ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านซีเอตินไรโบไซด์ เพื่อใช้ในการตรวจวัดซีเอตินไรโบไซด์ในพืช โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์

ผู้เขียน นางสาวปริญญาภรณ์ วิโรจน์สกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชสวน

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดรุณี นาพรหม	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ เพทาย พงษ์เพียจันทร์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านซีเอตินไรโบไซด์ (Zeatin Riboside : ZR) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน ZR โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay : ELISA) โดยใช้ Zeatin Riboside – Bovine Serum Albumin (ZR-BSA) เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c เมื่อหนูมีการสร้างแอนติบอดี จึงนำเซลล์ม้าม (Spleen cell) ของหนูมาหลอมเซลล์ (Fusion) กับเซลล์ไมอิโลมา (Myeloma cell : X63-Ag 8.653) ประมาณ 14-21 วัน จะพบโคลนของ Hybridoma cells ในหลุม แล้วทำการคัดเลือกโคลนของ Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมน ZR พบว่า Hybridoma cells ที่ผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมน ZR จำนวน 2 หลุม จากทั้งหมด 25 หลุม (8 %) นำ Hybridoma cells จากหลุมหนึ่งมาแยกโคลนเดี่ยว ได้ Hybridoma cells ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้ 17 โคลน แล้วจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน พบว่า ทั้งหมดเป็นชนิด IgG1 นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 50 % จากนั้นหาปฏิกิริยาเกาะเกี่ยว (% Cross reaction) กับฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ พบ % Cross reaction กับ *trans*-ZeatinRiboside-5'-monophosphate, *trans*-Zeatin, Dihydrozeatin, *trans*-Zeatin-9-glucoside และ Dihydrozeatin Riboside คิดเป็น 86.13 %, 56.97 %, 2.53 %, 2.48 % และ 1.91 % ตามลำดับ อีกทั้งพบ 50 % binding ของการวัดอยู่ที่ 38.5 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมน ZR ที่ผลิตได้ สามารถนำไปตรวจวัดใน xylem sap ใบและรากของลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(*Dimocarpus longan*) ทั้งหมด 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ราดสารโพแทสเซียมคลอเรต และไม่ได้ราดสารโพแทสเซียมคลอเรต พบว่าใน xylem sap และรากของลำไยกลุ่มที่ราดสารโพแทสเซียมคลอเรตพบปริมาณ ZR มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ราดสารโพแทสเซียมคลอเรตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ในใบนั้นกลับไม่พบความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Monoclonal Antibody Production Against Zeatin Riboside for Detection in Plant by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Author Miss. Parinyaporn Virodsakul

Degree Master of Science (Agriculture) Horticulture

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Daruni Naphrom	Chairperson
Assoc. Prof. Petai Pongpiachan	Member

Abstract

The study of the monoclonal antibody production against Zeatin Riboside (ZR) for ZR detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique was investigated. The Zeatin Riboside - Bovine Serum Albumin (ZR-BSA) was used as the antigen to immunize antibody against ZR in BALB/c mice. After the antibodies had been produced, mouse spleen cells were fused with myeloma cells (X63 – Ag 8.653) to create hybridomas. About 14-21 days after the fusion, 2 wells from 25 wells of the hybridoma cells were identified as positive clones (8 %) One of the positive wells was processed in limiting dilution. Seventeen clones were found and characterized as IgG1. The monoclonal antibody was purified with 50 % saturated ammonium sulfate and determined the % cross reaction with other Cytokinin derivatives. The results showed that the cross reaction with *trans*-ZeatinRiboside-5'-monophosphate, *trans*-Zeatin, Dihydrozeatin, *trans*-Zeatin-9-glucoside and Dihydrozeatin Riboside were 86.13, 56.97, 2.53, 2.48 and 1.91 %, respectively. Moreover, It was found that the highest sensitivity at 50 % binding was 38.5 ng/50ul. The generated monoclonal antibody against ZR was used to detected the ZR with the method of ELISA in various longan tissues (*Dimocarpus longan*). The two experiments were manipulated with $KClO_3$ and without $KClO_3$. The longan xylem sap, roots and leaves were used as samples and compared the ZR quantity between each treatment. With $KClO_3$ treatment, the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

longan xylem sap and roots were significantly higher than the without $KClO_3$ treatment while longan leaves were not.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved