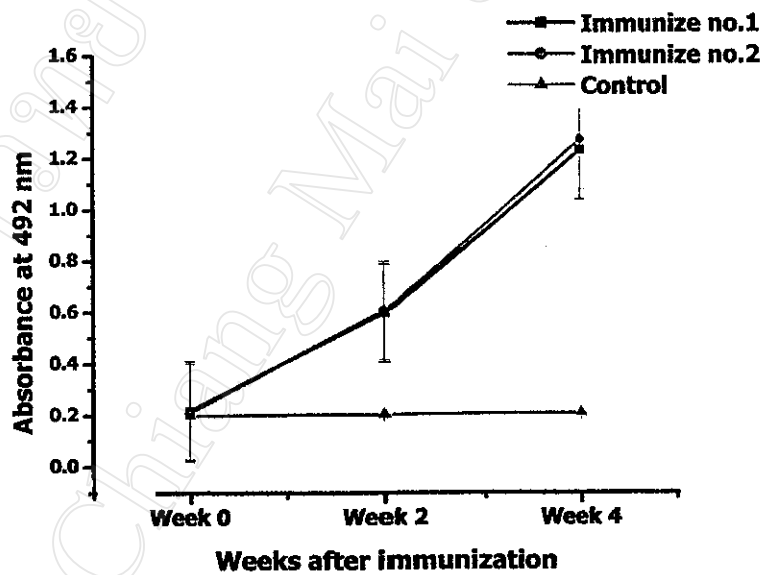


## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู Balb/c

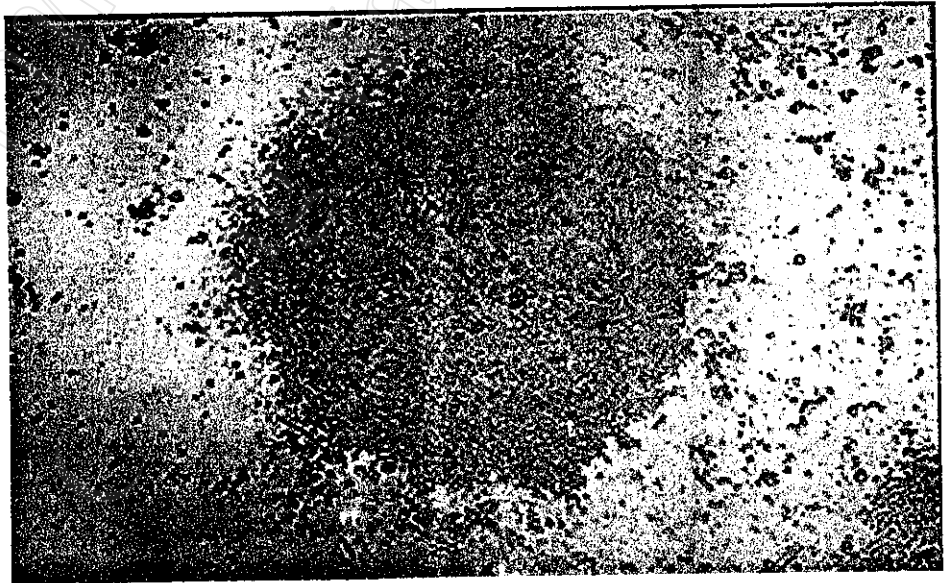
หลังจากได้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/c ทุก 2 สัปดาห์เป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ วันที่ 0 สัปดาห์ที่ 2, 4 และเก็บเลือดหนูมาเพื่อวัดการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลแล้วพบว่า หนูตัวที่ 1 และ 2 ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-1)



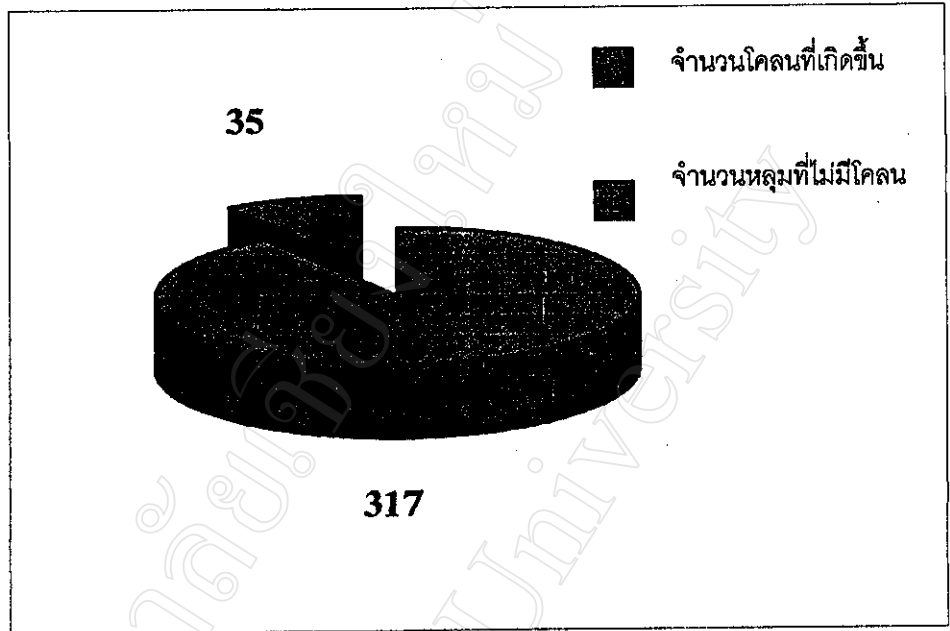
ภาพที่ 4-1. ผลการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ โคเลสเตอรอลในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/c.

#### 4.2 ผลการผลิตเซลล์ลูกผสม (hybridomas)

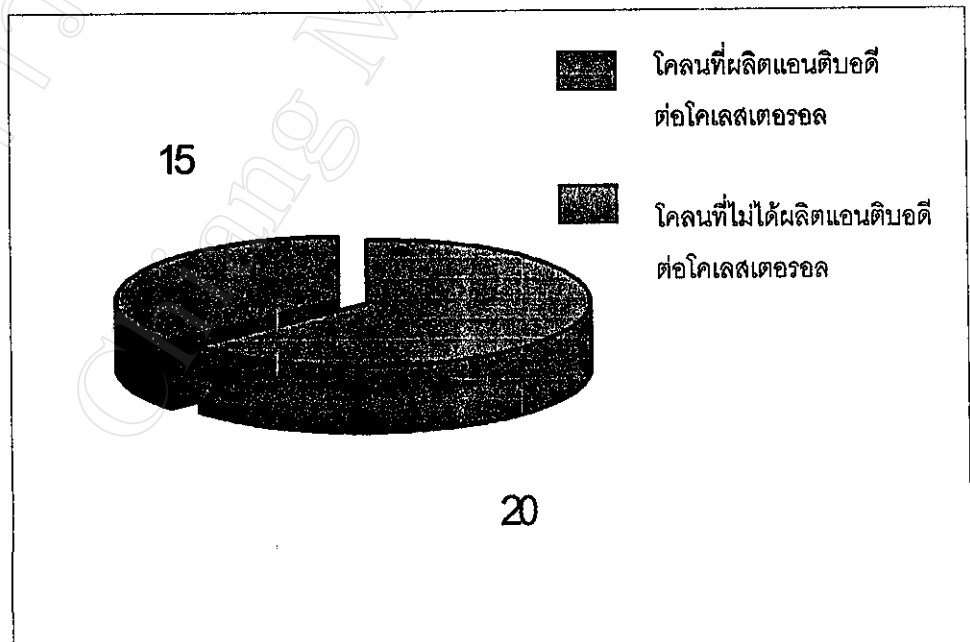
การทดลองนี้ได้ทำการเชื่อมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ม้าม (splenocyte) ของหนูที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล และเซลล์ไมอีโลมา (myeloma) สายพันธุ์ X63Ag8.653 ปรากฏว่าพบเซลล์ลูกผสม (hybridomas) หลังจากทำการเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT แล้วประมาณ 7 วัน (ภาพที่ 4-2) โดยพบการเกิดโคลนทั้งหมด 35 หลุม จากทั้งหมด 352 หลุม คิดเป็น 9.94 % (ภาพที่ 4-3) ทำการตรวจหาเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้ พบว่ามี 20 หลุม จาก 35 หลุม คิดเป็น 57.14 % (ภาพที่ 4-4) ของเซลล์ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 2) หลังจากนั้นได้ทำการแยกโคลนเดี่ยวที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลเซลล์ได้ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวน 15-20 วัน ได้โคลนเดี่ยวทั้งหมด 12 โคลน ได้แก่โคลนจากเพลทที่ 4 หลุม D3 หลุม F7 เพลทที่ 5 หลุม C5 หลุม D8 หลุม E6 หลุม E7 หลุม F4 หลุม F9 เพลทที่ 6 หลุม C7 หลุม D4 หลุม F4 และหลุม F7 (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 4-2. แสดง โคลนที่ขึ้นหลังจากหลอมเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมา 14 วัน (กำลังขยาย 30 เท่า).



ภาพที่ 4-3. แผนภูมิแสดงจำนวน โคลนที่เกิดขึ้นจากการหลอมเซลล์มี้ามและเซลล์ไมอีโลมา ในเพลทเลี้ยงเซลล์จำนวน 352 หลุม.



ภาพที่ 4-4. แผนภูมิแสดงจำนวน โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ โคเลสเตอรอลจาก โคลน 35 หลุม.

ตารางที่ 2. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) ในหลุมที่ผลิต  
โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล.

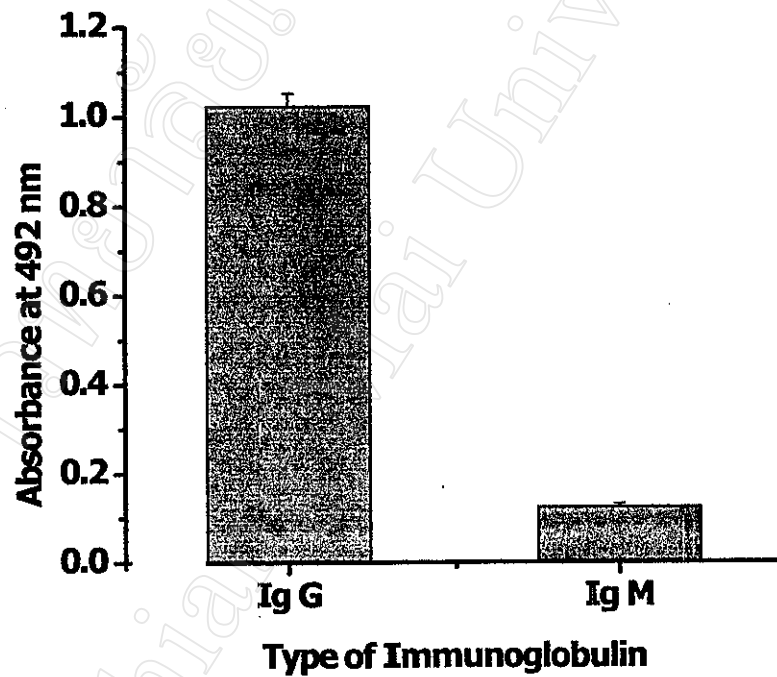
หลุม	ค่า O.D. หลุมที่เคลือบด้วย โคเลสเตอรอล-BSA	ค่า O.D. หลุมที่เคลือบด้วย BSA	ค่าความแตกต่างของ O.D
1C6	1.017	0.193	0.824
1D2	1.13	0.325	0.805
1F7	0.859	0.605	0.254
1G9	0.839	0.344	0.495
1H5	1.306	0.204	1.102
2B5	1.42	0.258	1.162
2F3	0.805	0.259	0.546
3B6	1.372	0.329	1.043
3B8	0.777	0.17	0.607
3E8	0.892	0.645	0.247
3E9	0.896	0.58	0.316
3F2	0.925	0.3	0.625
3F6	0.932	0.336	0.596
3F8	0.729	0.131	0.598
4C4	0.962	0.119	0.843
4D7	0.844	0.123	0.721
4D11	1.138	0.106	1.032
4E2	1.279	0.127	1.152
4E5	0.914	0.234	0.68
4F4	0.869	0.119	0.75

ตารางที่ 3. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรในการตรวจการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลของอาหารเลี้ยงเซลล์ (media) ในหลุมที่ผลิตโคลนเดี่ยวหลังจากการแยกโคลนเดี่ยว (limiting dilution).

หลุม	ค่า O.D. หลุมที่เคลือบด้วย โคเลสเตอรอล-BSA	ค่า O.D. หลุมที่เคลือบด้วย BSA	ค่าความแตกต่าง ของ O.D.
3B6-4D3	1.026	0.27	0.756
3B6-4F7	0.925	0.3	0.625
3B6-5C5	0.957	0.21	0.747
3B6-5D8	1.116	0.14	0.976
3B6-5E6	1.024	0.251	0.773
3B6-5E7	0.995	0.354	0.641
3B6-5F4	1.104	0.397	0.707
3B6-5F9	0.858	0.357	0.501
3B6-6C7	0.782	0.203	0.579
3B6-6D4	0.852	0.342	0.51
3B6-6F4	0.877	0.452	0.425
3B6-6F7	0.952	0.256	0.696

#### 4.3 ผลการจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3B6-6F4 มาทำการจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อจำแนกระหว่าง อิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม (Ig M) และ อิมมูโนโกลบูลิน จี (Ig G) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงต่อ Ig G สูงกว่า Ig M อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3B6-6F4 เป็น Ig G (ภาพที่ 4-5.)



ภาพที่ 4-5. กราฟเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรระหว่าง Ig G และ Ig M.

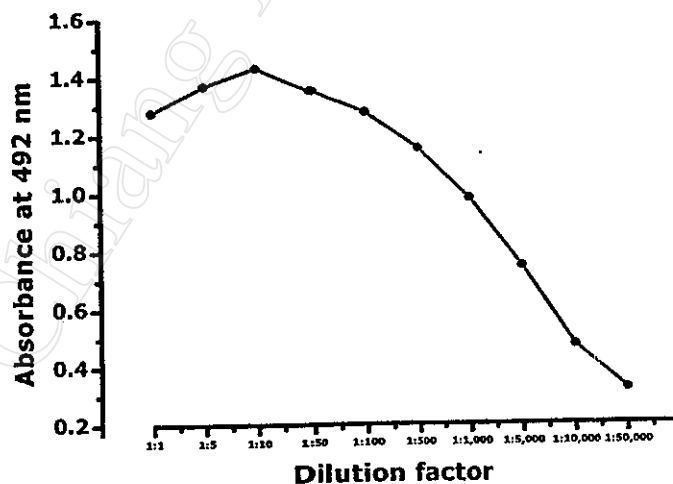
#### 4.4 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

จากการนำแอนติบอดีที่ได้จากการเก็บ ascitic fluid จากช่องท้องหนูและนำมาทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นพบว่าได้ปริมาณ โปรตีน 0.234 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปกรองผ่าน thiophilic column chromatography และเลือกของเหลวหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากรวมกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งเพื่อหาปริมาณ Ig G พบว่าได้ปริมาณ Ig G 0.204 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

#### 4.5 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการทำ ELISA

##### 4.5.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีและแอนติเจน

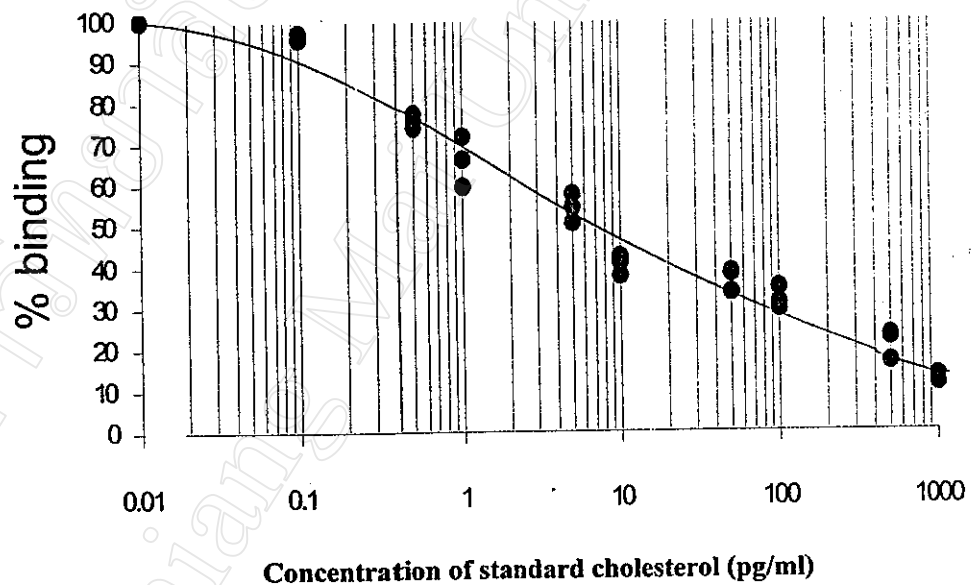
จากการตรวจสอบการทำปฏิกิริยากันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3B6-6F4 ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000 กับแอนติเจนพบว่าแอนติบอดีที่ได้มีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้เป็นอย่างดี (ภาพที่ 4-6) ซึ่งอัตราส่วนที่เหมาะสมของการเจือจางได้แก่ 1:500



ภาพที่ 4-6. แสดงอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดี (3B6-6F4) ในปฏิกิริยา ELISA.

#### 4.5.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอล

ในการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 3B6-6F4 ในอัตราส่วนการเจือจางที่ 1:500 มาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอลพบว่าการเมื่อให้แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโคเลสเตอรอลมาตรฐานเป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ จะให้เกิดปฏิกิริยาการจับกันได้ดีขึ้น และเมื่อนำแอนติบอดีมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโคเลสเตอรอลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 4-7.) จากกราฟพบว่าค่าความไวของการทำปฏิกิริยา (50 % binding) อยู่ที่ 7.2 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีความไวมากในการวัดโคเลสเตอรอลสามารถนำมาใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 4-7. กราฟมาตรฐาน โคเลสเตอรอล โดยวิธี ELISA.



#### 4.5.3 ผลการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธี ELISA

จากการทดลองเมื่ออัตราส่วนที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้แล้วจึงได้นำมาทำการวัดหาปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของนกกระทาที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีการของ Abell *et al.*, (1951) เติมนเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) และ เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) อย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเพื่อละลายโคเลสเตอรอลที่ติดอยู่ในขวดสกัดโคเลสเตอรอล นำตัวอย่างไข่แดงที่สกัดได้มาเจือจางที่อัตราส่วนระหว่างสารสกัดและเอทิลแอลกอฮอล์ 1:0, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:50,000 และ 1:100,000 จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมในการหาค่าโคเลสเตอรอลคือ 1:10,000 และเมื่อนำมาวัดหาปริมาณโคเลสเตอรอลได้ค่าเฉลี่ย  $\pm$  S.E (n) เท่ากับ  $645.28 \pm 40.91$  (40) มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมไข่แดง (ตารางที่ 4)

#### 4.5.4 การหา intra และ inter coefficient assay

จากผลการหา intra, inter coefficient assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.7 % และ 10.0 % ตามลำดับ แสดงว่าเมื่อนำตัวอย่างเดียวกันมาทำการวิเคราะห์ภายในเพลทเดียวกันค่าที่วิเคราะห์ได้จะมีความแตกต่างกันน้อยกว่าหรือมากกว่าประมาณ 6.7 % และถ้าเป็นตัวอย่างเดียวกันแต่ทำคนละเพลทพบว่าค่าที่ได้จะมีความแตกต่างกันน้อยกว่าหรือมากกว่าประมาณ 10.0 % จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์หาปริมาณโคเลสเตอรอลด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ค่อนข้างแม่นยำเนื่องจาก % intra, inter coefficient assay ที่ได้มีค่าไม่เกิน 10 %

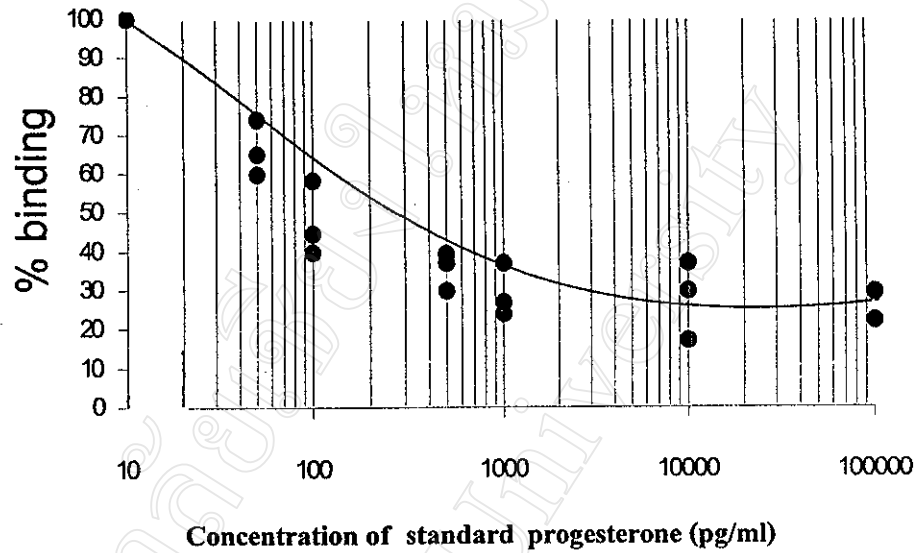
#### 4.6 การวัดปฏิกิริยา cross reaction ของแอนติบอดี

เมื่อนำโมโนโคลนอลที่ได้จากโคลน 3B6-6F4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำปฏิกิริยากับสเตียรอยด์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ โปรเจสเตอโรน (progesterone) และ อีสตราไดออล (estradiol) และคำนวณการเกิด cross reaction พบว่าค่า % cross reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน คือ 2.8 % (ภาพที่ 4-8) และต่ออีสตราไดออล คือ 1.62 % (ภาพที่ 4-9)

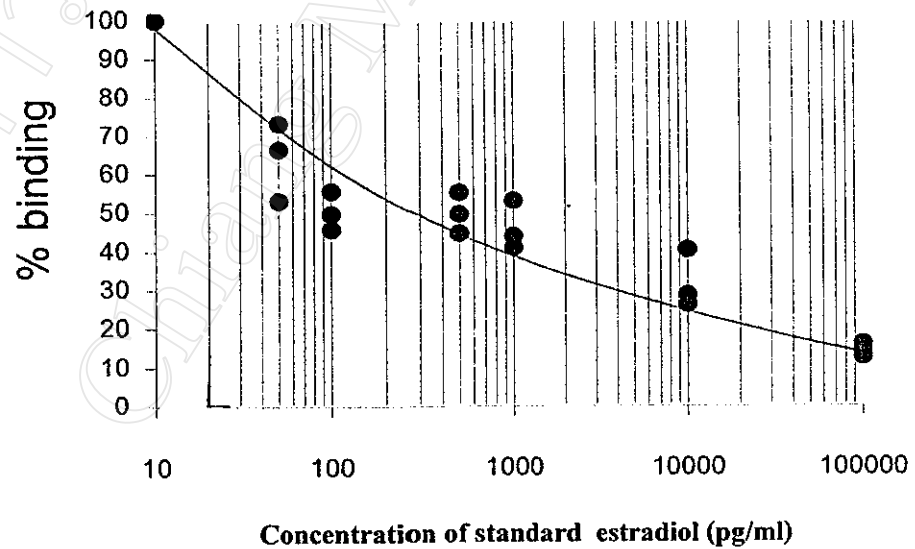
ตารางที่ 4. ผลการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงนกกกระทาด้วยวิธี ELISA และวิธีคัลเลอร์เมตริกของ Zak (1957).

ฟองที่	weight	yolk	วัดด้วย ELISA (mg/100 g egg yolk)	วัดด้วยวิธี Zak (1957) (mg/100 g egg yolk)
1	8.75	2.849	885.92	779.92
2	13.891	4.155	682.55	590.85
3	11.417	3.745	206.14	295.33
4	11.15	3.743	445.90	572.54
5	10.439	3.918	442.83	368.04
6	11.156	3.597	238.53	236.31
7	12.769	3.842	582.25	467.99
8	11.909	3.959	615.81	695.38
9	11.452	3.562	593.49	690.90
10	9.724	2.928	431.69	486.34
11	11.454	3.62	977.07	981.77
12	11.477	3.552	682.43	581.64
13	10.778	3.5	568.00	563.43
14	10.862	3.427	886.20	922.67
15	10.55	3.43	1001.75	986.30
16	12.336	4.228	765.61	727.06
17	11.884	3.909	749.81	804.30
18	10.146	3.158	710.58	595.31
19	12.731	3.539	291.89	349.82
20	12.371	3.908	715.46	772.52
21	10.17	2.993	1295.02	1159.04
22	12.074	4.101	511.34	577.18

23	10.412	3.222	283.99	281.81
24	11.834	3.885	591.25	645.30
25	10.492	3.55	466.76	540.85
26	10.938	3.422	509.06	545.30
27	10.317	2.996	919.23	1054.41
28	10.913	3.534	880.59	777.87
29	11.54	3.867	295.32	358.93
30	11.143	3.325	474.59	568.12
31	9.886	3.151	487.78	399.87
32	12.072	4.033	744.36	817.26
33	10.438	3.562	778.50	845.31
34	11.555	3.876	599.33	518.06
35	12.391	3.648	250.00	304.28
36	11.516	3.653	829.73	718.04
37	9.86	2.744	1090.74	1250.00
38	11.963	4.006	431.60	390.66
39	12.063	3.79	1046.17	1127.18
40	12.517	3.899	852.27	899.97
$\bar{X} \pm S.E$			654.28 $\pm$ 40.91	656.20 $\pm$ 40.78



ภาพที่ 4-8. ปฏิกริยา cross reaction ระหว่างโมนโคลอนอลแอนติบอดีและโปรเจสเตอโรน.

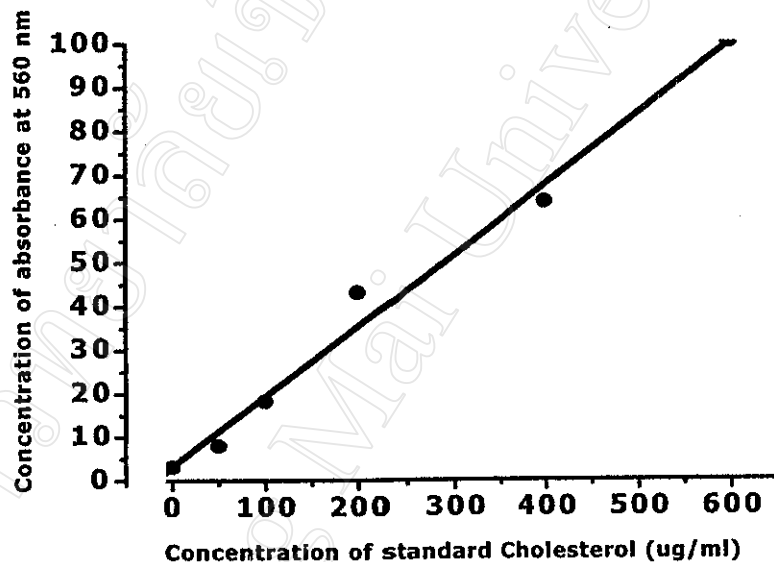


ภาพที่ 4-9. ปฏิกริยา cross reaction ระหว่างโมนโคลอนอลแอนติบอดีและอีสตราไดออล.

#### 4.7 การวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธีคัลเลอร์ริเมตริกของ Zak (1957)

##### 4.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐานต่อโคเลสเตอรอลโดยวิธี Zak.

การวัดค่าโคเลสเตอรอลที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400, 600 ไมโครกรัมเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานโดยวิธีของ Zak (1957) นำเอาค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟพบว่ากราฟที่ได้นั้นมีค่าความเข้มข้นที่กึ่งกลางของกราฟมาตรฐานที่ 325 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-10)



ภาพที่ 4-10. กราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอลโดยวิธี Zak (1957).

##### 4.7.2 ผลการวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธี Zak (1957).

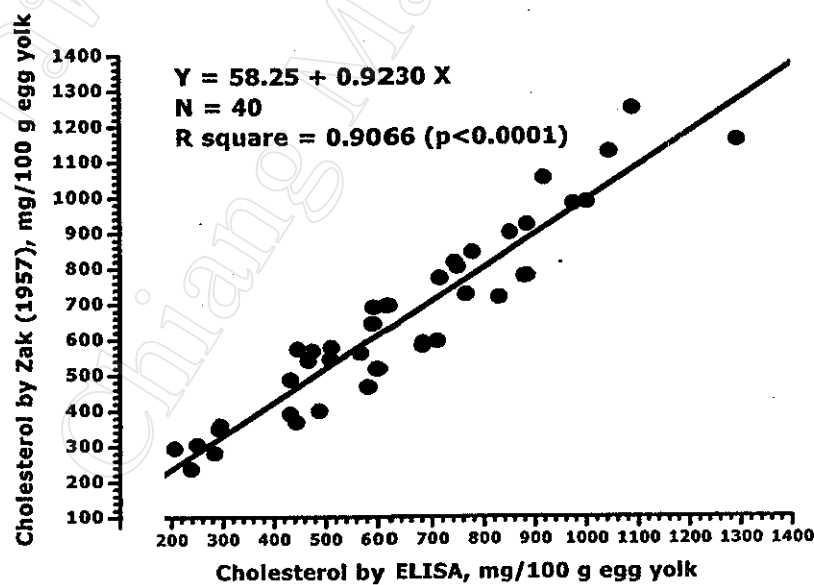
วิธีการวัดโคเลสเตอรอลแบบคัลเลอร์ริเมตริก (colorimetric method) ตามวิธีการของ Zak. (1957) โดยใช้ไข่แดงนกระหาที่สกัดโคเลสเตอรอลทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) และ กรดกำมะถันเข้มข้น (sulfuric acid) ปริมาณโคเลสเตอรอลที่วัดได้มีค่าเฉลี่ย  $\pm$  S.E (n) เท่ากับ  $656.20 \pm 40.78$  (40) มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมไข่แดง

#### 4.8 ผลการเปรียบเทียบค่าทางสถิติระหว่างวิธีการวัดโคเลสเตอรอลด้วย ELISA และวิธีของ Zak (1957)

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของโคเลสเตอรอลระหว่างวิธีการวัดโดย ELISA และวิธีคัลลอร์รีเมตริกของ Zak (1957) โดยวิธี Grouped z-test วิธีการวัดทั้งสองวิธีไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติ

#### 4.9 การหาค่าสหสัมพันธ์และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างวิธีการวัดโคเลสเตอรอลด้วย ELISA และวิธีของ Zak (1957)

เมื่อนำค่าการวัดโคเลสเตอรอลในไข่แดงของวิธี ELISA และวิธีของ Zak (1957) สร้างสมการ regression โดยให้แกน x เป็นวิธีการวัดโคเลสเตอรอลด้วย ELISA แกน y เป็นวิธีการวัดของ Zak (1957) หาค่าความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธี และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ได้สมการ regression คือ  $y = 58.25 + 0.9230x$  ( $n = 40$ ) และได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์  $R^2 = 0.9066$  ( $p < 0.0001$ ) (ภาพที่ 4-11)



ภาพที่ 4-11. กราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ของวิธีการ ELISA และวิธี Zak (1957).