บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อมาลาเรีย P. falciparum

1.1 เชื้อมาลาเรียสำหรับเตรียมเป็นแอนติเจน เพื่อฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู และเตรียมสไลด์สำหรับทดสอบแอนติบอดีที่ผลิตโดย hybridomas เป็นเชื้อที่ได้รับจากหน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่สายพันธุ์ T9/94 S300.300 และ T9/94(M1-1)b3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการชักนำด้วยสารซึ่งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่ ethyl methane sulphonate (EMS) และ N'-methyl-N' nitro-N-nitroguanidine ตามลำดับ ทำให้มีคุณสมบัติการต้านทานต่อยา pyrimethamine (Thaithong et al.,1992) ที่มีความเข้มข้นของ pyrimethamine จากระดับ $5x10^{-8}$ M ถึง $1x10^{-6}$ M สำหรับสายพันธุ์ T9/94 S300.300 และ $5X10^{-6}$ M สำหรับสายพันธุ์ T9/94 (M1-1)b3 ตามลำดับ

1.2 เชื้อมาลาเรียที่ใช้ สำหรับทดสอบปฏิกิริยาความจำเพาะระหว่างแอนติเจนของเชื้อกับ MAb ต่างๆที่ผลิตได้ จำนวน 18 ไอโซเลตเป็นเชื้อที่หน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แยกมาจากผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในจังหวัดตากและตราด ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของเชื้อมาลาเรีย ดังแสดงในตารางที่ 6

2. สัตว์ทดลอง

หนูไมซ์สายพันธุ์ Balb/c ซึ่งเลี้ยงไว้ที่เรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 เชื้อมาลาเรีย P. falciparum ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกจากผู้ป่วยที่อาศัยอยู่ในจังหวัดตากและตราด

ไอโซเลต	แหล่งที่มาของเชื้อ	วันที่ทำการเก็บเชื้อ	วันที่เตรียมสไลด์	%parasitemia			
				total	Ring	Schizont	Merozoite
TM335R	รพ.เวชศาสตร์ฯ	2-11-90	5-03-91	2.5	0.9	1.1	0.5
BR12*	อ. บ่อไร่ จ. ตราด	30-12-90	30-01-91				
BR14*		30-12-90	4-03-91				
MBR24		29-01-91	14-02-91	8.5	7.0	1.0	0.5
MBR27		10-02-91	7-03-91	26.0	18.0	6.0	2.0
MBR93		10-02-91	7-03-91	11.9	5.2	3.9	2.8
MBR94		10-02-91	18-02-91	7.0	4.0	2.0	1.0
MMS1*	อ. แม่สอด จ. ตาก	14-02-91	16-04-91				
MMS3		14-02-91	16-04-91	17.5	10.8	5.5	1.2
MMS4		20-03-91	16-04-91	5.15	3.3	1.6	0.25
MMS10		19-03-91	17-04-91	11.3	6.8	3.8	0.7
MMS14		17-04-91	17-05-91	18.5	12.0	5.0	1.5
MMS15		5-04-91	17-04-91	17.5	4.6	8.7	4.2
MMS20		23-04-91	17-05-91	23.0	11.0	8.0	4.0
MMS21		30-04-91	17-05-91	5.0	2.5	2.0	0.5
MMS23		25-04-91	17-05-91	12.0	7.0	3.5	1.5
MMS24		3-05-91	17-05-91	1.5	1.0	0.3	0.2
MMS33		8-05-91	17-05-91	6.0	3.0	2.0	1.0

หมายเหตุ : * ข้อมูล %parasitemia สูญหาย

3. Myeloma cell

Plasmacytoma เซลล์สายพันธุ์ NS-1 จากหน่วยวิจัยมาลาเรีย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับใช้เป็น parental cell ในการเชื่อมเซลล์

4. อุปกรณ์

เครื่อง Laminar Flow : ISSCO, BV-124, International Scientific Supply CO.Ltd, Thailand

ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 Incubator) : Forma Scientific

ตู้อบแห้ง (hot air oven)

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและ -80 องศาเซลเซียส : Forma Scientific

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) : PHM83 Autocal

เครื่องชั่งละเอียด : Sartorius, 2842

เครื่อง Tissue sonicator

ตู้เพาะเชื้อ (Incubator)

เครื่องเซนตริฟิวก์แบบตั้งโต๊ะ (Bench Centrifuge) : Du Pont Instruments

เครื่องเซนตริฟิวก์แบบปรับอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge): Sorvall

กล้องจุลทรรศน์ Fluorescence : Olympus,BH-2

กล้องจุลทรรศน์ Inverted : Olympus,CK 2

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)

เครื่อง vortex mixer

ถัง Liquid N_2 Refrigerator

เครื่องมือผ่าตัดประกอบด้วย กรรไกรผ่าตัดปลายแหลมและปลายมน และปากคีบปลายแหลมโค้งและปลายมน

ตะแกรงที่มีขนาดรูตะแกรงประมาณ 100-200 ไมโครเมตร

เดซิเคเตอร์

โกร่งบดสี

ไมโครปิเปตปริมาตร 40-200 ไมโครลิตร (Micropipette 40-200 μl): Labsystems,Finland

ไมโครปิเปตปริมาตร 20-100 ไมโครลิตร (Micropipette 20-100 μl): Gilson,France

มัลติแชลนัลไมโครปิเปต 8 แชลนัลปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร (Multi-Channel Micropipette 8 channels 50-200 μl) : Socorex,Swiss

ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)

เครื่อง aspirator

กระดาษกรองมิลลิพอร์ (pore size 0.22 μm)

สายยาง

เครื่องปั๊มอากาศ

เครื่องนับเม็ดเลือด

สไลด์นับเม็ดเลือด (Blood Counting Chamber)

กล่องเก็บความชื้น (wet box)

นาฬิกาตั้งเวลา

ปากกา paint สีขาว (Sakura,Japan)

5. <u>ภาชนะพลาสติกชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง</u> (Disposable plastic ware)

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 4 หลุม (Multidishes 4) : Nunc.,Denmark

ชนิด 24 หลุม (Multidishes 24) : Nunc.,Denmark

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (Microwell Plate F96) : Nunc., Denmark

จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Tissue culture dish) ขนาด 35x10 และ 60x10 มิลลิเมตร : Nunc.,Denmark

ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (Tissue Culture Flask 25 cm^2) : Nunc.,Denmark

ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 175 ตารางเซนติเมตร (Tissue Culture Flask 175 cm^2) : Nunc.,Denmark

หลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 15 มิลลิลิตรพร้อมฝาเกลียว (Centrifuge tube 15 ml.) : Falcon,USA

หลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 50 มิลลิลิตรพร้อมฝาเกลียว (Centrifuge tube 50 ml.) : Costar,USA

หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ปริมาตรบรรจุ 1.5 และ 2.5 มิลลิลิตร : Nunc.,Denmark

Cryotubes ปริมาตรบรรจุ 1.0 มิลลิลิตร : Nunc.,Denmark

หลอดฉีดยาขนาด 1,2.5 และ 5 มิลลิลิตร (Syringe) : Terumo Corporation,Tokyo,Japan

เข็มฉีดยาขนาด 18 และ 22 G

6. <u>เครื่องแก้ว</u>

ชุดเครื่องกรองมิลลิพอร์ (Millipore fliter holder)

ขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์

หลอด Micro-hematocrit cappillary tubes

Cover glasses

Microscope slides

ปิเปตวัดปริมาตร 5, 10 และ 50 มิลลิลิตร

พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)

บีกเกอร์ขนาด 100,250,500 และ 1,000 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

หลอดทดลองที่มีฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร

หลอดแก้ว (vial) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

ขวดวัดปริมาตร (volummetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

7. อาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียและ hybridomas

RPMI 1640 Medium : Gibco (Cat.No. 430-1800)

8. ซีรั่ม

ซีรั่มคน (Human Serum) แยกจากหมู่เลือด O,A,B และ AB สำหรับใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

Fetal Bovine Serum : Gibco

Fetal Calf Serum : Seromed (Cat.No.S0015 Lot.6H01 และ Cat. No.S0113 Lot.6G03) สำหรับใช้เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์

9. เลือดคนหมู่ O

เม็ดเลือดแดงหมู่ O สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

10. สารเคมี

10.1 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย

Garamycin : Schering Corporation, U.S.A.

Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) : Flow Laboratories (No. 15-884-15)

Sodium Hydrogen Carbonate ($NaHCO_3$)

D-Sorbitol

แอลกอฮอล์ 95%และ70%

10.2 สารเคมีที่ใช้ย้อมเม็ดเลือดแดง

Absolute Methyl alcohol

Giemsa's stain

10.3 สารเคมีที่ใช้เตรียมแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย

Saponin

Percoll : Sigma (No. P-1644)

Adjuvant Complete Freund : Difco Laboratories (No. 0638-59)

Adjuvant Incomplete Freund : Difco laboratories (No. 0639-59)

10.4 สารเคมีที่ใช้ในการผลิต monoclonal antibodies

HAT (Hypoxanthine Aminopterin Thymidine) : Gibco (No.320-1062) ประกอบด้วย 10mM sodium hypoxanthine,40μM aminopterine, 1.6mM thymidine

HT (Hypoxanthine Thymidine) (100x) : Gibco (No. 320-1067) ประกอบด้วย 10mM sodium hypoxanthine, 1.6mM thymidine

8-Azaguanine lyophillized : Gibco (No. 670-4020)

Penicillin-Streptomycin : Gibco (No. 600-5145)

ประกอบ Penicillin (Base) 10,000 u/ml Streptomycin (Base) 10,000 μg/ml

Sodium pyruvate : Gibco (No. 890-1840)

Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) : Flow Laboratories (No. 15-884-15)

L-Glutamine

Sodium Hydrogen Carbonate ($NaHCO_3$)

PEG 1500 (Polyethylene glycol)

PEG 4000 (50% solution in Dulbecco's phosphate buffer saline) : Gibco (No. 670-4030)

Dimethyl sulfoxide (DMSO) : Sigma (No. D-2650)

Pristane (12,6,10,14-tetramethylpentadecane) : Sigma (No. P-1403)

Acridine Orange : Fluka (No. 01660)

Ethidium Bromide : Fluka (No. 46065)

Alcohol 95 และ 70%

CO_2 gas

Liquid N_2

10.5 สารเคมีสำหรับย้อมสไลด์ IFA

Anti-mouse IgG (whole molecule) FITC conjugate (developed in rabbit) : Sigma (No. F-7506)

Evans Blue

Sodium Chloride (NaCl)

Sodium Carbonate (Na_2CO_3)

Disodium Hydrogenphosphate anhydrous (Na_2HPO_4)

Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_2)

Sodium Azide (NaN_3)

Bovine Serum Albumin (BSA)

Glycerol

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรีย P. falciparum ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อมาลาเรีย P. falciparum สายพันธุ์ T9/94 S300.300 และ T9/94 (M1-1)b3 เป็นสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามวิธีของ Trager และ Jensen (1976) จากการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น โดยได้รับเม็ดเลือดที่มีเชื้อซึ่งเพาะเลี้ยงอยู่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35x10 มิลลิเมตร และมีจำนวนของเชื้อสูง ดูดเลือดจากจานเพาะเลี้ยงใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อเดิมชั้นบนออก ดูดเม็ดเลือดแดงไปทำสไลด์แบบฟิล์มบาง เพื่อนับจำนวนเชื้อ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมาลาเรียดูในภาคผนวก ก หน้า 95) ลงไปในปริมาตร 5.4 มิลลิลิตร ต่อ 0.5 มิลลิลิตรของเม็ดเลือดแดงที่เหลืออยู่ เพื่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 8% haematocrit และเติมเม็ดเลือดแดงที่เตรียมจากเลือดคนหมู่ O ลงไปประมาณ 0.1 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นเม็ดเลือดที่ได้ทำการปั่นล้างเอาส่วนพลาสมาและบัฟฟีโคต (buffy coat) รวมทั้งเม็ดเลือดขาวออกแล้ว และทำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50% haematocrit ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อดูดส่วนผสมที่ได้ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 60x10 มิลลิเมตร วางจานเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นในเดสซิเคเตอร์ซึ่งมีเทียนไขวางอยู่ จุดเทียนไขจนเทียนลุกไหม้ดีแล้วปิดฝาเดสซิเคเตอร์เมื่อเทียนใกล้ดับปิดส่วน stop cock ที่อยู่ด้านบนของฝาเดสซิเคเตอร์ทิ้งไว้สักครู่เทียนจะดับสนิท นำเดสซิเคเตอร์ไปวางในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 36-38 องศาเซลเซียส การจุดเทียนไขโดยวิธีนี้ทำให้ภายในเดสซิเคเตอร์นั้นมีก๊าซ CO_2 ประมาณ 3% และ O_2 ประมาณ 17% ในการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้จะต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสามารถเจริญเพิ่มจำนวน และในการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละครั้งจะต้องทำการตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยโดยการเตรียมสไลด์เม็ดเลือดแบบฟิล์มบาง ซึ่งกระทำได้โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเลือดที่ติดอยู่ก้นจานเพาะเลี้ยงเชื้อออกมาเล็กน้อย หยดบนสไลด์แล้วใช้ขอบสไลด์อีกแผ่นหนึ่งแตะหยดเลือดทำมุม 45 องศา เลื่อนขอบสไลด์ที่ทำมุมอยู่ออกไปทางปลายอย่างรวดเร็วและสม่ำ

เสมออย่าให้หยุดชะงัก จะทำให้เลือดแผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางบนแผ่นสไลด์ ทิ้งให้แห้งสนิทก่อนจึงนำไป fix ในแอบโซลูทเมธิลแอลกอฮอล์ ประมาณครึ่งนาที นำไปย้อมด้วยสียิมซาแล้วตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดที่ติดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (วิธีการนับดูในภาคผนวก ข หน้า 98-99) ถ้ามีจำนวนเชื้อสูงกว่า 3% ต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ทุกๆ 4 วันจะต้องเพิ่มเม็ดเลือดแดงลงไปในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 100 ไมโครลิตรต่อจานเพาะเลี้ยงขนาด 60x10 มิลลิเมตร

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ทำการเลี้ยงและผสมพันธุ์หนูไมซ์สายพันธุ์ Balb/c ในเรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายในห้องที่ปรับอุณหภูมิห้องเป็น 25 องศาเซลเซียส และควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมงคือระหว่างเวลา 06.00 - 20.00 นาฬิกา ด้วยเครื่องควบคุมอัตโนมัติ ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำดื่มแก่หนูทดลองตลอดเวลา การผสมพันธุ์หนูจะใช้พ่อพันธุ์ต่อแม่พันธุ์ในอัตราส่วน 1:2 เลี้ยงไว้ในกรงเดียวกัน เมื่อแม่พันธุ์ตั้งท้องแล้วแยกพ่อพันธุ์ออกมาจากกรง ตามปกติแม่หนูจะใช้เวลาตั้งท้องนานประมาณ 20-30 วันนับจากวันที่ผสม เมื่อลูกหนูมีอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์จะถูกแยกออกมาจากกรงแม่และทำการแยกเพศลูกหนูนั้นเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละกรง สำหรับการทดลองผลิต monoclonal antibody ครั้งนี้จะใช้เฉพาะหนูเพศเมียเท่านั้น ส่วนหนูเพศผู้จะเก็บไว้เป็นพ่อพันธุ์หรือถ้ามีจำนวนมากเกินไปต้องทำการฆ่าทิ้ง

3. การเตรียมแอนติเจน

3.1 การเตรียมแอนติเจนสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู

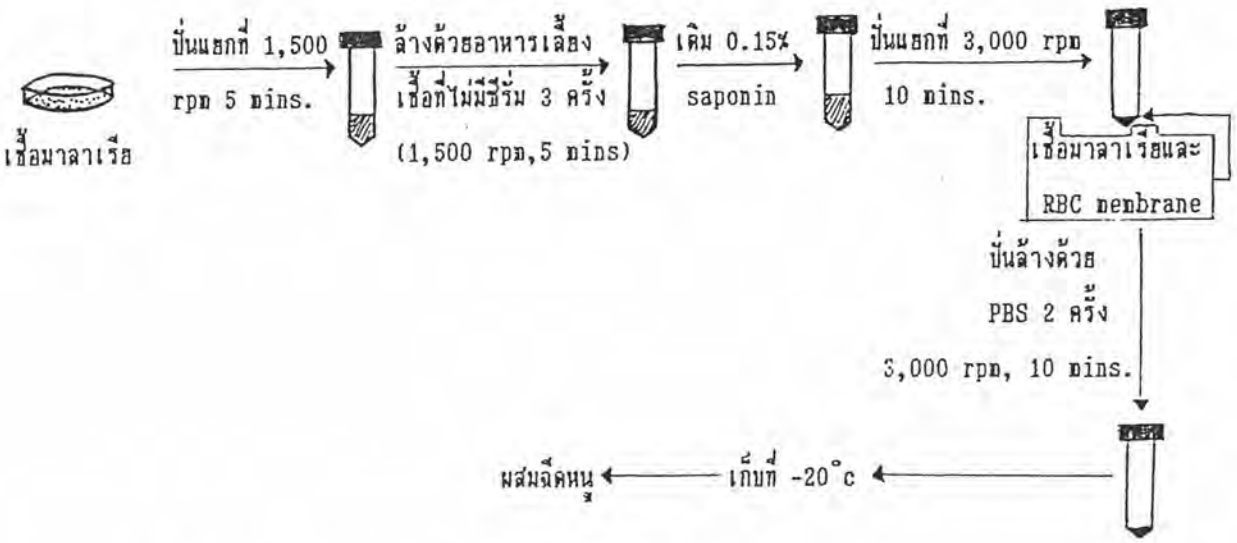
เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ T9/94 S300.300 และ T9/94 (M1-1)b3 ดังที่ได้อธิบายในข้อ 1 เมื่อจำนวนของเชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ schizont ประมาณ 15-20% parasitemia จึงนำมาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนู โดย

จะใช้เชื้อที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 60x10 มิลลิเมตร ทั้งหมด 20-24 dish ซึ่งได้ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงประมาณ 10-12 มิลลิลิตร สำหรับการเตรียมเป็นแอนติเจนแต่ละครั้งจะได้ปริมาณของแอนติเจนประมาณ 250-300 ไมโครลิตร และผสมฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูได้ประมาณ 3-4 ตัว (100 ไมโครลิตรต่อหนู 1 ตัว) โดยในการทดลองทำการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้งจะใช้หนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพียงหนึ่งตัวเท่านั้น ส่วนหนูที่เหลือจะเก็บไว้สำหรับทำการเชื่อมเซลล์ครั้งต่อไป ภายหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูแล้ว ต้องตรวจวัดหาปริมาณของแอนติบอดี (titre) ในซีรั่มของหนูก่อนที่จะนำมาใช้ในการเชื่อมเซลล์ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคในการเตรียมแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียเป็น 2 แบบคือ

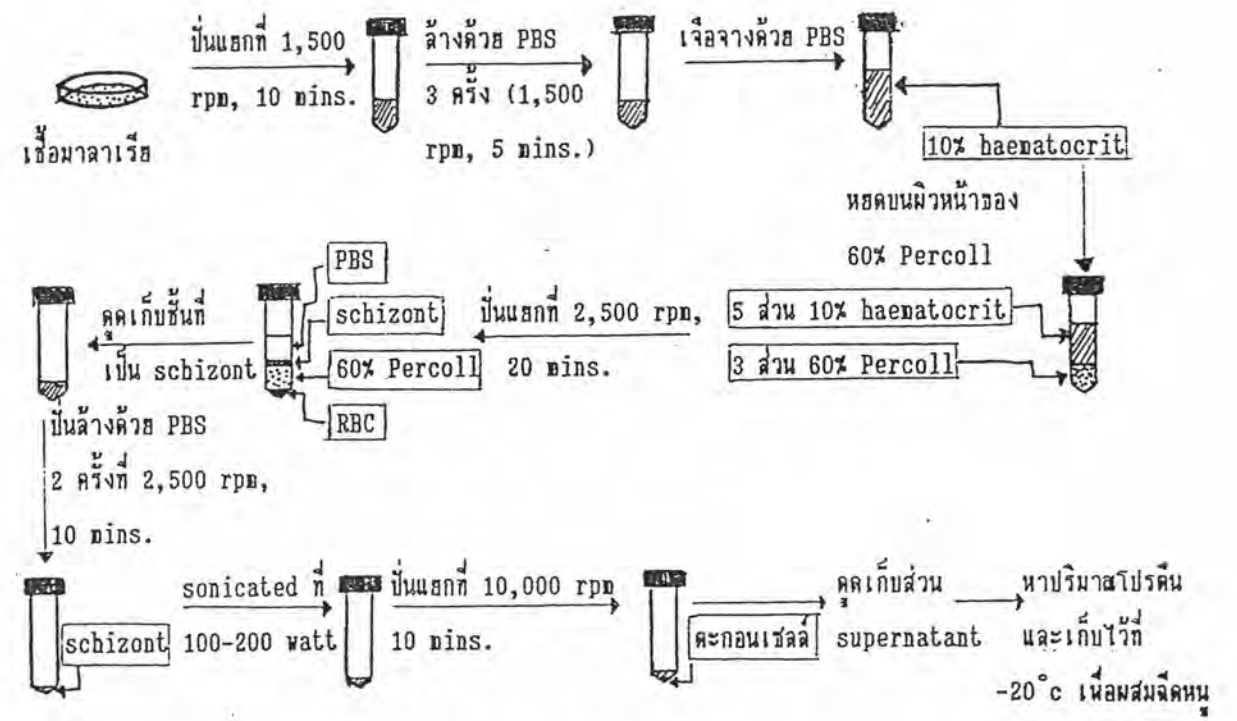
3.1.1 การเตรียมแอนติเจนของเชื้อสายพันธุ์ T9/94 S300.300 ได้เตรียมตามวิธีของ McBride และคณะ (1982) ดังแสดงในรูปที่ 8ก โดยถ่ายเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ข้างต้นใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ที่สะอาดปราศจากเชื้อ นำไปปั่นล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรั่ม 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที หลังจากการปั่นล้างครั้งสุดท้ายแล้วดูดส่วนของเหลวออกให้มากที่สุดจนเหลือแต่เม็ดเลือดแดงที่ก้นหลอด แล้วเติม 0.15% saponin ลงไปในปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตรเม็ดเลือดแดงที่มีอยู่ ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้เม็ดเลือดแดงสัมผัสถูกสารละลาย saponin นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำสีแดงชั้นบนออกจนเหลือเฉพาะตะกอนสีดำอยู่ข้างใต้ ซึ่งเป็นเชื้อมาลาเรียและส่วนของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดง ปั่นล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีซีรั่มประมาณ 3 ครั้ง ดูดส่วนน้ำและส่วนสีขาวซึ่งเป็นส่วนของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงออกจนหมดเหลือแต่ตะกอนสีดำ นำไปเก็บที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอไปใช้ฉีดหนูต่อไป

3.1.2 การเตรียมแอนติเจนของเชื้อสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 นั้นจะทำการแยกเชื้อที่อยู่ในระยะ schizont ด้วยวิธี Percoll gradient (รูปที่ 8ข) โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Scholfield และคณะ (1982) ทำได้โดยการถ่ายเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ข้างต้นใส่หลอดเซนตริฟิวก์ ปั่นล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมล ใช้ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เมื่อปั่นล้าง

ก. การใช้ saponin ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก



ข. การทำ Percoll gradient แล้วทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดย sonication



รูปที่ 8 วิธีการเตรียมแอนติเจนของเชื้อมาลาเรีย

หมายเหตุ: ก. การใช้ saponin ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก, ข. การทำ Percoll gradient แล้วทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดย sonication

ครั้งสุดท้ายแล้ว ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดส่วนน้ำชั้นบนออกจนหมดเหลือเฉพาะเม็ดเลือดแดงที่ก้นหลอด เจือจางเม็ดเลือดแดงส่วนนี้ให้เป็น 10% hematocrit ด้วย PBS หรือให้มีปริมาตรของเม็ดเลือดแดงต่อ PBS เท่ากับ 1:10 ขั้นตอนต่อมาหยดเม็ดเลือดแดงที่เตรียมเป็น 10% hematocrit ลงบนผิวหน้าของ 60% Percoll ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดเซนตริฟิวก์ในอัตราส่วนของ 60% Percoll ต่อ 10% hematocrit เท่ากับ 3:5 จะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น โดยที่ของเหลวในชั้นล่างคือ 60% Percoll ส่วนของเหลวชั้นบนคือเม็ดเลือดแดง 10% hematocrit นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที จะทำให้เม็ดเลือดแดงที่มีเชื้อมาลาเรียในระยะ schizont แยกออกมาเป็นชั้นสีดำอยู่ระหว่างชั้นของ PBS ซึ่งอยู่ชั้นบนกับชั้นของ 60% Percoll ซึ่งอยู่ชั้นล่าง ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อระยะอื่นรวมทั้งที่ไม่ติดเชื้อจะแยกออกมาอยู่ก้นหลอด ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเก็บเอาเฉพาะชั้นสีดำใส่หลอดเซนตริฟิวก์อีกหลอด ปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้งที่ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสออกให้มากที่สุดจนเหลือแต่ตะกอนสีดำ เติม PBS ลงไปในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของเชื้อที่ได้เก็บไว้ในตู้ -20 องศาเซลเซียส เมื่อได้เชื้อเป็นปริมาณมากแล้วจึงนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Tissue sonicator ที่ 100 ถึง 200 วัตต์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนของเหลวชั้นบนไว้และแบ่งมาเล็กน้อย เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (Peterson, 1983) ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูต่อไป

3.2 <u>การเตรียมแอนติเจนสำหรับทำสไลด์เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่ผลิตโดย hybridoma และทดสอบความจำเพาะของ MAb</u>

เพาะเลี้ยงเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ T9/94 S300.300 และ T9/94 (M1-1)b3 ทำนองเดียวกันกับการเตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู โดยเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อที่มีการเจริญในระยะ schizont ประมาณ 5-6% parasitemia และมีเชื้อในระยะอื่นปะปนด้วย เก็บเชื้อที่ได้มาปั่นล้างด้วย PBS แล้ว เจือจางเม็ดเลือดแดงที่ได้ให้เป็น 1% hematocrit ด้วย PBS

นำแผ่นสไลด์แก้วที่สะอาด และแช่ไว้ใน 95% แอลกอฮอล์มาเช็ดให้สะอาด ใช้ปากกา paint สีขาวขีดบนสไลด์ให้เป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 3X3 มิลลิเมตรเป็นจำนวน 15 หรือ 21 ช่องต่อสไลด์หนึ่งแผ่นทิ้งไว้ให้สีแห้ง หยด coating buffer (วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวก ข หน้า 97) ลงไปในช่องดังกล่าวช่องละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ถาดครอบปิดไว้เพื่อกันการระเหยของ coating buffer ทิ้งไว้ 30 นาทีจึงดูด coating buffer ที่เหลืออยู่ออก หยดเม็ดเลือดแดงที่เจือจางเตรียมไว้แล้วลงไปช่องละประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ถาดครอบปิดทิ้งไว้ 30 นาที ดูดส่วนน้ำชั้นบนออกให้มากที่สุดเป่าสไลด์ให้แห้งด้วยพัดลม เมื่อสไลด์แห้งแล้ว สามารถนำสไลด์ไปใช้ทดสอบปฏิกิริยา indirect immunofluorescent assay (IFA) กับแอนติบอดีที่ผลิตได้ทันที แต่ถ้ายังไม่ใช้ต้องเก็บสไลด์ที่เตรียมได้นี้ใส่ในกล่องที่มี siligar gel บรรจุอยู่ด้วยเพื่อดูดความชื้น แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสหรือที่ -80 องศาเซลเซียส ในการเตรียมสไลด์แอนติเจนแต่ละครั้งจะเตรียมไว้ประมาณ 50-60 แผ่น เพื่อให้เพียงพอกับการนำไปใช้ทดสอบในการทดลอง

สำหรับการเตรียมสไลด์ เพื่อทดสอบความจำเพาะของ MAb ต่อระยะต่างๆของเชื้อ ซึ่งต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีการเจริญอยู่ในระยะเดียวกัน (synchronous culture) โดยชักนำด้วยสารละลาย 5% sorbital นำเชื้อที่มีการเจริญอยู่ในแต่ละระยะคือ ระยะ ring, trophozoit, schizont และ merozoit ตามลำดับ มาเตรียมสไลด์สำหรับทดสอบกับ MAb ที่ผลิตได้ด้วยวิธีเดียวกับข้างต้น

4. <u>การกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู</u> (Immunization)

ใช้วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูเช่นเดียวกับ วิธีของ McBride และคณะ (1982) สำหรับการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 1-3 (CU1-3) และใช้วิธีเดียวกับของ Khusmith และคณะ (1984) ในการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4-8 (CU4-8) โดยในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูสำหรับทำการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาอย่างน้อยประมาณ 1-2 เดือน เนื่องจากต้องทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูอย่างน้อย 3 ครั้ง และอีก 1 ครั้งก่อนทำการเชื่อมเซลล์ 3 วัน ในการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 1-3 จะใช้เวลาสำหรับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูนานกว่าการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 4-8

ประมาณ 1 เดือน

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูนั้น ทำได้โดยนำแอนติเจนที่เตรียมได้ในข้อ 3.1.1 หรือ 3.1.2 เป็นปริมาณ 100-200 ไมโครกรัมโปรตีนสำหรับการฉีดหนู 1 ตัว ผสมกับ Freund's Complete Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ vortex mixer แล้วนำไปฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูไมซ์ Balb/c เพศเมียอายุประมาณ 8 สัปดาห์ หลังจากนั้น จึงฉีดกระตุ้นหนูตัวเดิมด้วยแอนติเจนที่ผสมกับ Freund's Incomplete Adjuvant ในปริมาณเท่ากับครั้งแรก และฉีดกระตุ้นซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 3 ด้วยแอนติเจนเช่นเดียวกับครั้งที่ 2 ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการฉีดหนูแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 1-2 สัปดาห์ และหลังจากการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 3 แล้ว ประมาณ 1 สัปดาห์ จะทำการเจาะเลือดหนูทางเบ้าตาด้วยหลอด capillary เพื่อแยกซีรั่มไปตรวจหา titre ของแอนติบอดีต่อเชื้อมาลาเรียโดยวิธี IFA ค่า titre ในซีรั่มของหนูควรจะสูงกว่า 1:6250 ถ้าพบว่าค่า titre ที่ได้ต่ำกว่านี้ต้องทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูซ้ำอีกครั้งด้วยแอนติเจนที่ผสมกับ Freund's Incomplete Adjuvant โดยเว้นระยะเวลาการฉีดกระตุ้นครั้งนี้นานประมาณ 2-3 สัปดาห์ และหลังจากนั้น 1 สัปดาห์จึงเจาะเลือดจากหนูมาทำการตรวจหา titre ซ้ำอีกครั้ง

การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูก่อนทำการเชื่อมเซลล์ 3 วัน ใช้แอนติเจนเช่นเดิมแต่นำมาผสมกับ PBS แทน Freund's adjuvant

5. การทดสอบประสิทธิภาพของ Fetal Calf Serum (FCS)

FCS ทุก lot. ที่สั่งซื้อมาใช้จะต้องนำมาทดสอบประสิทธิภาพ ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ myeloma หรือ hybridoma ก่อน โดยนำมาเติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ประมาณ 10-20% แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม FCS มาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ด้วยวิธี Limiting dilution cloning เพื่อตรวจดูว่า FCS lot.ใดบ้างที่ช่วยให้การเจริญของเซลล์ดีที่สุด แล้วจึงสั่งซื้อเฉพาะ lot. นั้นๆมาเก็บไว้ให้เพียงพอตลอดการทดลอง

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma

ในช่วงเวลาเดียวกันกับที่เริ่มทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนู ต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma ไว้เพื่อเตรียมสำหรับทำการเชื่อมเซลล์ โดยนำหลอดที่บรรจุเซลล์ myeloma NS-1 ที่เก็บแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมา ทำให้เซลล์ที่แข็งตัวอยู่เกิดการหลอมเหลวอย่างรวดเร็วแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรั่มปริมาณ 20% (RP20) ลงไป ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ $1x10^5$ ถึง $5X10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร แล้วดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ตรวจลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted นำจานเพาะเลี้ยงดังกล่าวไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator) ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบรรยากาศภายในตู้มีก๊าซ CO_2 5% ความชื้นสัมพัทธ์ 100%

หลังจากนั้นประมาณ 1-2 วัน หรือเมื่อเซลล์ myeloma เจริญเพิ่มจำนวนมากแล้วอาจลดปริมาณซีรั่มที่เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงเป็น 10-15% เพื่อชลอการเจริญอย่างรวดเร็วของเซลล์ myeloma และเนื่องจากเซลล์ NS-1 เป็น myeloma ที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ HGPRT แต่การเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานอาจเกิดมีการกลายพันธุ์ไปเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นมาได้อีก ดังนั้นจึงควรเติม 8-azaguanine ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma โดยให้เซลล์เจริญอยู่ในอาหารนี้เป็นระยะเวลา 2-3 วันควรทำเช่นนี้ทุกๆ 6 เดือน เมื่อมีการเพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน

7. การผลิตเซลล์ hybridoma

7.1 การแยกเซลล์ม้ามจากหนูที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ทำการฆ่าหนูด้วยวิธีดึงคอ จุ่มหนูที่ตายแล้วทั้งตัวในแอลกอฮอล์ 70% เพื่อฆ่าเชื้อและล้างสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ที่ขนหนู ใช้กรรไกรผ่าตัดและปากคีบที่อบฆ่าเชื้อแล้วเปิดหนังชั้นนอกตรงบริเวณท้องด้านซ้ายออก แล้วใช้กรรไกรและปากคีบอีกชุดตัดเปิดกล้ามเนื้อหน้าท้อง ใช้ปากคีบดึงม้ามซึ่งอยู่ทางด้านล่างของกระเพาะอาหารขึ้นมาใช้กรรไกรตัดม้ามออกมา ล้างใน

อาหารเลี้ยงเซลล์ RP 2 ครั้ง วางชิ้นม้ามบนตะแกรง (seive) ใช้ปลายของไส้หลอดฉีดยาพลาสติกกดเบาๆเพียง 4-5 ครั้งบนชิ้นส่วนของม้าม ขณะเดียวกันหยดอาหารเลี้ยงเซลล์ RP ลงไปทีละน้อย เพื่อให้เซลล์ม้ามลอดผ่านช่องตะแกรงสู่หลอดเซนตริฟิวก์ที่รองรับ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RP อีก 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นล้าง 2 ครั้งที่ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้งเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RP ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนับจำนวนเซลล์และคำนวณค่า viability ของเซลล์ (ดูในภาคผนวก ข หน้า 99)

7.2 การเตรียม Feeder cell

เตรียมโดยวิธีเดียวกันกับข้อ 7.1 โดยใช้หนูเพศเมียปกติ (ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน) หลังจากปั่นล้างเซลล์ม้ามปกติครั้งสุดท้ายพร้อมทั้งนับจำนวนเซลล์และคำนวณค่า viability ของเซลล์แล้ว เจือจางเซลล์โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 ที่ผสมสาร HAT (sodium hypoxanthine 0.1mM, aminopterine 0.4μM, และ thymidine 16μM) ให้มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ $2x10^5$ หรือ $3X10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปกติจะใช้เซลล์ม้ามจากหนู 1 ตัว สำหรับเตรียม feeder cell ต่อการทำการเชื่อมเซลล์ 1 ครั้ง เก็บเซลล์ที่ได้นี้ไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ก่อน แล้วจึงมาทำการเชื่อมเซลล์ต่อไป

7.3 การเชื่อมเซลล์ (Cell Fusion)

วิธีการเชื่อมเซลล์ในการทดลองนี้ใช้วิธีของ McBride และคณะ (1982) โดยการเชื่อมเซลล์แต่ละครั้งจะต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma ให้เจริญอยู่ในช่วง log phase และได้เชื่อมโดยใช้อัตราส่วนระหว่างจำนวนเซลล์ myeloma ต่อ immune spleen cell เป็น 4 แบบคือ 1:2, 1:4, 1:5 และ 1:10 ขั้นตอนการเชื่อมเซลล์กระทำดังนี้ นำเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาผสมกัน แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RP 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวออกจนหมด เคาะก้นหลอดเบาๆ 2-3 ครั้งเพื่อให้เซลล์ที่เกาะตัวกันอยู่หลุดแยกออกมา แล้วนำหลอดนั้นไปแช่ในน้ำอุ่นที่ปรับอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆหยดสารละลาย 50% PEG ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปบนเซลล์ในหลอดเซนตริฟิวก์ภายในเวลา 60 วินาทีเอียงหลอดไปมา เพื่อให้

เซลล์สัมผัสกับสารละลาย PEG ได้ทั่วถึงตั้งทิ้งไว้ 60 วินาที เขย่าเบาๆเป็นครั้งคราว สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1,500 ในการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 1-2 และ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4,000 สำหรับการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 3-8 หลังจากตั้งทิ้งไว้ 60 วินาทีแล้ว หยดอาหารเลี้ยงเซลล์ RP ลงไปในปริมาตร 1 มิลลิลิตรให้หมดภายในเวลา 60 วินาที ผสมให้เข้ากันดี ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RP ลงไปอีก 9 มิลลิลิตรภายในเวลา 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง

นำ feeder cell ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.2 แบ่งใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยให้มีจำนวนเซลล์ต่อหลุมประมาณ $2x10^5$-$3X10^5$ เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร เก็บจานเพาะเลี้ยงดังกล่าวใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วนำหลอดที่ทำการเชื่อมเซลล์ไว้ข้างต้น มาปั่นแยกที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวชั้นบนออกเคาะก้นหลอดให้เซลล์หลุดออกมา เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 ที่มี HAT ผสมอยู่ลงไป โดยเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ $1x10^6$-$2X10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หยดส่วนผสมที่ได้นี้ลงในจานเพาะเลี้ยงที่มี feeder cell อยู่ หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ดังนั้นในแต่ละหลุมจะมีอาหารเลี้ยงเซลล์เท่ากับ 200 ไมโครลิตร) นำไปเก็บในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์

ทุกครั้งที่ทำการเชื่อมเซลล์จะเพาะเลี้ยงเซลล์ myeloma (NS-1) ใน HAT selective medium ด้วย เพื่อใช้เป็น control เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเชื่อมเพราะเซลล์ NS-1 จะไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าเซลล์ลูกผสมที่เจริญขึ้นมานั้นไม่ใช่เซลล์ myeloma แต่เป็นเซลล์ hybridoma ที่แท้จริง

สำหรับในการทำวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเชื่อมเซลล์ทั้งหมด 8 ครั้ง ซึ่งในการทดลองทำการเชื่อมเซลล์แต่ละการทดลอง ได้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์และตรวจสอบ MAb เป็นเวลาประมาณ 3-4 เดือน เพื่อให้ได้ monoclone ของ hybridoma ที่ผลิต MAb ที่มีความจำเพาะตามต้องการแล้วจึงจะเริ่มทำการทดลองเชื่อมเซลล์ครั้งต่อไป

7.4 การตรวจการเจริญและการเพาะเลี้ยงโคโลนีของ hybridoma

ภายหลังจากทำการเชื่อมเซลล์ได้ 2 วัน จะต้องตรวจดูการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted โดยตรวจดูเซลล์ในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง

ทั้งหมดที่ทำไว้ และจะทำการตรวจการเจริญของเซลล์เช่นนี้ทุกๆ 1-2 วัน เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน หรือจนแน่ใจว่าไม่มีโคโลนีของ hybridoma เจริญขึ้นมาอีกต่อไป

ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม ในวันที่ 4 หลังทำการเชื่อมเซลล์แล้ว โดยใช้มัลติแชลนัลไมโครปิเปต ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในหลุมออกมาประมาณ 100 ไมโครลิตร (ประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์) แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 ที่มี HAT ลงไป 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยง การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม HAT มาเป็น อาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 ที่มี HT (sodium hypoxanthine 0.1mM, และ 16μM thymidine) แทนนั้น จะกระทำต่อเมื่อสังเกตเห็นว่าเซลล์ NS-1 ซึ่งใช้เป็น control ได้ตายหมดแล้ว หลังจากนั้นจะทำการตรวจดูการเจริญของเซลล์และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี HT ทุกๆ 1-2 วัน แล้วจึงเปลี่ยนไปเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 ต่อไป

7.5 การคัดเลือก hybridoma ที่ผลิต MAb

7.5.1 การเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ (culture supernatant)

เมื่อโคโลนีของ hybridoma ในแต่ละหลุมเจริญจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ดูดน้ำเลี้ยงเซลล์จากแต่ละหลุมเก็บใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์แต่ละหลอด เพื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบว่ามีแอนติบอดีหรือไม่ โดยจะทำการทดสอบทันที หรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบในวันรุ่งขึ้น

7.5.2 การทดสอบ MAb ที่ผลิตโดย hybridoma ด้วยวิธี IFA

นำสไลด์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.2 ออกมาเป่าให้แห้งด้วยพัดลมประมาณ 30 นาที หยดน้ำเลี้ยงเซลล์จากข้อ 7.5.1 ลงในหลุมบนสไลด์หลุมละ 15 ไมโครลิตร โดยระวังมิให้มีการปนเปื้อนระหว่างหลุม ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RP20, PBS และน้ำเลี้ยงเซลล์ NS-1 สำหรับเปรียบเทียบเป็น negative control ของปฏิกิริยา IFA ส่วน positive control ได้ใช้ MAb ต่อเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* ที่ผลิตจากน้ำในช่องท้อง (ascitic

fluid) โดยได้รับความกรุณาจาก Dr. J.S. McBride แห่ง Institute of Cell, Animal and Population Biology, Edinburgh University, Scotland, United Kingdom

ขั้นตอนการย้อมสไลด์มีดังต่อไปนี้คือ หลังจากหยดน้ำเลี้ยงเชลล์, สารละลาย negative และ positive control ลงในหลุมบนสไลด์แล้ว วางสไลด์ไว้ในกล่องที่มีความชื้น 100% เป็นเวลา 30 นาที ดูดน้ำเลี้ยงเชลล์ออกจากสไลด์ ด้วยเครื่อง aspirator แล้วล้างด้วย PBS ทำซ้ำเช่นนี้ประมาณ 5-6 ครั้ง หยด anti-mouse IgG (whole molecule) conjugated FITC หลุมละ 15 ไมโครลิตรลงในทุกๆหลุม เก็บสไลด์ไว้ในกล่องที่มีความชื้นเป็นเวลา 30 นาที ดูด anti-mouse IgG conjugated FITC ส่วนเกินออก แล้วล้างด้วย PBS 5-6 ครั้ง ย้อมสไลด์อีกครั้งด้วยสี Evans blue 0.1% นาน 3-5 นาที แล้วล้างสีออกด้วย PBS หลังจากนั้นนำไป mount ด้วย 50% glycerol ใน PBS ปิดด้วย coverglass แล้วทำการอ่านผลจากสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ทันที เนื่องจากถ้าเก็บไว้นานความเข้มของการเรืองแสงจะลดลง การอ่านผลจากสไลด์จะเทียบกับผลของ negetive และ positive control ในแต่ละสไลด์เสมอ

การทดสอบแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเชลล์ ที่เก็บจาก culture ที่มี hybridoma ในแต่ละครั้ง จะนำมาย้อมสไลด์ทันทีหลังจากดูดเก็บมาจาก culture แล้ว และจะดูดมาทำการทดสอบผลซ้ำอีกครั้งภายในเวลา 2-3 วันต่อมา เพื่อให้แน่ใจว่า culture ที่ให้ผล IFA เป็นบวกซึ่งแสดงว่าเชลล์ hybridoma ในหลุมนั้นผลิตแอนติบอดี ยังคงสามารถผลิตแอนติบอดีได้

หลังจากทดสอบ การผลิตแอนติบอดีของ hybridoma ที่ผลิตได้จะทำการเลือกเฉพาะ hybridoma ที่ผลิตแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาติดสีสารเรืองแสงเข้มชัดเจนมาทำ monoclone ต่อไป hybridoma ที่ถูกเลือกไว้จะใช้รหัสแทนเป็น CU ซึ่งย่อมาจาก Chulalongkorn University แล้วตามด้วยตัวเลขที่แสดงครั้งที่ทำการเชื่อมเชลล์ และตามด้วยตัวเลขแสดงลำดับของ clone ที่เกิดจากการเชื่อมเชลล์แต่ละครั้ง เช่น CU4.1 หมายถึง hybridoma ที่ได้จากการเชื่อมเชลล์ในครั้งที่ 4 และเป็น clone ลำดับที่ 1 (ดูในตารางที่ 11)

