การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

นางสาว สุปรีชา ฉัตรทอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4035-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONALANTIBODIES AGAINST PROGESTERONE

MIiss Supreecha Chattong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements

For the Degree of Master of Science

Program in Biotechnology Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-4035-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน
โดย	นางสาวสุปรีชา ฉัตรทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงษ์ วิทิตศานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นางทรงจันทร์ ภู่ทอง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุปรีชา ฉัตรทอง : การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROGESTERONE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, ทรงจันทร์ ภู่ทอง, 101 หน้า. ISBN 974-17-4035-2.

โพรเจสเทอโรนเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์ มีน้ำหนักโมเลกุล 314 ดาลตัน ฮอร์โมนนี้ถูกสร้างและหลั่งออกมาสู่น้ำนม และกระแสเลือด ในวงรอบการเป็นสัดและในขณะตั้งท้องของโคนม โดยระดับโพรเจสเทอโรนจะสูงสุดประมาณวันที่ 21 และ 22 ของการตั้งครรภ์ ดังนั้นในการหาระยะเวลาเป็นสัดของโคนมเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้อง และการตรวจสอบการตั้งครรภ์สามารถทำได้โดยการวัดระดับโพรเจสเทอโรน

ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน สำหรับนำไปผลิตเป็นชุดตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรน ในการเตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนนั้น ได้ทำการหลอมรวมเซลล์ทั้งหมด 4 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน จำนวน 12 โคลน คือโคลนรหัส 2/A3-F1, 3/F7-F1, 1/10B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7/F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4 จากการศึกษาสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4 และ5/H8-F4 มีไอโซไทป์เป็น IgG1 รหัส 3/D7-F4 และ 5/G7/F4 มีไอโซไทป์เป็น IgG2a รหัส 2/A3-F1, 3/F7-F1 และ 1/10B10-F4 มีไอโซไทป์เป็น IgG3 รหัส 3/E4-F4 และ 5/H2-F4 มี ไอโซไทป์เป็น IgG2b และ IgM ตามลำดับ เมื่อทดสอบความจำเพาะในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 2/A3-F1 และ 3/F7-F1 ไม่มีความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหลืออื่น ๆ อีก 10 โคลน มีความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 2 - 361 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.03 – 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ไปทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ พบว่าโมโนโคลน 3/D7-F4, 3/E4-F4 ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ต่ำกว่า 0.01 เปอร์เซนต์

สาขา....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา.....2548.....

ลายมือชื่อนิสิต.....สุปรีชา ฉัตรทอง.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672457723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : PROGESTERONE / ELISA / MONOCLONAL ANTIBODY

SUPREECHA CHATTONG : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST PROGESTERONE. THESIS ADVISOR : KITTINAN KOMOLPIS, Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSIST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph. D. AND SONGCHAN PUTHONG, M.Sc., 101 pp. ISBN 974-17-4035-2.

Progesterone is a steroid hormone with a molecular weight of 314 daltons and is secreted in milk and blood during estrus and pregnancy in cattle. The progesterone level reaches its peak on the 21st and 22nd day of pregnancy. Therefore, the level of progesterone is routinely used to predict the date of fertilization and pregnancy.

The purpose of this this researchis to produce monoclonal antibodies against progesterone for test kit development. To produce hybridoma cells which can secrete monoclonal antibodies specific for progesterone, four somatic fusions were carried out, yielding twelve monoclones named 2/A3-F1, 3/F7-F1, 1/10B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7/F4, 5/H2-F4 and 5/H8-F4. The properties of all monoclonal antibodies were characterized. The isotypes of each monoclonal antibodies were determined as follows; 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4 and 5/H8-F4 are IgG1, 3/D7-F4 and 5/G7/F4 are IgG2a, 3/F7-F1 and 1/10B10-F4 are IgG3; 3/E4-F4 and 5/H2-F4 is IgG2b and IgM respectively. The two antibodies, 2/A3-F1 and 3/F7-F1, are nonspecific for progesterone in a free form, but the rest of antibodies are specific for progesterone in a free form with the IC50 value in the range of 2 - 361 ng/ml and the LOD value in the range of 0.03 - 80 ng/ml. The cross reactivity of 3/D7-F4 and 3/E4-F4 with other steroid hormones and antibiotics is less than 0.01%.

Department...Biotechnology...
Field of study...Biotechnology...
Academic year...2005.....

Student's signature Supreecha Chattong
Advisor's signature K. Komolpis
Co-advisor's signature Tanapat Palaga
Co-advisor's signature Songchan Puthong

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ และ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.นันทิกา ปานจันทร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งเขียนวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และ บัณฑิตวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมืออุปกรณ์ และเงินทุนในการวิจัย

ขอขอบคุณอณุมาศ บัวเขียว เพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือทุกเรื่องตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนทำให้การทดลองสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ที่สำคัญที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ น้า และ พี่สาว ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาตลอด และให้ความรัก ความห่วงใยและกำลังใจ มาตั้งแต่เกิดจนถึงปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญรูป.....ฑ

คำย่อและสัญลักษณ์.....ฒ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....2

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....3

2.1.1 กระบวนการสืบพันธุ์ในโค.....3

2.1.2 การแบ่งวงรอบการเป็นสัดโดยอาศัยอาการที่เปลี่ยนแปลงของโค.....4

2.1.3 การทำงานของฮอร์โมนที่ควบคุมการเป็นสัดและการตกไข่.....5

2.1.4 การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในระยะวงรอบการเป็นสัด.....8

2.1.5 แอนติเจน.....18

2.1.6 อิมมูโนเจน.....18

2.1.7 แฮปเทน.....19

2.1.8 แอนติบอดี.....19

2.1.9 เทคนิคไฮบริโดมา.....23

บทที่ หน้า

2.2 การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน.....25

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....27

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....27

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....28

3.3 ขั้นตอนการวิจัย.....32

4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย.....45

4.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน โดยวิธี BCA assay.....45

4.2 ผลการหาเปอร์เซ็นต์การจับของโพรเจสเทอโรนต่อ BSA โดยวิธี TNBS.....46

4.3 ผลการหาปริมาณโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับโปรตีนBSA โดยใช้ชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica.....47

4.4 ผลการตรวจหาปริมาณแอนติบอดีในซีรัมหนูโดยการทำ Indirect ELISA.....49

4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยการทำ competitive indirect ELISA.....51

4.6 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์มัยอีโลมา.....52

4.7 ผลการหาระดับการเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสม.....55

4.8 ผลการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือก.....58

4.8.1 ผลการหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....58

4.8.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ.....59

4.8.3 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรเจสเทอโรน.....66

4.8.4 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์.....73

4.8.5 ผลการทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน.....75

บทที่ หน้า

4.9 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์....76
5 สรุปผลการวิจัย....78
รายการอ้างอิง....80
ภาคผนวก....84
ภาคผนวก ก....85
ภาคผนวก ข....95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์....101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....28

4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนที่อัตราการเจือจางต่าง ๆ และปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้.....46

4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีน BSA ในรูปอิสระ และสารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ เปอร์เซ็นต์การจับระหว่างโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน.....47

4.3 ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่หาได้จากชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica.....48

4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการทำ indirect ELISA ของแอนติบอดีในซีรัมหนู 50

4.5 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี ของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4.....51

4.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของแอนติบอดีในซีรัมหนู.....52

4.7 อัตราส่วนเซลล์ไฮบริโดมาและหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรองภายหลังการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 4 ครั้ง.....54

4.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect ELISA ของอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาคัดเลือกแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน.....55

4.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect ELISA ของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ความเจือจางต่าง ๆ.....57

4.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากชุดทดสอบ Isotyping kit ของ บริษัท Sigma.....59

ตารางที่ หน้า

4.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....61
4.12 ค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน.....66
4.13 ค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ คอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และ เทสโทสเทอโรน.....72
4.14 เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อ คอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน.....73
4.15 ค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ เพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล.....74
4.16 เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อเพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล.....75
4.17 ค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนต่อโพรเจสเทอโรน.....76
4.18 เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อเพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล.....75
4.19 ค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนต่อโพรเจสเทอโรน.....76
ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 1/B10-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....85
ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 2/A3 -F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....86

ตารางที่ หน้า

ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/C9 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....87
ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/D -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....88
ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/E4 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....89
ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/F7 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....90
ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 4/E11 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....91
ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5/G7 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....92
ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5/H2 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....93

ตารางที่ หน้า

ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ
competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5/H8 -F4
ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน,
โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....94

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ฮอร์โมนจากสมองส่วนไฮโพทาลามัส (hypothalamus) และต่อมใต้สมอง (pituitary) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัดของโค	7
2.2	ระดับโพรเจสเทอโรน (progesterone) และเอสโทรเจน (estrogen) ในรอบวงจรสัด(estrus cycle)	7
2.3	สูตรโครงสร้างของเอสโทรน, 17แอลฟา – เอสทราไดออล และ17บีตา – เอสทราไดออล 10	9
2.4	สูตรโครงสร้างของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน	10
2.5	ลำดับขั้นการสังเคราะห์โพรเจสเทอโรน	12
2.6	แสดงลำดับขั้นกระบวนการเมแทบอลิซึมของเพรกโนโลน และ โพรเจสเทอโรนในโค	14
2.7	ระดับโพรเจสเทโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโครระหว่างรอบวงจรสัด	16
2.8	ระดับโพรเจสเทโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโคขณะตั้งท้อง	17
2.9	โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบุลิน	20
4.1	กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA	45
4.2	กราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรนโดยชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica	48
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %B/B_0 และความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4	62
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %B/B_0 และความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟา ไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน	67
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และสารละลายแต่ละลำดับส่วนที่ชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ	77

คำย่อและสัญลักษณ์

BCA assay	bicinchoninic acid assay
BSA	bovine serum albumin
CFA	complete Freund's adjuvant
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
HAT	aminopiter, hypoxanthine และ thymidine
HRP	horseradise peroxidase
HT	hypoxanthine และ thymidine
ICFA	incomplete Freund's adjuvant
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%
LOD	limit of detection
M	molar
N	normal
Nm.	nanometer
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
OPD	O-phenylenediamine
PBS	phosphate buffer saline
P3cmo	progesterone-3-(*O*-carboxymethyl)oxime
PEG	polyethylene glycol
rpm	round per minute
SDS	sodium dodesyl sulfate
TNBS	trinitrobenzene sulfonic acid
v	volume
w	weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาชีพการเลี้ยงวัวนมเป็นอาชีพที่สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรไทย ในปีพ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีการผลิตนมพร้อมดื่มจำนวน 1,213,423 ตัน ขณะที่เกษตรกรผลิตน้ำนมดิบได้เพียง 494,692 ตัน ซึ่งคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการของความต้องการน้ำนมดิบทั้งประเทศ (วิโรจน์, 2546) ปัญหาสำคัญของเกษตรกรที่เลี้ยงโคนม คือ ขาดการจัดการด้านการขยายพันธุ์ของโคที่ดีทำให้การผสมพันธุ์ผิดพลาดทำให้แม่โคท้องว่าง การให้นมก็จะเลื่อนกำหนดออกไปด้วย ในการหาระยะเวลาเป็นสัดของโคเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้อง และการตรวจสอบการตั้งครรภ์จึงจำเป็นมากสำหรับการจัดการด้านการสืบพันธุ์ (ม.ร.ว. ชวนิศนดากร, 2530)

การตรวจสอบการเป็นสัดและการตั้งครรภ์สามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (progesterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สร้างจากคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ตามขั้นตอนต่อไปนี้ ภายในรังไข่จะมีไข่จำนวนมากฝังตัวอยู่ภายในเป็นกลุ่ม ๆ ต่อมากลุ่มเซลล์ที่ล้อมไข่ จะเจริญเติบโตเป็นฟองไข่ (follicle) เมื่อไข่โตเต็มที่ฟองไข่จะแตก ปล่อยไข่ออกจากรังไข่ เรียกว่าการตกไข่ (ovulation) แล้วเซลล์ของฟองไข่รอบ ๆ จะสร้างคอร์ปัสลูเทียม มีลักษณะเป็นแผ่นซึ่งจะขยายตัวขึ้น และผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนเข้าสู่กระแสเลือดและน้ำนม หากเกิดการตั้งครรภ์ฮอร์โมนนี้จะยังคงถูกสร้างอย่างต่อเนื่องเพื่อป้องกันไข่ใบอื่นที่ตามมาแก่และสุกขึ้น หากไม่เกิดการตั้งครรภ์คอร์ปัสลูเทียมจะสลายไป และรังไข่จะผลิตไข่ใบใหม่ขึ้นมา วงรอบการเป็นสัด 1 รอบมีเวลาประมาณ 21 วัน โดยระดับของโพรเจสเทอโรนในกระแสเลือดและน้ำนมจะสูงในวันที่ 17 หรือ 18 ของวงรอบการเป็นสัด หากตั้งครรภ์ระดับโพรเจสเทอโรนจะยังคงสูงอยู่ แต่หากไม่มีการตั้งครรภ์ ระดับโพรเจสเทอโรนจะลดลง ดังนั้นการวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจึงเป็นวิธีที่นำมาใช้ เพื่อหาระยะเวลาเป็นสัดของโคทำให้สามารถกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้อง และตรวจสอบการตั้งครรภ์ของโคได้ ซึ่งการวัดระดับโพรเจสเทอโรนที่นิยมทำกัน คือใช้ชุดทดสอบแบบ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศจึงมีราคาแพง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน เพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นชุดทดสอบหาฮอร์โมนนี้ ทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน
2. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

1.4 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1.4.2 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

1.4.3 เตรียมเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความสามารถในการสร้างแอนติบอดี

1.4.4 ทำการแยกเซลล์ให้เป็นโมโนโคลนที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนโดยวิธี limiting dilution

1.4.5 ศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้

1.4.5.1 การทำบริสุทธิ์ และ การทดสอบไอโซไทป์ (isotype)

1.4.5.2 ทดสอบการทำปฏิกิริยาข้าม (cross reactivity)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 กระบวนการสืบพันธุ์ในโค

การสืบพันธุ์ของโคนมเป็นสิ่งสำคัญที่สุดที่จะทำให้โคผลิตน้ำนม โดยการให้นมจะเริ่มต้นตั้งแต่คลอดลูกตัวแรกไปจนกระทั่งลูกโคถึงระยะที่ไม่ต้องการนมจากแม่อีก แม่โคจะหยุดให้นม จนกว่าจะคลอดลูกตัวใหม่จึงให้นมครั้งใหม่เป็นเช่นนี้ไปจนกว่าจะไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ โดยปกติโคนมจะให้ลูกทุก ๆ 12-13 เดือน ระยะเวลาการให้นมจะนานติดต่อกันประมาณ 10-11 เดือน ซึ่งระยะการให้นมและการคลอดลูกจะเป็นไปตามระยะเวลานี้ ต้องมีการผสมพันธุ์ให้แน่นอน ถ้าการผสมพันธุ์ในแต่ละครั้งไม่ได้ผล การให้นมแต่ละครั้งจะเลื่อนกำหนดนานไปด้วย (ม.ร.ว. ชวนิศนดากร, 2530)

ขั้นตอนการสืบพันธุ์ของโคขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งควบคุมการทำงานของฮอร์โมนและระบบประสาท ให้ทำงานสัมพันธ์กัน และควบคุมซึ่งกันและกันภายในร่างกายโค ส่วนปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ เช่น สภาพแวดล้อม, อุณหภูมิ, ความชื้นของอากาศ และการดูแล เป็นต้น โคจัดเป็นพวกแสดงสัดตลอดปี (polyestrus) โคที่มีสุขภาพดี ได้รับอาหารและการเลี้ยงดูอย่างดี จะแสดงอาการเป็นสัดครั้งแรกในช่วงอายุ 7 – 18 เดือน หรือโดยเฉลี่ย 10 เดือน โคสาวเมื่อเป็นสัดครั้งแรกมักไม่แสดงอาการแม้ว่าจะมีการตกไข่ (silent heat) รอบวงจรการเป็นสัดของโคมีระยะโดยเฉลี่ย 18 –22 วัน ดังนั้น การแสดงอาการสัด (estrus หรือ heat) และการตกไข่ คือกระบวนการทางสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย เมื่อมีน้ำหนัก และอายุที่สมบูรณ์ ที่เรียกว่า ความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งพร้อมที่จะได้รับการผสมพันธุ์จากอสุจิของเพศผู้ ฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศเมีย ที่ผลิตจากเซลล์ชั้นทีคา อินเทอร์นา (theca interna) จะมีผลต่อการแสดงอาการสัด และกระตุ้นให้ฮอร์โมน LH (luteinizing hormone) หลั่งออกมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าซึ่งมีผลให้ไข่ตกจากรังไข่ จากนั้นเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) จะเจริญไปเป็นคอร์ปัสลูเทียม ผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน กระตุ้นให้มดลูกเตรียมรับการฝังตัวของตัวอ่อน และช่วยจรรโลงการตั้งท้อง ไข่ที่ตกจะเคลื่อนไปตามท่อรังไข่ และจะได้รับการผสมกับอสุจิบริเวณตอนบนของรังไข่ เรียกว่า การปฏิสนธิ ไข่ที่ได้รับการผสมจะเคลื่อนตัวผ่านลงมาฝัง

ตัว (implantation) อยู่ที่ปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่งจนกระทั่งคลอด หากไข่ไม่ได้รับการผสมกับอสุจิ คอร์ปัสลูเทียมจะสลายตัวไป และรังไข่จะผลิตไข่ใบใหม่ขึ้นมา และเริ่มเข้าสู่รอบการเป็นสัดใหม่ต่อไป (วิโรจน์, 2546)

2.1.2 การแบ่งวงรอบการเป็นสัดโดยอาศัยอาการที่เปลี่ยนแปลงของโค

วงรอบการเป็นสัด (estrus period) เป็นช่วงเวลาของการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายและอารมณ์ทางเพศของสัตว์เพศเมีย ซึ่งถูกควบคุมโดยฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นและหลั่งออกมาอย่างเป็นระบบ การที่โคแสดงอาการสัดแสดงถึงโคอยู่ในระยะที่ร่างกายเจริญเติบโตและพร้อมที่จะรับการผสมพันธุ์และตั้งท้อง (สมชาย, 2541) ระยะต่าง ๆ ในวงรอบการเป็นสัดสามารถอธิบายโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ รวมทั้งพฤติกรรมการแสดงออก เพื่อประโยชน์ในการผสมพันธุ์โดยวงรอบการเป็นสัดของโคโดยเฉลี่ยคือ 18- 21 วัน ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ได้ 4 ระยะ ตามลักษณะภายนอก และภายใน ที่เปลี่ยนแปลงไป (วิโรจน์, 2546)

1. ระยะก่อนเป็นสัด (Proestrus)

เป็นระยะก่อนที่โคจะแสดงอาการเป็นสัด โดยเริ่มประมาณวันที่ 16-18 ของวงรอบการเป็นสัด มีระยะประมาณ 4 – 6 วัน ระยะนี้ไม่มีคอร์ปัสลูเทียม แต่จะมีการเจริญของฟอลลิเคิล โดยการทำงานของฮอร์โมน FSH และ ฮอร์โมน LH ในระยะแรกอาจมีการเจริญของฟอลลิเคิลจำนวนมาก แต่จะมีเพียง 1 – 2 ฟอลลิเคิลเท่านั้นที่จะเจริญต่อไป เป็นฟอลลิเคิลที่แก่เต็มที่ซึ่งพร้อมจะตกไข่ และระดับฮอร์โมนเอสโทรเจนจะเริ่มสูงขึ้น และสูงสุดในระยะนี้

2. ระยะแสดงอาการสัด (Estrus or heat)

ระยะแสดงอาการสัดในโคโดยเฉลี่ยประมาณ 12 - 26 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่โคเพศเมียยอมรับการผสมพันธุ์ ระดับฮอร์โมนต่าง ๆที่เกี่ยวข้องในวงรอบการเป็นสัดจะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะในรอบวงจรสัด ซึ่งมีผลต่อการแสดงอาการสัด และสามารถสังเกตการแสดงออกทางสรีระของโคได้ดังนี้

1. โคจะปีนทับตัวอื่น
2. ยืนสงบนิ่งเมื่อตัวอื่นขึ้นทับ
3. ร้องเรียกหาตัวผู้

4. มีน้ำเมือกใสไหลออกจากช่องคลอด

5. อวัยวะเพศบวมแดง

6. กระสับกระส่ายกระวนกระวายหาตัวผู้

7. ปัสสาวะบ่อย ๆ

หลังจากแสดงอาการสัดประมาณ 10 ชั่วโมง แล้ว โคจะเกิดการตกไข่ และไข่จะมีชีวิตเพื่อรอการผสมประมาณ 24 ชั่วโมง

3. ระยะหลังตกไข่ (Metestrus)

ระยะนี้เป็นระยะที่ต่อจากการตกไข่ มีระยะเวลาประมาณ 2 – 4 วัน ระยะนี้คอร์ปัสลูเทียมซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์แกรนูโลซา เริ่มทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ซึ่งในระยะแรกมีระดับต่ำ ต่อมาคอร์ปัสลูเทียมเจริญเติบโตเต็มที่ ส่งผลให้ระดับโพรเจสเทอโรนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อเตรียมมดลูกให้พร้อมที่จะรับการฝังตัวของรังไข่ ทำให้เซลล์เยื่อบุหนาขึ้น ต่อมต่าง ๆ เริ่มทำงาน และอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการสืบพันธุ์บีบรัดตัวช้าลง ระยะนี้เรียกระยะการทำงานของคอร์ปัสลูเทียม (luteal phase) และระดับเอสโทรเจนลดลงหลังแสดงอาการสัด

4. ไดเอสทรัส (Diestrus)

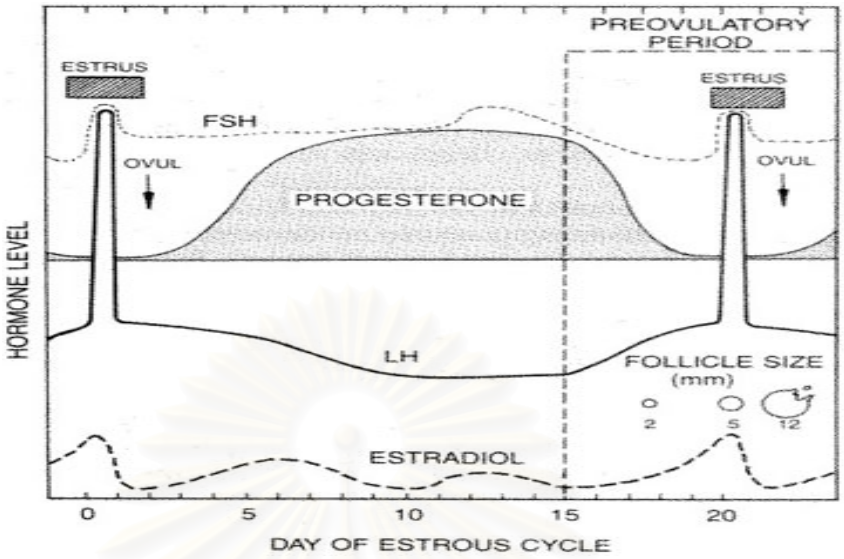
เป็นระยะท้ายของวงรอบการเป็นสัด อยู่ระหว่างระยะหลังแสดงอาการสัดและก่อนเป็นสัด เป็นระยะที่มีเวลายาวนานสุดในวงรอบการเป็นสัด คือมีเวลาประมาณ 10 - 13 วัน ระยะแรกของไดเอสทรัส คอร์ปัสลูเทียมเจริญเต็มที่มีระดับโพรเจสเทอโรนสูงสุด ต่อมาคอร์ปัสลูเทียมเสื่อมสลาย ระดับโพรเจสเทอโรนลดต่ำลงอย่างรวดเร็วประมาณ 16 – 17 วัน หลังแสดงอาการสัด (ม.ร.ว. ชวนิศนดากร, 2530)

2.1.3 การทำงานของฮอร์โมนที่ควบคุมการเป็นสัดและการตกไข่

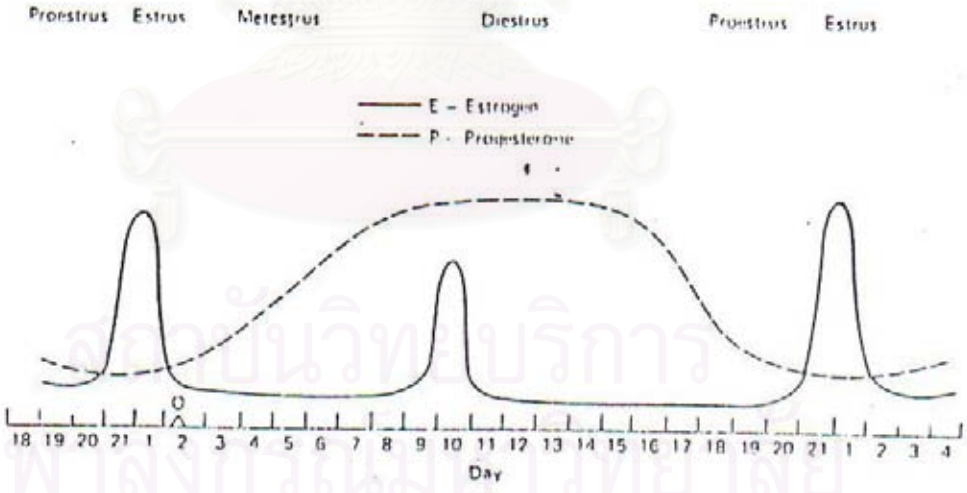
สมองส่วนไฮโพทาลามัส (hypothalamus), ต่อมใต้สมอง (pituitary) และรังไข่ (ovary) ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนเพื่อควบคุมการแสดงอาการสัดและการตกไข่ เมื่อโคสาวเจริญเติบโตเต็มที่ สมองส่วนไฮโพทาลามัสจะพัฒนาอย่างสมบูรณ์ และจะเริ่มทำงานแบบเป็นวงรอบ ดังแสดงในรูป

ที่ 2.1 และ 2.2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงฮอร์โมนที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัดและการตกไข่ โดยสมองส่วนไฮโพทาลามัสจะผลิตฮอร์โมน GH (gonadotropin releasing hormone) ไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ให้ผลิตฮอร์โมน FSH (follicle stimulating hormone) เข้าไปในกระแสเลือด เป็นผลให้รังไข่พัฒนาไข่อ่อน และฟอลลิเคิล ให้โตขึ้นที่พร้อมจะให้ไข่ตก โดยเริ่มจากฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.25 นิ้ว แบ่งตัวเจริญเติบโตเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว ระยะเวลาในการเจริญประมาณ 3 – 5 วัน จากนั้นถุงไข่จะผลิตฮอร์โมนเอสโทรเจนหลั่งเข้าในกระแสเลือดทำให้โคแสดงอาการสัด และเตรียมระบบสืบพันธุ์ให้พร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ และมีผลย้อนไปที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้ากระตุ้นให้หลั่งฮอร์โมน LH สู่กระแสเลือด ซึ่งจะมีผลทำให้ไข่ตกจากรังไข่และเปลี่ยนถุงไข่ที่ตกไข่ออกแล้วให้เป็นคอร์ปัสลูเทียม ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมรโพรเจสเทอโรนซึ่งฮอร์โมนนี้จะไปยับยั้งการผลิตและการหลั่ง ฮอร์โมน FSH ถ้าโคตั้งท้องตัวอ่อนจะฝังตัวที่มดลูกทำให้มดลูกไม่สร้างฮอร์โมนโพรสทาแกลนดิน (prostaglandin) และคอร์ปัสลูเทียมจะยังคงสร้างโพรเจสเทอโรนออกมาอย่างสม่ำเสมอเพื่อพยุงการตั้งท้อง โคจะไม่มีวงรอบการเป็นสัดครั้งใหม่ ถ้าโคไม่ตั้งท้อง มดลูกจะสร้างโพรสทาแกลนดิน หลั่งเข้าในกระแสเลือดประมาณ 17 วันหลังตกไข่ ฮอร์โมนนี้จะมีผลทำให้คอร์ปัสลูเทียมสลายตัว และไม่มีโพรเจสเทอโรนในกระแสเลือด เมื่อระดับของโพรเจสเทอโรนหมดไปต่อมใต้สมองจะเริ่มทำงานในรอบใหม่โดยเริ่มหลั่ง FSH เข้าสู่กระแสเลือดทำให้วงรอบการเป็นสัดครั้งใหม่เริ่มขึ้น (วิโรจน์, 2546)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 ฮอร์โมนจากสมองส่วนไฮโพทาลามัสและต่อมใต้สมอง ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัดของโค (Sorensen, 1979)



รูปที่ 2.2 ระดับโพรเจสเทอโรน (progesterone) และเอสโทรเจน (estrogen) ในรอบวงจรสัด (Sorensen, 1979)

2.1.4 การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในระยะวงรอบการเป็นสัด

ในวงรอบหนึ่ง ๆ ของการเป็นสัดจะได้รับการควบคุมโดยฮอร์โมนต่าง ๆ ดังนี้

2.1.4.1 LH

เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดย LH จะทำงานร่วมกับ FSH ช่วยทำให้ไข่ตก การทำงานของฮอร์โมนนี้ในตกไข่จะไปกระตุ้นให้คอเลสเทอรอลเปลี่ยนไปเป็นโพร เจสเทอโรน จึงมีผลทำให้ระดับของโพรเจสเทอโรนสูงขึ้นในระยะลูเทียลของวงรอบการเป็นสัด (มงคล, 2543)

2.1.4.2 FSH

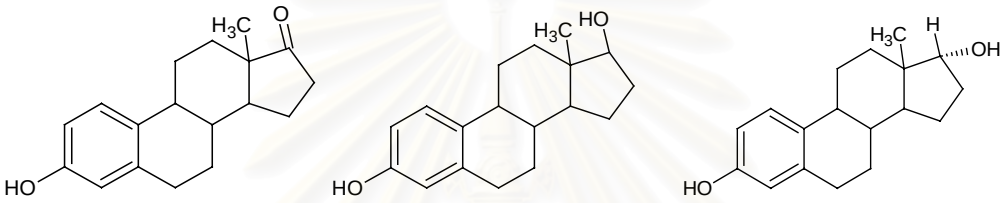
เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดย FSH มีการทำงานให้ไข่อ่อนและถุงไข่ฟอลลิเคิลเจริญเติบโตขึ้น และ กระตุ้นให้เทสโทสเทอโรน เปลี่ยนไปเป็นเอสโทรเจนชนิดเอสไทรออล, เอสโทรน และ เอสทราไดออล (มงคล, 2543)

2.1.4.3 **โพรสทาแกรนดิน**

เป็นฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดโพทาโนอิก (protanoic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยปกติกรดโพทาโนอิก จะไม่อยู่โดด ๆ แต่จะมีกลุ่มต่าง ๆ เข้าไปต่อเป็นโพรสทาแกรนดิน กลุ่มที่พบอยู่บ่อย ๆ ได้แก่ A, B, E และ F ส่วนกลุ่มอื่น ๆ ก็เกิดขึ้นได้เช่นกันโพรสทาแกรนดินที่ใช้กันมีชื่อสามัญ คือ โพรสทาแกรนดิน เอฟทู แอลฟา (prostaglandin $F_2\alpha$) หรือ PG $F_2\alpha$ ปัจจุบันพบโพรสทาแกรนดินหลายชนิดในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีโพรสทาแกรนดิน เอฟทู แอลฟา มีบทบาทในการควบคุมวงรอบการเป็นสัดในสัตว์หลายชนิด โดยโพรสทาแกรนดินจะหลั่งมาจากมดลูก ไปออกฤทธิ์ทำให้คอร์ปัสลูทียมฝ่อ เป็นเหตุให้ระดับโพรเจสเทอโรนลดลง โพรสทาแกรนดิน เอฟทู แอลฟา ที่เกิดจากคอร์ปัสลูเทียม จะไปกระตุ้นเยื่อบุภายในมดลูกให้สร้างสารขึ้นมาทำลายตัวเองซึ่งเกิดขึ้นหลังระยะกลางของวงรอบการเป็นสัด (วิโรจน์, 2546)

2.1.4.4 เอสโทรเจน

เอสโทรเจนจัดเป็นสเทอรอยด์ฮอร์โมนที่สำคัญ ประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอม สูตรโครงสร้างของเอสโทรเจนแสดงดังรูปที่ 2.3



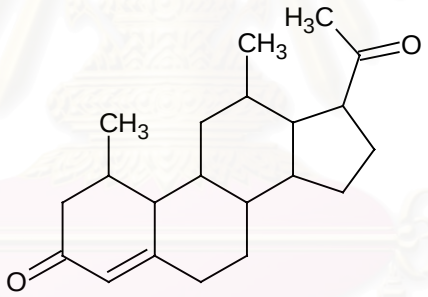
เอสโทรน 17แอลฟา – เอสทราไดออล 17บีตา – เอสทราไดออล

รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของเอสโทรน, 17แอลฟา – เอสทราไดออล และ17บีตา – เอสทราไดออล

เอสโทรเจนผลิตจากเนื้อเยื่อที่อยู่ล้อมรอบฟอลลิเคิล ในระยะก่อนมีการตกไข่ไม่กี่วัน ฮอร์โมนนี้ทำหน้าที่ควบคุมพฤติกรรมที่แสดงออกทางเพศ คือพฤติกรรมการเป็นสัด และกระตุ้นให้ระบบสืบพันธุ์ และมดลูกเตรียมพร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ และการฝังตัวของไข่ที่ได้รับการผสมติด ในระยะก่อนและระหว่างเป็นสัด ฮอร์โมนนี้จะกระตุ้นให้มีการผลิตน้ำเมือก ไหลซึมมาทางปากช่องคลอด เพื่อเป็นการหล่อลื่น และเตรียมพร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ อิทธิพลของฮอร์โมนนี้ยังมีผลต่อการกระตุ้นให้คลายตัว โดยกล้ามเนื้อปากช่องคลอดจะบวมแดงในระหว่างที่เป็นสัด กระตุ้นให้กล้ามเนื้อปากมดลูกคลายตัวเพื่อให้อสุจิผ่านเข้าไปผสมกับไข่ได้ และยังช่วยให้กล้ามเนื้อรอบมดลูกบีบตัวช่วยพาให้ไข่ และอสุจิเคลื่อนที่เข้าหากันได้เร็วขึ้น เป็นการเพิ่มโอกาสในการผสมพันธุ์ (วิโรจน์, 2546)

2.1.4.5 **โพรเจสเทอโรน**

โพรเจสเทอโรนจัดเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) สูตรโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 21 อะตอม มีชื่อทางเคมี คือ Δ^4-pregnene-3,20-dione สูตรโครงสร้างของโพรเจสเทอโรนแสดงดังรูปที่ 2.4 โพรเจสเทอโรนจัดเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในวงรอบการป็นสัดและในการตั้งท้อง แหล่งที่ทำการสังเคราะห์โพรเจสเทอโรน คือ คอร์ปัสลูเทียม รังไข่ รก และอาจสังเคราะห์ได้บ้างในระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมนตัวอื่น ได้แก่ ฮอร์โมนเพศ (sex hormone) ในรังไข่ ในอัณฑะ และคอร์ทิโคสเตอรอยด์ (corticosteroid) ในต่อมหมวกไต ทำให้สามารถตรวจระดับโพรเจสเทอโรนในคอร์ปัสลูเทียม ในรก ในเปลือกต่อมหมวกไต ในน้ำเลือด และในน้ำนม เป็นต้น (Drofman, 1975)



รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน

นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพบฮอร์โมนอื่น ซึ่งมีสูตรโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายกับโพรเจสเทอโรน คือ 20α-hydroxy- Δ^4-pregnene-3-one (20α-01) 20β-hydroxy- Δ^4-pregnene-3-one(20β-01) และ 17α-hydroxy- Δ^4-pregnene-3-dione(17α-hydroxyprogesterone) (Drofman, 1975)

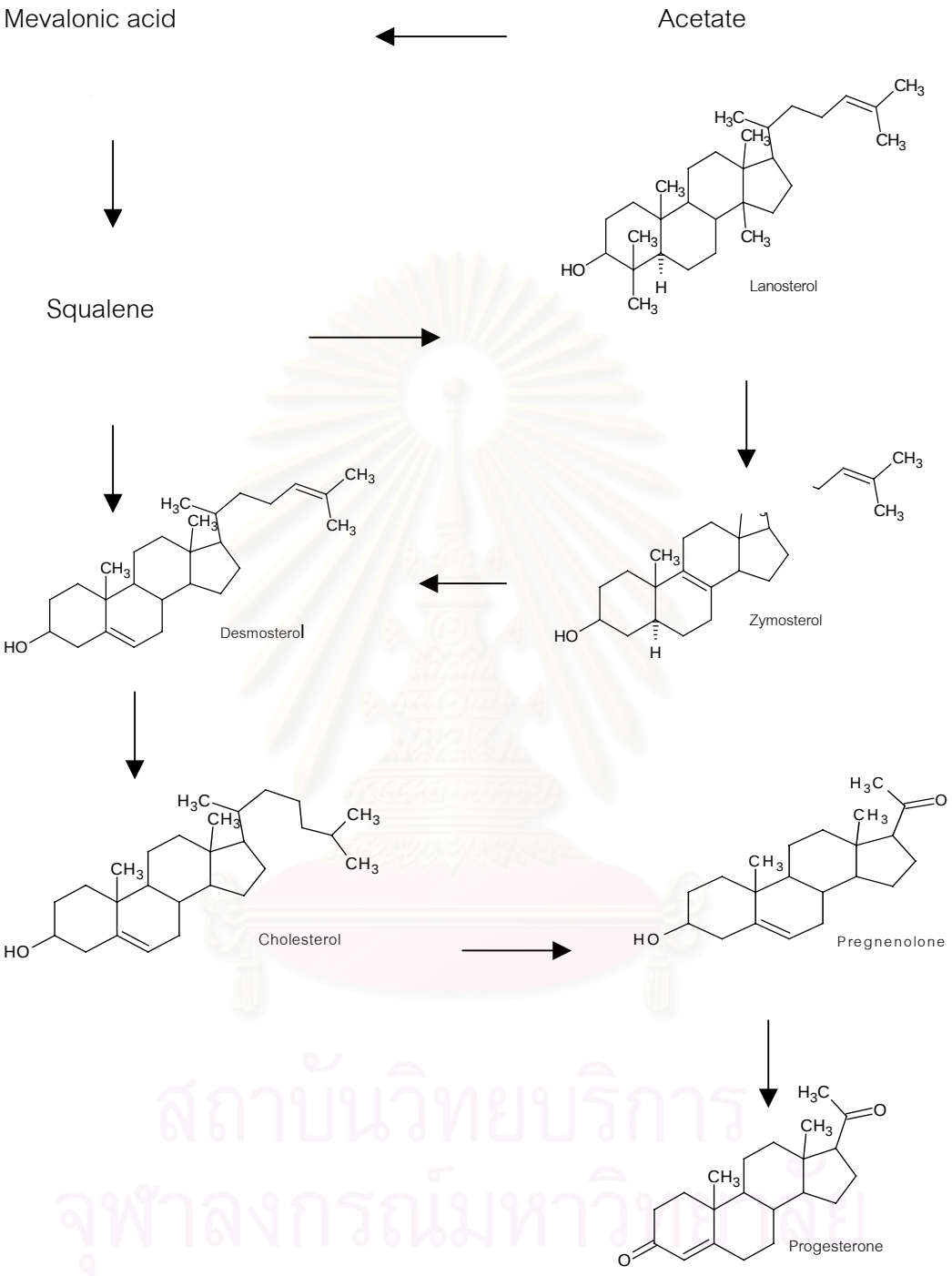
2.1.4.6 บทบาทของโพรเจสเทอโรนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Mcdonald (1975) ได้กล่าวถึงบทบาทหน้าที่ของโพรเจสเทอโรนไว้ดังนี้

1. ควบคุมการเคลื่อนย้ายไข่ผ่านท่อนำไข่ร่วมกับเอสโทรเจน
2. เตรียมเยื่อบุผนังให้พร้อมที่จะรับการฝังตัวของตัวอ่อน
3. ยับยั้งการตกไข่ขณะตั้งท้อง โดยทำงานร่วมกับเอสโทรเจนไปยับยั้งการหลั่งโกนาโดโทรพินจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า
4. พยุงการตั้งท้อง
5. ทำงานร่วมกับเอสโทรเจน กระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มถุงน้ำนม เหนี่ยวนำให้เกิดการคลอด โดยระดับโพรเจสเทอโรนลดลงตอนใกล้คลอด ซึ่งเป็นหน้าที่ทางอ้อม

2.1.4.7 กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของโพรเจสเทอโรน

สารตั้งต้นในการสังเคราะห์โพรเจสติน (progestin) คือ อะซิเตต (acetate) และสารประกอบตัวกลางในขบวนการสังเคราะห์ คือ อะซิโตอะซิเตต (acetoacetate), ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาเรต (hydroxymethylglutarate) และ สควอลีน (squalene) ซึ่งสังเคราะห์ต่อได้คอเลสเทอรอล (cholesterol) มีการเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน 20α และ 22R โดยอาศัยเอนไซม์ 20,22R เดสโมเลส (20,22R desmolase) เป็นเหตุให้คาร์บอนที่เชื่อมกันในตำแหน่งที่ 20-22 แตกออก ถูกเปลี่ยนเป็นเพรกเนนโนโลน (pregnenolone) ซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 21 อะตอม วิถีทางของคอเลสเทอรอลเปลี่ยนไปเป็น เพรกเนนโนโลน เพรกเนนโนโลนเปลี่ยนไปเป็นโพรเจสเทอโรนในเนื้อเยื่อโกเนท (gonate tissue) และในรก โดยอาศัยการทำงานของ 3*B*-01 dehydrogenase ลำดับขั้นการสังเคราะห์ทางชีวภาพของโพรเจสเทอโรนแสดงดังรูปที่ 2.5 (Drofman, 1975)



รูปที่ 2.5 ลำดับขั้นการสังเคราะห์โพรเจสเทอโรน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.4.8 กระบวนการเมแทบอลิซึมของโพรเจสเทอโรน

Kaddouri และคณะ (1992) ทำการทดลองในหลอดแก้ว (in vitro) พบว่า เอนไซม์ไซโทโครมคอมเพลก ในไมโครโซมของตับเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของโพรเจสเทอโรน

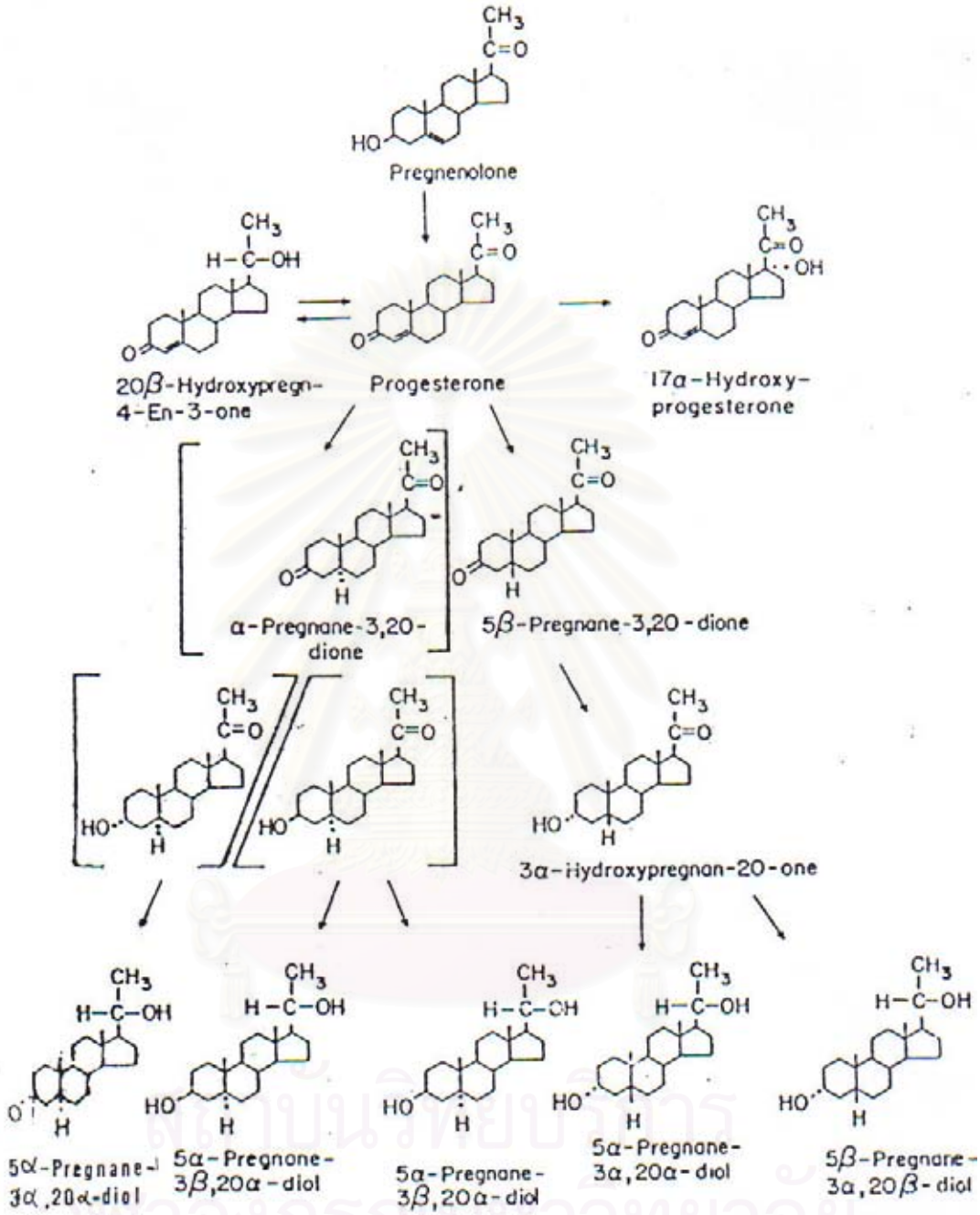
Heisterman และคณะ (1998) ทำการฉีดโพรเจสเทอโรน ^{14}C เข้าในเส้นเลือดโค จากนั้น 2 วัน สามารถตรวจพบ โพรเจสเทอโรน ^{14}C ในปัสสาวะ และอุจจาระโดยในอุจจาระพบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าโพรเจสเทอโรนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 5β- pregnane-3α,20α-diol, 5β- pregnane-3α-ol-20-one และ pregnanediol

Rabiee และคณะ (2003) ตรวจพบ 20-oxo-pregnane, 20α-pregnane และ 20β-pregnane ในอุจจาระ และน้ำเลือดโค ลำดับแสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของเพรกโนโลนและโพรเจสเทอโรนในโค แสดงดังรูปที่ 2.6

Andrea และคณะ (2004) ศึกษาถึงผลของโพรสทาแกลนดินต่อการสลายตัวของโพรเจสเทอโรนในโคเนื้อ โดยฉีดโพรสทาแกลนดินเข้าเส้นเลือดโคในวันที่ 8 ของวงรอบการเป็นสัดซึ่งเป็นระยะลูเทียล พบว่าหลังฉีดโพรสทาแกลนดิน 1 ชั่วโมง ระดับโพรเจสเทอโรนในเลือดลดลงและคงระดับต่ำเช่นนี้กว่า 24 ชั่วโมง เมื่อวัดระดับ 20β-hydroxyprogesterone และ pregnanenolone พบว่าสูงขึ้น

โพรเจสเทอโรนซึ่งได้จากการสังเคราะห์จะเข้าสู่กระแสเลือด และเกิดเมแทบอไลท์ในตับและ กระแสเลือด สามารถตรวจวัดระดับของเมแทบอไลต์ของโพรเจสเทอโรนได้ ในเลือด น้ำนม ปัสสาวะและอุจจาระ เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

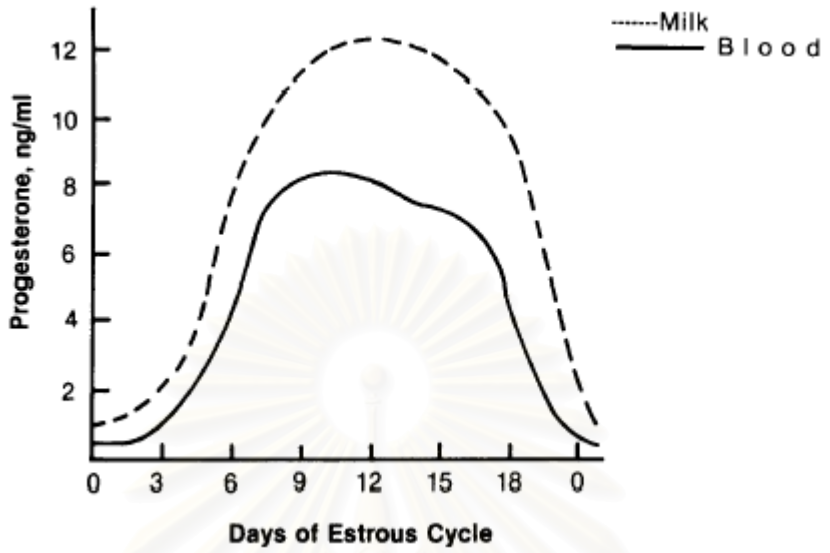


รูปที่ 2.6 แสดงลำดับขั้นกระบวนการเมแทบอลิซึมของเพรกโนโลน และ โพรเจสเทอโรนในโค

2.1.4.9 ระดับโพรเจสเทอโรนในระยะวงรอบการเป็นสัด

วงรอบการเป็นสัด เป็นห้วงเวลาของการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายและ อารมณ์ทางเพศ ตามธรรมชาติของสัตว์เพศเมีย ซึ่งถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้น โดยหลั่งออกมาอย่างเป็นระบบ วงรอบการเป็นสัดของโค โดยปกติมีเวลาโดยเฉลี่ยประมาณ 21 วัน ต่อรอบ โดยนับเวลาตั้งแต่วันเริ่มเป็นสัดวันแรก จนถึงการเป็นสัดครั้งที่สองติดต่อกันไป ทั้งนี้ตั้งแต่สาว จนชรา การสังเคราะห์โพรเจสเทอโรนมีความสัมพันธ์กับการเจริญของคอร์ปัสลูเทียมตามขั้นตอนต่อไปนี้ ภายในรังไข่จะมีไข่จำนวนมากฝังตัวอยู่ภายในเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มเซลล์ที่ล้อมรอบไข่ ต่อมาจะเจริญเติบโตเป็นฟองไข่ เมื่อไข่โตเต็มที่ฟองไข่จะแตกออก ปล่อยไข่ออกจากรังไข่ เรียกว่าการตกไข่ แล้วเซลล์ของฟองไข่รอบ ๆ จะสร้างคอร์ปัสลูเทียม มีลักษณะเป็นแผ่น ซึ่งจะขยายตัวขึ้นและผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ประมาณวันที่ 5 ของ วงรอบการเป็นสัด ต่อมาเซลล์ที่คาอินเทอนาจะทำการแบ่งตัว ทำให้ขนาดและน้ำหนักของคอร์ปัสลูเทียมเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของโพรเจสเทอโรนเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด

(Moeljono และ คณะ, 1977) วัดปริมาณโพรเจสเทอโรน ในพลาสมาจะน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันแสดงอาการสัด และคงระดับต่ำประมาณ 3-4 วัน จากนั้นมีระดับสูงขึ้นและสูงสุดโดยเฉลี่ย 6-7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 16-17 ของการเป็นสัดซึ่งคอร์ปัสลูเทียมอาจมีขนาด 2 เซนติเมตร หลังจากนี้ระดับโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลง สรุปแล้วระดับโพรเจสเทอโรนลดต่ำสุดในวันแสดงอาการสัด และสูงสุดในวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด และตั้งแต่วันที่ 17 เป็นต้นไประดับโพรเจสเทอโรนจะลดลงเรื่อย ๆ จนต่ำสุดจนถึงวงรอบการเป็นสัดใหม่ เนื่องจากอิทธิพลของโพรสทาแกลนดินเอฟทูแอลฟา ซึ่งสังเคราะห์จากเยื่อบุผนังมดลูก ผ่านเส้นเลือดดำระหว่างมดลูกกับรังไข่ (utero – ovarian vein) เข้าสู่คอร์ปัสลูเทียม เป็นเหตุให้คอร์ปัสลูเทียมเสื่อมสลายภายใน 40 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มรอบวงจรสัดครั้งต่อไป ซึ่งระดับระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาและในน้ำนม ระหว่างรอบวงจรสัด แสดงดังรูปที่ 2.7



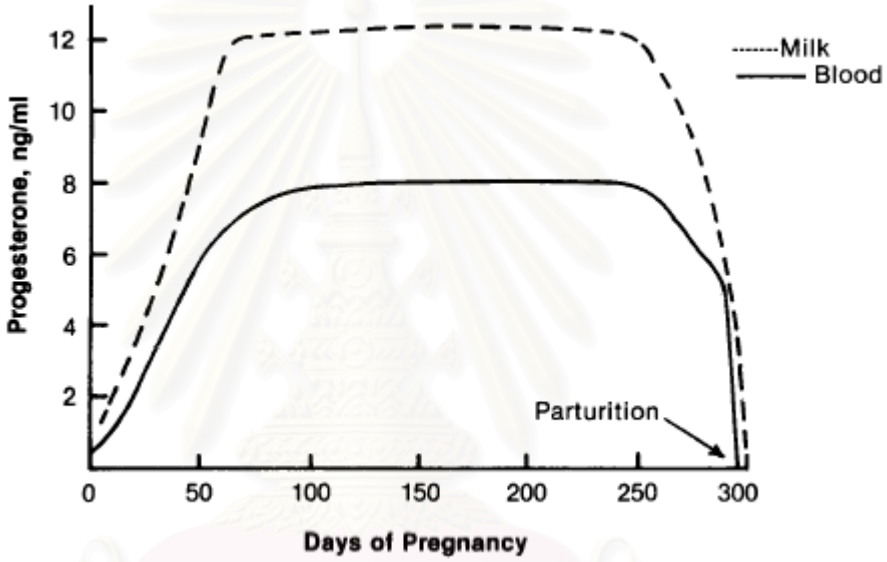
รูปที่ 2.7 ระดับโพรเจสเทโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโคระหว่างรอบวงจรสัด

2.1.4.10 ระดับโพรเจสเทอโรนตลอดการตั้งท้อง

โพรเจสเทอโรน คือ ฮอร์โมนที่สำคัญเพื่อพยุงการตั้งท้องในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้การตั้งท้องดำเนินไปตามปกติจนกระทั่งคลอด (parturition) แหล่งสังเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่สำคัญ คือ คอร์ปัสลูเทียมและ รก ในระยะที่ตั้งท้องสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด แหล่งสังเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่สำคัญ คือ คอร์ปัสลูเทียม จะหลั่งปริมาณโพรเจสเทอโรนที่มีระดับสูงค่อนข้างคงที่ ตลอดระยะการตั้งท้องจนครบกำหนดคลอด เช่น ในโค และ หมู (วิโรจน์, 2546)

หลังจากที่โคได้รับการผสมพันธุ์ ไข่ที่ได้รับการผสมจะผ่านกระบวนการที่เรียกว่า การปฏิสนธิ คือ กระบวนการผสมระหว่างไข่และอสุจิที่มีชีวิตอยู่ เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์เคลื่อนไปฝังตัวยังปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่ง ตลอดระยะเวลาการอุ้มท้องจนถึงวันที่คลอด คอร์ปัสลูเทียมทำหน้าที่ในการผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนเพื่อจรรโลงการตั้งท้อง ในระยะเริ่มต้นของการตั้งท้อง ระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาจะมีค่าใกล้เคียงกับวันที่ 14 – 16 ของวงรอบการเป็นสัดในโคที่ไม่ตั้งท้อง แต่ระดับของโพรเจสเทอโรนอาจสูงขึ้นบ้าง และจะคงระดับเช่นนี้ตลอดการตั้งท้อง ประมาณวันที่ 20 – 30 ก่อนคลอดจะเริ่มมีระดับลดลงอย่างช้า ๆ และมีระดับต่ำสุดในวันที่คลอด Fairclough และคณะ (1975) ศึกษาระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาของโคที่ตั้งท้อง

พบว่าระดับของโพรเจสเทอโรนเพิ่มสูงขึ้นจาก 1.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 8.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 9.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ในวันที่ 3 – 12 ของการตั้งท้อง) โดยระดับโพรเจสเทอโรนจะคงสูงอยู่ตลอดการตั้งท้อง จนกระทั่ง 1 วัน ก่อนคลอด ระดับโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลงถึง 0.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในรูป 2.8



รูปที่ 2.8 ระดับโพรเจสเทโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโคขณะตั้งท้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.4.11 การใช้ระดับโพรเจสเทอโรนในนมตรวจการตั้งท้อง

ในปัจจุบันอาศัยความแตกต่างของระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนม ตั้งแต่วันที่ 20 หลังการผสมเทียมเป็นต้นไป สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจการตั้งท้อง เพราะในโคที่ไม่ตั้งท้อง ระดับของโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลง เนื่องจากการเสื่อมสลายของคอร์ปัสลูเทียม ส่วนในโคที่ตั้งท้องระดับโพรเจสเทอโรนจะมีค่าสูงใกล้เคียงกับวันที่ 14 – 15 ของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งได้ผลดีในการวิเคราะห์หาระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมเพื่อตรวจการตั้งท้อง (วิโรจน์, 2546)

2.1.4.12 การใช้ระดับโพรเจสเทอโรนตรวจการแสดงอาการเป็นสัด

การเป็นสัดหลังคลอดของโคขึ้นกับการคืนตัวของสภาพมดลูกที่บอบช้ำเนื่องจากการคลอดสู่สภาพปกติและขึ้นกับการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ ที่หล่อเลี้ยงต่อมใต้สมองและมดลูกซึ่งควบคุมการผลิตฮอร์โมนโกนาโดโทรพิน (FSH และ LH) ไปควบคุมการทำงานของรังไข่ให้สร้างฮอร์โมนเอสโทรเจนและโพรเจสเทอโรนไปควบคุมสภาพมดลูก ให้เตรียมพร้อมต่อการผสมติดครั้งต่อไป ตามปกติโคนมจะเป็นสัดและตกไข่หลังคลอด 30 – 72 วัน เมื่อได้รับการเลี้ยงดูและให้อาหารอย่างดี การวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมสามารถตรวจอาการสัดได้ หากระดับของโพรเจสเทอโรนต่ำลงสุด จะเป็นเวลาที่โคเริ่มเป็นสัด ทำให้สามารถกำหนดเวลาผสมเทียมได้ (วิโรจน์, 2546)

2.1.5 แอนติเจน

แอนติเจน คือสารที่สามารถชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดีได้ โดยแอนติเจนจะมีคุณสมบัติ 2 ประการคือ

1. Immunogenicity คือ ความสามารถในการชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดี
2. Specificity คือ สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแอนติบอดี

เอพิโทป (epitope หรือ antigenic determinant) คือตำแหน่งย่อย ๆ บนแอนติเจนที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ แอนติเจน 1 โมเลกุลจะมีเอพิโทปได้มากมายและแอนติเจนชนิดหนึ่ง ๆ จะมีเอพิโทปบนโมเลกุลไม่เท่ากัน

2.1.6 อิมมูโนเจน

อิมมูโนเจน คือสารที่สามารถชักนำให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้

2.1.7 แฮปเทน

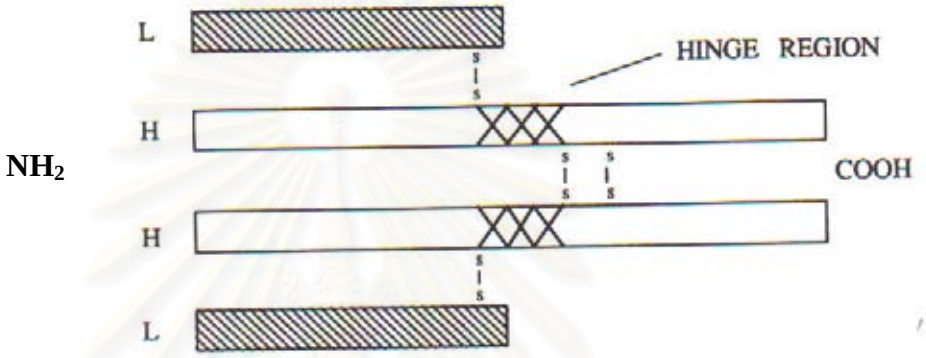
แฮปเทน หมายถึงแอนติเจนที่มีคุณสมบัติไม่ครบถ้วน คือมีความจำเพาะกับแอนติเจน แต่ไม่สามารถชักนำให้สร้างแอนติบอดีได้ แต่ถ้าแฮปเทนจับกับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าที่เรียกว่า carrier จะสามารถชักนำให้สร้างแอนติบอดีได้

2.1.8 แอนติบอดี

แอนติบอดี คือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82 - 96 % และ คาร์โบไฮเดรต 4 – 18 % เกิดจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเอพิโทป (epitope หรือ antigenic determinant) ที่แปลกปลอม โดยจะทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อเอพิโทปนั้นเท่านั้น ซึ่งผลจากปฏิกิริยานี้สามารถกำจัดสารพิษ จุลินทรีย์ ปรสิต และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ออกจากร่างกายได้ แอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในเซรุ่มส่วนแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) ถ้านำซีรัมของคนปกติมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) จะแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ คือ แอลบูมิน และ โกลบูลินอีก 4 ส่วน คือ แอลฟา 1(α_1), แอลฟา 2(α_2), บีตา (β) และ แกมมา (γ) เนื่องจากแอนติบอดีเป็นโกลบูลินที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย จึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) หรือ Ig ซึ่งมี 5 ชนิด คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน เป็นผลผลิตของเซลล์พลาสมาและลิมโฟไซต์ ไม่เพียงพบแต่ในเซรุ่มเท่านั้น ยังพบในส่วนน้ำอื่น ๆ ของร่างกาย และในเนื้อเยื่อ เช่น ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง น้ำนม น้ำลาย น้ำตา ต่อมน้ำเหลืองและม้าม นอกจากนี้ยังพบบนผิวของ บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) ด้วย (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

โครงสร้างพื้นฐานของอิมโมโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล (monomer) แสดงดังรูปที่ 2.9 ประกอบด้วย สายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกัน และ light (L) chain 2 สายที่เหมือนกัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) แรงยึดนี้สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยสาร mercaptoethanol ปลายข้างหนึ่งของสายพอลิเพปไทด์เรียก NH_2 หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเรียกว่า COOH หรือ carboxy terminal โดยทุกสายจะหันปลายข้าง NH_2 หรือCOOH ไปทางเดียวกัน โดยอาศัยความแตกต่าง H chain สามารถแบ่งอิมมูโนโกลบูลินออกได้เป็น 5 class คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งมี H chain ชนิด γ, α, μ, δ และ ε ตามลำดับ H chain ของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละ class มีความแตกต่างกันในน้ำหนักโมเลกุล, ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต, antigenic determinant, คุณ

สมบัติทางชีวภาพและการเคลื่อนที่เมื่อทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เช่นเดียวกันสามารถแบ่ง L chain ออกได้เป็น 2 ชนิด คือ kappa (k) และ lamda (λ)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

2.1.8.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมา ซึ่งกำเนิดมาจากบี-ลิมโฟไซต์เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งในด้านความจำเพาะต่อเอพิโทปของแอนติเจน และในด้านของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น

ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ และที่นำไปใช้ในการรักษาโรคเป็นชนิดที่ผลิตขึ้นในห้องทดลองด้วยวิธีต่าง ๆ กัน ที่สำคัญมี 2 วิธี คือ somatic hybridization ซึ่งเป็นการหลอมรวมเซลล์ 2 เซลล์เข้าด้วยกัน โดยเซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ อีกเซลล์หนึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง วิธีการนี้ทำให้ได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า ไฮบริโดมา (hybridoma) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดี และมีชีวิตยืนยาว (immortalize) สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่มีสิ้นสุด ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อแยกเอายีนอิมมูโนโกลบูลิน ออกมาดัดแปลง

แล้วนำกลับใส่เข้าไปในเซลล์ใหม่ เป็นการดัดแปลงในระดับยีน ทำให้โมเลกุลแอนติบอดีมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามที่ต้องการ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยวิธีนี้เรียกว่า แอนติบอดีที่ดัดแปลงพันธุกรรม (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

2.1.8.2 ความแตกต่างระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี และ พอลิโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมองระดับโมเลกุลแล้ว พอลิโคลนอลแอนติบอดี คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยแอนติเจน แอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน 4 ประการหลัก คือ (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่ว่าจะผลิตจากวิธี somatic hybridyzation หรือ โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมก็ตาม ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะ และต้องใช้กระบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูง เมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน ให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในกระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัม การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีจึงมีค่าใช้จ่ายถูกกว่าและทำได้ง่ายกว่า แต่พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิดหรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกัน แต่คนละตัวก็อาจมีส่วนประกอบของแอนติบอดีต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งจะมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้คนหรือสัตว์ทดลองจำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นทุก ๆ ครั้ง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดในด้านปริมาณและคุณภาพ เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ตลอดไป

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อ เอพิโทป ชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นเอพิโทปที่จำเพาะ หรือ เอพิโทปที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reactive epitope) ก็ได้ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี ประกอบด้วยแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่อเอพิโทปของตน ซึ่งทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อหลายเอพิโทป

ต่าง ๆ บนโมเลกุลของแอนติเจน ด้วยเหตุนี้ถ้าเปรียบเทียบความจำเพาะและปฏิกิริยาข้ามระหว่างพอลิโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว จะเห็นว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีปฏิกิริยาข้าม ได้มากกว่า เนื่องจากประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายชนิด ซึ่งบางชนิดอาจสามารถจับได้กับเอพิโทปที่มีอยู่บนแอนติเจนอื่นด้วย อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีก็สามารถมีปฏิกิริยาข้ามได้ในบางกรณี เช่น ในกรณีที่เอพิโทป ที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับอย่างจำเพาะนั้นเป็น เอพิโทปที่อยู่บนโมเลกุลของแอนติเจนชนิดอื่นด้วย

3. สัมพรรคภาพ และ อะวิดีตีของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพ คือ ค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง และ อะวิดีตี คือผลรวมแต่ละตำแหน่งของการจับกับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งสัมพรรคภาพ และอะวิดีตีเป็นคุณสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือส่วนของบริเวณแปรผันนั่นเอง สัมพรรคภาพเป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของบี-ลิมโฟไซต์จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่าง ๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพมากน้อยต่างกันได้

ดังนั้นหากต้องการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีสัมพรรคภาพดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นกับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น ๆ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีสัมพรรคภาพที่เป็นผลเฉลี่ยจากสัมพรรคภาพของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็มักอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

2.1.8.3 **การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์หนูด้วยวิธี** somatic hybridization

ในร่างกายมี บี-ลิมโฟไซต์หรือเซลล์พลาสมา ที่สามารถสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการได้ แต่เมื่อนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงนอกร่างกาย เซลล์ดังกล่าวจะแบ่งตัวได้ไม่ดีและตายในเวลาอันสั้น ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหลอดทดลองได้ ในขณะเดียวกันมีเซลล์มะเร็งกลุ่มหนึ่งซึ่งมีกำเนิดจากเซลล์พลาสมา เรียกว่าเซลล์ไมอีโลมา (myeloma cell) มีคุณสมบัติของเซลล์มะเร็ง คือ สามารถแบ่งตัวและมีชีวิตอยู่ได้

ตลอดไป เซลล์กลุ่มนี้อาจสูญเสียยีนอิมมูโนโกลบูลินของตน ทำให้ไม่สามารถสร้างแอนติบอดี แต่จะสามารถสร้างแอนติบอดีได้ถ้าได้รับยีนอิมมูโนโกลบูลิน จากบี-ลิมโฟไซต์ หรือเซลล์พลาสมาอื่นเข้าไป การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี somatic hybridization มีหลักการที่จะแสดงคุณสมบัติของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้รวมไว้ในเซลล์เดียวกัน Köhler และ Milstein (1975) รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้เทคนิคไฮบริโดมาโดยการหลอมรวม (fusion) เซลล์ไมอีโลมากับ บี-ลิมโฟไซต์จากม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นไว้แล้วด้วยแอนติเจน เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติพิเศษซึ่งได้มาจากต้นกำเนิดทั้ง 2 ฝ่าย คือ มีความสามารถในการเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้ตลอดไปเหมือนเซลล์ไมอีโลมา และมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ได้จากบี-ลิมโฟไซต์ ดังนั้นจึงสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะได้ตลอดไปจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสมดังกล่าว (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

2.1.9 **เทคนิคไฮบริโดมา**

มีขั้นตอนสำคัญดังต่อไปนี้ (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

1. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนู (immunization) เพื่อให้ได้บี-ลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ ซึ่งส่วนใหญ่จะได้จากม้าม แต่ก็สามารถแยกได้จากอวัยวะน้ำเหลืองอื่น ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง วิธีการกระตุ้นหนูให้สร้างภูมิคุ้มกันให้ได้ผลดีขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ ทางที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ปริมาณของแอนติเจนที่ให้และช่วงห่างของระยะเวลาระหว่างการกระตุ้นแต่ละครั้ง ซึ่งอาจแตกต่างกันสำหรับแอนติเจนแต่ละประเภท แต่ที่สำคัญ คือ การให้แอนติเจนกระตุ้นครั้งสุดท้าย 3 วันก่อนทำการเชื่อมต่อเซลล์ จะทำให้ได้จำนวนโคลน (clone) ของเซลล์ลูกผสมที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้มากที่สุด

2. การกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกเชื่อมต่อ ความสำเร็จของการผลิตไฮบริโดมาส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับการกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกเชื่อมต่อ คือ เซลล์ไมอีโลมา และเซลล์จากม้าม ออกจากเซลล์ไฮบริโดมาที่เกิดขึ้น เซลล์จากม้ามไม่สามารถเติบโตในหลอดทดลองได้จึงไม่เป็นปัญหา แต่เซลล์ไมอีโลมาสามารถเจริญเติบโตในหลอดทดลองได้ไม่จำกัด และอาจเติบโตมากจนเบียดบังเซลล์ไฮบริโดมาที่มีอยู่จำนวนน้อยกว่าในระยะแรก หลังการเชื่อมต่อเซลล์ใหม่ ๆ ทำให้ไม่ได้เซลล์ลูกผสมที่ต้องการ ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีวิธีกำจัดเซลล์ไมอีโลมาที่ไม่ต้องการออกโดยใช้เซลล์ไมอีโลมามีคุณสมบัติขาดเอนไซม์ HGPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltranferase) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์

ไมอีโลมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใส่สาร 6-ไธโอกวานีน หรือ 8-อะซากวานีน ซึ่งเป็นอะนาลอกของเบสกวานีนและมีความเป็นพิษ เมื่อเซลล์ไมอีโลมาใช้สารนี้ที่จะเข้าไปแทนที่เบสกัวนินในการสังเคราะห์สาย DNA โดยใช้เอนไซม์ HGPRT ทำให้ได้สาย DNA ที่ผิดปกติ ซึ่งจะทำให้เซลล์ไมอีโลมาตายในที่สุด แต่เซลล์ไมอีโลมาบางเซลล์สามารถปรับตัวให้มีชีวิตรอดได้โดยเกิดการ กลายพันธุ์ไม่ใช้เอนไซม์ HGPRT ในการสร้างสาย DNA ($HGPRT^-$) ซึ่งจะนำเซลล์ไมอีโลมาที่มีคุณสมบัติ $HGPRT^-$ มาใช้ในการเชื่อมต่อและใช้ selective media ซึ่งมีสารชื่อ ไฮโพแซนทีน (hypoxanthine), อะมินอพเทอริน (aminopterin) และ ไทมิดีน (thymidine) เรียกว่า HAT medium ซึ่งมีคุณสมบัติที่จะยอมให้เฉพาะเซลล์ไฮบริโดมาเท่านั้นเจริญเติบโต โดยสารอะมินอพเทอรินเป็นอะนาลอกของกรดโฟลิก สามารถจับกับเอนไซม์โฟลิกแอซิดรีดักเทส ทำให้ยับยั้งโคเอนไซม์ที่จะใช้ในการสังเคราะห์ DNA ผ่านทาง *de novo* biosynthesis เซลล์ที่จะรอดชีวิตใน HAT medium ได้ จึงต้องมีการสร้าง DNA ผ่านทาง salvage pathway ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ตัวคือ ไทมิดีนไคเนส (TK) และ Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) ถ้าเซลล์ขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งไป จะไม่สามารถสร้าง DNAได้ แต่ถ้านำเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ TK หรือ HGPRT ไปทำการเชื่อมกับเซลล์ที่มีเอนไซม์ก็จะทำให้เซลล์ลูกผสมหรือเซลล์ไฮบริโดมาสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ใน HAT medium

3. การเชื่อมต่อเซลล์ โดยนำเซลล์บี-ลิมโฟไซต์ มาเชื่อมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา โดยใช้ Sendai virus หรือสารพอลิเอทิลีนไกลคอลซึ่งมีการใช้ครั้งแรกโดย Galfre และคณะ (1977) โดยพบว่าพอลิเอธิลีนไกลคอลมีสมบัติทำให้เยื่อหุ้มเซลล์นุ่มและเหนียวหนืด ทำให้ผิวนอกของเซลล์ 2 เซลล์ที่อยู่ในระยะไมโทติก เชื่อมรวมเป็นเซลล์เดียวกัน ทำให้เกิดการรวมกันของโครโมโซมจากเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสอง เซลล์ลูกผสมที่ได้จะมีโครโมโซมเป็นเททราพลอยดีซึ่งเท่ากับจำนวนรวมของโครโมโซมของเซลล์ต้นกำเนิด และมีส่วนประกอบทางพันธุกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดทั้งสอง หลังจากนั้นเมื่อเซลล์ลูกผสมแบ่งตัวเพิ่มจำนวน อาจมีการสูญหายของโครโมโซมบางอันไปบ้าง เช่น ถ้าโครโมโซมที่สูญหายมียีนของอิมมูโนโกลบูลิน ก็จะเป็นผลให้เซลล์ลูกผสมนั้นหยุดสร้างแอนติบอดี ถ้าโครโมโซมที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวสูญหาย ก็จะทำให้เซลล์ลูกผสมนั้นหยุดเจริญเติบโต เซลล์ลูกผสมจะเป็นเซลล์กลุ่มเดียวที่มีความทนทานต่อ HAT medium และสามารถเพิ่มจำนวนและหลั่งแอนติบอดีออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ตรวจพบได้

4. การคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ต้องการ ทำโดยคัดกรองแอนติบอดีที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามคุณสมบัติที่ต้องการ อาจใช้วิธีทดสอบต่าง ๆ ทางห้องปฏิบัติการ เช่น ELISA, western

blot, agglutination เป็นต้น แล้วแต่วัตถุประสงค์ที่ต้องการ หลังจากนั้นก็นำเซลล์ลูกผสม 1 เซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการมาเลี้ยง เพื่อให้ได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เป็นกลุ่มเดียวกันทั้งหมด คือมีต้นกำเนิดจากเซลล์ต้นแบบเดียวกัน

2.2 การผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน

Nakao และคณะ (1980) ฉีดกระตุ้นกระต่ายด้วย 11 แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเทอโรนเฮมิซัคซิเนตที่เชื่อมต่อกับ BSA แล้วจึงนำแอนติซีรัมที่ได้ไปหาปริมาณโพรเจสเทอโรนโดยวิธี enzyme immunoassay โดยเชื่อมต่อ แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเทอโรนเฮมิซัคซิเนตเข้ากับ บีตา-กาแลคโตไซเดส สามารถวัดโพรเจสเทอโรนระดับต่ำสุดได้ 12 พิโคกรัม เช่นเดียวกับ Waldmann และคณะ (1999) ทำการเชื่อมต่อ 11แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเทอโรนเฮมิซัคซิเนต เข้ากับ BSA แล้วนำไปฉีดกระตุ้นหนู mice สายพันธุ์ Balb/c mice พบว่าหนูสร้างแอนติบอดีไทเทอร์เท่ากับ 1: 125,000 เมื่อนำเซลล์ม้ามมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา ได้เซลล์ลูกผสมที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน 11 โคลน

Mustafaev และคณะ (1996) ได้ศึกษาถึงผลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหนู ต่อโพรเจสเทอโรนเมื่อฉีดกระตุ้นหนูด้วยพอลิแอนไอออนโปรตีนคอมเพลก โดยใช้โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ polyacrylic acid copper BSA (PAA-Cu^{2+}-(BSA-P)) เปรียบเทียบกับเมื่อฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ผสมกับ incomplete Freund's adjuvant พบว่า PAA-Cu^{2+}-(BSA-P) ทำให้หนูสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อ BSA สูงพอ ๆ กับแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อโพรเจสเทอโรน

Elder และคณะ (1997) ทำการสร้างเซลล์ไฮบริโดมาระหว่างบี-ลิมโฟไซต์และไมอีโลมา โดยใช้เทคนิคอีเลคโทรฟิวชัน พบว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าการสร้างเซลล์ลูกผสม โดยใช้สารพอลิเอธิลีนไกลคอล สามารถสร้างเซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนมากกว่า 1 เท่าตัว

Yucel และ คณะ (1999a) ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนโดยนำบี-ลิมโฟไซต์ ของหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA มาหลอมรวมกับเซลล์มัยอีมา โดยทำการเชื่อมรวม 2 ครั้ง สามารถสร้างเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน 2 โคลน ซึ่งเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ ไม่ทำ

ปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับที่นำมาทดสอบ คือ เอสทราไดออล, เทสโทสเทอโรน, อัลโดสเทอโรน และคอร์ทิโคสเทอโรน และพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตมีไอโซไทป์ คือ IgG2a

Yucel และคณะ (1999b) ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนและเอสทราไดออล โดยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองด้วยแอนติเจน 3 ชนิดผสมกัน คือ โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA, เอสทราไดออลที่เชื่อมต่อกับ BSA และเทสโทสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA จากนั้นนำบี-ลิมโฟไซต์ ของหนูที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนจำนวน 2 โคลน และจำเพาะต่อเอสทราไดออลจำนวน 1 โคลน ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็น IgG1, IgG2a และ IgG2b ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์

Corol และคณะ (2001) ทำการหาลักษณะสมบัติทางเคมีเชิงกายภาพ ของ โพรเจสเทอโรน-11-แอลฟา-เฮมิซัคซินิลที่เชื่อมต่อกับ BSA และ เทสโทสเทอโรน-3-คาร์บอกซีเมธิลออกไซม์ (T-3-cmo) ที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยวิธีการวัดความแตกต่างของสเปกตรัมระหว่าง P-11-alpha-hem-BSA และ T-3-cmo-BSA กับ โพรเจสเทอโรน-11-แอลฟา-เฮมิซัคซินิล และ เทสโทสเทอโรน-3-คาร์บอกซีเมธิลออกไซม์ จากการทดลองสามารถหาสัดส่วนโมลระหว่าง P-11-alpha-hem กับ BSA ใน P-11-alpha-hem-BSA เท่ากับ 23:1 และ สัดส่วนโมลระหว่าง T-3-cmo กับ BSA ใน T-3-cmo-BSA เท่ากับ 17:1 ซึ่งแอนติเจนทั้งสองชนิดนี้จะนำไปใช้ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองต่อไป

Hong และ Choi (2002) ทำการเชื่อมต่อ โพรเจสเทอโรน-3-คาร์บอกซีเมธิลออกไซม์ (P-3cmo) เข้ากับ BSA โดยใช้ N–hydroxysuccinimide ester (NHS) และ dicyclohexlycarbodiimide (DDC) ช่วยในการเชื่อมต่อ แล้วจึงนำ P-3cmo ที่ติดกับ BSA (P-3cmo-BSA) ไปฉีดกระตุ้นหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน จากนั้นนำแอนติบอดีที่ได้ ไปทำเป็นชุดทดสอบแบบ one-step fluorescence polarization immunoassay (FPIA) เพื่อใช้วัดระดับโพรเจสเทอโรนได้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1.1 หนู mouse สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.2 เซลล์ไมอีโลมา P3/NSI/1-4A4-1 (NSI) ATCC No: TIB 18

1.3 อุปกรณ์ต่างๆ

กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร	Nipro
กระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร	Nipro
กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon
ขวดแก้ว	Boro
เข็มฉีดยา (18G, 21G)	Nipro
เครื่องมือนับเซลล์	Boeco
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE minor 35
เครื่องวัดพี เอช	Mettler Toledo
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	Titertek
เครื่อง microtiterplate reader	Titertek
จานชนิด 96 หลุม	Nunc
ตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato
ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige
ปิเปตต์	Eppendorf
ปิเปตต์อัตโนมัติ	Socorex
ปั๊มลม	Iwaki
ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (50, 250 มิลลิลิตร)	Nunc
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc
หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ที่มา
1. Absolute Ethanol	บริษัท Italmar, Italy
2. Aldosterone	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
3. Aminopterine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
4. BCA protein assay	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
5. Bovine serum albumin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
6. Cholesterol	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
7. Citric acid	บริษัท Merck, Germany
8. Corticosterone	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
9. D-glucose	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
10. Diethyl ether	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
11. Dimethylformamide (DMF)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
12. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	บริษัท Fluka, Swithzerland

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ที่มา
13. Disodium hydrogenphosphate	บริษัท Carlo erba, USA
14. Disodium hydrogenphosphate	บริษัท Carlo erba, USA
15. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
16. Estrdiol	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
17. Fetal bovine serum	บริษัท Invitromex, USA
18. Hydrogen peroxide	บริษัท Fluka, Swithzerland
19. Hypoxanthine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
20. Isotyping kit	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
21. L-glutamine	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
22. Methanol	บริษัท Merck, Germany
23. N-hydroxysuccimide ester (NHS)	บริษัท Fluka, Swithzerland
24. Norfloxacin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
25. O-phenylenediamine	บริษัท Abkem Iberia S.L., USA
26. Penicllin G	บริษัท Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ที่มา
27. Peroxidase-Rabbit Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	บริษัท Zymed, USA
28. Polyethylene glycol	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
29. Progesterone	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
30. Progesterone-3-(*O*-carboymethyl)oxime (P-3cmo)	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
31. Progesterone-17αhydroxy- BSA conjugate	บริษัท Fitzgerald, USA
32. Progesterone-17αhydroxy	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
33. RPMI 1640medium	บริษัท Invitromex, Germany
34. Salbutamol	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
35. Sodium bicarbonate	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
36. Sodium cabonate	บริษัท Merck, Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ที่มา
37. Sodium chloride	บริษัท Merck, Germany
38. Sodium dihydrogen phosphate	บริษัท Carlo erba, USA
39. Sodium pyruvate	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
40. Sulfuric acid	บริษัท Merck, Germany
41. Testosterone	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
42. Tetracyclin	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
43. Tween 20	บริษัท Sigma-Aldrich, USA
44. Tris (hydroxymethyl) aminomehane	บริษัท Merck, Germany
45. นมผงพร่องมันเนย	บริษัท มิชชัช, Thailand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

3.3.1 การเตรียมอิมมูโนเจน (immunogen)

เนื่องจากโพรเจสเตอโรนเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กทำให้ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในการตอบสนองได้ โดยเรียกสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่าแฮปเทน (hapten) ดังนั้นในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จึงต้องมีการเชื่อมแฮปเทนกับสารที่ขนาดโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารแฮปเทนที่ต้องการเพื่อตอบสนองได้ สารที่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเรียกว่า อิมมูโนเจน (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537) โดยทำการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์เข้ากับ BSA ดังนี้ ชั่ง P3cmo 4 มิลลิกรัม, NHS 3 มิลลิกรัม และ EDC 3 มิลลิกรัม ละลายใน DMF 0.5 มิลลิลิตร เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA 4 มิลลิกรัม ใน carbonate buffer 0.5 M, pH 9.6 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไป กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง (Hong และ Myung, 2002)

3.2.2 การหาปริมาณโปรตีนของBSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน

หาปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ด้วยวิธี Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ assay kit ของบริษัท Pierce โดยเตรียม Working reagent ด้วยการผสม Reagent A กับ Reagent B ในอัตราส่วน Reagent A:B = 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA และสารโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยทำการเจือจางด้วย PBS ซึ่งสารมาตรฐานเจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเจือจาง 1:5 และไม่เจือจาง แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานชนิด 96 หลุม ๆ ละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่างหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุม เบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำจานชนิด 96 หลุม ออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiterplate reader

3.3.3 การหาปริมาณโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA โดยใช้ชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica

หาปริมาณโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยโดยใช้ชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica ซึ่งอาศัยหลักการ competitive ELISA โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลายโพรเจสเทอโรนมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ของชุดทดสอบ จากนั้นเติมสารละลายโพรเจสเทอโรนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ สารละลายโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ความเจือจาง 1: 1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 เท่า ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะกับ IgG ของกระต่าย แล้วจึงเติมโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ HRP และสารละลายแอนติบอดีปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยหลุมที่เป็นแบลงค์ใส่เพียงบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้าง 3 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์สำหรับล้าง จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรตปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยาปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiterplate reader สร้างกราฟมาตรฐานโพรเจสเทอโรนระหว่าง ค่า %maximal absorbance และความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนมาตรฐาน หาปริมาณโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดย

$$\% \text{ maximal absorbance} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } _{450} \text{ ของโพรเจสเทอโรนมาตรฐาน X 100}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } _{450} \text{ ของโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้น 0}}$$

3.3.4 การหาเปอร์เซนต์การจับของโพรเจสเทอโรนต่อ BSA โดยวิธี 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)

เนื่องจากในการเชื่อมต่อกันระหว่าง BSA กับโพรเจสเทอโรน เป็นการจับกันบริเวณตำแหน่งหมู่คาร์บอกซี (carboxylic group) ของโพรเจสเทอโรนและ หมู่เอมีน (amino group) ของ BSA ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณหมู่เอมีนของ BSA ที่ไม่จับกับโพรเจสเทอโรนได้โดยใช้วิธี TNBS โดยมีวิธีการดังนี้ ละลาย BSA และ สารโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ให้มีความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน sodium bicarbonate buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 8.5 เติมสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในจานชนิด 96 หลุม แล้วเติมสาร

ละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Sodium Dodesyl Sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง microtiterplate reader ที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับกันระหว่างโพรเจสเทอโรนต่อ BSA จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ BSA ที่มีโพรเจสเทอโรนจับ จากค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ในรูปอิสระ

3.3.5 การฉีดกระตุ้นหนูให้สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้หนูทดลองครั้งแรก โดยใช้อิมมูโนเจนที่เตรียมได้มาฉีดกระตุ้นหนู mouse สายพันธุ์ BALB/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ ซึ่งจะแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กระตุ้นกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA (17αP-BSA) จำนวน 3 ตัว

กลุ่มที่ 2 กระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA (P3cmo-BSA) จำนวน 2 ตัว

ในครั้งแรกของการฉีดกระตุ้นจะใช้อิมมูโนเจนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ผสมกับ complete Freund ‘s adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 (ซึ่งจะมีอิมมูโนเจน อยู่ 40 ไมโครกรัม) โดยผสมให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็น water in oil emulsion โดยฉีดเข้าภายในช่องท้อง หลังจากฉีดกระตุ้นครั้งที่หนึ่งไปแล้วเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ จึงฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยใช้อิมมูโนเจนความเข้มข้นเท่ากับการฉีดในครั้งแรก แต่นำมาผสมกับ incomplete Freund ‘s adjuvant (ICFA) ในปริมาณและช่องทางการฉีดเดิม หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 เป็นเวลา 7-10 วัน เจาะเลือดจากหางหนูเพื่อนำซีรัมไปทดสอบ หาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีในเลือดหนูโดยวิธี indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดีไตเตอร์สูง จึงกระตุ้นหนูครั้งสุดท้าย โดยใช้อิมมูโนเจนปริมาณและความเข้มข้นเท่าเดิมผสมกับน้ำเกลือ ฉีดเข้าช่องทางเดิมก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูกับเซลล์ไมอีโลมา หลังจากฉีดกระต้นครั้งสุดท้าย 5 วัน

3.3.6 การเตรียมซีรัมจากเลือดหนู

หลังจากเจาะเลือดจากหางหนูแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 – 8 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนน้ำใสคือ ซีรัมออก (Harlow และ Lane,1988)

3.3.7 การทำ indirect ELISA เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี (antibody titer) ในซีรัมหนู

ไตเตอร์ หมายถึง ค่าการเจือจางสูงสุดของสิ่งที่ต้องการตรวจวัดที่ยังคงให้ผลบวกในการทดสอบ ซึ่งสามารถหาค่าแอนติบอดีได้โดยการทำ indirect ELISA ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เตรียมสารละลาย โพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA, โพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA และ BSA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเติมใน จานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำ จานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมซีรัมจากหนูที่เจือจางระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 1:500 – 1:300,000 (เจือจางด้วย 0.5% BSA ใน PBS เนื่องจากในการฉีดกระตุ้นหนูใช้แอนติเจน คือ สารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน ดังนั้นร่างกายของหนูจึงสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อทั้ง สารละลายโปรตีน BSA และโพรเจสเทอโรน ดังนั้นจึงต้องดูดซับ (absorb) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BSA ออกด้วยสารละลาย BSA) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำ จานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-Rabbit anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:2000 ใน 0.5% BSA/PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำ จานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน citrate buffer หลุมละ 150 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 - 15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microtiterplate reader เลือกหนูตัวที่มีระดับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนสูงสุดมา เพื่อนำเซลล์

บี-ลิมโฟไซต์จากม้ามไปหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมาสำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

3.3.8 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยการทำ competitive indirect ELISA

ในการฉีดกระตุ้นหนูใช้แอนติเจน คือ สารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน ดังนั้นร่างกายของหนูจึงสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อทั้ง สารละลายโปรตีน BSA โพรเจสเทอโรนและเอพิโทปใหม่ที่อาจเกิดระหว่างปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบว่าหนูทดลองสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระหรือไม่ เพราะหากในซีรัมหนูมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ เมื่อนำบี-ลิมโฟไซต์ ของหนูมาหลอมรวม จึงมีโอกาสได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระสูง ทดสอบความจำเพาะโดยวิธี competitive indirect ELISA โดยเตรียมสารละลายโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับซีรัมหนูที่เจือจางด้วย 0.5% BSA/PBS ความเจือจาง 1:10,000 โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.7 โดยเติมซีรัมหนูที่ผสมกับโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แทนซีรัมหนู

ถ้าแอนติบอดีที่ได้จำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ แอนติบอดีจะจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ผสมอยู่ เมื่อเติมลงในหลุมที่มีสารละลายโพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA เคลือบอยู่จะทำให้แอนติบอดี ไม่สามารถจับกับโพรเจสเทอโรนที่อยู่หลุมได้ เมื่อเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ลงไป จึงจับกับแอนติบอดีได้น้อยลง จะปรากฏสีจางลง

3.3.9 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.3.9.1 การเตรียมเซลล์ไมอีโลมา NSI

นำเซลล์ไมอีโลมา NSI ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ hybrid medium ที่เติม FCS ปริมาณ 10% มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้ว ละลายตะกอนเซลล์ด้วย hybrid medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ไมอีโลมาที่ได้มาย้อมด้วยสี trypan blue และนับเซลล์โดยใช้ haemacytometer หา viable cell ให้มีมากกว่า 95 % โดยให้มี

ความหนาแน่นของเซลล์มากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ในตู้บ่ม ที่มี CO_2 5%, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปเชื่อมกับเซลล์ม้าม

3.3.9.2 การเตรียมเซลล์ม้าม

โดยสลบหนูที่ผ่านการฉีดกระตุ้นด้วย dimethyl ether แล้วใช้ syringe เจาะเลือดจากหัวใจโดยวิธี cardiac puncture เพื่อเตรียมไว้ใช้เป็น positive control ในการทดสอบ ELISA แล้วเปิดช่องท้องด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำม้ามออกมาบดบนตะแกรงลวดตาถี่โดยใช้ด้าม (plunger) ของหลอดฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร เป็นตัวบด จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย hybrid medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ด้วยความเร็ว 1,500 rpm นาน 5 นาที แล้วนำเซลล์มา resuspend ด้วย hybrid medium แล้วนำเซลล์ม้ามที่ได้มาย้อมด้วยสี trypan blue และนับเซลล์โดยใช้ haemacytometer หาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ให้มีมากกว่า 95 % โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.3.9.3 การหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมา

ทำการเชื่อมรวมระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอีโลมาด้วยสารละลาย PEG เข้มข้น 50 % (Galfre และคณะ, 1977) ซึ่งทำโดยนำเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมาที่เตรียมไว้มาผสมกัน โดยใส่รวมกันในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปั่นที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทน้ำใสทิ้งจากนั้นค่อย ๆเติมสารละลาย 50% PEG ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงในตะกอนเซลล์แล้วเขย่าหลอดเบาๆ โดยต้องควบคุมการไหลของ PEG ให้หมดภายใน 1 นาที แล้วเขย่าหลอดเบาๆ นาน 1 นาที หลังจากนั้นล้าง PEG ออกด้วย hybrid medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยควบคุมการไหลให้หมดภายในเวลา 1 นาที แล้วจึงเติม hybrid medium ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม HAT medium ที่มี FCS ความเข้มข้น 20% ลงไป กระจายเซลล์ลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มี CO_2 5%, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3.9.4 การเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมา

หลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วให้เติม HAT medium ทุก 2- 3 วันและเมื่อผ่านไปแล้ว 5-7 วัน คอยสังเกตเซลล์ในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมา มีลักษณะกลมวาว และโปร่งแสง เซลล์ไมอีโลมาและเซลล์ม้าม ที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะตาย โดยสังเกตตรวจติดตามเซลล์ไฮบริโดมาพร้อมกับเปลี่ยนอาหารโดยดูดอาหารเก่าออกแล้วเติม HAT medium ใหม่เข้าไป โดยทำการตรวจดูเซลล์ไฮบริโดมาเป็นระยะ ๆ เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุม จึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนของหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมาตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน โดยวิธี indirect ELISA หลังจากการหลอมรวมเซลล์ผ่านไปประมาณ 3 สัปดาห์จึงเปลี่ยนไปใช้ HT medium เป็นเวลา 1 สัปดาห์จึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเหมือนที่ใช้เลี้ยงไมอีโลมา

3.3.9.5 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน โดยการทำ indirect ELISA

เมื่อเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นที่ก้นหลุม จึงตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยการทำ indirect ELISA ทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมกับ BSA (17αP-BSA) เมื่อทดสอบในหนูที่กระตุ้นด้วย 17αP-BSA, โพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA (P3cmo-BSA) เมื่อทดสอบในหนูตัวที่กระตุ้นด้วย P3cmo-BSA และ BSA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสง จากนั้นทำการทดลองตามวิธีในข้อ 3.3.7 โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ต้องการทดสอบลงไปแทนซีรัมหนู หลังจากทำ ELISA แล้ว ถ้าเซลล์ในหลุมใดมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย BSA ต่ำ ก็จะเลือกเซลล์ในหลุมนั้นไปทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวต่อไป

3.3.9.6 การทำเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยว (cloning) โดยวิธี limiting dilution (Harrow และ Lane, 1988)

นำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนมานับเซลล์แล้วเจือจางใน HT medium ให้มีความเข้มข้นที่ต้องการในจานชนิด 96 หลุมโดยให้ความเข้มข้นเซลล์แต่ละหลุมมีประมาณ 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, และ 0.25 เซลล์ต่อหลุม (จำนวนเซลล์ 0.5 และ 0.25 เซลล์ต่อหลุมเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณ) นำไปเพาะเลี้ยงไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO_2 ประมาณ 14 วัน โดยต้องตรวจติดตามเซลล์เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่เกิดจากหลุมในความเข้มข้น 1 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์เจริญได้ 1/2 ของพื้นที่ก้นหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีเซลล์เริ่มต้น 1 เซลล์ ไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งหนึ่งโดยวิธี indirect ELISA ก่อนนำเซลล์ที่ให้ผลบวกกับการทำ indirect ELISA มา ทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 แล้วเก็บเซลล์นั้นมา ทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาเพียง 1 โคลนเท่านั้น

3.3.10 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาอย่างถาวร

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่อยู่ในช่วง Exponential phase ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ hybrid medium ที่มี 10% FCS มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง และเติมน้ำยาแช่แข็งเซลล์ที่มี 10% DMSO ขณะเย็นลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปตต์เป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ ก่อนถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงย้ายลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส

3.3.11 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บอย่างถาวรแล้วกลับมาเลี้ยงใหม่

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาออกมาจากการเก็บในไนโตรเจนเหลว หรือตู้แช่ –70 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายหมดแล้วให้ถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ hybrid medium อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์ hybrid medium ที่มี 20% FCS ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายเซลล์ทุกๆ 2-3 วันเมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด

3.3.12 การหาความเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสมเพื่อนำความเจือจางนี้ไปใช้ในการทดสอบต่อไป

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นสูง เมื่อนำไปใช้ทดสอบโดยวิธี ELISA จะทำให้สัญญาณอิ่มตัวและเป็นการสิ้นเปลืองแอนติบอดี จึงต้องหาความเจือจางที่เหมาะสมเพื่อนำความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป การหาความเจือจางทำโดยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย PBS แบบ two-fold-dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1:2 – 1:2000 แล้วทำการทดสอบเหมือนในข้อ 3.3.7 โดยเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางแทนซีรัมหนู

3..3.13 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.3.13.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยชุดทดสอบ (isotiping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยเตรียม Isotyping specific antibody ชนิด IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA และ IgM มาทำการเจือจางใน PBS ให้ได้ความเจือจาง 1:1000 นำไปเติมในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (pH 7.4) ที่มี 0.05% Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ ซึ่งจำเพาะต่อ Fab (HPR-Rabbit anti-mouse IgG (Fab specific)) ที่เจือจาง 1:600 ใน PBS-T หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำจานชนิด 96 หลุมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย OPD และ H_2O_2 ละลายใน citrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หยุด

ปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 2.5 M H_2SO_4 หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมไปวัดค่าดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microtiterplate reader

3.3.13.2 ทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้นได้จากการฉีดการกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนที่ถูกเชื่อมต่อด้วยโปรตีน ดังนั้นจึงต้องทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระหรือไม่ โดยวิธี competitive indirect ELISA โดยเตรียมสารโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางด้วย PBS โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.7 โดยเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผสมกับโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆลงไปแทนซีรัมหนู จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ใส่ลงไปจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และเปอร์เซนต์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของ ELISA ที่ลดลงที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่จุดต่าง ๆ ($\%B/B_0$) โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 4.0 ดัดแปลงจากวิธีของ Bucknall และคณะ 2003 แล้วจึงหาค่า IC_{50} จากกราฟ (เมื่อ B_0 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ของ ELISA ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน, B = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรของ ELISA ที่มีโพรเจสเทอโรนความเข้มข้นต่าง ๆ, IC_{50} คือ ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ทำให้ $\%B/B_0$ = 50)

3.3.13.3 การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรเจสเทอโรน

เพื่อตรวจสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารในกลุ่มที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายโพรเจสเทอโรน ได้แก่ อัลโดสเทอโรน, คลอเลสเทอรอล, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟ่าไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน จึงทำการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA โดยเตรียมสารทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอล

แอนติบอดีที่เจือจางด้วย PBS โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.7 และหาค่า IC_{50} วิธีเดียวกับในข้อ 3.3.12.2

3.3.13.4 การทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารนอกกลุ่ม

เพื่อดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนสามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์หรือไม่ ซึ่งสารนอกกลุ่มที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ เพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และซัลบูทามอล โดยวิธี competitive indirect ELISA โดยเตรียมสารทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางด้วย PBS โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วทำการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.7 และหาค่า IC_{50} วิธีเดียวกับในข้อ 3.3.12.2

3.3.13.5 หาค่าเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารตัวอื่นที่ไม่ใช่โพรเจสเทอโรน

$$\text{เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของโพรเจสเทอโรน}}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}} \times 100$$

3.3.13.6 การทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

เพื่อดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน จะสามารถจับกับโพรเจสเทอโรนได้ที่ปริมาณน้อยที่สุดเท่าใดโดยบอกเป็นค่า LOD ซึ่งหาได้จากผลการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรน ซึ่งค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนต่ำสุดที่ทำให้ค่า $\%B/B_0$ เริ่มแปรผกผันกับความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่แย่งจับ

3.3.14 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.3.14.1 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว จึงเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนที่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ และมีค่า LOD ต่ำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hybrid medium ที่มี 10 % FCS ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเซลล์มีสีเหลืองซึ่งจะมีปริมาณแอนติบอดีสูง จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3.3.14.2 การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ

โปรตีน เอ เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของ *Staphylococcus aureus.* โปรตีน เอ สามารถเกิดอันตรกิริยากับแอนติบอดีโดยมีสัมพรรคภาพสูงที่ค่า pH 8.0 เมื่อค่า pH ต่ำลง อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน เอ กับแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพต่ำลง จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกได้โดยวิธีการดังนี้

ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.3.14.2 ให้เท่ากับ 8.1 โดยใช้ Tris buffer 1 M, pH 9.0 แล้วเติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที (โปรตีน เอ 1 โมเลกุล สามารถจับกับแอนติบอดีได้ 2 โมเลกุล) ล้างคอลัมน์ด้วย phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ citrate buffer 0.1 M, pH 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ pH สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 8.0 โดยใช้ Tris buffer 1 M, pH 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ (Hudson และ Hay, 1980)

นำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

3.3.14.3 การหาปริมาณแอนติบอดี

หาปริมาณแอนติบอดีตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ไดแอไลซ์แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี (IgG)(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{extinction coefficient ของ IgG}}$$

<u>หมายเหตุ</u> ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่า 1.35

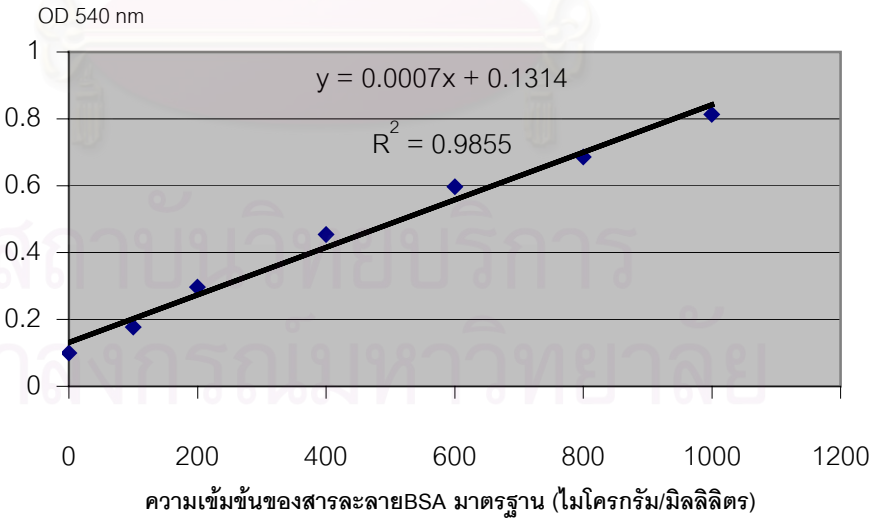
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนด้วยวิธี BCA assay

จากการหาปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ โดยนำมาเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:10, 1:5 และไม่เจือจาง แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ จากค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ดังแสดงในรูปที่ 4.1 โดยใช้เครื่อง Microtiterplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พบว่า สารละลายโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนที่อัตราส่วน 1:5 และไม่เจือจาง มีค่า การดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.206 และ 0.616 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณกลับไปเป็นปริมาณโปรตีนพบว่า BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนมีปริมาณโปรตีน เท่ากับ 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนที่อัตราการเจือจางต่าง ๆ และปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้

อัตราการเจือจางของโปรตีน ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน	ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีนที่หาได้ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
ไม่เจือจาง	0.616	692
1:5	0.206	533
เฉลี่ย		613

4.2 ผลการหาเปอร์เซ็นต์การจับของโพรเจสเทอโรนต่อ BSA โดยวิธี TNBS

จากการหาปริมาณหมู่เอมีนของ BSA ในรูปอิสระ และBSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน คาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยวิธี TNBS แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Microtiterplate reader ที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร พบว่าสารละลายโปรตีน BSA ในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร เท่ากับ 1.14 และ 2.28 ตามลำดับ ส่วนสารละลาย BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร เท่ากับ 0.28 และ 0.39 ตามลำดับ ซึ่งสามารถหาเปอร์เซ็นต์โดยเฉลี่ยของการจับระหว่างโปรตีน BSA กับโพรเจสเทอโรน เท่ากับ 79.32 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 4.2

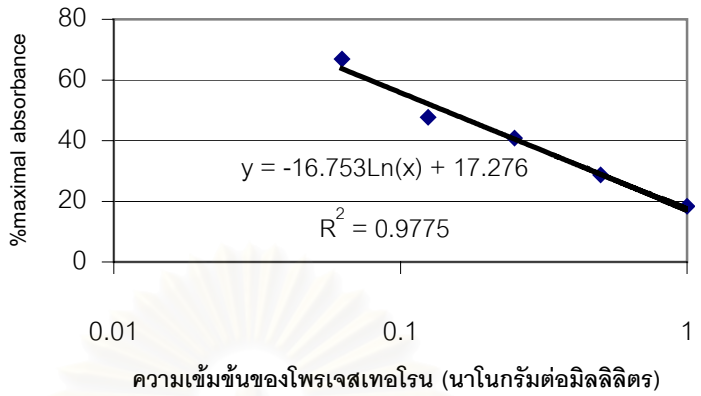
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีน BSA ในรูปอิสระ และสารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเปอร์เซ็นต์การจับระหว่างโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนBSA ในรูปอิสระ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมกับโพรเจสเทอโรน	เปอร์เซ็นต์การจับระหว่างโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน
250	1.14	0.28	75.66
500	2.28	0.39	82.98
เฉลี่ย			79.32

4.3 ผลการหาปริมาณโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA โดยใช้ชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica

จากการหาปริมาณโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยนำมาเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 แล้วนำไปหาความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนโดยใช้ชุดทดสอบ โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในรูปของ %maximal absorbance กับปริมาณโพรเจสเทอโรนมาตรฐาน ซึ่งกราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรน แสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า สารละลายโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ความเจือจาง 1:1,000, 1:10,000 และ 1:100,000 มีค่า %maximal absorbance เท่ากับ 9.44, 31.83 และ 54.13 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณกลับไปเป็นปริมาณโพรเจสเทอโรนมีค่าเท่ากับ 7.6 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรน โดยชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่หาได้จากชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica

ความเจือจางของ P3cmo-BSA	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	%maximal absorbance	ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนจากกราฟ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นจริงของโพรเจสเทอโรน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1:1,000	0.19	9.44	-	-
1:10,000	0.46	31.83	0.42	4.2
1:100,000	0.73	54.13	0.11	11
เฉลี่ย				7.6

จากการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์เข้ากับ BSA ได้สารละลายปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากการเชื่อมต่อจะได้สาร 2 ชนิดคือ BSA และ โพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA จากผลการหาปริมาณโปรตีนในข้อ 1 ได้เท่ากับ 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณโปรตีนของ BSA และ โพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อม

ต่อกับ BSA เมื่อหาเปอร์เซ็นต์การจับระหว่าง BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนได้เท่ากับ 79.32 เปอร์เซนต์ หากคิดว่าเปอร์เซ็นต์การจับกันที่ได้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ และ BSA ดังนั้นปริมาณ BSA ในโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA จึงเท่ากับ 487 ไมโครกรัม และปริมาณโพรเจสเทอโรนที่หาได้จากข้อ 3 เท่ากับ 7.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากโพรเจสเทอโรนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 387.5 และ BSA มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66,000 ดังนั้นสัดส่วนโมลระหว่างโพรเจสเทอโรนและ BSA ในโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA มีค่าเท่ากับ 2.7 : 1

4.4 ผลการตรวจหาปริมาณแอนติบอดี ในซีรัมหนู โดยการทำ indirect ELISA

หลังจากกระตุ้นหนูทดลองทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA (17αP-BSA) จำนวน 3 ตัว

กลุ่มที่ 2 กระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA (P3cmo-BSA) จำนวน 2 ตัว

โดยหลังจากกระตุ้นหนูครั้งที่ 4 แล้ว 7 วัน จึงเก็บซีรัมของหนูแต่ละตัวมาตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ของซีรัมหนูทั้ง 5 ตัว แสดงในตารางที่ 3 พบว่าหนูทั้ง 5 ตัว มีไตเตอร์ของแอนติบอดีดังแสดงในตารางที่ 4.4 และตารางที่ 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect ELISA ของแอนติบอดีในซีรัมหนู

ความเจือจางของแอนติบอดีในซีรัม	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร									
	หนูตัวที่ 1		หนูตัวที่ 2		หนูตัวที่ 3		หนูตัวที่ 4		หนูตัวที่ 5	
	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ 17αP-BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ 17αP-BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ 17αP-BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ P3cmo-BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือ P3cmo-BSA	แอนติเจนที่ใช้ตรึงคือBSA
1:1,000	2.254	0.433	2.853	0.633	2.821	0.278	2.654	1.120	2.499	1.100
1:2,000	1.375	0.218	1.926	0.480	2.121	0.178	2.592	0.420	2.552	0.640
1:4,000	0.637	0.125	1.294	0.195	1.274	0.118	2.432	0.302	2.351	0.321
1:8,000	0.388	0.091	0.660	0.145	0.715	0.085	2.208	0.298	2.012	0.241
1:16,000	0.245**	0.070**	0.540	0.094	0.442	0.076	1.360	0.214	1.812	0.211
1:32,000	0.118	0.052	0.248**	0.054**	0.218**	0.058**	0.928	0.175	1.178	0.185
1:64,000	0.085	0.055	0.142	0.058	0.126	0.054	0.714	0.142	0.842	0.125
1:128,000	0.054	0.049	0.098	0.049	0.075	0.061	0.468	0.086	0.674	0.097
1:256,000	0.052	0.051	0.075	0.052	0.064	0.064	0.275**	0.076**	0.452	0.064
1:512,000							0.195	0.068	0.298**	0.066**
C-	0.078	0.065	0.059	0.064	0.087	0.065	0.067	0.069	0.057	0.049

หมายเหตุ C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน , ** คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ที่นำมาหาค่าไตเตอร์ของหนูแต่ละตัว

ตารางที่ 4.5 ค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี ของหนูทดลองทั้ง 5 ตัว หลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 4

หนูทดลอง	แอนติเจนที่ใช้ตรึง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร	แอนติบอดีไตเตอร์
หนูตัวที่ 1	17αP-BSA	0.245	1:16,000
หนูตัวที่ 2	17αP-BSA	0.248	1:32,000
หนูตัวที่ 3	17αP-BSA	0.218	1:32,000
หนูตัวที่ 4	P3cmo-BSA	0.275	1:256,000
หนูตัวที่ 5	P3cmo-BSA	0.298	1:512,000

4.5 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยการทำ competitive indirect ELISA

ในการฉีดกระตุ้นหนูใช้แอนติเจน คือ สารละลายโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน ดังนั้นร่างกายของหนูจึงสร้างพอลิโคลนอลแอนติบอดีต่อทั้ง สารละลายโปรตีน BSA, โพรเจสเทอโรน และบริเวณรอยต่อระหว่างโปรตีนและโพรเจสเทอโรน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบว่าหนูทดลองสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนหรือไม่ เพราะหากในซีรัมหนูมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน แสดงว่าบี-ลิมโฟไซต์ของหนูจะมีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน เมื่อนำบี-ลิมโฟไซต์ของหนูมาเชื่อมรวม จึงมีโอกาสได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง โดยทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี competitive indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีในซีรัมจากหนูตัวที่ 1 2 และ 3 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย 17αP-BSA ไม่จับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ผสมอยู่ เมื่อเติมลงในหลุมที่มีสารละลาย 17αP-BSA เคลือบอยู่ทำให้แอนติบอดีจับกับ17αP-BSA ได้ เมื่อเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ลงไปจึงจับกับแอนติบอดีได้เท่าเดิม ปรากฏสีคงเดิม ส่วนซีรัมจากหนูตัวที่ 4 และ 5 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วย P3cmo-BSA สามารถจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ผสมอยู่ เมื่อเติมลงในหลุมที่มีสารละลาย P3cmo-BSA เคลือบอยู่ทำให้แอนติบอดีจับกับ P3cmo-BSA ได้น้อยลง เมื่อเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ลงไปจึงจับกับแอนติบอดีได้เท่าน้อยลง ปรากฏสีจางลง ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของแอนติบอดีในซีรัมหนู

หนูทดลอง	แอนติเจนที่ใช้ตรึง	การดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร		
		ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนรูปอิสระที่แย่งจับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
		0	10	100
หนูตัวที่ 1	17αP-BSA	1.259	1.195	1.246
หนูตัวที่ 2	17αP-BSA	1.175	1.098	1.138
หนูตัวที่ 3	17αP-BSA	0.942	0.956	0.962
หนูตัวที่ 4	P3cmo-BSA	1.387	0.412	0.102
หนูตัวที่ 5	P3cmo-BSA	1.259	0.654	0.211
C-		0.059		

หมายเหตุ C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

4.6 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมา

4.6.1 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมาครั้งที่ 1 (fusion 1)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 1 ที่ฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSAหลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุมจำนวน 5 จาน (480หลุม) ด้วย HAT medium สังเกตการเจริญของเซลล์ในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมา มีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสงเซลล์ไมอีโลมาและเซลล์ม้าม ที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะตายเกือบหมด หลังจากผ่านไปประมาณ 15 วัน เมื่อส่องดูกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับจะเห็นเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุม โดยพบเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมทั้งหมด 322 หลุม จึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำมาตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนโดยวิธี indirect ELISA พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนจากจานชนิด 96 หลุมทั้งหมด 24 หลุม และเมื่อทำการแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยว (single cell) โดยทำการโคลนเซลล์ซ้ำ 3 ครั้ง ได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดเดียวกันที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนจำนวน 2 โคลน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ 4.8

4.6.2 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมาครั้งที่ 2 (fusion 2)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 2 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 2 ที่ฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA หลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุมจำนวน 5 จาน (480หลุม) ด้วย HAT medium เมื่อเลี้ยงเซลล์ได้ 1 วันตรวจดูอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์พบว่าสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนจากสีชมพูไปเป็นสีเหลือง เมื่อส่องดูกล้องจุลทรรศน์ เห็นเซลล์ตายเป็นจุดดำ ๆ กระจายทั่วไปไม่มากนัก จึงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยดูดอาหารเก่าออก และใส่อาหารใหม่เข้าไป จากนั้น 1 วัน พบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นในการหลอมรวมเซลล์ครั้งนี้จึงไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมา

4.6.3 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมาครั้งที่ 3 (fusion 3)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 3 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 3 ที่ฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA หลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุมจำนวน 5 จาน (480หลุม) ด้วย HAT medium โดยหลังจากเลี้ยงเซลล์ได้ 2 วัน เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ขนาดเล็ก ๆ กระจายทั่วหลุม ไม่พบโคโลนีของไฮบริโดมา หลังจากเลี้ยงเซลล์ได้ 7 วัน เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ขนาดเล็ก ๆ กระจายเกือบเต็มหลุม ซึ่งเซลล์เล็ก ๆ เหล่านี้สามารเจริญเติบโตใน HAT medium ได้ เพราะเมื่อเลี้ยงไป 2-3 วัน สีของอาหารเลี้ยงเซลล์จะเปลี่ยนจากสีชมพูไปเป็นสีเหลืองอมส้ม หลังจากเลี้ยงเซลล์ได้ 10 วัน เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ขนาดเล็ก ๆ กระจายเต็มหลุม จึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนของหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำมาตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนจาก จานชนิด 96 หลุมทั้งหมด 86 หลุม จึงย้ายเซลล์จากหลุมใน 96 wells plate ไปยังจานชนิด 24 หลุม และเลี้ยงเซลล์ด้วย HT medium จากนั้น 1 วัน ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์เล็ก ๆ เหล่านั้นตายหมด ดังนั้นในการหลอมรวมเซลล์ครั้งนี้จึงไม่ได้เซลล์ไฮบริโดมา

4.6.4 ผลการหลอมรวมเซลล์ม้ามเข้ากับเซลล์ไมอีโลมาครั้งที่ 4 (fusion 4)

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 4 ที่ฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA หลังจากการหลอมรวมเซลล์แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ในจานชนิด 96 หลุม จำนวน 5 จาน (480หลุม) ด้วย HAT medium โดยทุก 2- 3 วันและ สังเกตเซลล์ในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมา มีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสงเซลล์ไมอีโลมาและเซลล์ม้าม ที่ไม่ถูกหลอมรวมเป็นเซลล์ไฮบริโดมาจะตายเกือบหมด หลังจากผ่านไปประมาณ 15 วัน เมื่อส่องดูกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณครึ่งของพื้นที่ก้นหลุม โดยพบเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมทั้งหมด 128 หลุม จึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนของหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำมาตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน โดยวิธี indirect ELISA พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนจาก จานชนิด 96 หลุมทั้งหมด 36 หลุม และเมื่อทำการแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยทำการโคลนเซลล์ซ้ำ 3 ครั้ง จะได้เซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดเดียวกันที่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน จำนวน 10 โคลน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ 4.8

ตารางที่ 4.7 อัตราส่วนเซลล์ไฮบริโดมาและหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง ภายหลังการหลอมรวมเซลล์ทั้ง 4 ครั้ง

การหลอมรวมเซลล์ครั้งที่	หนูตัวที่	จำนวนหลุมทั้งหมด	อัตราส่วนที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา		อัตราส่วนของหลุมที่ให้ผลบวก	
			จำนวนหลุมที่ได้เซลล์ไฮบริโดมา	เปอร์เซ็นต์ (%)	จำนวนหลุมที่ให้ผลบวกในการคัดกรอง	เปอร์เซ็นต์ (%)
1	1	480	322	67.1	2	0.42
2	2	480	0	0	0	0
3	3	480	86	17.9	0	0
4	4	480	128	26.7	10	2.08

ตารางที่ 4.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect ELISA ของอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่นำมาคัดเลือกแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	แอนติเจนที่ใช้ตรึง	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร ของการโคลนเซลล์		
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	2/A3-F1	17αP-BSA	1.586	1.498	1.595
2	3/F7-F1	17αP-BSA	1.478	1.523	1.479
3	1/B10-F4	P3cmo-BSA	2.542	2.469	2.512
4	2/A3-F4	P3cmo-BSA	2.675	2.712	2.698
5	3/C9-F4	P3cmo-BSA	2.685	2.692	2.549
6	3/D7-F4	P3cmo-BSA	2.489	2.529	2.612
7	3/E4-F4	P3cmo-BSA	2.845	2.795	2.798
8	3/F7-F4	P3cmo-BSA	2.432	2.523	2.402
9	4/E11-F4	P3cmo-BSA	2.795	2.852	2.756
10	5/G7-F4	P3cmo-BSA	2.625	2.495	2.563
11	5/H2-F4	P3cmo-BSA	1.012	1.115	1.122
12	5/H8-F4	P3cmo-BSA	2.625	2.595	2.665
	C-		0.059	0.062	0.066
	C+		1.987	2.021	1.995

หมายเหตุ C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

C+ คือ ซีรัมหนูจากเลือดหัวใจหลังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA 4 ครั้ง

4.7 ผลการหาระดับการเจือจางของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เหมาะสม

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นมากเมื่อนำไปใช้ทดสอบทาง ELISA จะทำให้เกิดการอิ่มตัวของสัญญาณและเป็นการสิ้นเปลืองแอนติบอดี จึงต้องหาความเจือจางที่เหมาะสมเพื่อนำความเจือจางที่ได้นี้ไปใช้สำหรับ

การทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป การหาความเจือจางทำโดยวิธี indirect ELISA โดยจะเลือกความเจือจางที่ให้ค่าการดูดแสงที่ 492 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1 ซึ่งผลที่ได้พบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ซึ่งมีรหัส 2/A3-F1 และ 3/F7-F1 สร้างแอนติบอดีมีค่าความเจือจางที่เหมาะสม คือ 1:8 เท่า และ 1:16 เท่า ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ซึ่งมีรหัส 1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4 , 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8 -F4 สร้างแอนติบอดีมีค่าความเจือจางที่เหมาะสม คือ 1:64 เท่า, 1:800 เท่า, 1:800 เท่า, 1:400 เท่า, 1:800 เท่า, 1:256 เท่า, 1:1,600 เท่า, 1:800 เท่า, 1:2 เท่า และ 1:800 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ indirect ELISA ของแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ที่ความเจือจางต่าง ๆ

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร										
		ความเจือจางของแอนติบอดี										
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:400	1:800	1:1,600
1	2/A3-F1	1.628	1.396	0.964**	0.797	0.684	0.478	0.359				
2	3/F7-F1	1.498	1.280	1.016	1.031**	0.419	0.312	0.353				
3	1/B10-F4	2.565	2.264	2.022	1.643	1.327	0.919**	0.701	0.511			
4	2/A3-F4	2.742	2.550	2.624	2.585	2.526	2.270	1.913	1.439	1.312	1.002**	0.658
5	3/C9-F4	2.705	2.523	2.569	2.606	2.532	2.286	1.609	1.380	1.158	0.892**	0.485
6	3/D7-F4	2.789	2.588	2.458	2.324	2.247	1.954	1.729	1.176	0.948**	0.642	0.441
7	3/E4-F4	2.898	2.642	2.621	2.524	2.215	2.105	1.856	1.773	1.287	0.958**	0.542
8	3/F7-F4	2.602	2.416	2.460	2.202	1.993	1.689	1.177	0.864**			
9	4/E11-F4	2.857	2.561	2.690	2.770	2.601	2.549	2.300	2.060	1.828	1.300	0.898**
10	5/G7-F4	2.710	2.649	2.655	2.545	2.512	2.121	1.868	1.459	1.359	0.951**	0.423
11	5/H2-F4	1.015	0.630**	0.271	0.148	0.110	0.076	0.063	0.051			
12	5/H8-F4	2.786	2.655	2.621	2.521	2.462	2.329	1.858	1.333	1.265	0.924**	0.771
	C-	0.064										

หมายเหตุ C- คือ ซีรัมหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน, ** คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรที่นำมาหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดี

4.8 ผลการศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่คัดเลือก

4.8.1 ผลการหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 ซึ่งมีรหัส 2/A3-F1 และ 3/F7-F1 มี ไอโซไทป์เป็น IgG3 สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 ซึ่งมีรหัส 5/H8-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F1, 4/E11-F4 และ 3/F7-F4 มี ไอโซไทป์ เป็น IgG1 ส่วน5G7/-F4 และ 3/D7-F4 มี ไอโซไทป์ เป็น IgG2a และ 3/E4-F4, 1/B10-F4 และ 5/H2 มีไอโซไทป์เป็น IgG2b, IgG3 และ IgM ตามลำดับ ในการทดสอบ indirect ELISA เพื่อคัดกรองหาโมโนโคลนอลแอนติบอดีใช้แอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อส่วน heavy chain ของ mouse IgG ซึ่งเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นแอนติบอดีทุติยภูมิที่ใช้นี้จึงอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกับ mouse IgM ทำให้ในการคัดกรองได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์เป็น IgM ติดมา ดังแสดงผลในตารางที่ 4.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากชุดทดสอบ Isotyping kit ของ บริษัทSigma

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร						
		Immunoglobulin ไอโซไทป์						
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	สรุป
1	2/A3-F1	0.092	0.106	0.190	0.694	0.101	0.166	IgG3
2	3/F7-F1	0.094	0.103	0.139	0.709	0.103	0.164	IgG3
3	1/B10-F4	0.051	0.048	0.079	0.990	0.048	0.085	IgG3
4	2/A3-F4	0.541	0.076	0.086	0.092	0.064	0.085	IgG1
5	3/C9-F4	0.709	0.104	0.087	0.076	0.047	0.069	IgG1
6	3/D7-F4	0.072	0.727	0.081	0.092	0.044	0.080	IgG2a
7	3/E4-F4	0.064	0.051	1.820	0.147	0.051	0.085	IgG2b
8	3/F7-F4	0.541	0.074	0.083	0.086	0.047	0.076	IgG1
9	4/E11-F4	0.758	0.102	0.117	0.118	0.064	0.112	IgG1
10	5/G7-F4	0.052	0.993	0.090	0.089	0.044	0.081	IgG2a
11	5/H2-F4	0.052	0.056	0.087	0.087	0.050	0.468	IgM
12	5/H8-F4	0.742	0.076	0.085	0.179	0.048	0.132	IgG1
	IgG3 มาตรฐาน	0.192	0.344	0.405	1.329	0.166	0.298	IgG3

4.8.2 ผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

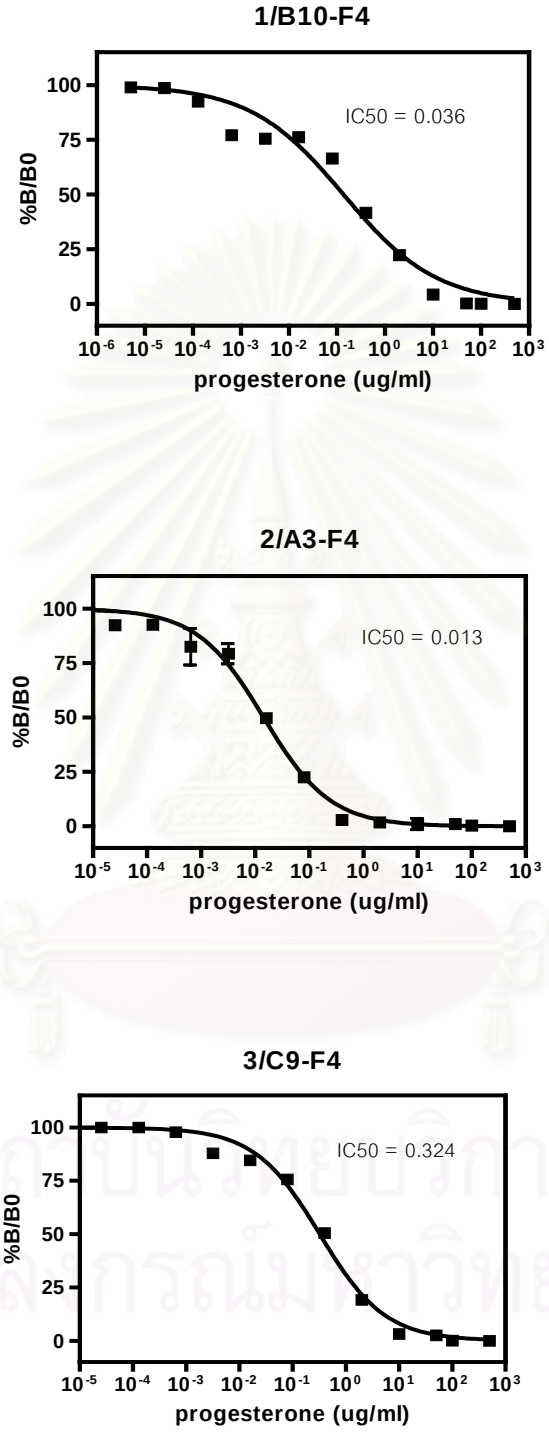
โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นั้น ได้จากการฉีดการกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนที่ถูกเชื่อมต่อด้วยโปรตีน ดังนั้นจึงต้องทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระหรือไม่ โดยวิธี competitive indirect ELISA ซึ่งผลที่ได้พบว่า เซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 1 รหัส 2/A3-F1 และ 3/F7-F1 สร้างแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะกับโพรเจสเทอโรน ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากในการหลอมรวมเซลล์ครั้ง 1 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 1 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อเข้ากับ BSA โดยหลังจาก

กระตุ้นครั้งที่ 4 แล้วได้นำพอลิโคลนอลแอนติบอดีในซีรัม มาหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางซีรัมหนูด้วย 0.5% BSA ใน PBS ซึ่งผลจากการทำ indirect ELISA โดยเคลือบเพลตด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA เปรียบเทียบกับที่เคลือบด้วย BSA พบว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูมีความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA (ผลการทดลองในข้อ 3) จึงได้ทำการหลอมรวมเซลล์ แต่เมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีในซีรัมมาหาความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีไม่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ (ผลการทดลองในข้อ 4) ซึ่งหมายความว่า บี-ลิโฟไซต์ของหนูไม่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ดังนั้นเมื่อนำบี-ลิโฟไซต์ มาทำการเชื่อมรวม จึงได้เซลล์ไฮบริโดมาที่ไม่สร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ซึ่งแอนติบอดีที่ไฮบริโดมาสร้างอาจไปจำเพาะกับเอพิโทปใหม่ที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีเข้ากับ BSA จึงทำให้ในการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีให้ผลบวกเนื่องจากในการทำ indirect ELISA จะเคลือบเพลตด้วยโพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีเที่เชื่อมต่อกับ BSA เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ในครั้งนี้ไม่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ดังนั้นจึงไม่ทำการศึกษาต่อในรายละเอียดของแอนติบอดีที่ได้นี้

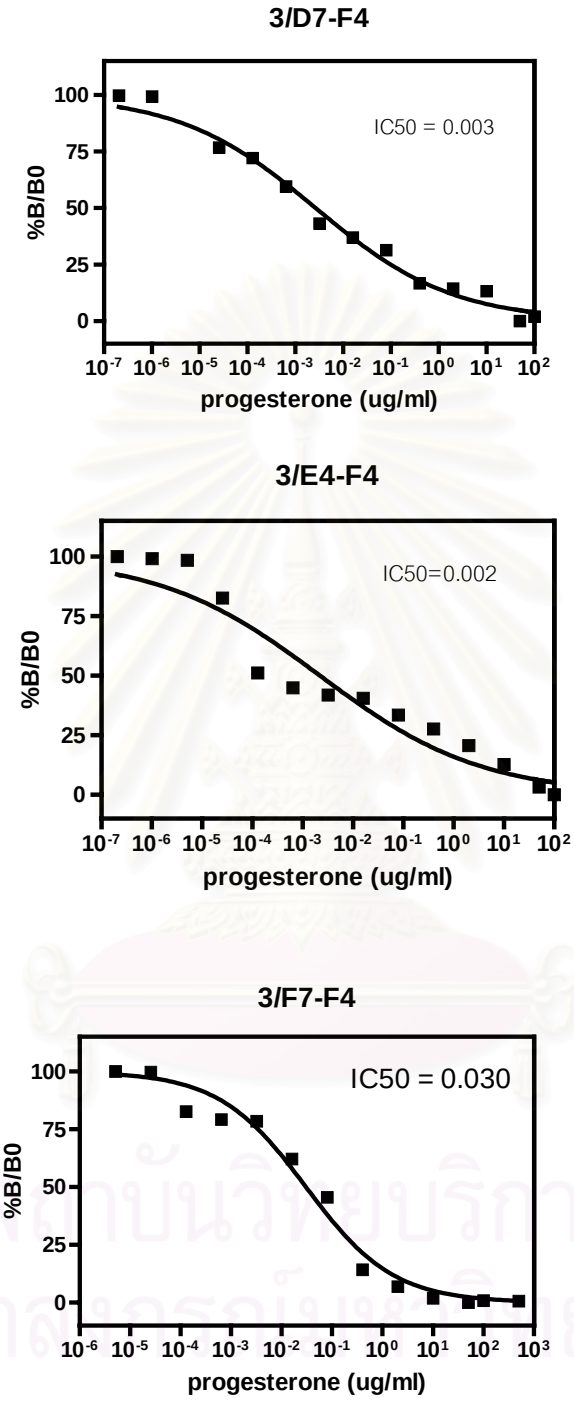
ส่วนเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ครั้งที่ 4 รหัส1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4 , 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8 -F4 สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโพรเจสเทอโรน ซึ่งในการหลอมรวมเซลล์ครั้ง 4 ใช้ม้ามจากหนูตัวที่ 4 ซึ่งฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยหลังจากกระตุ้นครั้งที่ 4 แล้วได้นำพอลิโคลนอลแอนติบอดีในซีรัม มาหาระดับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนโดยวิธี indirect ELISA เช่นเดียวกับหนูตัวที่ 1 โดยแอนติเจนที่ใช้เคลือบเพลตคือโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA เปรียบเทียบกับที่เคลือบด้วย BSA ว่า แอนติบอดีในซีรัมหนูมีความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA (ผลการทดลองในข้อ 3) และเมื่อนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีในซีรัม มาหาความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ พบว่าพอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ (ผลการทดลองในข้อ 4) ซึ่งหมายความว่า บี-ลิโฟไซต์ของหนูสร้างแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ดังนั้นเมื่อนำบี-ลิโฟไซต์มาทำการหลอมรวม จึงได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ซึ่งผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ โดยวิธี competitive indirect ELISA แสดงในตารางที่ 4.11 และ กราฟรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

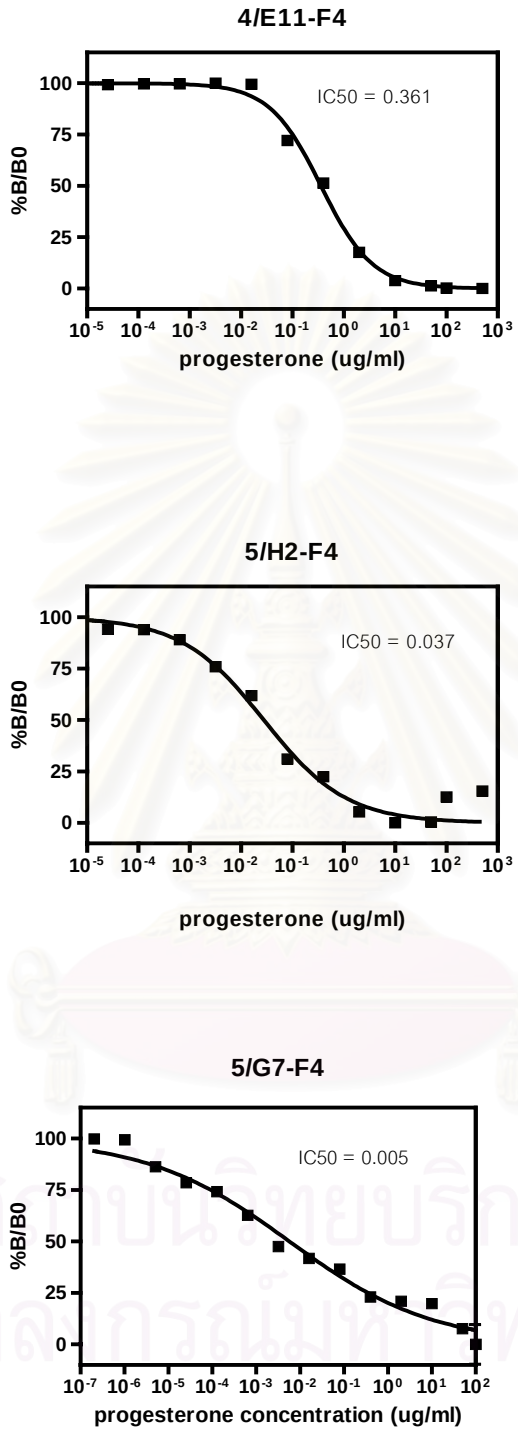
ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร													
		ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ใช้จับกับแอนติบอดี (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)													
		0	0.005	0.026	0.128	0.640	3.20	16	80	400	2,000	10,000	50,000	100,000	500,000
1	2/A3-F1	0.895	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.865	-	0.889	-
2	3/F7-F1	0.928	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.965	-	0.942	-
3	1/B10-F4	0.978	0.970	0.967	0.917	**0.791**	0.778	0.783	0.704	0.501	0.342	0.194	0.161	0.160	0.159
4	2/A3-F4	1.120	1.125	1.126	1.124	**1.015**	1.004	0.922	0.673	0.343	0.132	0.134	0.132	0.124	0.122
5	3/C9-F4	2.174	2.169	2.172	2.170	2.159	**1.927**	1.861	1.679	1.171	0.524	0.209	0.196	0.141	0.142
6	3/D7-F4	0.621	0.618	**0.507**	0.484	0.423	0.342	0.312	0.284	0.212	0.201	0.195	0.130	0.140	0.139
7	3/E4-F4	0.756	0.750	**0.655**	0.466	0.428	0.410	0.402	0.359	0.324	0.282	0.235	0.178	0.158	0.159
8	3/F7-F4	1.301	1.303	1.299	**1.100**	1.066	1.057	0.869	0.688	0.324	0.240	0.184	0.160	0.172	0.169
9	4/E11-F4	1.752	1.762	1.759	1.761	1.763	1.771	1.762	**1.314**	0.965	0.416	0.196	0.152	0.139	0.135
10	5/G7-F4	0.815	0.817	0.818	**0.705**	0.567	0.522	0.404	0.374	0.272	0.270	0.216	0.186	0.175	0.170
11	5/H2-F4	0.582	0.552	0.555	0.554	**0.531**	0.470	0.404	0.260	0.220	0.140	0.115	0.117	0.115	0.117
12	5/H8-F4	1.812	1.815	1.814	**1.725**	1.685	1.595	1.503	0.978	0.851	0.333	0.190	0.152	0.153	0.155



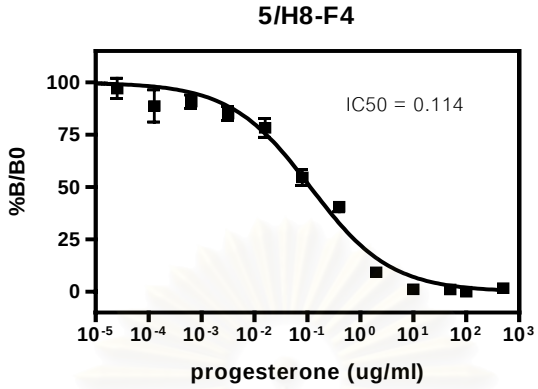
<u>รูปที่ 4.3</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4



<u>รูปที่ 4.3</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4 (ต่อ)



<u>รูปที่ 4.3</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4 (ต่อ)



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 1/B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7-F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4 (ต่อ)

จากกราฟในรูปที่ 4.3 สามารถหาค่า IC_{50} ต่อโพรเจสเทอโรนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนได้ดังตารางที่ 4.12

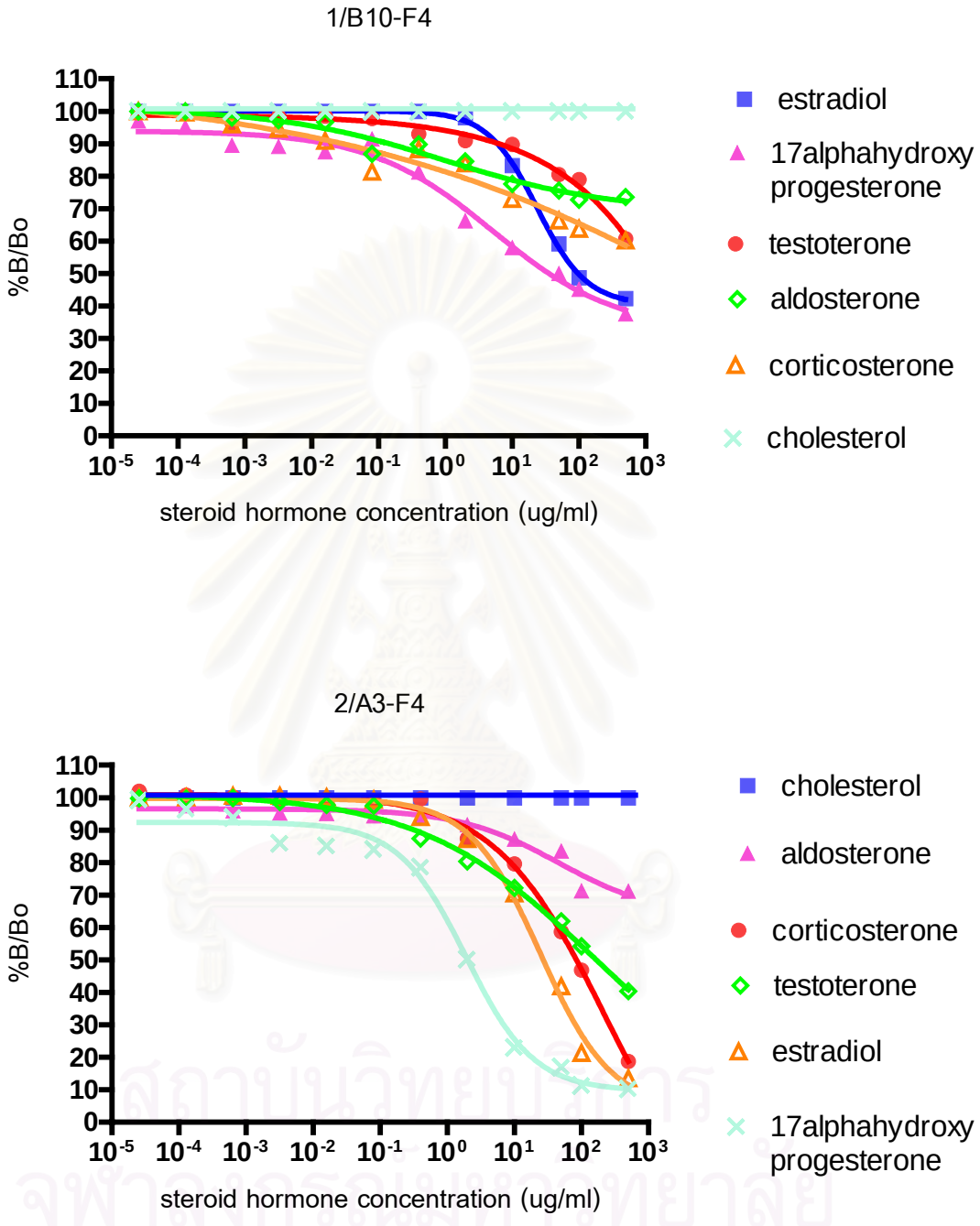
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 ค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

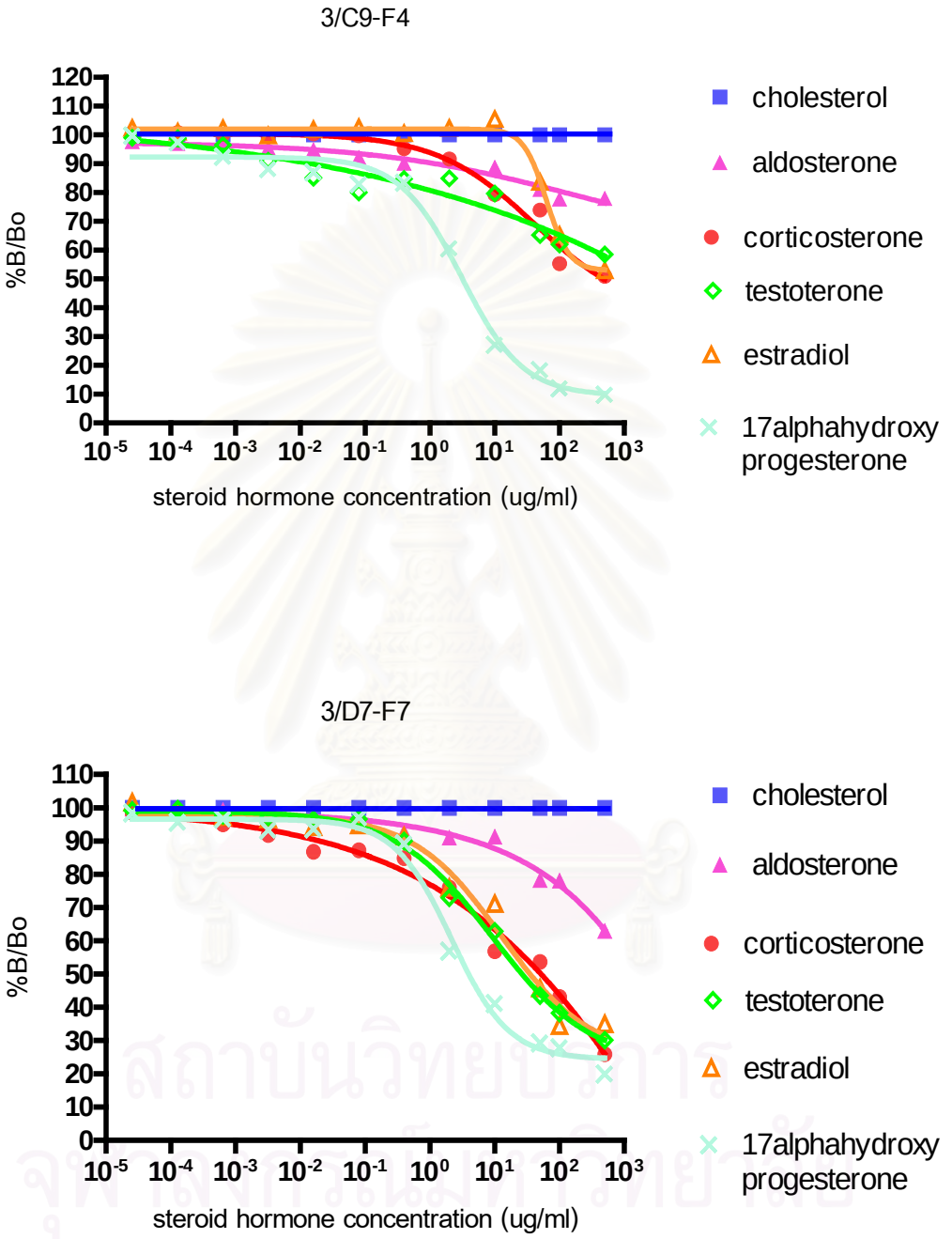
ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC_{50} ของโพรเจสเทอโรน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	1/B10-F4	0.036
2	2/A3-F4	0.013
3	3/C9-F4	0.324
4	3/D7-F4	0.003
5	3/E4-F4	0.002
6	3/F7-F4	0.030
7	4/E11-F4	0.361
8	5/G7-F4	0.005
9	5/H2-F4	0.037
10	5/H8-F4	0.114

4.8.3 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรเจสเทอโรน

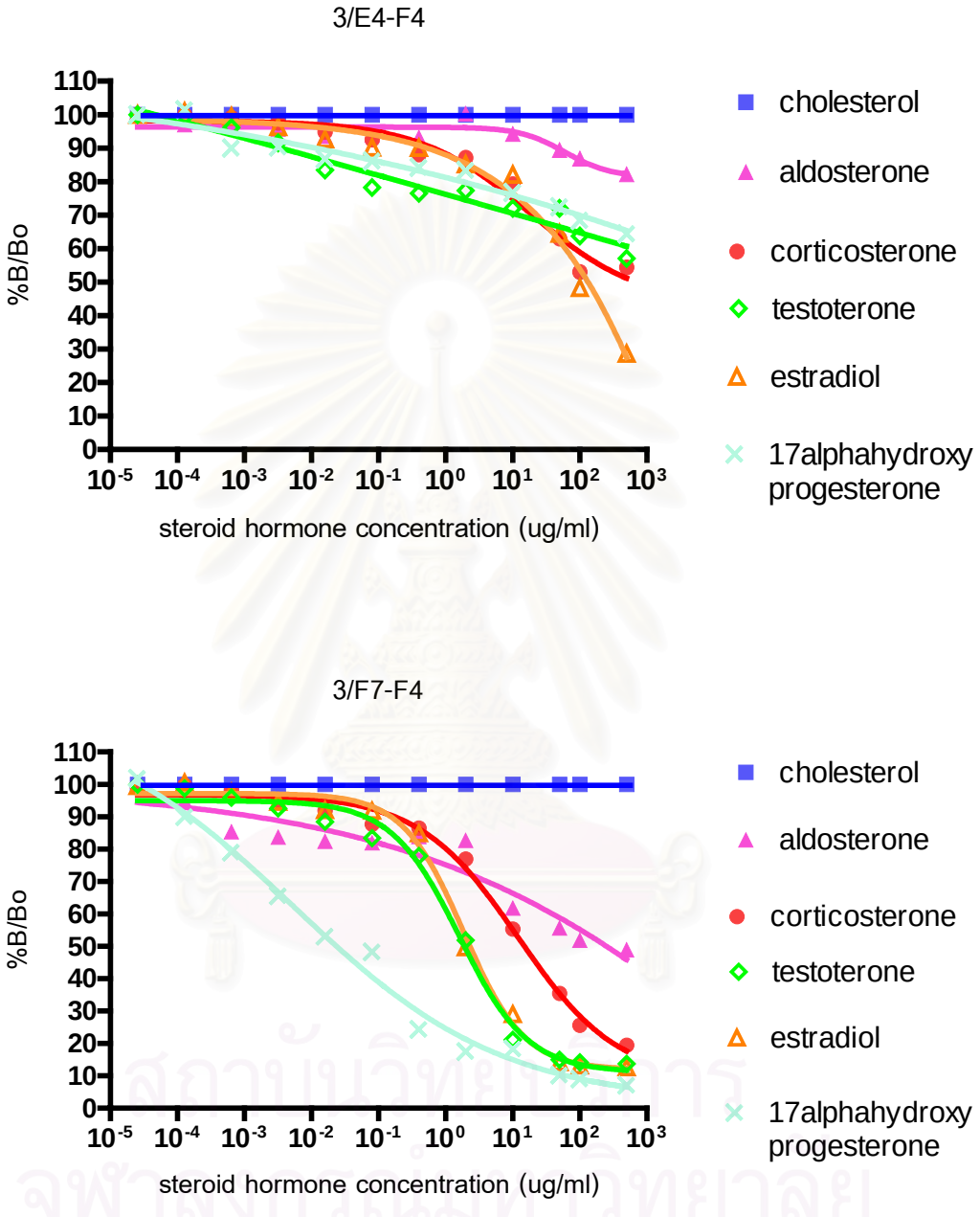
จากการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรเจสเทอโรน ได้แก่ แอลโดสเทอโรน, คอเลสเทอรอล, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ซึ่งผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรเจสเทอโรนทั้ง 6 ชนิด โดยวิธี competitive indirect ELISA แสดงเป็นค่า IC_{50} ดังตารางที่ 4.13 และ กราฟในรูปที่ 4.4



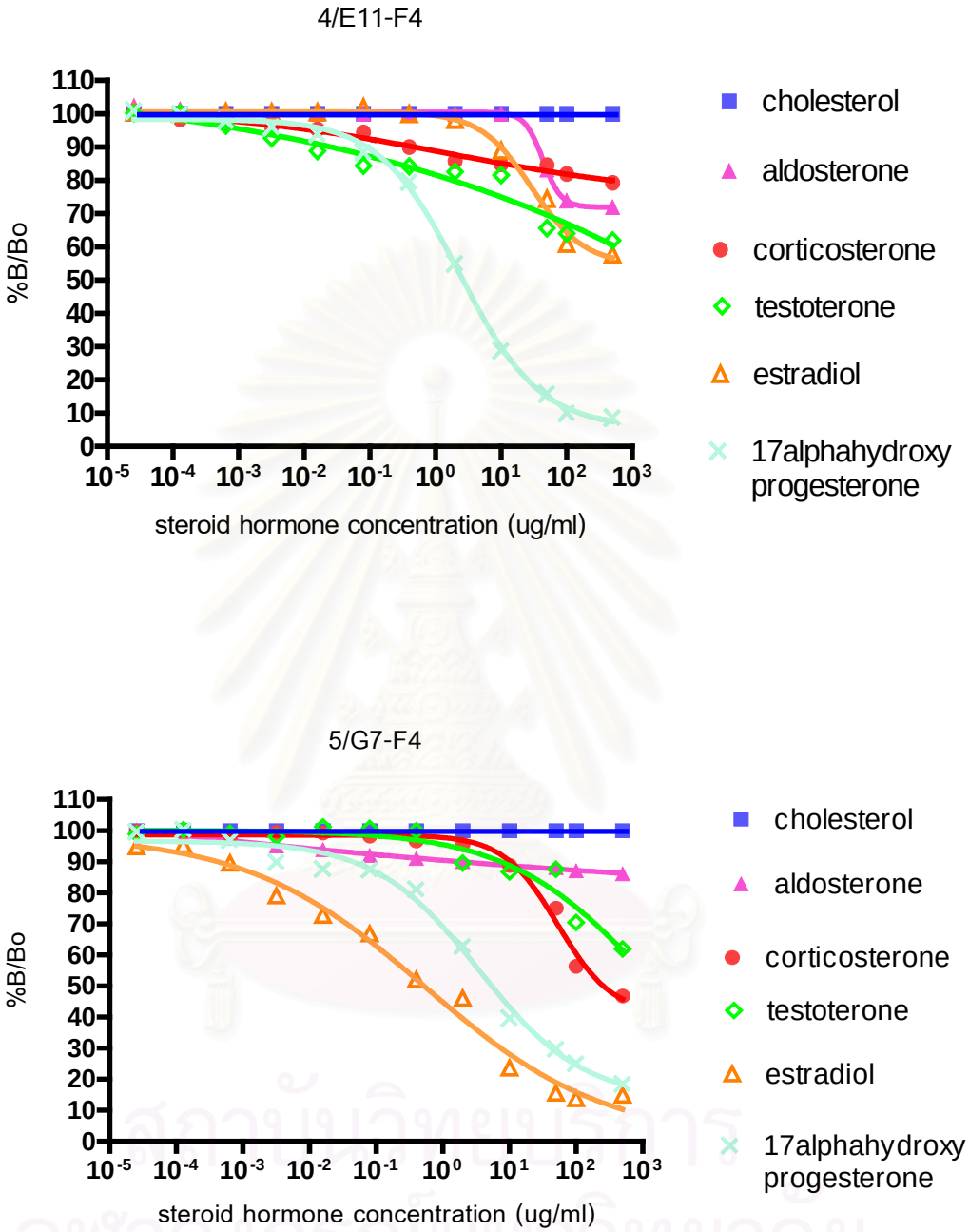
<u>รูปที่ 4.4</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน



<u>รูปที่ 4.4</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน (ต่อ)

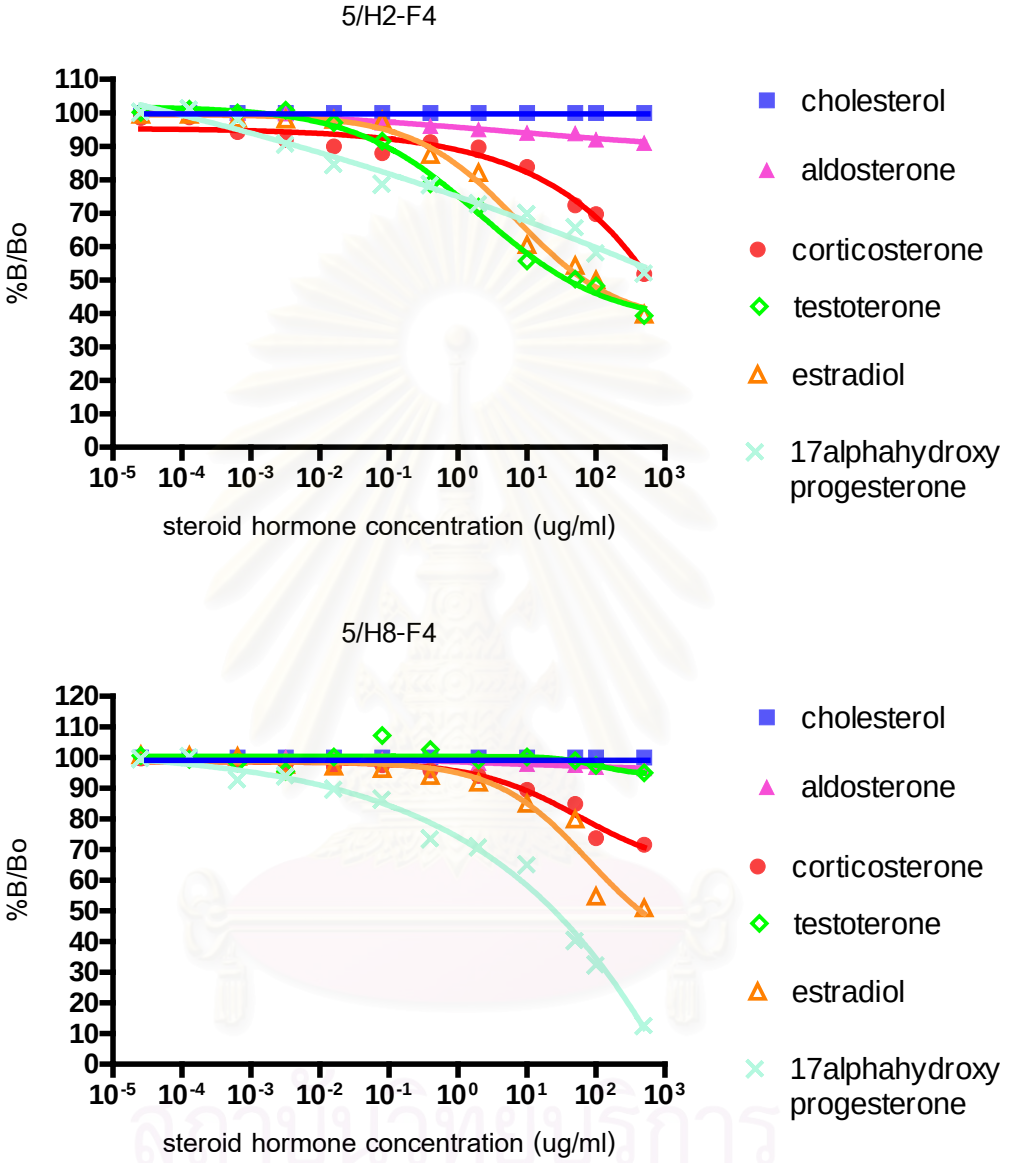


<u>รูปที่ 4.4</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %B/B_0 และความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน (ต่อ)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 4.4</u> กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %B/B_0 และความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน (ต่อ)



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\%B/B_0$ และความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และ เทสโทสเทอโรน ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน (ต่อ)

จากกราฟสามารถหาค่า IC_{50} ต่อคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนได้ดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ คอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
		คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
1	1/B10-F4	>500	>500	16.45	>500	>500	1.25
2	2/A3-F4	>500	>500	17.5	9.81	35.2	1.46
3	3/C9-F4	>500	>500	>500	>500	>500	1.99
4	3/D7-F4	>500	>500	5.49	5.58	5.98	2.39
5	3/E4-F4	>500	>500	6.40	>500	>500	>500
6	3/F7-F4	>500	0.51	1.58	1.11	5.70	0.02
7	4/E11-F4	>500	>500	>500	>500	>500	1.80
8	5/G7-F4	>500	>500	0.16	>500	38.55	2.03
9	5/H2-F4	>500	>500	5.41	0.08	>500	>500
10	5/H8-F4	>500	>500	>500	>500	>500	1.7

จากค่า IC_{50} ของโพรเจสเทอโรน และ IC_{50} ของคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน สามารถหาเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนได้ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อ คอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน – 17 แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรน

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม					
		คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
1	1/B10-F4	<0.1	<0.1	0.22	<0.1	<0.1	2.88
2	2/A3-F4	<0.1	<0.1	<0.1	0.13	<0.1	0.89
3	3/C9-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	16.28
4	3/D7-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.13
5	3/E4-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
6	3/F7-F4	<0.1	5.88	1.90	2.70	0.53	150
7	4/E11-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	20.06
8	5/G7-F4	<0.1	<0.1	3.12	<0.1	0.01	0.24
9	5/H2-F4	<0.1	<0.1	0.68	46.25	<0.1	<0.1
10	5/H8-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	6.70

4.8.4 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์

จากการทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม กับสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน , นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล ซึ่งผลการทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ทั้ง 4 ชนิด โดยวิธี competitive indirect ELISA แสดงเป็นค่า IC_{50} ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ค่า IC_{50} ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ เพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
		เพนิซิลลิน	เททราซัยคลิน	นอร์ฟลอกซาซิน	ซัลบูทามอล
1	1/B10-F4	>500	>500	>500	>500
2	2/A3-F4	>500	>500	>500	>500
3	3/C9-F4	>500	>500	>500	>500
4	3/D7-F4	>500	>500	>500	>500
5	3/E4-F4	>500	>500	>500	>500
6	3/F7-F4	>500	>500	>500	>500
7	4/E11-F4	>500	>500	>500	>500
8	5/G7-F4	>500	>500	>500	>500
9	5/H2-F4	>500	>500	>500	>500
10	5/H8-F4	>500	>500	>500	>500

จากค่า IC_{50} ของโพรเจสเทอโรน และ IC_{50} ของเพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล หาเปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ได้ดังตารางที่ 17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลน ต่อเพนิซิลลิน, เททราซัยคลิน, นอร์ฟลอกซาซิน และ ซัลบูทามอล

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	เปอร์เซ็นต์การทำปฏิกิริยาข้าม			
		เพนนิซิลิน	เททราซัยคลิน	นอร์ฟลอกซาซิน	ซัลบูทามอล
1	1/B10-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
2	2/A3-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
3	3/C9-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
4	3/D7-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
5	3/E4-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
6	3/F7-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
7	4/E11-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
8	5/G7-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
9	5/H2-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
10	5/H8-F4	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

4.8.5 ผลการทดสอบหาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน

จากกราฟในรูปที่ 4.3 สามารถหาค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนได้ดังตารางที่ 4.17

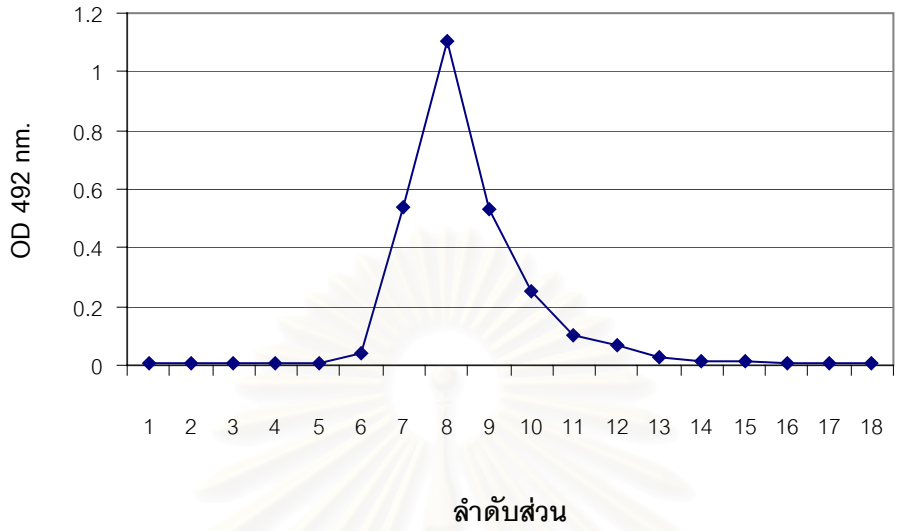
ตารางที่ 4.17 ค่า LOD ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนต่อโพรเจสเทอโรน

ลำดับที่	รหัสเซลล์ไฮบริโดมา	ค่า LOD (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	1/B10-F4	0.64
2	2/A3-F4	0.64
3	3/C9-F4	3.2
4	3/D7-F4	0.03
5	3/E4-F4	0.03
6	3/F7-F4	0.13
7	4/E11-F4	80
8	5/G7-F4	0.13
9	5/H2-F4	0.64
10	5/H8-F4	0.13

4.9 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่า โมโนโคลนอแอนติบอดีรหัส 3/D7-F4 ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ และมีค่า LOD ต่ำ จึงเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/D7-F4 มาทำให้บริสุทธิ์

จากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ เมื่อชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ แล้วเก็บสารละลายแต่ละหลอดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่า สารละลายในหลอดทดลองลำดับส่วนที่ 7, 8, 9 และ 10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.579, 1.103, 0.579 และ 0.292 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และสารละลายแต่ละลำดับส่วนที่ชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ

เมื่อนำสารละลายในหลอดทดลองลำดับส่วนที่ 7, 8, 9 และ 10 มารวมกันแล้วนำไปไดแอไลซ์ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.851 (สารละลายเจือจาง 1 ต่อ 10 เท่า) ซึ่งสามารถหาความเข้มข้นของแอนติบอดีได้เท่ากับ 6.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

หลังจากทำการเชื่อมโพรเจสเทอโรน (P3cmo) กับ BSA แล้ว เมื่อคิดเป็นปริมาณโปรตีนของสารโพรเจสเทอโรน ที่เชื่อมกับ BSA (P3cmo-BSA) ได้เท่ากับ 613 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อหาปริมาณโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมติดกับ BSA โดยใช้ชุดทดสอบ progesterone EIA ของบริษัท Euro-diagnostica ได้ปริมาณโพรเจสเทอโรนเท่ากับ 7.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคิดเป็นสัดส่วนโมลระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ BSA ในสารละลาย P3cmo-BSA มีค่าเท่ากับ 20.4:1 เมื่อหาเปอร์เซนต์การจับระหว่างโปรตีน BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรน เท่ากับ 79.32 และเมื่อนำ P3cmo-BSA ไปเคลือบ plate พบว่า มีค่าดูดกลืนที่ 492 นาโนเมตร แสดงว่าสามารถเชื่อมสารโพรเจสเทอโรน ติดกับ BSA

หลังจากฉีดกระตุ้นหนูด้วยสารโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมกับ BSA 2 ชนิด คือ โพรเจสเทอโรน-17แอลฟาไฮดรอกซีที่เชื่อมต่อกับ BSA (17αP-BSA) และ โพรเจสเทอโรนคาร์บอกซี เมทิลออกไซม์ที่เชื่อมต่อกับ BSA (P3cmo-BSA) แล้วนำเซลล์ม้ามของหนูมาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา โดยภายหลังการหลอมรวมทั้งหมด 4 ครั้ง ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 12 โคลน คือ 2/A3-F1, 3/F7-F1,(ซึ่งได้จากเซลล์ม้ามของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย 17αP-BSA) 1/10B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7/F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4 (ได้จากเซลล์ม้ามของหนูที่ฉีดกระตุ้นด้วย P3cmo-BSA)

เมื่อศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยตรวจหา ไอโซไทป์ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโมโนโคลนรหัส2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4 และ5/H8-F4 มี ไอโซไทป์ IgG1 รหัส 3/D7-F4 และ 5/G7/F4 มี ไอโซไทป์ IgG2a รหัส 2/A3-F1, 3/F7-F1 และ 1/10B10-F4 มี ไอโซไทป์ IgG3 รหัส 3/E4-F4 และ 5/H2-F4 มี ไอโซไทป์ IgG2b และ IgM ตามลำดับ

เมื่อทดสอบความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี รหัส 2/A3-F1 และ 3/F7-F1 ไม่มีความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 10 โคลนคือ 1/10B10-F4, 2/A3-F4, 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/E4-F4, 3/F7-F4, 4/E11-F4, 5/G7/F4, 5/H2-F4 และ 5/H8-F4 มีความจำเพาะกับ โพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ซึ่งการทดสอบก่อนการหลอมรวมเซลล์นอกจากการวัดระดับ ไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมหนู

แล้ว การทดสอบที่สำคัญมากอีกอย่างคือ การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมหนูกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ เพราะหากแอนติบอดีในซีรัมหนูมีความจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระแล้วเมื่อนำม้ามของหนูมาทำการหลอมรวมเซลล์จะทำให้มีโอกาสได้เซลล์ไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง ทั้งนี้เนื่องจากโพรเจสเทอโรนเป็นสารโมเลกุลเล็กที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วไม่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้ จึงต้องทำการเชื่อมโพรเจสเทอโรนเข้ากับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เช่น BSA เมื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยสารโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมกับ BSA สัตว์ทดลองจะสร้างแอนติบอดีต่ออิพิโทปที่อยู่บนโพรเจสเทอโรน, BSA และ อิพิโทปใหม่บริเวณรอยต่อระหว่าง โพรเจสเทอโรนและ BSA ดังนั้นการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีในซีรัมต่อโพรเจสเทอโรนจึงจำเป็นมากสำหรับการฉีดกระตุ้นด้วยสารที่มีขนาดเล็ก

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระทั้ง 10 โคลนไปทดสอบการทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีก 10 โคลนทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์น้อยกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น 5/H2-F4 ทำปฏิกิริยาข้ามกับเทสโทสเทอโรนสูงที่สุด 46.25 เปอร์เซ็นต์ 4/E11-F4 และ3/C9-F4 ทำปฏิกิริยาข้ามกับโพรเจสเทอโรน – 17แอลฟ่าไฮดรอกซี 20.06 และ 16.28 เปอร์เซ็นต์ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/E4-F4 ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มทุกตัวน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์ จากการหาค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 10 โคลนต่อโพรเจสเทอโรน มีค่าความไวอยู่ในช่วง 0.03 – 80 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 4/E11-F4 มีค่าความไว ต่ำสุดคือ 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ โมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/E4-F4 และ 3/D7-F4 มีความไวสูงสุดคือ 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งหากคัดเลือกโคลนที่ดีมาทำการเพาะเลี้ยงต่อควรเลือกโคลนรหัส 3/E4-F4 และ 3/D7-F4 เพราะไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มและนอกกลุ่มสเตอรอยด์ฮอร์โมน และมีความไวต่อ โพรเจสเทอโรนในการทดสอบสูง โดยมีค่าความไวในการทดสอบ 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากรายงานของ Fairclough และคณะ 1975 ซึ่งวัดระดับโพรเจสเทอโรนในโคนมขณะตั้งครรภ์ในช่วง 240 วันมีค่าเท่ากับ 8.8 - 9.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 โคลนนี้จึงศักยภาพนำไปพัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบระดับโพรเจสเทอโรนได้

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/D7-F4 ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ และมีค่า LOD ต่ำ มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โปรตีน เอ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความเข้มข้น 6.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รายการอ้างอิง

ชวนิศนดากร วรวรรณ, ม.ร.ว. 2530. การเลี้ยงโคนม. ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

มงคล เตชะกำพุ, 2543. เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรงพันธุ์ในปศสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิโรจน์ ภัทรจินดา, 2546. โคนม. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิวไล. 2537. อิมมูโนวิทยา. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

สมชาย จันทร์ผ่องแสง, 2541. การเลี้ยงโคนม. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Andrea, L. W., Donald, W. H. and Fedrick, S. 2005. Chang in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F2alfa. Domestic animal endocrinology. 28 :162-171.

Bucknall, S., Silverlight, J. Coldham, N., Thorne, L. and Jackman, R. 2003. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animals product. Food Addition Contamination. 20(3): 221-228.

Corol, D . 2001. The Characterization of Immunogenic Conjugates by Sprctral Differences Method. Biotecnology.Letter. 6(4): 299-304.

Drofman, I. R. 1975. Steroid hormones. Syntex research, Standard industrial park, Palo Alto, California.

Elder, P. A., Gaynor, P. T., Lewis, J. G., Bodger, P. S., and Bason,L. M. 1997. Generation of monoclonal antibodies by electrofusion techniques. Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 43: 35-40.

Fairclough, R. J. , Hunter, J. T. and Welch, R. A. S. 1975. Peripheral plasma progesterone and utero-ovarian prostaglandin F concentrations in cow around parturition. Prostaglandins. 6(10) : 901-909.

Galfre, G., Howe, S. C., and Milstein, C. 1977. Antibody to major histocompatibility antigen produce by Hybrid cell line. Nature. 266: 550-552.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibody; A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York .

Henricks, D. M., Dicky, J. M., Hill, J. R. and Niswender, G. D. 1970. Serum lutenizing hormone and plasma progesterone levels during the estrus cycle and early pregnancy in cows. Biological Reproduction. 2:347-355.

Heisterman, M., Agil, M., Buthe, A. and Hodges, J.K. 1998. Metabolism and excreation of oestradiol and progesterone in Sumatran rhinoceros. Animal reproduction science. 53: 157-172.

Hong, J, Y. and Choi M, J. 2002. Development of one-step fluorescence polarization immunoassay for progesterone. Biological Pharmaceutical Bulletin. 25(10): 1258-1262.

Hudson, L. and Hay, F. C. 1980. Practical immunology. Blackwell Scientific publication. London.

Johnstone, A. and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in practice. Cambridge. Cambridge university press.

Kaddouri, M., Bresset, N. and Bonfils, C. 1992. Ontogenic development of liver progesterone metabolism in female sheep. Steriod Biochemical Molecular Biology. 42: 499-508.

Rabiee, A. R., Macmillma, K. L. and Schwarzenberger, F. 2001. Progesterone metabolism in ovariectomised non-lactating Holstein-Friesian cows treated with progesterone with two levels of feed intake. Annimal reproduction science. 66 (15): 35-46

Mcdonald, L. E. 1975. Veterinary Endocrinology and reproduction. 2 nd edition. Philadelpia: Lea and Febiger.

Moeljono, M. P., Thatcher, W. W., Brazer, F. W., Frank, M. Owen, L. J. and Wilcox, C. J. 1977. A study of prostaglandin F2 as the luteolysin in swine, It characterization and comparison of prostaglandin F, estrogen and progestin concentrations in utero-ovarian vein plasma of non-pregnant and pregnant glits. Prostaglandins. 14: 543-555.

Mustafaev, M., Yucel, F., Cirakoglu, B., and Bermak, E. 1996. Immune response to progesteroneinvolved in Cu 2+ mediated poly- anion protein complex-antigen specificity and affinity of hybridoma clones. Immunology Letter. 52(4): 63-68.

Nakao, T. 1980. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum." Acta Endocrinol (Copenh). 93(2): 223-7.

Sorenson, J. 1979 Animal reproduction principle and practices. New York; McGraw-Hill Book company.

Waldmann, A. 1999. Monoclonal antibodies to progesterone: characterization and selection for enzyme immunoassay in bovine milk. Hybridoma. 18(3): 289-96.

Yucel, F., and Cirakoglu, B. 1999. Production of monoclonal antibodyies specific for progesterone. Journal of Biology. 23:393-399.

Yucel, F., and Cirakoglu, B. 1999. Production of monoclonal antibodies specific for progesterone, estradiole by Simultaneous Injection of Different Steroids. Journal of Biology. 24:697-705.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 1/B10-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	0.985	0.744	1.034	0.999	0.692	0.817
0.026	1.004	0.758	1.056	0.990	0.691	0.810
0.128	1.157	0.744	1.053	0.974	0.695	0.805
0.640	1.170	0.729	1.048	0.942	0.654	0.795
3.20	1.165	0.723	1.101	0.954	0.65	0.784
16	1.100	0.719	1.065	0.961	0.629	0.781
80	1.177	0.646	1.076	0.950	0.565	0.779
400	1.139	0.668	1.103	0.930	0.606	0.709
2,000	1.122	0.629	1.011	0.873	0.579	0.558
10,000	1.121	0.577	0879	0.915	0.486	0.437
50,000	1.167	0.562	0.656	0.803	0.435	0.412
100,000	1.175	0.541	0.505	0.789	0.419	0.392
500,000	1.202	0.547	0.477	0.615	0.406	0.310

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 2/A3-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	1.312	1.174	1.509	1.350	0.916	1.233
0.026	1.321	1.171	1.510	1.347	0.934	1.225
0.128	1.289	1.145	1.511	1.345	0.923	1.190
0.640	1.331	1.126	1.517	1.348	0.918	1.158
3.20	1.314	1.118	1.517	1.332	0.911	1.059
16	1.298	1.116	1.511	1.319	0.912	1.049
80	1.255	1.108	1.499	1.316	0.906	1.036
400	1.175	1.108	1.418	1.179	0.912	0.970
2,000	1.230	1.076	1.316	1.085	0.801	0.620
10,000	1.304	1.035	1.063	0.974	0.729	0.284
50,000	1.150	0.981	0.631	0.835	0.537	0.301
100,000	1.034	0.836	0.322	0.731	0.429	0.139
500,000	1.324	0.835	0.203	0.545	0.172	0.127

ตารางที่ ก.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/C9-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	1.311	1.166	1.449	1.351	0.924	1.272
0.026	1.306	1.140	1.483	1.338	0.927	1.269
0.128	1.322	1.133	1.464	1.336	0.932	1.239
0.640	1.309	1.128	1.482	1.305	0.927	1.176
3.20	1.259	1.114	1.446	1.231	0.921	1.126
16	1.312	1.107	1.447	1.151	0.929	1.108
80	1.287	1.075	1.487	1.081	0.922	1.055
400	1.372	1.076	1.458	1.146	0.881	1.062
2,000	1.296	1.053	1.483	1.147	0.847	0.772
10,000	1.349	1.036	1.529	1.077	0.733	0.345
50,000	1.218	0.945	1.212	0.881	0.684	0.234
100,000	1.238	0.908	0.946	0.837	0.511	0.135
500,000	1.382	0.901	0.767	0.791	0.471	0.125

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/D7-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	0.733	0.441	0.695	0.763	0.507	0.669
0.026	0.740	0.440	0.707	0.757	0.500	0.659
0.128	0.726	0.438	0.688	0.760	0.498	0.640
0.640	0.716	0.438	0.676	0.746	0.482	0.646
3.20	0.711	0.423	0.671	0.742	0.466	0.624
16	0.714	0.430	0.655	0.736	0.440	0.627
80	0.712	0.427	0.659	0.737	0.442	0.649
400	0.694	0.409	0.635	0.687	0.430	0.597
2,000	0.612	0.401	0.528	0.557	0.386	0.380
10,000	0.601	0.403	0.494	0.479	0.288	0.275
50,000	0.654	0.345	0.318	0.332	0.272	0.196
100,000	0.615	0.344	0.239	0.292	0.219	0.186
500,000	0.608	0.278	0.243	0.230	0.131	0.133

ตารางที่ ก.5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/E4-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	0.825	0.674	0.910	0.678	0.701	0.572
0.026	0.823	0.675	0.905	0.676	0.709	0.582
0.128	0.845	0.644	0.913	0.671	0.700	0.590
0.640	0.824	0.655	0.900	0.649	0.702	0.523
3.20	0.835	0.647	0.871	0.619	0.692	0.526
16	0.831	0.632	0.838	0.564	0.672	0.505
80	0.838	0.634	0.816	0.529	0.656	0.501
400	0.825	0.629	0.815	0.517	0.625	0.491
2,000	0.834	0.677	0.771	0.522	0.618	0.485
10,000	0.812	0.636	0.742	0.487	0.562	0.447
50,000	0.795	0.604	0.584	0.486	0.383	0.421
100,000	0.801	0.586	0.437	0.431	0.451	0.398
500,000	0.812	0.555	0.259	0.385	0.386	0.375

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 3/F7-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	1.264	1.166	1.424	1.718	1.015	1.688
0.026	1.238	1.163	1.415	1.715	1.088	1.719
0.128	1.312	1.106	1.431	1.696	0.985	1.518
0.640	1.325	0.995	1.390	1.646	0.957	1.334
3.20	1.312	0.976	1.347	1.590	0.897	1.107
16	1.354	0.960	1.309	1.519	0.842	0.896
80	1.363	0.955	1.307	1.433	0.761	0.815
400	1.364	0.977	1.280	1.338	0.757	0.410
2,000	1.295	0.964	0.707	0.891	0.785	0.294
10,000	1.275	0.720	0.413	0.363	0.585	0.308
50,000	1.267	0.648	0.201	0.257	0.328	0.172
100,000	1.259	0.604	0.187	0.243	0.233	0.152
500,000	1.219	0.570	0.180	0.235	0.196	0.119

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 4/E11-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	1.475	0.986	2.107	1.630	1.026	1.584
0.026	1.429	1.009	2.115	1.633	1.032	1.599
0.128	1.514	0.995	2.115	1.632	1.008	1.581
0.640	1.398	0.981	2.111	1.571	0.995	1.550
3.20	1.378	0.956	2.114	1.509	0.985	1.520
16	1.465	0.902	2.116	1.447	0.978	1.488
80	1.398	0.995	2.141	1.375	0.968	1.401
400	1.417	1.025	2.104	1.372	0.923	1.261
2,000	1.448	1.036	2.068	1.346	0.879	0.871
10,000	1.459	1.034	1.872	1.329	0.87	0.456
50,000	1.398	0.820	1.567	1.068	0.868	0.252
100,000	1.458	0.728	1.282	1.044	0.84	0.161
500,000	1.449	0.709	1.216	1.010	0.813	0.137

ตารางที่ ก.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5/G7-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	0.786	0.575	1.165	0.762	0.559	0.807
0.026	0.785	0.576	1.104	0.753	0.562	0.804
0.128	0.769	0.535	1.110	0.763	0.559	0.809
0.640	0.774	0.561	1.043	0.755	0.548	0.782
3.20	0.751	0.542	0.919	0.747	0.556	0.726
16	0.763	0.539	0.847	0.771	0.564	0.707
80	0.725	0.562	0.778	0.767	0.55	0.706
400	0.724	0.532	0.606	0.762	0.55	0.654
2,000	0.752	0.562	0.536	0.682	0.525	0.508
10,000	0.741	0.554	0.275	0.661	0.509	0.320
50,000	0.703	0.559	0.180	0.667	0.433	0.241
100,000	0.699	0.560	0.161	0.537	0.318	0.203
500,000	0.710	0.550	0.173	0.471	0.278	0.149

ตารางที่ ก.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5/H2-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	0.569	0.737	0.766	0.625	0.431	0.533
0.026	0.587	0.723	0.762	0.626	0.424	0.534
0.128	0.574	0.753	0.762	0.632	0.422	0.539
0.640	0.569	0.730	0.753	0.625	0.406	0.522
3.20	0.598	0.742	0.751	0.630	0.396	0.483
16	0.565	0.755	0.750	0.607	0.363	0.450
80	0.575	0.760	0.749	0.572	0.379	0.419
400	0.548	0.742	0.670	0.493	0.393	0.418
2,000	0.582	0.733	0.629	0.449	0.386	0.388
10,000	0.559	0.750	0.464	0.348	0.361	0.372
50,000	0.588	0.737	0.416	0.314	0.312	0.350
100,000	0.578	0.769	0.383	0.302	0.300	0.310
500,000	0.541	0.719	0.304	0.246	0.223	0.278

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรจากการทำ competitive indirect ELISA ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีรหัส 5/H8-F4 ต่อสารคอเลสเทอรอล, แอลโดสเทอโรน, เอสทราไดออล, คอร์ทิโคสเทอโรน, โพรเจสเทอโรน– 17แอลฟาไฮดรอกซี และเทสโทสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร					
	คอเลสเทอรอล	แอลโดสเทอโรน	เอสทราไดออล	เทสโทสเทอโรน	คอร์ทิโคสเทอโรน	โพรเจสเทอโรน – 17แอลฟาไฮดรอกซี
0	1.179	1.105	1.754	1.212	0.882	1.237
0.026	1.185	1.103	1.769	1.220	0.879	1.233
0.128	1.125	1.104	1.765	1.206	0.878	1.242
0.640	1.115	1.112	1.76	1.191	0.876	1.147
3.20	1.162	1.108	1.741	1.158	0.864	1.164
16	1.008	1.115	1.704	1.215	0.819	1.110
80	1.108	1.138	1.689	1.301	0.860	1.069
400	1.158	1.098	1.651	1.244	0.844	0.910
2,000	1.114	1.127	1.613	1.204	0.854	0.878
10,000	1.357	1.148	1.491	1.215	0.790	0.525
50,000	1.247	1.024	1.401	1.244	0.749	0.499
100,000	1.138	1.108	0.960	1.182	0.650	0.401
500,000	1.111	1.119	0.894	1.096	0.632	0.312

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ สำหรับใช้การเชื่อมโพรเจสเทอโรนกับ BSA

0.05 M Carbonate buffer, pH 9.6

Na_2CO_3	1.59	กรัม
$NaHCO_3$	2.93	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 9.6 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer (Stock reagent)

   ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4

2. 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.4

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	19	ลิตร
0.01% Thimerosal	20	มิลลิลิตร

   ผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องกรองสารละลาย แล้วเก็บใส่ถังสีขาว

3. PBS-Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween 20	250	ไมโครลิตร
PBS	500	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. <u>นมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซนต์</u>

นมพร่องมันเนย	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

5. <u>0.15 M Phosphate Citrate buffer, pH 5.0</u>

Na_2HPO_4	11.9	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Citric acid	7	กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 5.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ –20 องศาเซลเซียส

6. <u>Substrate OPD</u>

O-phenylenediamine	0.04	กรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	100	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.04	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน(เตรียมในขวดสีชา) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. <u>2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)</u>

18 M H_2SO_4	69.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	430.5	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันจะเกิดความร้อน ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. 0.1 M citrate buffer pH 3

   citric acid 0.1 M

   Na_2HPO_4 0.1 M

   ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. 0.1 M Phosphate buffer pH 8

   ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. 1 M Tris HCl buffer pH 9

   Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

   HCl 1 M

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดสอบ TNBS

0.1 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

Na_2CO_3 3.18 กรัม

$NaHCO_3$ 5.86 กรัม

น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 8.5 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ

1. Stock HAT 100X

Hypoxanthine	0.1361 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Aminopterin	0.0018 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidin	0.0388 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายแต่ละสารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

2. Stock HT 100X

Hypoxanthine	0.1361 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
Thymidin	0.0388 กรัม	ละลายด้วยน้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

นำสารละลายทั้ง 2 สารมาผสมกัน แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเซลล์ hybrid

RPMI 1640	10.4	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
L-glutamin	0.1	กรัม
Glucose	2	กรัม
Pyruvic acid	0.11	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนจะใช้ผสม 20% FCS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. <u>อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT</u>

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร.
HAT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. <u>อาหารเลี้ยงเซลล์ HT</u>

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	1	ลิตร
HT 100X	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย PEG 50 เปอร์เซนต์

นำ PEG มาอุ่นให้ละลาย ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่หลอดๆ ละ ประมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนการเชื่อมเซลล์ให้นำออกมาอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การเตรียมน้ำยาแช่แข็งเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	70	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	20	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายที่ใช้ทำ BCA assay

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

Bovine serum albumin	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

BCA™ Reagent A และ BCA™ Reagent B (BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE)

ก่อนใช้ผสม Reagent A : B ในอัตราส่วน 50 : 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุปรีชา ฉัตรทอง เกิดเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน พ.ศ. 2522 ที่จังหวัด สิงห์บุรี สำเร็จการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2542 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย