บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

สารเคมี	Lot number	บริษัท
Ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$	101217	Merk
Androstenedione	024K0809	Sigma
Bovine serum albumin, BSA	027528	FisherBiotech
Citric acid	C2270	Sigma
Dihydrogen phosphate, KH_2PO_4	4873	Merk
Dimethyl sulfoxide, DMSO	802912	GIBCO
Disodium phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$	30414	Riedel-de Haen
17β-Estradiol	21K1267	Sigma
17(-Estradiol-6-(o-carboxymethyl)-oxime-BSA	R 272	Steraloids
Estrone	87F3782	Sigma
Ethanal	65434	Scharlau
Fetal bovine serum, FBS	40G4540K	GIBCO
Freund's complete adjuvant	014K8927	Sigma
Freund's incomplete adjuvant	112K8930	Sigma
Gelatin	K4988770	Merk
Gentamycin sulphate injection	548062	T.P. Drug lab
Goat anti-mouse IgG-HRP	120K9220	Sigma
Hydrocortisone	13H0525	Sigma
11(-Hydroxyprogesterone	81H0454	Sigma
17(-Hydroxyprogesterone	065K0963	Sigma

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	Lot number	บริษัท
Hypoxanthine aminopterine thymidine, HAT	225F	Biochrom
Hypoxanthine thymidine, HT	1290473	GIBCO
Iscove's Modified Dulbecco's medium, IMDM	1282453	GIBCO
2-Mercaptoethanal	M-6250	Sigma
N,N-Dimethyl-formamide	D4254	Sigma
O-phynylene-diamine-HCl, OPD	80972	Zymed lab
Polyethylene glycol, PEG	P-3640	Sigma
Polyethylene sorbitan monolaurate, Tween 80	H0306	Sigma
Potassium chloride, KCl	31248	Riedel-de Haen
Pregnenolone	033K1107	Sigma
Progesterone	61K0286	Sigma
Protein G Agarose	1279141	Invitrogen
Sodium chloride, NaCl	K29287204	Merk
Sodium hydrogen carbonate, NaHCO3	612	Merk
Sodium hydroxide	K19742898	Merk
Sulfuric acid, H2SO4	-	J.T.Baker
Testosterone	T1500	Sigma

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
Biohazard laminar flow	BLF-120	Major lab	-
CO2 incubator	3194	Forma Scientific	สหรัฐอเมริกา
Immunowash	1575	BIO-RAD	ฝรั่งเศส
Inverse microscope	CK2	Olympus	ญี่ปุ่น
Micropipet (20, 100, 200, 1000 µl)	Pipetman	Gilson	ฝรั่งเศส
Microplate 96 wells	Nunc-immuno™	Nalge Nunc International	เดนมาร์ก
Microplate reader	2010	Anthos	ออสเตรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

pH meter	678	EP/KE	สวิสเซอร์แลนด์
Refrigerated centrifuge	6930	Kubota	ญี่ปุ่น
Spectrophotometer UV-visible	DU	Beckman	อเมริกา
Vortex mixer	K-500 GE	Labinco	อเมริกา

3.1.3 สัตว์ทดลอง

1. หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 23.57 ± 1.63 กรัม จำนวน 3 ตัว อำเภอศาลายา จังหวัดนครปฐม

2. โคนมลูกผสมพื้นเมือง × ฟรีเชียน มีเลือดโคฟรีเชียน 93.75 % จำนวน 14 ตัว ของฟาร์มโคนมเกษตรกร สหกรณ์โคนมแม่วางจำกัด อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำนม

เก็บตัวอย่างน้ำนมโคโดยใช้โคนมลูกผสมพื้นเมือง × ฟรีเชียน มีเลือดโคฟรีเชียน 93.75 % จำนวน 14 ตัว โดยเก็บครั้งละ 30 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร ที่มีโปแตสเซียมไดโครเมต 0.3 กรัม วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น เริ่มทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมตั้งแต่หลังคลอด 5 วัน ไปจนกระทั่งผสมติด พร้อมทั้งบันทึกวันเป็นสัด, วันผสมเทียม และจำนวนครั้งของการผสมเทียมต่อการผสมติด เก็บตัวอย่างไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

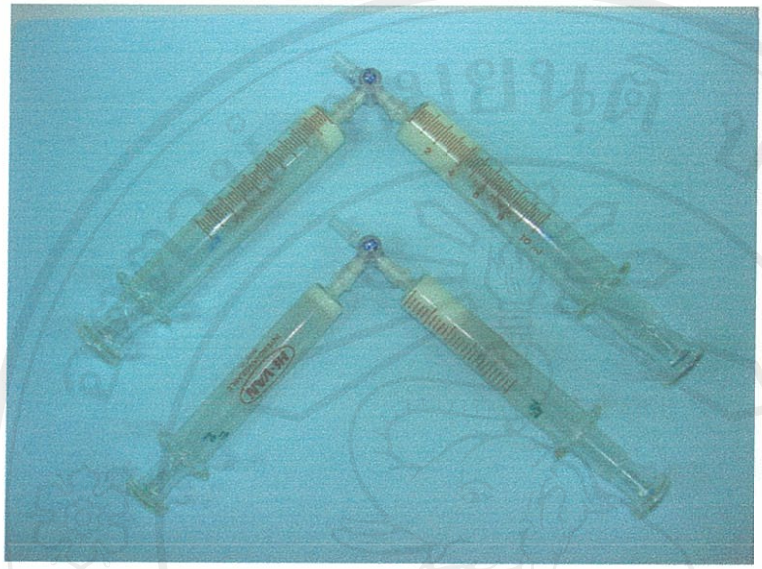
3.3 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ E_2 ($MAbE_2$)

3.3.1 การเตรียมแอนติเจนและการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

แอนติเจนที่ใช้คือ E_2-6-CMO-BSA ปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อตัว ในสารละลาย PBS 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ adjuvant คือ Freund's complete adjuvant 100 ไมโครลิตร ในการฉีดกระตุ้นครั้งแรก หลังจากนั้นจะใช้ Freund's incomplete adjuvant ในการฉีดกระตุ้นครั้งต่อไป โดยการเตรียมจะใช้วิธีโฮโมจีไนเซชั่น (homogenization) คือ ต่อกระบอกฉีดยา 2 อัน กับ 3 ทาง (3-waystopcock) แล้วใส่สารทั้งหมดลงในกระบอกฉีดยาด้านหนึ่ง หลังจากนั้นดันกระบอกฉีดยาไปมาประมาณ 50-100 ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเป็นสีขาวขุ่น (รูปที่ 3-1) นำสารละลายที่ได้ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัว ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อตัว โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลัง ทุก 2 สัปดาห์ และทำการเก็บเลือดก่อนการฉีดกระตุ้นทุกครั้ง ตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละประมาณ 300 ไมโครลิตร นำมาปั่นแยกเอาส่วนพลาสมาและเก็บที่ –20 °C เพื่อนำมาตรวจสอบผลการตอบสนองต่อ E_2

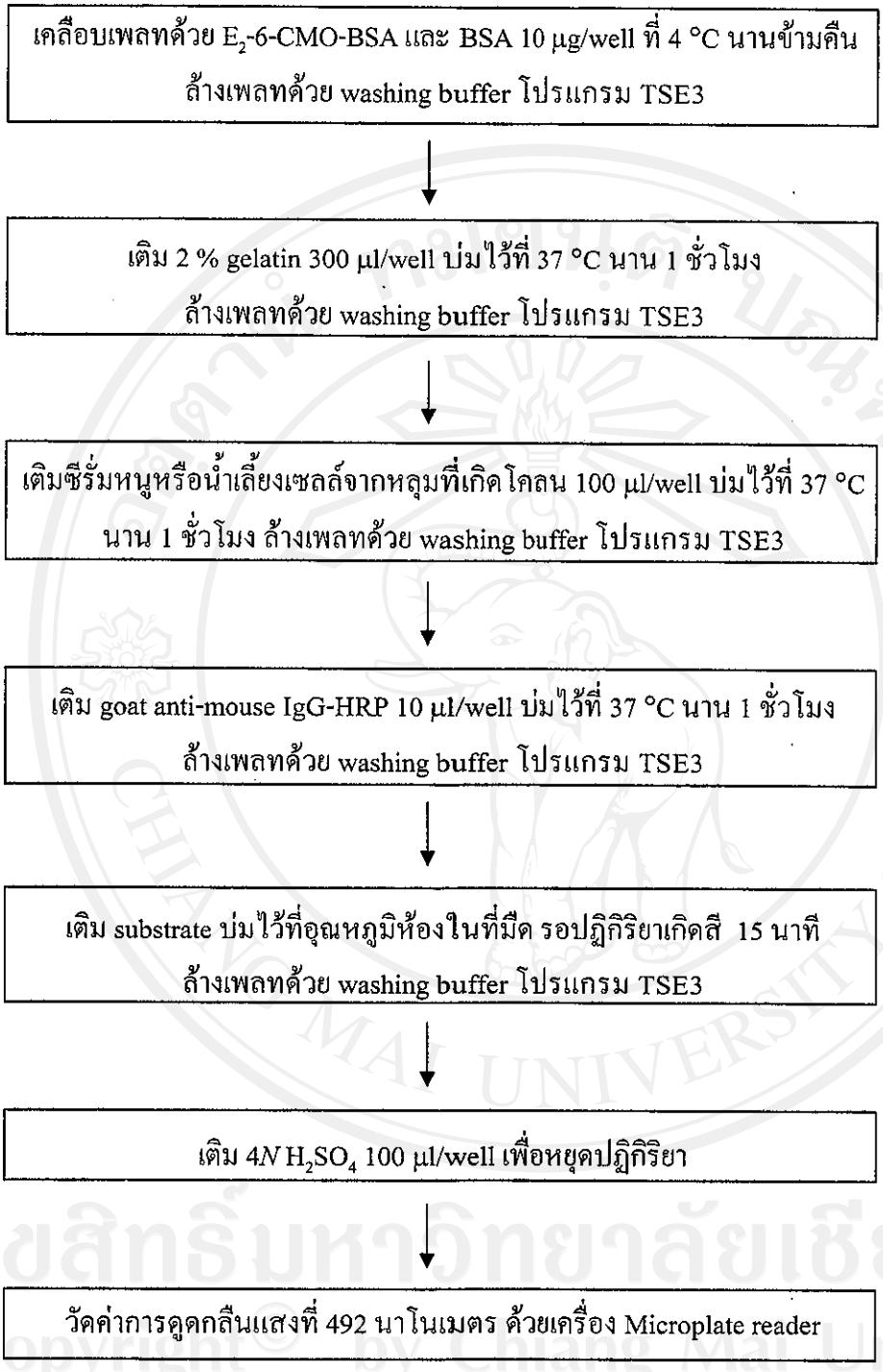


รูปที่ 3-1. แสดงการต่อระหว่าง 3 ทางกับกระบอกฉีดยา เพื่อโฮโมจิไนซ์ระหว่าง adjuvant กับแอนติเจน.

3.3.2 การวัดระดับแอนติบอดีต่อ E_2 ด้วยวิธี indirect ELISA

เคลือบเพลทด้วย E_2-6-CMO-BSA และ BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุมในสารละลายสำหรับการเคลือบ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมซีรั่มหนูที่เจือจาง 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติม goat anti-mouse เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ที่เจือจาง 1:2,500 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (รูปที่ 3-2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3-2. การวัดระดับแอนติบอดีต่อ E_2 จากซีรั่มหนูและน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ด้วยวิธี indirect ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3 เตรียมเซลล์ไมอิโลมา

ใช้เซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63 – Ag8.653 เป็นเซลล์มะเร็งของหนูที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยเลี้ยงใน 10 % FCS ที่ 37 °C มีสัดส่วนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (5 % CO_2) ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ตรวจนับจำนวนเซลล์ และสุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

3.3.4 เตรียมเซลล์ม้ามหนูขาวตัวเล็ก

ฆ่าหนูเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางบนแผ่นโฟม เปิดช่องท้องเพื่อตัดม้าม นำม้ามที่ตัดมาแช่ใน IMDM และฉีดชะล้างเซลล์ด้วย IMDM ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.83 % 10 มิลลิลิตร นาน 6 นาที นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย IMDM 10 มิลลิลิตรนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง เติม IMDM 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว ตรวจนับจำนวนเซลล์ และสุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

3.3.5 การเตรียม feeder cell

ฆ่าหนูเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 70 % แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อ วางบนแผ่นโฟม ดึงหนังช่องท้องออก ให้เห็นเยื่อที่คลุมท้องอยู่ ฉีด IMDM เข้าไปในช่องท้อง 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ดูด IMDM กลับออกจากช่องท้อง ใส่ลงในหลอด 15 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ ปิดฝา ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เท IMDM ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายโดยทั่ว เทลงใน tray เติมสารละลาย HAT อีก 50 มิลลิลิตร ดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม ชนิดปลอดเชื้อ หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 6 เพลท นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ ที่ 37 °C 5 % CO_2 และมีความชื้นสูง ก่อนนำไปใช้ต้องมีการตรวจการปนเปื้อนโดยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

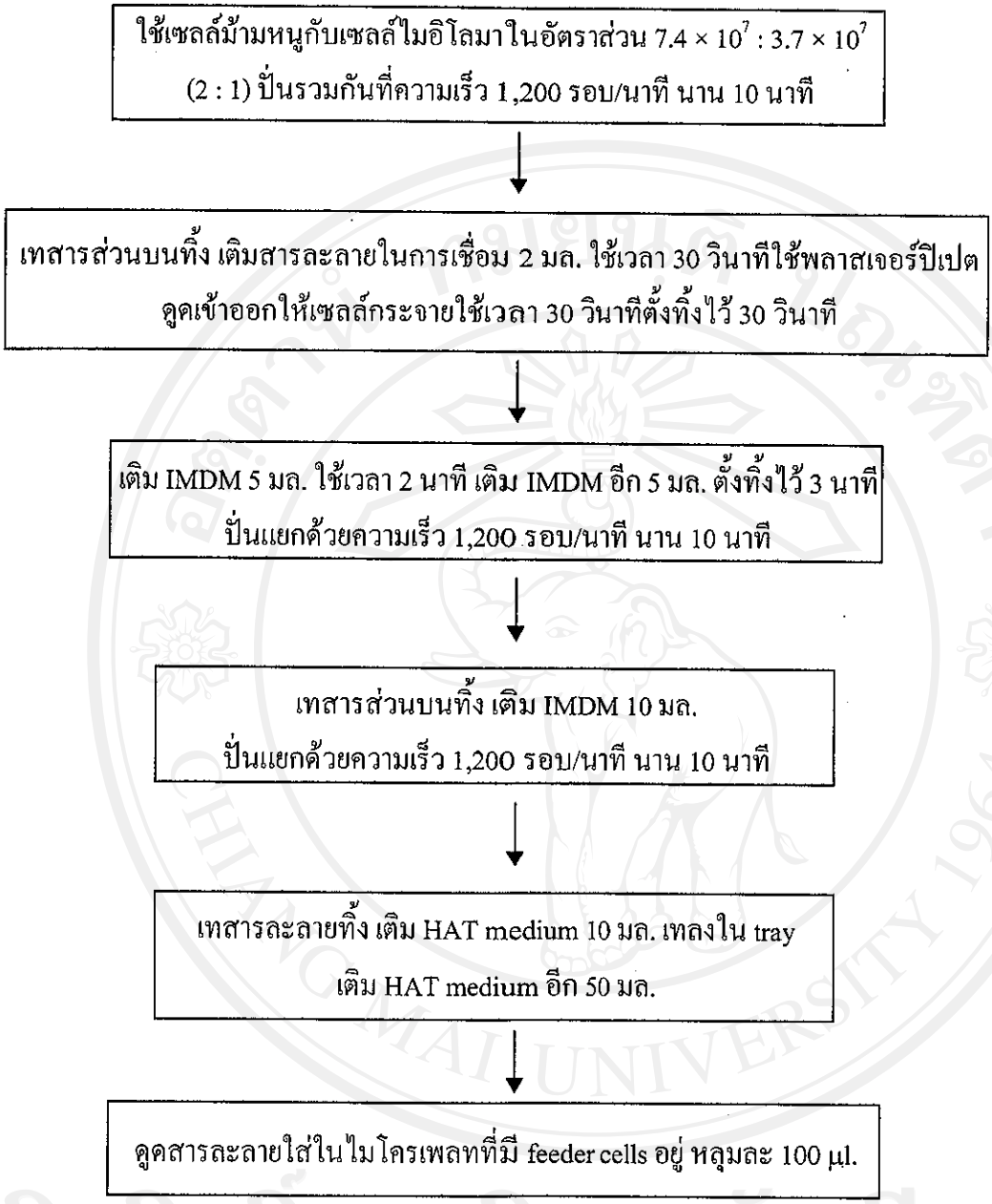
3.3.6 การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามหนูและเซลล์ไมอิโลมา

การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามหนูและเซลล์ไมอิโลมาจะต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ โดยอัตราส่วนระหว่างเซลล์ม้ามหนูต่อเซลล์ไมอิโลมา (X63Ag8.653) เท่ากับ 2:1 ทำการนับจำนวนเซลล์ม้ามเท่ากับ 7.4×10^7 เซลล์ และเซลล์ไมอิโลมาเท่ากับ 3.7×10^7 เซลล์ แล้วผสมเซลล์ทั้งสองในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 50 % PEG 2 มิลลิลิตร ภายใน 30 วินาที ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เพื่อทำการเชื่อมเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที เติม IMDM ให้ครบ 5 มิลลิลิตร ภายใน 2 นาที ผสมให้เข้ากัน เติม IMDM 5 มิลลิลิตรและทิ้งไว้ 3 นาที ก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายออก เติม IMDM 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเป็นการล้าง PEG ออก แล้วเทสารละลายออก เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบา ๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว เทลงใน Tray เติมสารละลาย HAT อีก 50 มิลลิลิตร ดูดสารสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุมที่มี feeder cell อยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร (รูปที่ 3-3) จำนวน 6 เพลท นำไปเลี้ยงที่ 37 °C 5 % CO_2 และมีความชื้นสูง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้สารละลาย HT ในการเลี้ยงเซลล์

3.3.7 การคัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 (screening)

เคลือบเพลทด้วย E_2-6-CMO-BSA และ BSA 10 ไมโครกรัมต่อหลุมในสารละลายสำหรับการเคลือบ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีโคลน ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติม goat anti-mouse IgG เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ที่เจือจาง 1:200 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (รูปที่ 3-2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3-3. การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามหนู BALB/c และเซลล์ไมอิโลมา.

3.4.8 การแยกโคลนเดี่ยว (limiting dilution)

ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์เข้าออกเพื่อให้เซลล์กระจายในน้ำเลี้ยง นับจำนวนเซลล์โดย haemocytometer แล้วดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ให้ได้เซลล์ 1,000 เซลล์ ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มล. เติมสารละลาย 10 % FBS 30 มล. เทลงใน tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตทำให้เซลล์กระจายโดยทั่ว แล้วดูดสารละลายลงในไมโครเพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 % FBS 20 มล. เทลงใน tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตทำให้เซลล์กระจายโดยทั่ว แล้วดูดสารละลายลงในไมโครเพลทที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10 % FBS 20 มล. เทลงใน tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตทำให้เซลล์กระจายโดยทั่ว แล้วดูดสารละลายลงในไมโครเพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ทั้ง 6 เพลท ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C 5 % CO_2 จนกระทั่งเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมา แล้วทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 อีกครั้ง แล้วเลือกกลุ่มโคลนที่มีลักษณะกลมสวย

3.4.9 การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotype)

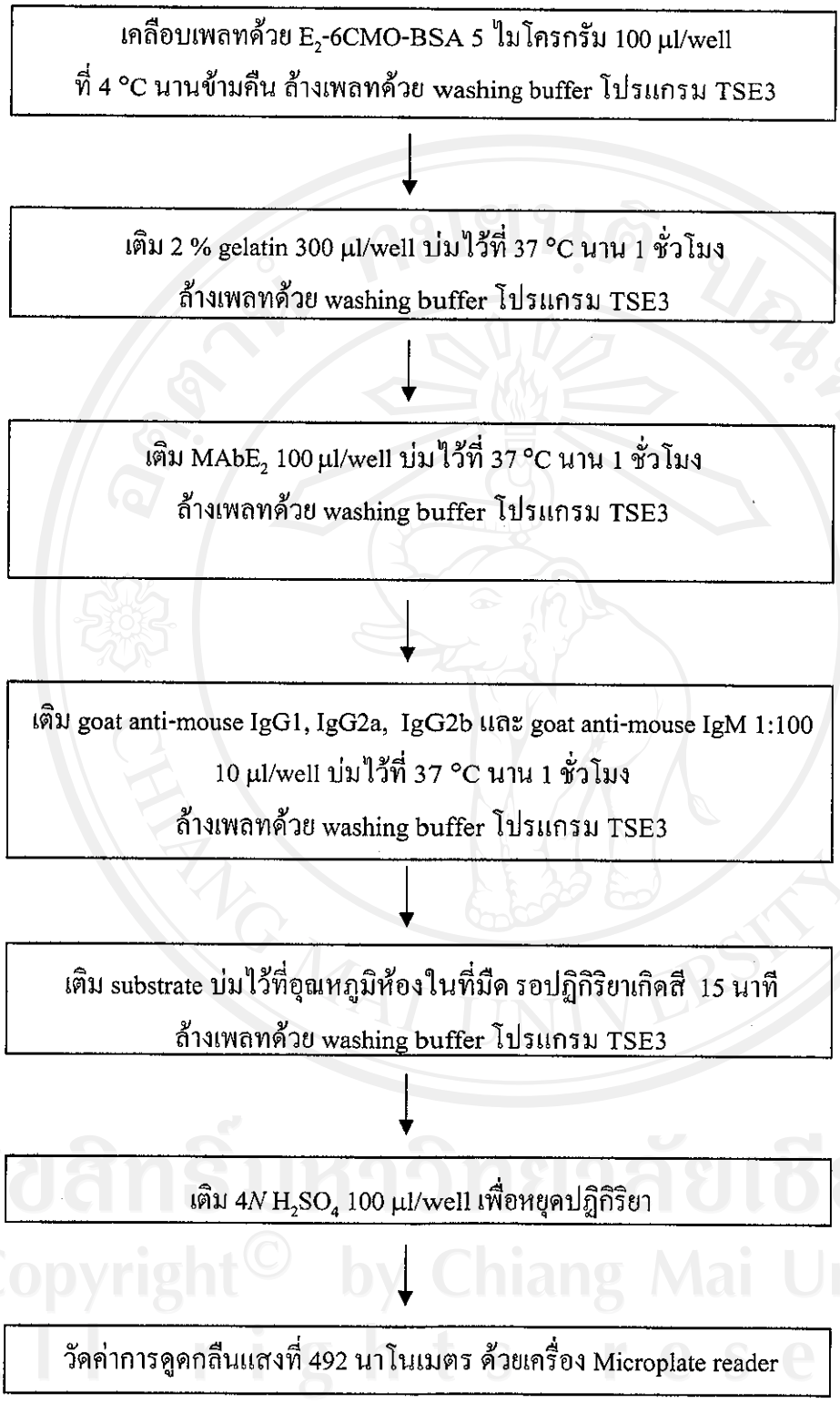
จำแนกโดยวิธี ELISA โดยเคลือบเพลทด้วย E_2-6CMO-BSA 5 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติม $MAbE_2$ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติม goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b และ goat anti-mouse IgM ที่เจือจาง 1:100 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (รูปที่ 3-4)

3.4.10 การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์

นำเอาน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี Ab ปริมาตร 20 มล. มาปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 30 นาที ที่ 25 °C เก็บส่วนของเหลว แล้วเติม 18 % Na_2SO_4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 25 °C นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ เติม 16 % Na_2SO_4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในส่วนที่เป็นตะกอน 33 มล. บ่มไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 25 °C นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่ความเร็ว 5,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอน นำส่วนที่เป็นตะกอนเติมน้ำกลั่น 25 มล. นำไป dialyse ในสารละลาย 50 mMNaCl นาน 3 วัน ที่ 4 °C โดยเปลี่ยน 50 mMNaCl วันละครั้ง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รูปที่ 3-5)เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

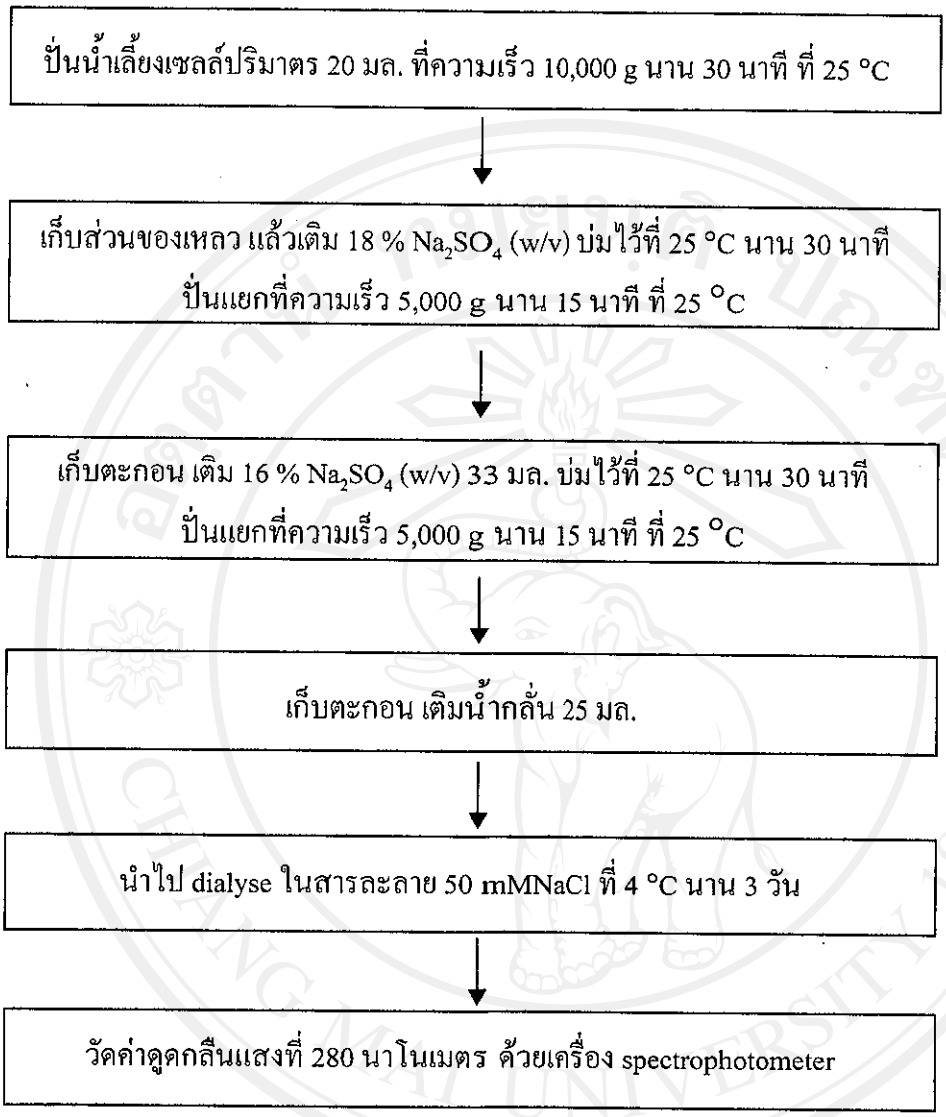
ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย = $\frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm.}}{1.4}$ mg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3-4. การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (isotype) ด้วยวิธี ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3-5. ขั้นตอนการตกตะกอนแยกแอนติบอดีจากน้ำเลี้ยงเซลล์.

3.4.11 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ (purification)

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ตกตะกอนได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Protein G column chromatography เทสารละลาย binding buffer ลงในคอลัมน์ปริมาตร 10 มล. ปล่อยให้ของเหลวไหลผ่านด้วยอัตรา 1 มล./5 นาที แล้วนำแอนติบอดีที่ผ่านการตกตะกอนมาเติม binding buffer 2 มล. ค่อย ๆ เติมสารละลายลงในคอลัมน์จนหมด แล้วล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer 5 มล. ตามด้วย elute buffer 20 มล. เก็บสารละลายที่ได้ใน micro centrifuge tube ขนาด 1.5 มล. หลอดละ 1 มล. แล้วล้างคอลัมน์ด้วย binding buffer ปริมาตร 10 มล. นำสารละลายที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm และนำไปวัดด้วยวิธี indirect ELISA เก็บสารละลายที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงไว้เพื่อนำไปใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และล้างคอลัมน์ ด้วย binding buffer ต่อไปจนได้สารละลายค่าดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.005 nm. ซึ่งแสดงว่าไม่เหลือส่วนของแอนติบอดีแล้ว

3.4.12 การหาค่าปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยว (cross reaction) ของแอนติบอดี

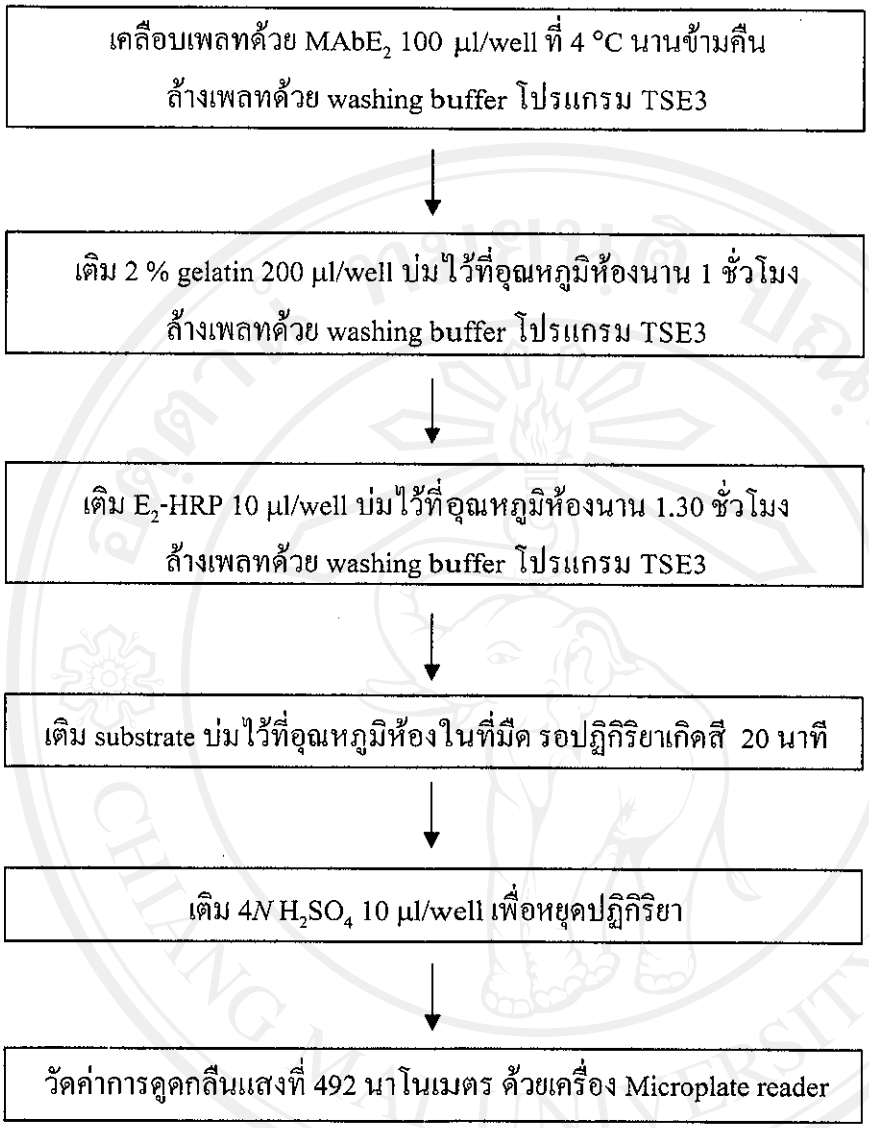
เคลือบเพลทด้วย $MAbE_2$ เจือจาง 1:128 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายฮอร์โมนมาตรฐาน 17β-Estradiol, Estron, Progesterone, Testosterone, Androstenedione, Pregnenolone, Hydrocortisone, 11α-Hydroxyprogesterone, และ17α-Hydroxyprogesterone ความเข้มข้น 0, 10, 500, 10,000, 50,000 และ100,000 ng./ml. ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เติม Estradiol-peroxidase-labeled (E_2-HRP) เจือจาง 1:10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย $4N\ H_2SO_4$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

3.5 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการทำ ELISA เพื่อวัดปริมาณ E_2 ในน้ำนมโค

3.5.1 การหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ $MAbE_2$ และ E_2-HRP โดยวิธี ELISA

เคลือบเพลทด้วย $MAbE_2$ เจือจาง 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 และ 1:1,024 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติม E_2-HRP เจือจาง 1:500, 1:800, 1:1,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย $4N\ H_2SO_4$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (รูปที่ 3-6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3-6. แสดงการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ $MAbE_2$ และ E_2-HRP ด้วยวิธี ELISA.

3.5.2 การหากราฟมาตรฐาน

เคลือบเพลทด้วย $MAbE_2$ เจือจาง 1:64 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายมาตรฐาน 17β-Estradiol 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ1,000 พิโคกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เติม E_2-HRP เจือจาง 1:800 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้

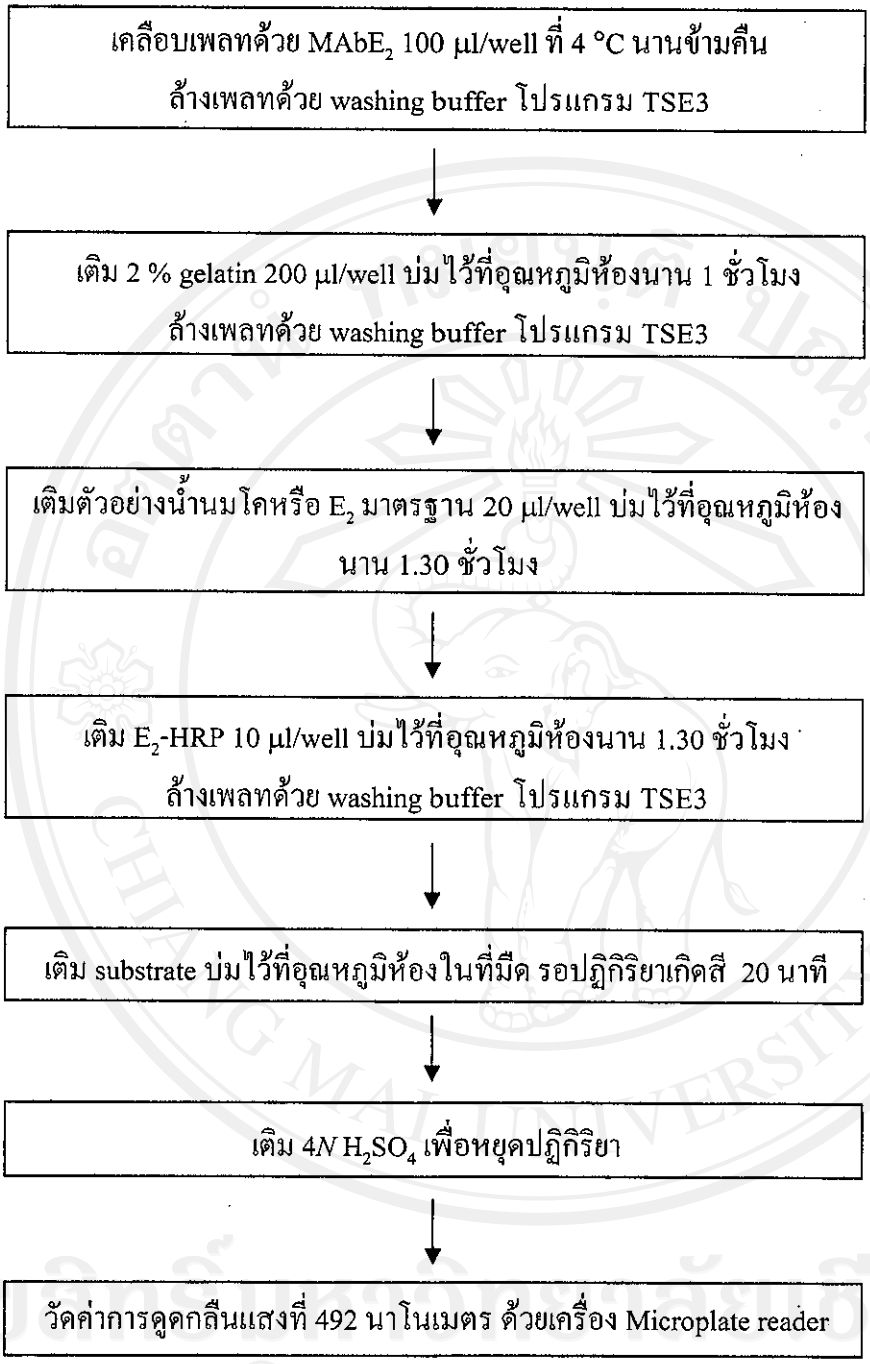
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (รูปที่ 3-7)

3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ E_2 ในน้ำนมด้วยวิธี Competitive ELISA

เคลือบเพลทด้วย $MAbE_2$ เจือจาง 1:64 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowach โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมตัวอย่างน้ำนมหรือ E_2 มาตรฐาน ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เติม E_2-HRP เจือจาง 1:800 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (รูปที่ 3-7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3-7. แสดงการหากราฟมาตรฐานและการวัดระดับอีสตราไดออลในน้ำนมโดยวิธี Competitive ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved