บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 สัตว์ทดลอง

หนูไมซ์สายพันธุ์ Balb/C เพศผู้หรือเพศเมียอายุ 6-8 สัปดาห์

1.1.2 สารชีวภาพ

เซลล์มะเร็งตับ (Hepatoma) ได้แก่ เซลล์ HepG-2 เป็นผลิตภัณฑ์ของ ATCC (American Type Culture Collection)และเซลล์ S102 ซึ่งผลิตจากผู้ป่วยมะเร็งตับคนไทย (Laohathai and Bhamarapravati ,1985)

เซลล์ไมอิโลมา (myeloma) ได้แก่ PBNSI/1- A4-1 (non secreting clone P3x63Ag)เป็นผลิตภัณฑ์ของ ATCC

เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma)เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละโคลน ได้จาก ผศ.พญ.กิ่งกาญจน์ เลาหทัย

1.1.3 อาหารเลี้ยงเซลล์

RPMI-1640 Medium เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Seromed

Fetal Calf Serum เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Seromed

1.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โซเดียมไบคาร์บอเนต	Sigma Chemical
แอลกลูตามีน	Sigma Chemical
เสตรปโตไมซิน	องค์การเภสัชกรรม
เพนนิสซิลลินวี	องค์การเภสัชกรรม
กรดไพรูวิค	Sigma Chemical
กลูโคส	Sigma Chemical
ฟอร์มาลิน	Sigma Chemical
ไทเมอโรซอล	Sigma Chemical
พริสเทน	Sigma Chemical
เบนซามิดีน	Sigma Chemical
กรดเอฟซีลอนอะมิโนคาร์โปอิค	Serva
ฟีนิลเมทธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์	Serva
กรดซัลฟูริค	Millinchrodt Chemicals
Protein A Sepharose	Pharmasia
แอมโมเนียมซัลเฟต	Sigma Chemical
เปอร์ออกซิเดสแรทแอนติเมาส์ อิมมูโนโกลบลูลินจี	Zymed
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	Fluka Chemie
โบไวน์อัลบูมิน	Sigma Chemical
สับสเตรท OPD	Sigma Chemical

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	Sigma Chemical
คลอรามีน-ที	Sigma Chemical
โซเดียมไอโอไดด์-125	Australian Radioisotope
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์	Sigma Chemical
โปแตสเซียมไอโอไดด์	Carloerba
คอลัมน์พีดี-10	Pharmasia
ไดคลอโรมีเทน	Sigma Chemical

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Yamato ,Japan

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sanyo ,Japan

เครื่องเซนตริฟิวต์แบบปรับอุณหภูมิ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Kubota,Japan

เครื่องผสม เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sicentific Industrials,USA

ถังLiquid N_2 Refrigerator เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Union Carbide corporation ,USA

เครื่อง Geiger Muller Counterเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Nuclear -Chicago, USA

เครื่องนับวัดรังสีแกมมา เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Packard Instrument, USA

เครื่องอ่าน ELISA เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Labsystems, Finland

เครื่องElectrophoresis Instrument เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท EC Apparatus Co.st.Peterburg, USA

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96หลุม เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท NUNC,Denmark

ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Nunc, Denmark

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมแอนติเจน

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG-2และS102 ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 มิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก n) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่มีซีรัมลูกวัวอ่อนร้อยละ 5 จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวไปเก็บในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบรรยากาศภายในตู้มีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนขึ้นจนกระทั่งเกาะเต็มพื้นขวด (จำนวนเซลล์ประมาณ 10^6เซลล์) ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 10 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อีกหนึ่งคืน วันต่อมาถ่ายเซลล์ที่ได้ลงเลี้ยงต่อในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยใช้ปิเปตดูดอาหารเก่าทิ้ง เติมอาหารใหม่ลงไป 20 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ไม้ขูดเซลล์ค่อยๆขูดเซลล์ออกจากพื้นขวดจนหมด และใช้พลาสเจอร์ปิเปตเป่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วกัน ใช้ปิเปตขนาด20มิลลิลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมลูกวัวอ่อนร้อยละ5 หยดลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 2 หยดต่อหลุม จากนั้นดูดเซลล์จากขวดเพาะเลี้ยงหยดตามลงไป 2 หยดต่อหลุมเช่นกัน นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นประมาณ 2-3วัน หรือเมื่อเซลล์มะเร็งตับเจริญเกาะเต็มพื้นหลุมทุกหลุม(จะมีเซลล์ประมาณ $2.0-2.5\times10^4$ เซลล์ต่อหลุม)ตรึงเซลล์เพื่อรักษาสภาพของแอนติเจนบนผิวเซลล์ด้วยการเติมฟอร์มาลินร้อยละ 2 ปริมาณ 250ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 เก็บรักษาด้วยการเติม 0.01โมลาร์ ไทเมอโรซอล ใน 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะนำเซลล์ที่เตรียมได้มาใช้ในการทำปฏิกิริยาทาง

อิมมูโน ให้กำจัด non specific protein binding site ของเซลล์ ด้วยการเติมสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน(BSA)ร้อยละ 0.5 จำนวน 250 ไมโครลิตรต่อหลุม นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวไปเก็บในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง จึงนำมาใช้ในการทำการทดลองต่อไป

2.2 การเตรียมแอนติบอดี

2.2.1 การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีในน้ำในช่องท้องหนู ด้วยวิธีของ Alan and Robin(1987)

โดยก่อนนำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี ที่ต้องการไปฉีดหนู ต้องฉีดพรีสเทนปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้องของหนู เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันของหนูเกิดการตอบสนอง โดยมีการหลั่งสารและชักนำให้เม็ดเลือดขาวชนิดลิมม์โฟไซส์และโมโนไซส์เข้ามาอยู่ในช่องท้องหนู ทำให้สภาพในช่องท้องหนูเหมาะแก่การเจริญของเซลล์ไฮบริโดมา

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด25มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์(ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก) ที่มีซีรัมลูกวัวอ่อนร้อยละ 5 จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบรรยากาศภายในตู้มีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อเซลล์เจริญเพิ่มจำนวนขึ้นจนลอยเต็มขวดประมาณ10^6เซลล์ (เซลล์ไฮบริโดมาจะลอยอยู่บนอาหารเลี้ยงเซล แต่เซลมะเร็งตับจะเกาะที่พื้นขวด) ถ่ายเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ข้างต้นใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ที่สะอาดปราศจากเชื้อ นำไปปั่นล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากปั่นล้างครั้งสุดท้ายแล้ว ดูดส่วนของเหลวออกให้มากที่สุดจนเหลือแต่เซลล์ที่ก้นหลอด เจือจางเซลล์ไฮบริโดมา ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่

มีซีรัม ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูที่เตรียมไว้ข้างต้น หลังจากนั้นประมาณ 7-21 วัน ท้องของหนูจะมีขนาดโตขึ้น ใช้หัวเข็มขนาด 25G แทงเข้าทางช่องท้อง ค่อย ๆดูดน้ำจากช่องท้องหนูออกมาเก็บใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์และไขมันออก ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำมาเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสในอัตราส่วน 1:100 เพื่อลบล้างฤทธิ์ของเอนไซม์โปรตีเอสซึ่งสามารถทำลายแอนติบอดีได้ แบ่งเก็บในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดละประมาณ 1 มิลลิลิตร

2.2.2 <u>การตกตะกอนโปรตีนในน้ำในช่องท้องหนูด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50</u>

โดยนำน้ำในช่องท้องหนูที่เก็บได้ปริมาณ 1มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวก์แช่ในถังน้ำแข็ง จากนั้นค่อยๆ หยดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ลงไปปริมาณ 1 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าไปด้วย นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30นาที จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้งไป นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยการเติม 1 มิลลิลิตร สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้ง ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนมาละลายด้วย 1มิลลิลิตร 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 นำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลส์ใน 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศา เพื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาต่อไป

2.2.3 <u>การวัดปริมาณอิมมูโนโกลบลูลินจี (IgG) ในน้ำในช่องท้องหนูหลังตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50</u> ด้วยวิธีของAlan and Robin(1987)

โดยนำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการที่ตกตะกอนน้ำในช่องท้องหนูด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากขั้นตอนที่ 2.2.2 มาเจือจางด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ โดยใช้สารละลายโปรตีน 40 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 ปริมาณ 360 ไมโครลิตร ได้สารเจือจาง 1:10 เท่า นำสารละลายเจือจาง 1:10เท่าที่ได้มา 100ไมโครลิตร เติม 100ไมโครลิตร 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ได้สารละลายเจือจางลงเป็น 1:20 เท่า จากนั้นนำสารละลายเจือจางทั้งสองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้สามารถนำมาคำนวณหาปริมาณ IgG โดย

ปริมาณ IgG = $\frac{\text{ค่า OD280 x 10}}{13.6}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4 <u>การแยก IgG_{2a} จากน้ำในช่องท้องหนูโดยวิธี protein A affinity chromatography</u> ด้วยวิธีของ Alan and Robin(1987)

2.2.4.1 <u>การเตรียมโครมาโตกราฟีคอลัมน์</u>

แช่ protein A sepharose 1.5 กรัม ใน 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1ชั่วโมง ใส่ลงในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย 0.1โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 3 ก่อนนำมาใช้

2.2.4.2 <u>การเตรียมน้ำในช่องท้องหนูที่จะทำการแยก</u>

นำน้ำในช่องท้องหนูมา 3 มิลลิลิตร เติม 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.1 ด้วย 1.0 โมลาร์

Tris-HCl pH 9

2.2.4.3 <u>การแยกอิมมูโนโกลบลูลินจี</u>

ล้างคอลัมน์ที่เตรียมจากขั้นที่ 2.2.4.1ด้วย 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ประมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่น้ำในช่องท้องหนูที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.4.2 ทั้งหมด ลงในคอลัมน์ที่ เตรียมไว้ในข้อ 2.2.4.1 ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร(อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที) เพื่อชะโปรตีนที่ไม่จับกับ protein A-sepharose ออกจากนั้นชะ IgG_1ออกด้วย 0.1โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาณ 30มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาณ 30มิลลิลิตร จากนั้นชะ IgG_{2a} ออกด้วย 0.1 โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.5 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร การเก็บต้องเก็บในหลอดที่มี 1.0 โมลาร์ Tris-HCl pH 8.5 ปริมาณ 200ไมโครลิตรต่อหลอด จากนั้นชะ IgG_{2b} ออกด้วย 0.1โมลาร์ ซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 3.5 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มี Tris-HCl เช่นเดียวกับ IgG_{2a} ปรับคอลัมน์ให้มี pH 8.0 ด้วย 0.1โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำอิมมูโนโกลบลูลินแต่ละส่วนที่แยกได้มาไดอะไลส์ใน0.01โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทำ protein A affinity Chromatography จะได้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์ขึ้น เพื่อนำไปใช้ติดฉลากสารรังสี เนื่องจากให้ผลทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับได้ดีกว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

2.3 <u>หาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับจำนวนคงที่ ด้วยวิธี ELISA</u>

เพื่อนำปริมาณที่หาได้ไปใช้ในการทำ inhibition binding assay โดยนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่เตรียมจากข้อ 2.2.2 และน้ำในช่องท้องหนูที่ใช้เซลล์ NS1เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน(สารควบคุมในทางลบ:Negative control และ โมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 เป็นสารควบคุมทางบวก : positive control ตลอดการทำวิจัย) มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้ได้ความเข้มข้น 50,100,150,200,250,300,350,400,450,500,550 นาโนกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ได้ มาเติมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.1ชนิดละ 100ไมโครลิตรต่อหลุม(ทำ 3ซ้ำ) นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวไปเก็บไว้ที่ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ครั้ง จากนั้นเติมrat antimouse peroxidase IgG_{2a} (ความเข้มข้นเดิม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5ให้ เป็น1:1000 เท่า) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปเก็บในตู้อบอีก 2ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 3 ครั้งและเติมสับเสตรท OPD ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2.5โมลาร์ กรดซัลฟูริค ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่าน ELISA

2.4 การติดฉลากไอโอดีน-125 บนโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธีคลอรามีนที ด้วยวิธีของ Alan and Robin(1987)

เติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีจากขั้นตอนที่ 2.2.4 จำนวน 30 ไมโครกรัม และ 2 ไมโครลิตร 0.5 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ดังกล่าวมาเติม สารละลายโซเดียมไอโอไดด์-125 จำนวน 200 ไมโครคิวรี และสารละลายคลอรามีนที 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 100 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้มาแยกไอโอไดด์อิสระออกด้วยคอลัมน์พีดี-10 อัตราเร็วในการไหลของบัฟเฟอร์ 1มิลลิลิตรต่อนาที เก็บหลอดละ 1มิลลิลิตร จำนวน 20 หลอด นำส่วนผสมที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลาก ด้วยวิธีเปเปอร์อิเลคโตรโฟลิซิส

วิธีหาร้อยละความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากหลังจากแยกไอโอไดด์อิสระด้วยคอลัมน์พีดี-10 โดยวิธีเปเปอร์อิเลคโตรโฟลิซิส

ใช้กระดาษ whatman No.1 ขนาด 4x20 เซนติเมตร และสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนตเป็นสารละลายอิเลคโตรไลท์ หยดสารละลายของสารประกอบที่ติดฉลากแล้ว 10ไมโครลิตร ลงบนกระดาษจากกึ่งกลาง 9 เซนติเมตรทางขั้วลบ เปิดสวิทช์ของเครื่องมือ ปรับความต่างศักย์ให้มีค่า 240 โวลท์(16 โวลท์ต่อเซนติเมตร) แล้วปรับทิศทางการเคลื่อนที่ของอิออนให้เคลื่อนเข้าหาขั้วบวก เมื่อทำการแยกครบ 1 ชั่วโมง นำกระดาษออกทำให้แห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดความแรงรังสีที่ทุก 2 เซนติเมตรของกระดาษ

2.5 <u>การทดสอบการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ (เซลล์ S102)</u>

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากส่วนที่ตรวจสอบจากวิธีเปเปอร์อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่ามีเปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์สูงมาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้มีความแรงรังสีต่างๆกัน เติมแต่ละความเจือจางลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.1และตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง 3 ครั้ง ด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และนำไปวัดค่าความแรงรังสี(จำนวนนับวัดต่อนาที ,count per minute,CPM) ด้วยเครื่องนับวัดรังสีแกมมา

2.6 <u>การหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในแง่ของการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ(เซลล์S102)</u>

2.6.1 โดยใช้หลักปฏิกิริยายับยั้ง (inhibition binding assay)

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ไม่ติดฉลากสารรังสี (cold MAb) ที่เตรียมจากขั้นที่ 2.2.2 แต่ละชนิดมาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่หาได้จากการทำ ELISA ในขั้นตอนที่ 2.3 เติมสารละลายเจือจางที่ได้ของ cold MAb แต่ละชนิดจำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ S102 ดังกล่าวตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงและนำมาล้าง3 ครั้งด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4

นำโมโนโคลนัลแอนติบอดี 27 ,54 และ 43 ที่ติดฉลากสารรังสีแล้ว(hot MAb) จากขั้นตอนที่ 2.4.2 มาเจือจางด้วยโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้ได้ความแรงรังสีประมาณ $4x10^4$ จำนวนนับวัดต่อนาทีต่อ 100 ไมโครลิตร (มีจำนวน

โมโนโคลนัลแอนติบอดี 5 นาโนกรัม) เติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เจือจางแล้วลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ S102 จากข้างต้น ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 และนำไปวัดค่าความแรงรังสี

2.6.2 โดยใช้หลักปฏิกิริยาการแย่งจับ (competitive binding assay) ด้วยวิธีของ Ohuchi และคณะ (1987)

นำ cold MAb ที่เตรียมจากขั้นที่ 2.2.2 แต่ละชนิดมาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้ได้ความเข้มข้นเป็นสองเท่าของความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่หาได้จากการทำ ELISA ในขั้นตอนที่ 2.3

นำ hot MAb 27,54 และ 43 จากขั้นตอนที่ 2.4.2 มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5ให้ได้ความแรงรังสีประมาณ $4x10^4$จำนวนนับวัดต่อนาทีต่อ 50 ไมโครลิตร ทำการผสม cold MAb และ hot MAb แต่ละชนิดในปริมาณที่เท่ากัน เติมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ S102 ที่เตรียมจากขั้นที่ 1 จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง16-18 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และนำไปวัดค่าความแรงรังสีด้วยเครื่องนับวัดรังสีแกมมา

2.7 <u>หาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับ (เซลล์ S102 และ เซลล์ HepG-2)จำนวนคงที่</u>

เพื่อนำปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนการผสมโมโนโคลนัลแอนติบอดี

โดยนำhot MAb 27,54 และ43 จากขั้นที่ 2.4.2 มาเจือจางด้วยโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้ได้ความแรงรังสีประมาณ $4x10^4$ จำนวนนับวัดต่อนาที

ต่อ 50ไมโครลิตร

นำ cold MAb 27,54 และ 43 จากขั้นที่ 2.2.4 มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้มีความเข้มข้นเป็น 25,50,75,100,150, 200,250,300และ350 นาโนกรัมต่อ 50ไมโครลิตร

ผสม cold MAbแต่ละความเจือจาง กับ hot MAbชนิดเดียวกัน ในปริมาณที่เท่ากัน เติมลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์S102 และHepG-2 ปริมาณ 100ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ25องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวมาล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และนำไปวัดค่าความแรงรังสีด้วยเครื่องนับวัดรังสีแกมมา

2.8 <u>ทำการผสมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จับกับเอพิโทปต่างกันบนเซลล์มะเร็งตับ</u>

นำhot MAb 27,54และ43 มาเจือจางด้วยสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมินร้อยละ 0.5 ให้มีความแรงรังสีเป็น $4x10^4$ จำนวนนับวัดต่อนาทีต่อ 50 ไมโครลิตร ผสมกับcold MAb ปริมาณเหมาะสมตามที่หาได้จากขั้นที่ 2.7 จากนั้นนำโมโนโคลนัลแอนติบกดีแต่ละโคลนมาผสมในปริมาณที่เท่ากัน โดยผสมทีละ 2 และ 3 โคลน เติมโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม (cocktail of MAbs) ที่ได้แต่ละกลุ่มลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ S102 และHepG-2(เตรียมจากขั้นที่ 1) ปริมาณ 100ไมโครลิตรต่อหลุม สำหรับโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม 2 กลุ่ม และ ปริมาณ 150 ไมโครลิตรต่อหลุม สำหรับโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม 3 กลุ่ม และต้องมีหลุมที่เติมเฉพาะโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยว(single of MAb) แต่ละโคลนด้วย นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้าง 3 ครั้งด้วย 0.01โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ pH 7.4 และนำไปวัดค่าความแรงรังสีด้วยเครื่องนับวัดรังสีแกมมา