ภาคผนวก ก.

ตารางที่ 1. แสดงค่า Optical density (OD) ของมีเดียที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนของไฮบริโดมา จากการเชื่อมระหว่างเซลล์ม้ามที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Progesterone-3CMO-BSAและเซลล์ไมอิโลมา

มีเดียจากไฮบริโดมาโคลน	ค่า OD วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ความแตกต่างของค่า OD
	หลุมที่ coat ด้วย P4-3CMO-BSA	หลุมที่ coat ด้วย BSA	
1B4	0.439	0.27	0.169
1B8	0.635	0.418	0.217
1C5	1.567	0.423	1.144
1D10	0.896	0.702	0.194
1G4	0.745	0.598	0.147
1H5	0.301	0.267	0.034
1H6	1.154	1.089	0.065
1H7	1.772	0.656	1.116
1H8	0.512	0.422	0.09
1H11	0.881	0.769	0.112
2B7	0.89	0.713	0.177
2B8	0.65	0.519	0.131
2B11	0.499	0.343	0.156
2C1	0.117	0.123	-0.006
2C5	0.194	0.144	0.05
2D8	0.894	0.867	0.027
2E9	0.443	0.329	0.114
2H3	0.633	0.754	-0.121
2H5	0.435	0.494	-0.059

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1. แสดงค่า Optical density (OD) ของมีเดียที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนของไฮบริโดมา จากการเชื่อมระหว่างเซลล์ม้ามที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Progesterone-3CMO-BSAและเซลล์ไมอิโลมา(ต่อ)

มีเดียจากไฮบริโดมาโคลน	ค่า OD วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ความแตกต่างของค่า OD
	หลุมที่ coat ด้วย P4-3CMO-BSA	หลุมที่ coat ด้วย BSA	
2H6	1.566	0.511	1.055
2H9	1.756	0.659	1.097
2H11	0.504	0.284	0.220
3B2	0.889	0.61	0.279
3C10	**2.788**	**0.319**	**2.469**
3F2	0.566	0.329	0.237
3H4	1.386	0.218	1.168
3H5	0.464	0.397	0.067
4B2	**2.711**	**0.301**	**2.410**
4G11	1.013	0.902	0.111
5B2	0.566	0.341	0.225
5B5	0.756	0.669	0.087
5C10	1.553	0.428	1.125
5D3	1.654	0.433	1.221
5E3	0.732	0.674	0.058
5F11	1.439	0.401	1.038
5G2	0.558	0.437	0.121
5G3	0.422	0.412	0.01
5G9	0.774	0.718	0.056
5G10	0.627	0.518	0.109
5H9	**2.834**	**0.335**	**2.499**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2. แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับProgesterone-3CMO-BSA และ BSAของมีเดียที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายหลังการทำ Limiting dilution.

มีเดียจากไฮบริโดมาโคลน	ค่า OD วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ความแตกต่างของค่า OD
	หลุมที่ coat ด้วย P4-3CMO-BSA	หลุมที่ coat ด้วย BSA	
5H94H9	2.021	0.538	2.483
5H95D8	2.873	0.421	2.452
5H95E5	2.953	0.501	2.452
5H95E10	2.876	0.448	2.428
5H95F9	2.902	0.501	2.401
5H95G1	2.938	0.461	2.477
5H96B6	2.089	0.581	2.508
5H96B10	2.823	0.476	2.347
5H96D3	2.923	0.421	2.502
5H96E11	2.102	0.615	2.487
5H96G4	2.084	0.549	2.535
3C105B10	2.934	0.538	2.396
3C105C3	2.833	0.321	2.512
3C105C9	2.841	0.418	2.423
3C105D8	2.923	0.467	2.456
3C106E4	2.977	0.514	2.463
3C106E7	2.815	0.412	2.403
3C106F3	2.053	0.591	2.462
3C106H1	2.912	0.427	2.485

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ Progesterone -3CMO-BSA และ BSAของมีเดียที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายหลังการทำ Limiting dilution. (ต่อ)

โมโนโคลนอล แอนติบอดี	ค่า OD วัดที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร		ความแตกต่าง ของค่า OD
	หลุมที่ coat ด้วย P4-3CMO-BSA	หลุมที่ coat ด้วย BSA	
3C106H8	2.792	0.322	2.470
4B24C1	2.956	0.422	2.534
4B25D3	2.967	0.388	2.579
4B26E1	2.832	0.369	2.463
4B26G3	2.911	0.342	2.569
4B26H11	2.939	0.387	2.552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข.

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4

ชั่ง NaCl 8.0 กรัม, KH_2PO_4 0.2 กรัม, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 2.8 กรัม และ KCl 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเพลท (coating buffer)

ชั่ง Na_2CO_3 4.29 กรัม, $NaHCO_3$ 2.93 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 9.6 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการล้างเพลท (washing buffer)

ชั่ง NaCl 45 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 4,800 มิลลิลิตร เติม polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 2.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 5,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียมสารละลายตั้งต้น (citrate phosphate buffer)

ชั่ง citric acid (monohydrate) 10.30 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 18.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลาย 3 % เจลาติน

ละลายเจลาติน 3 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบเพลท 80 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

6. การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (stop solution)

การเตรียม 4 *N* H_2SO_4 ประกอบด้วยสาร H_2SO_4 21.36 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การเตรียมสารละลายตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA

ชั่ง O-phenylenediamine acetate (OPD) 0.018 กรัม ละลายใน citrate phosphate buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อกันแสง นำไปเขย่าโดยใช้ Vortex mixer เมื่อ OPD ละลายหมดแล้วจึงเติม 0.03 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 20 ไมโครลิตร (การเตรียม OPD จะต้องเตรียมก่อนใช้เท่านั้นเนื่องจากสารละลายจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง)

8. การเตรียม Iscove ' s Modified Dulbecco ' s Medium (IMDM)

Iscove ' s Modified Dulbecco ' s Medium	17.7	กรัม (1 ซอง)
$NaHCO_3$	3.024	กรัม
2-mercapto	1	มิลลิลิตร

ละลาย Iscove ' s Modified Dulbecco ' s Medium และ $NaHCO_3$ ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 7.4 เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายด้วย filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร โดยใช้กรวย filtration assembly ที่ประกอบเข้ากับ side arm flask ขนาด 1 ลิตร กรองโดยอาศัยเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) ภายในตู้ปลอดเชื้อ พร้อมเติม 2-mercapto เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

9. การเตรียม 10 % Fetal bovine serum (10 % FBS)

Fetal bovine serum	10	มิลลิลิตร
IMDM	90	มิลลิลิตร
Gentamycin	20	unit
Kanamycin	20	unit

เตรียมในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวมัลลิกา กำภูศิริ
วันเดือนปีเกิด	21 พฤศจิกายน 2522
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนปิยะมหาราชาลัย จังหวัดนครพนม ปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและ วิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2546 – 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved