บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในขั้นตอนการเตรียมแอนติเจนจะมีการเชื่อม ZR เข้ากับ BSA ก่อน เนื่องจาก ZR มีขนาดเล็ก เรียกว่า hapten ไม่มีความสามารถที่จะเป็นแอนติเจนได้ ไม่สามารถที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ได้ จึงต้องเชื่อมติดกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ ทำให้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนและกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันได้ ในการศึกษาการผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนพืช ส่วนใหญ่ใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนในการเชื่อมติด (carrier protein) (Weiler, 1983) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า หลังจากที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูด้วย ZR-BSA ร่วมกับ Freund's complete adjuvant ในการฉีดกระตุ้นครั้งแรก และกระตุ้นครั้งต่อไปใช้ Freund's incomplete adjuvant โดยฉีดกระตุ้นในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c (ภาพที่ 8) พบแอนติเจนชนิด ZR-BSA สามารถกระตุ้นในหนูทดลองมีการตอบสนองและสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ ZR-BSA ขึ้นได้ หลังจากที่ตรวจ พบว่า หนูทดลองมีการสร้างแอนติบอดี จึงนำไปสู่ขั้นตอน Fusion ระหว่างเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอิโลมา ในขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ในขั้นตอน Fusion ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย ZR-BSA กับเซลล์ไมอิโลมา สายพันธุ์ X-63-Ag 8.653 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่พัฒนามาจากหนูตัวเล็ก พบว่า เกิดเซลล์ลูกผสม Hybridoma cells จำนวน 25 หลุม คิดเป็น 7.1 % ของทั้งหมด 352 หลุม (25/352) แล้ว (ตารางที่ 3) พบว่าเป็น Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR เท่ากับ 2 หลุมจาก 25 หลุม (8 %) ของเซลล์ Hybridoma cells ที่เกิดขึ้น ฉะนั้นโอกาสการเกิดเซลล์ Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR เพียง 0.56 % (2/352) ซึ่งเป็นโอกาสที่น้อยมากในการเกิดเซลล์ Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Joachim *et al.*, (1986) ได้ผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน IAA โดย Fusion ระหว่าง IAA-BSA กับเซลล์ไมอิโลมา สายพันธุ์ P3-NS1-AG4-1 (NS1) พบว่า เกิดเซลล์ลูกผสม Hybridoma cells จำนวน 158 หลุม คิดเป็น 82.29 % ของทั้งหมด 192 หลุม และพบเป็น Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน IAA เท่ากับ 7 หลุม จากทั้งหมด 158 หลุม (4.43 %) ดังนั้นทำให้ได้ Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน IAA ได้ 3.64 % (7/192)

สำหรับอัตราส่วนระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาที่จะนำมาทำการ Fusion ในการทดลองนี้ ใช้อัตราส่วนที่ 2.5: 1 พบการเกิดโคลนของเซลล์ลูกผสม (Hybridomas) จำนวน 25 หลุม คิดเป็น 7.1 % ของทั้งหมด 352 หลุม ซึ่งใกล้เคียงกับ มัลลิกา (2550) ที่ผลิต Strip Enzyme-linked

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

immunosorbent assay (Strip ELISA) ที่เตรียมจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAb) ต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone, P_4) สำหรับใช้ในการตรวจวัดระดับ P_4 ในน้ำนม และเปรียบเทียบประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์โคนมในสภาวะอากาศร้อนและเย็น โดยนำเซลล์ม้ามมา Fusion กับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63/Ag 8.653 โดยใช้อัตราส่วน 2 : 1 ซึ่งเกิดโคลนทั้งหมด 40 หลุม คิดเป็น 6.9 % ของทั้งหมด 576 หลุม ส่วนการทดลองของ กนกวรรณ (2542) ซึ่งผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่ายกับเซลล์ไมอิโลมาโดยใช้อัตราส่วนเท่ากับ 2.5 : 1 ซึ่งเกิดโคลนทั้งหมด 21 หลุม คิดเป็น 5.47 % ของทั้งหมด 384 หลุม จะเห็นได้ว่า การใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์ไมอิโลมาที่แตกต่างกันนั้น อาจไม่มีผลต่อการเกิดเซลล์ลูกผสม (Hybridoma cells) โดยตรง อาจเกิดจากความแข็งแรงของเซลล์ม้ามของหนูและเซลล์ไมอิโลมา รวมถึงสารเคมีและเทคนิคในการ Fusion ของแต่ละบุคคล ซึ่งต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญอย่างมาก

จากการทดลองเมื่อได้หลุมที่มีเซลล์ Hybridoma cells ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ภายในหลุมจะมีเซลล์หลายเซลล์เจริญขึ้นพร้อม ๆ กัน ดังนั้น จึงต้องทำการแยกโคลนเดี่ยวของเซลล์ Hybridoma cells แต่ละหลุม จากผลการทดลองหลังทำการแยกโคลนเดี่ยวได้ประมาณ 10 วัน พบว่า 1 หลุมของเซลล์ Hybridoma cells (ZR-G9) สามารถแยกโคลนเดี่ยวได้ถึง 17 โคลน ซึ่งแอนติบอดีที่แต่ละโคลนผลิตได้ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ได้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีของหนู เมื่อจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน พบว่า เป็นชนิด IgG1 (ตารางที่ 6)

หลังจากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยเลี้ยงด้วย 10 % FBS เป็นเวลา 3-5 วัน ทำการนับ Hybridoma cells จำนวน 10^5-10^6 เซลล์/1 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงเปรียบเทียบใน 2 % FBS และ 10 % FBS เพื่อศึกษาอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมของการผลิตแอนติบอดี ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 30 วันหรือสังเกตจน Hybridoma cells ตายจนเกือบหมด พบว่า อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้ผลิตแอนติบอดีใช้ที่ 2 % FBS ก็เพียงพอที่จะได้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นได้ (ภาพที่ 16) ซึ่งการใช้ประโยชน์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 2 % FBS ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้ออาหารเลี้ยงเซลล์กว่าการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 10 % FBS ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง

จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีโมโนโคลนอลแอนติบอดี มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40 และ 50 % พบปริมาณโปรตีนก่อนการ dialyse (หลังการผ่าน ammonium sulfate) เท่ากับ 1.82, 1.56, 1.21 และ 1.10 mg/ml ตามลำดับ แต่หลังการผ่าน dialyse พบปริมาณโปรตีน เท่ากับ 0.21, 0.25, 1.06 และ 1.79 ug/ml ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงให้เห็นว่า หลังการใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 50 % ทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นมากที่สุด คือ 1.79 mg/ml. จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 % เป็นความเข้มข้นที่ยังใช้สำหรับการตกตะกอนยังไม่เพียงพอหรือยังไม่สมบูรณ์ (Reinhard *et al.*, 1996) ส่งผลให้การใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 50% ดีและเหมาะสมที่สุด แต่มีความแตกต่างกับรายงานของ Reinhard *et al.* (1996) พบว่า การใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 30 % ดีที่สุด คือ 72.3 µg/ml โดยพบว่า การใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 20 % พบปริมาณโปรตีน 53.7 ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ยังตกตะกอนไม่สมบูรณ์ ในขณะที่การใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 40 และ 50 % พบว่า เป็นความเข้มข้นที่สามารถทำให้โปรตีนอื่นตกตะกอนลงมาได้ด้วย เช่น albumin ทำให้การใช้ saturated ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 30 % ทำให้ได้ปริมาณ Immunoglobulins สูง และได้ปริมาณ albumin ที่ต่ำ ซึ่งขั้นตอนการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์เป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะจะทำให้แอนติบอดีมีความเข้มข้นและความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น มีความไว (sentivity) สูงขึ้น ทำให้สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อย ๆ หรือสารที่มีการปนเปื้อนของสารอื่นได้ดี (รัชนีวรรณ, 2550)

จากกระบวนการผลิตทั้งหมดทำให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ซึ่งเป็นผลผลิตเริ่มต้นที่จะนำไปใช้สร้างกระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน ZR ในเนื้อเยื่อพืช เพื่อการตรวจที่สะดวก แม่นยำ โดยใช้วิธี Indirect ELISA โดยอัตราเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดี คือ 1:500 และอัตราเจือจางที่เหมาะสมของเอนไซม์ Goat anti-mouse IgG conjugate (IgG-AP) คือ 1:5000 เมื่อนำสารละลาย ZR มาตรฐานที่ระดับต่าง ๆ มาทำกราฟมาตรฐานได้ค่า 50% binding หรือ sentivity ที่ 38.50 ng/50 ul (ตารางที่ 8 และภาพที่ 21) สำหรับนำไปใช้ในตรวจวัดหาปริมาณ ZR ในตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช โดยสามารถบอกปริมาณของฮอร์โมนได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

อย่างไรก็ตามเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาวัดปฏิกิริยาเกาะเกี่ยวกับฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มของไซโตไคนินพบว่า แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับฮอร์โมน *trans*-ZeatinRiboside-5'-monophosphate มากที่สุด คือ 86.13 % รองลงมาคือ *trans*-Zeatin 56.97 % (ตารางที่ 7) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Joachim *et al.* (1986) ผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมน ZR ได้จำนวน 3 โคลน คือ J18-I-D1, J18-III-B5 และ J3-I-B3 ซึ่งแต่ละโคลนทำปฏิกิริยาเกาะเกี่ยวกับ *trans*-ZeatinRiboside-5'-monophosphate 97.8, 95.2 และ 95.2 % ตามลำดับ และทำปฏิกิริยาเกาะเกี่ยวกับ *trans*-Zeatin 36.2, 52.3 และ 47.3 % ตามลำดับ เพราะเนื่องจาก *trans*-ZeatinRiboside-5'-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

monophosphate และ *trans*-Zeatin ต่างก็เป็นอนุพันธ์กับ ZR จึงมีโครงสร้างของฮอร์โมนที่ใกล้เคียงกันมาก

ดังนั้นผลในการตรวจวัดที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ZR ที่ผลิตขึ้น นอกจากมีความจำเพาะต่อปริมาณ ZR แล้ว อาจมีความจำเพาะต่อฮอร์โมนอื่นด้วย เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น มีค่า % Cross reaction กับฮอร์โมนชนิดอื่น ดังที่กล่าวข้างต้น

จากผลการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน ในตัวอย่างพืช 3 ส่วน คือ ราก (Roots) ท่อน้ำ (Xylem sap) และใบ (Leaves) พบว่า สามารถตรวจวัดและเห็นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน โดยมีการเปลี่ยนแปลงของต้นลำไยที่ราดสารโพแทสเซียมคลอเรตเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ปริมาณฮอร์โมนเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าต้นลำไยที่ไม่ได้ราดสารอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 9-11 ภาพที่ 23-25) สอดคล้องกับผลการทดลองของพัชรินทร์ (2551) ที่พบว่า หลังการราดสารโพแทสเซียมคลอเรตทำให้ปริมาณไซโตไคนิน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับการไม่ราดสาร โดยพบปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 38 หลังกรรมวิธี เช่นเดียวกับ Potchanasin *et al.*, (2009) ที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณ Z/ZR ในเนื้อเยื่อตายอดและตาข้างของต้นลำไยที่เพิ่มขึ้นหลังราดสารโพแทสเซียมคลอเรตแล้ว 8 วัน

จากผลการทดลองของต้นที่ราดสารโพแทสเซียมคลอเรต พบปริมาณฮอร์โมน ZR มากในตัวอย่างรากและ xylem sap แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ราดสารอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9-10 และภาพที่ 23-24) แสดงให้เห็นว่าสารโพแทสเซียมคลอเรตมีผลต่อการผลิต ZR ของต้นลำไย ปัจจุบันแม้เป็นที่ยอมรับแล้วว่า สารโพแทสเซียมคลอเรตมีคุณสมบัติกระตุ้นการออกดอกของต้นลำไยได้ แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Sringarm *et al.*, 2009; Potchanasin *et al.*, 2009; Manochai *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามเชื่อว่าสารโพแทสเซียมคลอเรตอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนสมดุลฮอร์โมนภายในต้นพืช (hormonal balance) (ธนะชัย, 2542) กล่าวคือ พบการเปลี่ยนแปลงของต้นลำไยภายหลังการได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรตเพื่อการกระตุ้นให้เกิดการออกดอก โดยมีไซโตไคนินและเอทธิลีนภายในต้นลำไยสูงขึ้น ขณะที่ปริมาณจิบเบอเรลลินและ ออกซินจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Hegele *et al.*, (2004) ที่พบปริมาณไซโตไคนินเพิ่มขึ้นหลังการราดสารโพแทสเซียมคลอเรต ซึ่งปริมาณไซโตไคนินที่เพิ่มขึ้นจะเป็นตัวบ่งชี้หรือสัญญาณถึงการออกดอกของลำไย

จากผลการทดลองที่ตรวจพบว่า ปริมาณ ZR ในรากและ xylem sap มีปริมาณสูง ส่วนหนึ่งอาจมาจากการกระบวนการสังเคราะห์และการเคลื่อนย้ายของไซโตไคนิน แหล่งที่สังเคราะห์ไซโตไคนินที่สำคัญ คือ ราก โดยเฉพาะปลายราก และใน xylem sap ของราก ซึ่งจากการทดสอบโดยตัดใบจากพืชหลายชนิดนำไปเพาะในกระบะทรายเพื่อให้เกิดรากฝอยที่ตรงส่วนของฐานใบ พบว่าหากใบไม่เกิดรากหรือตัดรากทิ้ง ใบจะเกิดการแก่ชราอย่างรวดเร็ว ซึ่งการชะลอการแก่ชราของใบนั้นถูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กำหนดโดยไซโตไคนิน ที่สังเคราะห์จากราก และเคลื่อนย้ายไปยังใบโดยผ่านทางเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (Hopkins and Huner, 2004) สอดคล้องกับรายงานของ Neuman *et al.*, (1990) ที่พบว่าระบบรากเป็นส่วนสำคัญในการส่งไซโตไคนินไปยังใบ และช่วยป้องกันการเสื่อมสลายของใบก่อนระยะอันสมควร เป็นหลักฐานสำคัญที่ชี้ให้เห็นว่าไซโตไคนินมีการเคลื่อนที่ขึ้นสู่ยอด นอกจากนั้นยังพบไซโตไคนินในท่อน้ำ ซึ่งมาจากระบบรากด้วย รวมถึงงานวิจัยของ Menzel and Waite, 2005 ; Liang *et al.*, 1983 ที่พบหลักฐานเกี่ยวกับหน้าที่ของไซโตไคนิน โดยวิธี bioassay พบว่ามีไซโตไคนินมากในตาของลิ้นจี่และในท่อลำเลียงน้ำ สอดคล้องกับรายงานของ Lejeune *et al.*, (1994) ที่พบว่า ไซโตไคนินชนิด tZ-type (Zeatin/Zeatin Riboside, Z/ZR) จะถูกสะสมอยู่ในท่อน้ำ (xylem sap) และไซโตไคนินชนิด iP-type (N^6-(Δ^2-Isopentenyl) adenosine/ N^6-(Δ^2-Isopentenyl) adenine, iPA/iP) จะถูกสะสมอยู่ที่ท่ออาหาร (phloem)

นอกจากผลการทดลองข้างต้น ที่พบว่า ต้นที่ราดสารโพแทสเซียมคลอเรต มีปริมาณฮอร์โมน ZR ในตัวอย่างรากและ xylem sap แตกต่างจากต้นที่ไม่ได้ราดสารอย่างมีนัยสำคัญแล้ว ยังพบว่า ปริมาณ ZR ในใบ ของทั้งสองกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 25) อาจเป็นผลเนื่องมาจาก ZR ที่ลำเลียงขึ้นมาจากส่วนของรากนั้น ถูกเปลี่ยนเป็น *trans*-Zeatin (Sakakibara, 2006) ทำให้การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ ZR ที่ผลิตขึ้นได้ ตรวจวัดได้ไม่ชัดเจน เพราะโมโนโคลนอลแอนติบอดี ZR ดังกล่าวมี ค่า % Cross reaction ต่อ *trans*-Zeatin ถึง 56.97 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved