

ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson (France)
ไมโครปิเปต	Biohit (Finland)
ปั๊มสูญญากาศ	Iwaki (Japan)
ตูบ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)
ตูปลอดเชื้อ	Cambrige (Thaialnd)
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII (Japan)
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
1-aminohydantoin (AHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-(2-Nitrobenzylidenamino)-2, 4-imidazolidinedione (NPAHD)	Sigma-Aldrich	USA
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride (EDC)	Sigma-Aldrich	USA
2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS)	Pierce	USA
2-Nitrobenzaldehyde semicarbazone(NPSEM)	Sigma-Aldrich	USA

3-[[[(2-nitrophenyl)methylene] amino}-2-oxazolidinone) (NPAOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-amino-2-oxazolidinone (AOZ)	Sigma-Aldrich	USA
3-carboxybenzaldehyde (CBA)	Sigma-Aldrich	USA
5-(Morpholinomethyl)-3-(2-nitrobenzylidenamino)-2-oxazolidinone (NPAMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
5-morpholinomethyl-3-amino-oxazolidinone (AMOZ)	Sigma-Aldrich	USA
Acrylamide gel	Sigma-Aldrich	USA
Aminopterin	Sigma-Aldrich	USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	USA
Butanol	Merck	Germany
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	USA
Citric monohydrate	Merck	Germany
Clenbuterol	Sigma-Aldrich	USA
Copper sulfate	Fluka	Switzerland
D-glucose	Sigma-Aldrich	USA
Diethyl ether	Sigma-Aldrich	USA
Dimethyl sulfoxide	Fluka	Switzerland

Disodium carbonate	Fluka	Switzerland
Disodium hydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Ethylenediamine (EDA)	Sigma-Aldrich	USA
Fetal bovine serum	Invitromex	USA
Folin-Ciocalteu Phenol reagent	Sigma-Aldrich	USA
Furazolidone	Sigma-Aldrich	USA
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich	USA
Glycerol	Sigma-Aldrich	USA
Glycine	Merck	Germany
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	USA
Hydrogen peroxide	Fluka	Switzerland
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich	USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich	USA
Methanol	BDH	England
N-hydroxysuccimide ester (NHS)	Fluka	Switzerland
Skim milk	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.	India
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma-Aldrich	USA
Ovalbumin (OVA)	Ovalbumin (OVA)	USA
Oxytetracycline	Fluka	Switzerland

Penicillin G	Sigma-Aldrich	USA
Peroxidase Goat anti-mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	USA
Polyethylene glycol (PEG)	Sigma-Aldrich	USA
Potassium chloride	Sigma-Aldrich	USA
Potassium dihydrogen phosphate	Sigma-Aldrich	USA
Pyridine	Carlo Erba	USA
Pyruvic acid	Invitromex	USA
RPMI 1640 medium	Invitromex	USA
Salbutamol	Sigma-Aldrich	USA
Semicarbazide (SEM)	Sigma-Aldrich	USA
Sodium bicarbonate	Sigma-Aldrich	USA
Sodium carbonate	Merck	Germany
Sodium chloride	Merck	Germany
Sodium dihydrogen phosphate	Carlo erba	USA
Sodium dodecyl sulphate	Merck	Germany
Sodium hydrogen carbonate	Merck	Germany
Sodium hydroxide	Merck	Germany
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	USA
Streptomycin	Sigma-Aldrich	USA

Sulfamethazine	Sigma-Aldrich	USA
Sulfuric acid	Merck	Germany
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	USA
Trisodium citrate	Fluka	Switzerland
Tween 20	Sigma-Aldrich	USA

2.2 การเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA) และแอนติเจนสำหรับ

เคลือบจาน 96 หลุม (AOZ-OVA และ CPAOZ-OVA)

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงอนุพันธุ์ของสาร AOZ เป็น CPAOZ

โดยนำสาร AOZ มาทำปฏิกิริยากับสาร 3-carboxybenzaldehyde (CBA) ด้วยวิธีการ reflux ซึ่งมี dry pyridine เป็นตัวกลางช่วยให้เกิดปฏิกิริยา และมี molecular sieve ช่วยดูดน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นดึง pyridine ออกจากระบบด้วยแก๊สไนโตรเจน ทดสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยหลักการของเทคนิค ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ดูแถบของสาร CPAOZ ด้วยแสงยูวี และดูแถบของสาร AOZ โดยย้อมด้วยสารละลายนินไฮดริน

2.2.2 การเชื่อมต่อ CPAOZ กับ cBSA และ AOZ กับ BSA

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOZ ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ของยาไนโตรฟูแรน ฟลูราโซลิโดน ในขั้นต้นทำการเตรียมอนุพันธุ์ของ AOZ ให้อยู่ในรูปของ CPAOZ ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นแฮปเทน (hapten) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและใช้ในการเคลือบจาน 96 หลุมที่ผลิตจากพลาสติกได้ ต้องมีการเชื่อมแฮปเทนกับสารโมเลกุลใหญ่เช่น โปรตีน จึงทำการเชื่อมต่อ CPAOZ กับโปรตีนพาหะ cBSA (BSA ที่ผ่านปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนหมู่เอมีน ,cationized BSA) และ AOZ กับ BSA โดยใช้ NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำ CPAOZ หรือ AOZ ผสมกับ NHS และ EDC ละลายใน DMF เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA ใน 0.5 โมลาร์ carbonate buffer พีเอช 9.6 ลงไปที่ละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป ไดอะไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร CPAOZ-ed-cBSA และ AOZ-BSA ด้วยวิธี TNBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

2.2.3 การเชื่อมต่อ AOX และ CPAOX กับ OVA

ทำการเชื่อมสาร AOX และ CPAOX กับ OVA ได้เป็น AOX-ed-OVA และ CPAOX-ed-OVA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้หาระดับแอนติบอดีในซีรัมและคัดเลือกโคลนที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ AOX และ CPAOX โดยนำสาร AOX และ CPAOX ละลายใน DMF เติม EDC หลังจากนั้นค่อยๆเติม OVA ที่ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มี พีเอช 7.4 กวนเบาๆ ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA และหาเปอร์เซ็นต์ของการเชื่อมติดสาร AOX-ed-OVA และ CPAOX-ed-OVA ด้วยวิธี TNBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการทดสอบ ELISA

2.2.4 การหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี BCA

ทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท Pierce โดยเจือจางโปรตีน BSA มาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS และเจือจางสารตัวอย่าง จากนั้นเตรียม working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมน้ำละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้นลงในจานทดสอบชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติมน้ำ working reagent ลงไปในหลุม หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่าง

2.2.5 การวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวิธี TNBS

ทำการวัดการเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เอมีนอิสระบนโปรตีนด้วยวิธี TNBS โดยเตรียมสารละลายโปรตีนพาหะ ได้แก่ BSA และ OVA สารละลายของสารที่จะเชื่อมติดกับโปรตีนพาหะ ได้แก่ AOX และ CPAOX ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (sodium bicarbonate buffer) พีเอช 8.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมน้ำละลายโปรตีน และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ จากนั้นเติมน้ำละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำ SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ตามด้วย 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของหมู่เอมีนที่เชื่อมติดกับสาร

เปอร์เซ็นต์การเชื่อมติดของสารกับโปรตีนพาหะ เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ ลบ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนที่เชื่อมกับสาร หาดด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตรของโปรตีนพาหะ คูณ 100

2.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อสาร AOB และ NPAOB

2.3.1 การฉีดกระตุ้นหนูทดลอง

ทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ด้วยแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 (CPAOZ-cBSA) ซึ่งการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (Immunization) จะใช้แอนติเจนปริมาณ 50 ไมโครกรัม (ต่อหนู 1 ตัว) ผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนู และทำการฉีดกระตุ้นซ้ำอีก 4-6 ครั้ง ทุกๆ 2 อาทิตย์ โดยผสมแอนติเจน จากนั้นประมาณ 7-10 วัน ทำการเจาะเลือดหนูจากปลายหางเพื่อแยกซีรัมมาทดสอบระดับของแอนติบอดี (antibody titer) ด้วยวิธี Indirect ELISA ถ้าระดับแอนติบอดียังอยู่ในระดับต่ำก็ฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยวิธีการเดิมทุกๆ 2 อาทิตย์ เมื่อระดับแอนติบอดีสูงมากพอ ทำการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้าย ด้วยแอนติเจนที่ผสมกับน้ำเกลือเข้าช่องท้องในปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อหนูทดลองหนึ่งตัว ก่อนทำการหลอมรวมเซลล์ 3 วัน ถัดไป

2.3.2 การทดสอบแอนติบอดี โดยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบหลุมของจาน ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติเจน (CPAOZ-cBSA ,AOZ-BSA ,CPAOZ-OVA ,AOZ-OVA ,BSA หรือ OVA) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS พีเอช 7.4 ที่มี tween 20 ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย (skim milk) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน PBS หลุมละ 300 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมตัวอย่าง (ซีรัมหนู หรือ อาหารเลี้ยงเซลล์) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิ goat anti mouse IgG ที่มีเอนไซม์ horseradish peroxidase เชื่อมติดอยู่ (GAM-HRP) หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ HRP ซึ่งประกอบด้วย 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) และ H_2O_2 ละลายอยู่ใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer ,พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ปุ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์ H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำจานทดสอบชนิด 96 หลุม ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

2.3.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ AOA หรือ NPAOA โดยวิธี Indirect competitive

ELISA

ทำการทดสอบแอนติบอดีในซีรัมหนู หรือในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถจับกับ NPAOA หรือ

AOA ที่อยู่ในรูปอิสระ โดยเติมสารละลาย NPAOA หรือสารที่ต้องการทดสอบอื่นๆ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในจานทดสอบ ELISA ที่เคลือบด้วย AOA-OVA และผ่านการเติมสารละลายนมพร่องมันเนย และล้างด้วย PBS-T แล้ว จากนั้นเติมซีรัมหนูที่เจือจางแล้ว หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ให้ผลบวก (จากข้อ 2.3.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารที่ต้องการทดสอบ บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หรือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามขั้นตอนเดียวกับวิธี indirect ELISA ถ้าหลุมที่เติมสารทดสอบในรูปอิสระให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าหลุมที่ไม่เติมสาร แสดงว่า แอนติบอดีในซีรัมหนู หรืออาหารเลี้ยงเซลล์สามารถจับกับสารในรูปอิสระได้

2.4 การเตรียมเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสาร AOA และ NPAOA

2.4.1 การหลอมรวมเซลล์ (cell fusion หรือ hybridization)

โดยนำเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจน CPAOA-cBSA หรือ AOA-BSA เพื่อสร้างแอนติบอดีที่ต้องการผสมกับเซลล์มัยโอโดมา ในอัตราส่วน 1:2 โดยที่เซลล์ทั้งสองจะถูกนำมาเลี้ยงให้อยู่ในระยะที่กำลังจะแบ่งตัว มารวมกันในหลอดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ หยด 50 เปอร์เซ็นต์ พอลิเอทิลีนไกลคอล (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในตะกอนเซลล์พร้อมกับหมุนหลอดช้าๆ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FCS เพื่อล้าง 50 เปอร์เซ็นต์ PEG ออกให้หมด ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก โดยการเทส่วนใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ก่อนนำเซลล์ไปหยอดในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂

2.4.2 การเลี้ยงและการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาหลังการหลอมรวมเซลล์

ภายหลังการหลอมรวมเซลล์แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ทุก 3-4 วัน และเมื่อผ่านไปแล้ว 6-7 วัน สังเกตเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) จะเห็นโคลนของเซลล์ไฮบริโดมามีลักษณะกลมวาวและโปร่งแสงขึ้นเป็นกลุ่ม เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มหลุมแล้วจะต้องเปลี่ยนอาหารในหลุมโดยจะให้อาหารเลี้ยงเซลล์ HAT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS ประมาณ 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ HT ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS โดยจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเซลล์ถ้ามีสีเหลืองให้ดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่า

ทิ้งแล้วเติมอาหารใหม่ลงไป เมื่อพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาเจริญได้ประมาณ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุมให้นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2)

2.4.3 การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ หรือ NPAOZ โดยวิธี indirect ELISA

เพื่อตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ จึงทำการเคลือบ จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน 4 ชนิด คือ CPAOZ-OVA , AOZ-OVA , OVA และ BSA เพื่อเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2) ถ้าเซลล์ในหลุมใดมีค่าดูดกลืนแสงของจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย CPAOZ-OVA และ AOZ-OVA สูง และมีค่าดูดกลืนแสงของจานชนิด 96 หลุมที่เคลือบด้วย OVA และ BSA ต่ำ ก็จะได้เลือกเซลล์ในหลุมนั้นไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม และทำการทดสอบน้ำเลี้ยงเซลล์แล้วให้ค่าเหมือนเดิม และทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับสาร NPAOZ ในรูปอิสระ โดยวิธี indirect competitive ELISA ตามหัวข้อ 2.3.3 เลือกหลุมที่แอนติบอดีจับกับ NPAOZ ในรูปอิสระ จากนั้นจึงทำการโคลนเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยวต่อไป

2.4.4 การแยกเซลล์ไฮบริโดมาให้ได้เซลล์เดี่ยว (single cell cloning) โดยการทำให้เจือจางด้วยวิธี limiting dilution

หลังจากที่คัดเลือกจนได้เซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) ที่ต้องการแล้วเพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่ละเซลล์มีต้นกำเนิดจากเซลล์เดี่ยว ซึ่งวิธี limiting dilution ทำได้โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิตแอนติบอดีต่อ AOZ และ NPAOZ มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์ FCS โดยปรับความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาให้เท่ากับ 40 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาเจือจางแบบ 2 เท่า จนได้ความเจือจางของเซลล์ไฮบริโดมาเท่ากับ 5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาในแต่ละความเจือจางไปหยอดลงในจานชนิด 96 หลุมจำนวนความเจือจางละ 2 แถว (24 หลุม) จะได้เซลล์ไฮบริโดมาประมาณ 8 , 4 , 2 และ 1 เซลล์ ต่อหลุม ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 14 วัน ก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับโดยทำเครื่องหมายหลุมที่มี 1 เซลล์ เมื่อเซลล์เจริญได้ 2/3 ของพื้นที่ก้นหลุม จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่ได้ทำเครื่องหมายไว้แล้วไปตรวจหาแอนติบอดีอีกครั้งด้วยวิธี indirect ELISA และ indirect competitive ELISA ก่อนนำเซลล์จากหลุมที่ให้ผลบวกมาทำการโคลนเซลล์ซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 2 และ 3 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ได้มาจากเซลล์ไฮบริโดมาที่มาจากต้นกำเนิดจากเซลล์ลูกผสมเริ่มต้นเซลล์เพียงเซลล์เดียว

2.5 การศึกษาลักษณะเบื้องต้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

2.5.1 การตรวจสอบไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จะทำการตรวจหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยใช้ชุดทดสอบไอโซไทป์ (isotyping kit) ของบริษัท Sigma-Aldrich โดยนำ Isotyping specific antibody ชนิด IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA และ IgM มาทำการเจือจาง 1,000 เท่า ใน PBS นำไปเติมในจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBS (พีเอช 7.4) ที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 (PBS-T) จำนวน 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างส่วนที่ไม่จับออก เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่เชื่อมติดกับ HRP ซึ่งจำเพาะต่อ F_{ab} (HRP-Rabbit anti-mouse IgG [F_{ab} specific]) เจือจาง 2,000 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10-15 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แอนติบอดีเป็นชนิดใดจะให้ค่าผลบวกตามชนิดของแอนติบอดีที่เคลือบหลุมไว้

2.5.2 การหาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสม โดยวิธี indirect ELISA

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์มีความเข้มข้นมาก และไม่ทราบความเข้มข้นของแอนติบอดีที่แน่นอน ดังนั้น เมื่อนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี ELISA อาจทำให้มีสัญญาณรบกวน ส่งผลให้เกิดผลบวกเท็จได้ และยังเป็นการสิ้นเปลืองแอนติเจนและแอนติบอดีด้วย จึงต้องหาความเข้มข้นและความเจือจางที่เหมาะสมทั้งของแอนติเจนและแอนติบอดี ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใกล้เคียงกันกับสูงสุดเมื่อเจือจางสูงสุด หรือประมาณ 1.0 – 1.5 เพื่อนำความเข้มข้นและความเจือจางที่ได้ไปใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป โดยจะทำการเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติเจน AOZ-OVA ความเข้มข้นต่างๆ และเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย PBS แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.2)

2.5.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

การทดสอบความไว (sensitivity) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสารเมแทบอลิต์ AOZ ,NPAOZ หรือทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนเพื่อทดสอบดูว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ มีความจำเพาะและความไวต่อสาร AOZ ,NPAOZ ปริมาณเท่าใด และเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในและนอกกลุ่มไนโตรฟูแรนชนิดอื่นหรือไม่ จึงทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (ตามหัวข้อ 2.3.3) ถ้าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อสารทดสอบ ก็

จะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่อยู่ในรูปอิสระ ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงเมื่อเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ โดยจะคิดเป็นค่า inhibition concentration (IC_{50}) และ limit of detection (LOD) ซึ่งค่า IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงในการทำ competitive indirect ELISA ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ไม่มีสารแข่งขัน และค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้

2.6 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

2.6.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOX และ NPAOX มาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายลงภาชนะปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกววนขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกววนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.6.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A หรือ protein G affinity chromatography

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ AOX และ NPAOX โดยจะใช้ protein A หรือ protein G sepharose ขึ้นอยู่กับไอโซไทป์ของแอนติบอดีที่ได้ โดยนำโปรตีน A หรือ G sepharose แช่ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่คอลัมน์ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้เติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 โมลาร์ citrate buffer, พีเอช 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ พีเอช สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 7.4 โดยใช้ 1 โมลาร์ Tris buffer, พีเอช 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer, พีเอช 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดอะไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

2.6.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อ AOX และ NPAOX ในรูปอิสระ

หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้ทำการทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความสามารถในการจับกับ AOX และ NPAOX ในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม AOX ที่เชื่อมต่อกับ OVA หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลาย BSA 1 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม AOX และ NPAOX ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HRP-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 มิลลิโมลาร์ potassium citrate buffer , พีเอช 4.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เติม 1 โมลาร์ H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader