บทที่ 5

วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

การผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล

จากปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายนั้น เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการผลิตแอนติบอดีมากำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายแก่ร่างกาย ในการจะกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนใดๆก็ตามนั้นหากเป็นสารที่ร่างกายมีอยู่แล้วและเป็นสารที่มีขนาดเล็กก็ย่อมจะเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองได้ยาก

โคเลสเตอรอลมีขนาดเพียง 7.2 x 5 x 20 x10^{-7} มิลลิเมตร ทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาถือว่าเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กโดยตัวมันเองไม่สามารถที่จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ (Alving and Swatz, 1991) ดังนั้นจึงได้มีการเปลี่ยนสภาพของโคเลสเตอรอลให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อให้สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ โดยการนำมาเชื่อมติดกับอัลบูมินต่างๆ เช่น โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถละลายได้ง่ายและเป็นโมเลกุลพาหะที่ดีโดยมีผลกระตุ้นการทำงานของ บีเซลล์และ ทีเซลล์ด้วย (Harlow and lane, 1988)

การกระตุ้นให้สัตว์ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลนั้นได้มีการทำมาหลายงานทดลอง เช่นการเชื่อมโคเลสเตอรอลกับอัลบูมินแล้วนำมากระตุ้นให้กับกระต่าย พบว่าสามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้ (Klopstock *et al.*, 1964) วิธีการกระตุ้นให้สัตว์ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลนั้นแตกต่างกันไปเช่น การฉีดกระตุ้นด้วยโคเลสเตอรอลที่เชื่อมติดกับอัลบูมิน (Bailey *et al.*, 1964) การเหนี่ยวนำให้สัตว์ผลิตแอนติบอดีโดยใช้สารช่วยกระตุ้นเช่น ไลโปโซม (liposome) ซึ่งพบว่าการใช้ไลโปโซมเป็นสารช่วยกระตุ้นให้ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในนกกระทานั้นพบว่าจะช่วยในการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้ดีกว่าการกระตุ้นด้วยโคเลสเตอรอลเชื่อมติดกับ BSA เพียงอย่างเดียว (ทิวารัตน์, 2544) และจากการทดลองการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/c โดยใช้ไลโปโซมเป็นตัวกักเก็บแอนติเจนไว้นั้น เมื่อนำหนูมาตรวจภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลนั้น พบว่าหนูได้มีการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลสูงในสัปดาห์ที่ 4 (ทิวารัตน์, 2543) ได้ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/c โดยใช้โคเลสเตอรอลเชื่อมติดโบวายซีรัมอัลบูมินผสมกับ Freund's complete adjuvant ฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุก 2 สัปดาห์ เป็นจำนวน 3 ครั้ง พบว่าหนูขาวสามารถผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของทิวารัตน์ (2543)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีหลักการโดยการนำบีเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดีมาเชื่อมติดกับเซลล์ไมอิโลมาเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดีได้และสามารถแบ่งเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก

ได้นำหนูที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลมาเก็บเซลล์จากม้าม จะได้บีเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดี การหลอมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ม้าม (spleenocyte) และเซลล์ไมอิโลมา (myeloma) สายพันธุ์ X63Ag8.653 ด้วยโพลีเอทอรีน ไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG) น้ำหนักโมเลกุล 1500 ความเข้มข้น 50 % (Schelling, 1995) หรือ PEG (น้ำหนักโมเลกุล 1540) 47 % ผสมกับ 7.5 % Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 1:2 (Berrebeck and Moller, 1986) จะทำให้ผิวของเซลล์ไมอิโลมามีการอ่อนตัวและเกิดการหลอม (fusion) ของเซลล์ทั้งสองชนิด ซึ่งผลการหลอมเซลล์นั้น เกิดโคลนขึ้น 35 หลุมจากทั้งหมด 352 หลุมคิดเป็น 9.94 % และเมื่อตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล 20 โคลนจาก 35 โคลน คิดเป็น 57.14 % คิดเป็นโอกาสการเกิดโคลนต่อโคเลสเตอรอลคือ 5.68 % (20 โคลน จาก 352 หลุม) เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับ กนกวรรณ (2542) ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่ายกับเซลล์ไมอิโลมาซึ่งเกิดโคลนทั้งหมด 21 หลุมจาก 384 หลุมคิดเป็น 5.47 % และเป็นโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่ออีสตราไดออล 12 หลุม จาก 21 หลุม คิดเป็น 57.14 % โอกาสการเกิดเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีย์คิดเป็น 3.125 % (12 หลุม จาก 384 หลุม) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับงานทดลองในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของคนจาก heterohybridoma ระหว่างหนูกับคนโดยใช้เซลล์ลิมโฟซัยท์ของคนจากหลายแหล่ง มาเชื่อมติดกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 พบว่ามีโอกาสเกิด heterohybridoma ได้ถึง 31 % การเกิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลน้อยนั้นอาจเนื่องจากเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมามีการเบียดกันในหลุมมากเกินไปทำให้เกิดการแย่งอาหารมากขึ้น เซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาที่หลอมเข้าด้วยกันอาจได้รับอาหารน้อยเกินไปจึงทำให้ไม่สามารถผลิตโคลนขึ้นมาได้ ดังนั้นในการหลอมเซลล์ถ้ามีเซลล์เป็นจำนวนมากจึงควรเพิ่มปริมาณหลุมมากขึ้นเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัวและได้รับอาหารได้ในปริมาณมากขึ้น จำนวนโคลนน่าจะมีปริมาณมากขึ้นด้วย

เซลล์ลูกผสม (hybridomas) ที่เกิดขึ้นมานั้นภายในหลุมเดียวกันพบว่าจะมีโคลนเกิดขึ้นหลายโคลนดังนั้นจึงต้องทำการแยกโคลนเดี่ยวเพื่อให้ได้โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลเพียงอย่างเดียวซึ่งวิธีการแยกโคลนเดี่ยวนี้ได้เลือกเซลล์ที่ดูมีสุขภาพแข็งแรงและเมื่อตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลพบว่าผลิตแอนติบอดีค่อนข้างสูงและเมื่อทำการแยกโคลนเดี่ยว

ออกมาแล้วนั้นพบว่าเซลล์ลูกผสมของหลุมที่ 3B6 สามารถแยกโคลนเดียวได้ถึง 12 โคลนซึ่งเมื่อตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีแล้วพบว่ามีการผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล เนื่องจากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในหนูขาวนั้นได้ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ดังนั้นอิมมูโนโกลบูลินที่เกิดขึ้นจึงน่าจะเป็นชนิดจีเพราะอิมมูโนโกลบูลินชนิดจีจะเพิ่มปริมาณสูงมากภายหลังเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงกระตุ้นครั้งที่สอง (secondary respone) (อรวดี, 2539) ดังนั้นจึงทำการจำแนกชนิดของแอนติบอดีว่าเป็นอิมูโนโกลบูลินชนิดใดโดยวิธีการ Direct ELISA ให้น้ำเลี้ยงโคลนในหลุมต่างจับกับเอนไซม์เชื่อมติดกับแอนติบอดี (Horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse) ชนิดอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) เอ็ม (Ig M) และชนิด จี (Ig G) หลังจากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ซึ่งถ้าโคลนที่เกิดขึ้นเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิดจีก็จะติดสีเมื่อใส่สารละลายพัฒนาสีเนื่องจากแอนติบอดีของโคลนนั้นได้ทำปฏิกิริยากับแอนติ-แอนติบอดี ชนิด จีแล้ว ซึ่งจากการตรวจสอบพบว่าโคลนที่เกิดขึ้นนั้นเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด จี จากนั้นได้มาได้ทำการเพิ่มจำนวนแอนติบอดีให้มากขึ้นโดยการนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูและทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10-14 วันเพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเซลล์ในช่องท้องของหนูและจึงทำการเก็บของเหลวในช่องท้อง (ascitic fluid) ซึ่งในการเก็บของเหลวในช่องท้องนั้นควรสังเกตการบวมพองของช่องท้องของหนูหากพบว่ามีการช่องท้องของหนูมีการขยายขนาดใหญ่มากควรทำการเก็บของเหลวในช่องท้องได้เพราะหากถึงไว้นาน ของเหลวในช่องท้องอาจทะลักมายังปอดและเกิดภาวะน้ำท่วมปอดทำให้หนูตายได้ซึ่งของเหลวที่เก็บมาได้มีปริมาตรประมาณ 4 มิลลิลิตร นำของเหลวที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนและแยกอิมมูโนโกลบูลินออกด้วยการกรองผ่าน thiophilic column chromatography นำไปอ่านค่าคำนวนหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลินมาซึ่งจากการผลิตอิมมูโนโกลบูลินในงานทดลองนี้ได้ปริมาณเท่ากับ 0.204 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปใช้ในการทำ ELISA เพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอล

การวัดปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธี ELISA

การทำ ELISA นั้นอาศัยหลักการของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีซึ่งจะมีวิธีการทำด้วยกันหลายวิธีขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ว่าต้องการวัดค่าของอะไรเช่น Indirect method มักใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่างๆ Double antibody sandwich method ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน และ competitive binding method วิธีการนี้ตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี (นภาธร, 2536) ซึ่งในการทำ ELISA เพื่อใช้ในการวัดโคเลสเตอรอลนี้ได้ใช้วิธีการแบบ competitive binding method ซึ่งจะใช้หลักในการให้แอนติเจนที่ต้องการทราบจำนวนกับแอนติเจนที่ติดฉลากเอนไซม์แย่งกันจับแอนติบอดีที่เคลือบเพลทอยู่ (Crowther, 1995)

การทำ ELISA ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆในหลายด้านให้มีความสัมพันธ์กัน งานทดลองนี้ได้ใช้การทำ ELISA ดัดแปลงจากวิธีการของ Guyard-Dangremont *et al.*, (1994) โดยจะให้แอนติเจนที่ต้องการวัดทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 24 ชม.และเคลือบเพลทด้วยแอนติเจนบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ เป็นเวลา 16 ชม. หลังจากนั้นได้ดูดเอาแอนติเจนและแอนติบอดีที่ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยากันอยู่นั้นมาใส่ซึ่งถ้าปริมาณแอนติเจนมีอยู่มากปริมาณแอนติบอดีที่ไม่ได้จับกับแอนติเจนเลยจะเหลืออยู่น้อย แต่ในทางกลับกันถ้ามีแอนติเจนอยู่น้อย จะมีปริมาณแอนติบอดีเหลือมากดังนั้นแอนติบอดีที่เหลืออยู่เมื่อดูดมาใส่เพลทที่เคลือบด้วยแอนติเจน แอนติบอดีนั้นจะจับกับแอนติเจนที่เคลือบเพลทได้ดี ซึ่งเมื่อใส่แอนติ-แอนติบอดีซึ่งเชื่อมติดอยู่กับเอนไซม์ และใส่สารละลายเพื่อการพัฒนาสีลงไปแล้วจะทำให้มีการติดสีเข้ม ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าหากมีการติดสีเข้มแสดงว่ามีแอนติเจนอยู่น้อยแต่ถ้ามีการติดสีน้อยแสดงว่ามีปริมาณแอนติเจนอยู่มาก การทำ ELISA นั้นต้องหาความเหมาะสมของปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบเพลท งานทดลองนี้เคลือบเพลทด้วยโคเลสเตอรอลเชื่อมติด BSA คิดเป็นปริมาณแอนติเจน 100 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรเนื่องจากแอนติเจนตัวนี้ไม่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมด เมื่อนำมาละลายในบัฟเฟอร์สำหรับเคลือบเพลทยังเห็นเป็นตะกอนแขวนลอยอยู่ ในการเคลือบติดกับเพลทของแอนติเจนนั้นแอนติเจนจะจับกับพื้นผิวของเพลทและส่วนที่เกินออกมาหรือไม่สามารถจับกับพื้นผิวของเพลทจะถูกชะล้างออกมาเมื่อถึงขั้นตอนการล้างส่วนเกินด้วยบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง การหาปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสมจะทำให้รู้ว่าแอนติเจนที่จะจับติดกับพื้นผิวของเพลท ในอัตราส่วนความเข้มข้นเท่าใด เพราะถ้าใช้แอนติเจนในปริมาณมากเกิน ส่วนที่ไม่สามารถเกาะติดที่พื้นผิวได้จะถูกล้างออกมา ทำให้เกิดการสูญเสียแอนติเจนซึ่งถ้าแอนติเจนตัวนั้นเป็นสารที่หายากและมีราคาแพงแล้ว จะทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากขึ้น การหาอัตราส่วนการเจือจางของแอนติบอดีที่ใช้ในการจับกับแอนติเจน ในการทำ ELISA ครั้งนี้พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยาคือ 1:500 และอัตราส่วนของแอนติเจนที่ต้องการทราบจำนวนคือ 1:10000 ซึ่งจากอัตรา

ส่วนของแอนติเจนที่ต้องการตรวจทำให้ทราบว่าวิธีการวัดด้วย ELISA นั้นสามารถวัดปริมาณได้แม้จะมีตัวอย่างในปริมาณไม่มากและจากกราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลด้วย ELISA ได้ค่าความไวในการวัด (50 % binding) ที่ 7.2 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีความไวในการวัดค่าได้แม้ในตัวอย่างจะมีโคเลสเตอรอลอยู่น้อยและจากผลการหา intra, inter coefficient assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.7 % และ 10.0 % ตามลำดับ แสดงว่าเมื่อนำตัวอย่างเดียวกันมาทำการวิเคราะห์ภายในเพลทเดียวกันค่าที่วิเคราะห์ได้จะมีความแตกต่างกันน้อยกว่าหรือมากกว่าประมาณ 6.7 % และถ้าเป็นตัวอย่างเดียวกันแต่ทำคนละเพลทพบว่าค่าที่ได้จะมีความแตกต่างกันน้อยกว่าหรือมากกว่าประมาณ 10.0 % แสดงว่าการวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างแม่นยำเนื่องจาก % intra, inter coefficient assay ที่ได้มีค่าไม่เกิน 10 % สาเหตุที่ค่า inter coefficient assay มีค่าถึง 10 % นั้นอาจเนื่องมาจากในการให้โคเลสเตอรอลจับกับแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรเพื่อให้โคเลสเตอรอลและแอนติบอดีที่จะใส่ในเพลท ELISA ทั้ง 3 เพลทอยู่ในสภาวะเดียวกัน ดังนั้นเมื่อนำมาดูดแอนติเจนและแอนติบอดีที่จับตัวกันอยู่จึงทำได้ลำบากเพราะไม่สามารถทำให้สารอยู่ในสภาพฟุ้งกระจาย (resuspension) ได้ทั่วทั้งหลอดทดลอง ทำให้ปริมาณแอนติเจนและแอนติบอดีที่จับกันอยู่รวมทั้งแอนติบอดีที่เหลืออยู่ในหลอดทดลองที่ดูดขึ้นมาใส่ในแต่ละหลุมของเพลท ELISA มีค่าไม่เท่ากัน ค่าที่วัดได้จึงค่อนข้างกระจาย

การวัดโคเลสเตอรอลด้วยวิธีการคัลเลอร์ริเมตริก (colorimetric method) ของ Zak (1957)

วิธีการวัดโคเลสเตอรอลมีอยู่หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไปวิธีการวัดที่สะดวกและรวดเร็วได้แก่วิธีการวัดแบบเอนไซม์เมตริก โดยให้โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ด้วยเอนไซม์โคเลสเตอรอล เอสเทอร์เรส (cholesterol esterase) และถูกออกซิไดซ์ (oxidize) ต่อโดยเอนไซม์โคเลสเตอรอล ออกซิเดส (cholesterol oxidase) ได้ hydrogen peroxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ Aminoantipyrine ได้สาร Quinoneimine สีชมพูแดง วิธีการวัดแบบนี้มีข้อเสียคือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจถูกรบกวนได้โดยซีรัมบิริลูบินทำให้สีที่เกิดขึ้นมีความเข้มสูงขึ้นเมื่อนำไปวัดค่าโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ทำให้ค่าที่วัดได้อาจคาดเคลื่อนไปบ้าง วิธีการวัดแบบคัลเลอร์ริเมตริกของ Zak (1957) เป็นวิธีการที่อาศัยการทำปฏิกิริยาทางเคมีของเฟอริคคลอไรด์ กรดอะซิติกและกรดซัลฟูริคเข้มข้น จะเกิดสีม่วงอมชมพู นำไปวัดค่าโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งจากค่ากราฟมาตรฐานพบว่าวิธีการนี้มีความเข้มข้นที่จุดกึ่งกลาง 325 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งค่าที่วัดได้อยู่ในหน่วยไมโครกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าความละเอียดในการวัดแล้วการใช้ ELISA วัดปริมาณโคเลสเตอรอลสามารถ

วัดค่าได้ละเอียดกว่าอย่างเห็นได้ชัด วิธีการของ Zak (1957) นี้สามารถทำได้ง่ายเพราะสารเคมีที่ใช้สามารถเตรียมได้ง่ายแต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือ การใช้กรดอะซิติคเข้มข้นและกรดซัลฟูริคเข้มข้นทำให้ผู้วัดเสี่ยงต่ออันตรายจากการหยดหรือการหกของสารเคมีและกลิ่นเหม็นของกรดอะซิติคอีกด้วย

การเปรียบเทียบวิธีการวัดโคเลสเตอรอล

ผลของโคเลสเตอรอลที่วัดด้วย ELISA และวิธีคัลเลอร์ริเมตริกมีค่าเฉลี่ย ± S.E (n) เท่ากับ 645.28 ± 40.91 (40) และ 656.20 ± 40.78(40) มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมไข่แดง ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งแสดงว่าวิธีการวัดโคเลสเตอรอลโดยวิธี ELISA สามารถใช้งานได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีของ Zak (1957) แล้ว และวิธีการวัดแบบ ELISA ยังมีความปลอดภัยกว่าและยังสามารถวัดตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยกว่าได้ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

สรุปผลการทดลอง

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลโดยการกระตุ้นให้หนู Balb/c ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลด้วยการฉีดกระตุ้นด้วยโคเลสเตอรอลเชื่อมติดกับ BSA ผสมกับสารช่วยกระตุ้นคือ Freund 's complete adjuvant ทุกๆ 2 สัปดาห์เป็นจำนวน 3 ครั้งเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าหนูสามารถผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอลได้เมื่อนำมาหลอมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ม้าม (spleenocyte) ของหนูที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล กับเซลล์ไมอิโลมา (myeloma) สายพันธุ์ X63Ag8.653 เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridomas) ที่ผลิตแอนติบอดีต่อโคเลสเตอรอล 20 หลุม จาก 35 หลุม คิดเป็น 57.14 % ของเซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้น ทำการแยกโคลนเดี่ยวจากเซลล์ลูกผสม 3B6 ได้โคลนเดี่ยวทั้งหมด 12 โคลน และจำแนกได้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเป็น Ig G นำโมโนโคลนอลโคลน 3B6-6F4 มาใช้ในการทำ ELISA ในการสร้างกราฟมาตรฐานของโคเลสเตอรอลได้ค่าความไวในการวัด (50 % binding) ที่ 7.2 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อทำ cross reaction กับ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) และอีสตราไดออล (estrodiol) พบว่ามี % cross reaction เป็น 2.8 % และ 1.62 % ตามลำดับ วัดค่า intra และ inter coefficient assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.7 % และ 10.0 % ตามลำดับ ในการทำ ELISA เพื่อวัดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงสามารถวัดค่าได้ค่าเฉลี่ย ± S.E (n) เท่ากับ 645.28 ± 40.91 (40) มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมไข่แดงซึ่งใกล้เคียงกับวิธีการวัดแบบคัลเลอร์ริเมตริกของ Zak (1957) วัดได้ค่าเฉลี่ย ± S.E (n) เท่ากับ 656.20 ± 40.78(40) มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมไข่แดง เมื่อเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) นำข้อมูลที่วัดได้มาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยให้แกน x เป็นวิธีการวัดโคเลสเตอรอลด้วย ELISA แกน y เป็นวิธีการวัดของ Zak (1957) ได้ค่า $R^2 = 0.9066$ และการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลโดยวิธี ELISA มีความไวมากกว่าวิธีของ Zak (1957) ถึง 45×10^6 เท่า (7.2 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร *vs* 325 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาถึงการใช้วิธีการวัดโคเลสเตอรอลแบบ ELISA ในการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลจากน้ำลายเพื่อลดความเครียดจากการเจาะเลือดสัตว์ เพื่อตรวจปริมาณโคเลสเตอรอลในสัตว์ซึ่งจะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพการผลิตสัตว์

2. พัฒนาระบบ ELISA ให้เป็นแบบ Strip ELISA เพื่อความสะดวกในการนำออกไปใช้งานนอกสถานที่

3. ศึกษาวิธีการวัดโคเลสเตอรอลแบบเอนไซม์เพื่อนำมาทดลองวัดปริมาณโคเลสเตอรอลเปรียบเทียบกับวิธีการวัดด้วย ELISA

4. ทดลองผลิตลูกผสมข้ามสปีชีส์โดยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโคเลสเตอรอลในกระต่ายและทำการหลอมเซลล์ไมอิโลมากับเซลล์ลิโฟซัยท์ของกระต่าย เพื่อลดการฆ่าหนูทดลองในการเก็บเซลล์จากม้าม

5. เนื่องจากโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนพวกสเตียรอยด์ต่างๆดังนั้นในการผลิตโมโนโคลนอลต่อโคเลสเตอรอลอาจมีเซลล์ลูกผสมที่มีผลในการผลิตแอนติบอดีต่อสเตรียรอยด์ฮอร์โมน ดังนั้นเพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จะใช้ในการวัดปริมาณโคเลสเตอรอลอย่างแท้จริงควรจะทำการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อสารประกอบที่เกี่ยวข้องต่อโคเลสเตอรอลโดยตรงเช่นโคเลสเตอริล เอสเทอร์ ทรานสเฟอร์ โปรตีน (cholesteryl ester transfer protein) ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่งโคเลสเตอรอลในร่างกาย