8. การทำ cell cloning โดยวิธี Limiting dilution cloning

เตรียม feeder cell โดยใช้เซลล์ม้ามหรือเซลล์ธัยมัส (thymus) ชนิดใดชนิดหนึ่ง ด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียม immune spleen cell เมื่อได้ feeder cell แล้ว ทำการเจือจางเซลล์เหล่านั้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 ที่มี HT ผสมอยู่ให้มีเป็นจำนวนเซลล์เท่ากับ $5X10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบ่ง feeder cell ใส่หลอดทดลองที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 4 หลอด หยดเซลล์ hybridoma ที่ได้คัดเลือกไว้แล้วลงไปในหลอดที่ 1 เป็นจำนวน 200 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของ feeder cell แล้วเจือจางต่อไปอีกครั้งละ 5 เท่าเป็นแบบ serial dilution อีก 3 dilution ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ของ hybridoma เป็น 40, 8 และ 1.6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ หยดเซลล์ที่เตรียมได้นี้ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ดังนั้นแต่ละ dilution จะเพาะเลี้ยงได้ 24 หลุม เก็บจานเพาะเลี้ยงนี้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์

หลังจากทำ cloning แล้ว 5 วัน ตรวจหาโคโลนีของ hybridoma ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน เมื่อพบโคโลนีของ hybridoma ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร จะดูดส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์จากหลุมนั้นมาตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี IFA เช่นเดียวกับในข้อ 7.5.2 สำหรับหลุมที่มีโคโลนีของ hybridoma เจริญอยู่ 1-2 โคโลนี ซึ่งมักพบใน dilution ที่ 3 และ 4 ส่วน dilution ที่ 1 และ 2 ได้โคโลนีในแต่ละหลุมเป็นจำนวนมาก เลือกหลุมที่มีโคโลนีเพียง 1 หรือ 2 โคโลนีที่มีการสร้างแอนติบอดี นำเซลล์ในหลุมดังกล่าวมาทำ recloning อีก 1-2 ครั้ง เพื่อทำให้ได้ monoclone ของ hybridoma และจะทำการตรวจสอบและคัดเลือกโคโลนีที่ผลิตแอนติบอดีไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อไป monoclone ของเซลล์ hybridoma ที่ได้จากการทำ cloning จะใช้รหัสเช่นเดียวกับที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ โดยใช้เป็นตัวเลขแสดงลำดับของ clone ที่ได้ เช่น monoclone ที่ 1 ของ CU 4.1 ที่ได้จากการทำ cloning ครั้งที่ 1 ใช้รหัสเป็น CU 4.1-1 หรือถ้าเป็น monoclone ลำดับที่ 3 ของ CU 4.1-1 ซึ่งได้จากการทำ cloning ครั้งที่ 2 ใช้รหัสเป็น CU 4.1-1-3 เป็นต้น (ดังแสดงในตารางที่ 11)

9. การเพิ่มจำนวนเซลล์ hybridoma (propagation of hybridomas)

นำเซลล์ที่ได้จากการทำ cloning หรือ recloning ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตแอนติบอดี มาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หรือ 24 หลุมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RP20 เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ hybridoma ให้มากขึ้น ขณะเดียวกันต้องทำการทดสอบแอนติบอดีในน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี IFA ถ้า hybridoma ยังคงสามารถผลิตแอนติบอดีได้ นำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์ในขวดเพาะเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่ซึ่งจะทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีรวมอยู่ด้วยไว้ศึกษาต่อไป และเก็บเซลล์ที่เพิ่มจำนวนขึ้นนี้ส่วนหนึ่งเก็บแช่แข็งไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์ และอีกส่วนหนึ่งนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนู เพื่อผลิต ascitic fluid

10. การผลิต ascitic fluid

ก่อนนำเซลล์ hybridoma ที่ได้คัดเลือกแล้วว่า มีการผลิต MAb ที่ต้องการไปฉีดหนู ต้อง primed หนูโดยฉีด pristane ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรเข้าทางช่องท้องของหนูสายพันธุ์ Balb/c เพศเมียที่มีอายุ 2 เดือนขึ้นไป เพื่อกระตุ้นให้หนูเกิดการระคายเคืองมีผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของหนูเกิดการตอบสนอง โดยมีการหลั่งสารต่างๆและชักนำให้ monocyte และ lymphocyte เข้ามาอยู่ในช่องท้องหนู ทำให้สภาพภายในช่องท้องหนูนั้นเหมาะสมแก่การเจริญของ hybridoma ดูดเก็บ hybridoma ที่ต้องการจะทำ ascites ลงในหลอดเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ไว้ ปั่นล้าง hybridoma ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RP อย่างน้อย 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำทิ้งแล้วเจือจาง hybridoma ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RP ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูที่เตรียมไว้ข้างต้น หลังจากนั้นประมาณ 15-20 วัน ท้องของหนูจะมีขนาดโตขึ้น ใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรและหัวเข็มขนาด 25G แทงเข้าทางช่องท้องค่อยๆดูดเอาน้ำจากช่องท้องออกมาเก็บใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ นำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก

จาก ascitic fluid ดูดเก็บส่วนน้ำใสชั้นบนแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์หลอดละ 100-200 ไมโครลิตรเก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส และแบ่งบางส่วนออกมาเพื่อนำไปตรวจหาปริมาณของแอนติบอดี

11. <u>การเก็บเซลล์แช่แข็ง</u> (Cryopreservation)

Hybridoma ที่ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้ตามวิธีในข้อ 9 และได้ทดสอบแล้วว่าสามารถสร้างแอนติบอดีได้จะเก็บไว้เป็นเซลล์สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งเป็น clone ของ hybridoma โดยดูดเก็บเซลล์ใส่หลอดเซนตริฟิวก์นำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์ชั้นบนใส่หลอดที่สะอาด และนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อไว้ใช้ศึกษาต่อไป เคาะก้นหลอดเซนตริฟิวก์เบาๆให้เซลล์ hybridoma ที่ติดอยู่ก้นหลอดหลุดออกมา เติม freezing media (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข หน้า 97) ลงไป ให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดูดใส่ในหลอด cryotube นำหลอดดังกล่าวใส่ในกล่องโฟมที่มีสำลีรองอยู่เพื่อช่วยให้เซลล์เกิดการแข็งตัวช้าๆ นำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส 1 คืนก่อน แล้วจึงเก็บใส่ในถังซึ่งบรรจุไนโตรเจนเหลวมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยวิธีนี้จะสามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นาน

12. <u>การตรวจหาปริมาณของแอนติบอดี</u> (Antibody titration)

เจือจางน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บไว้และ ascitic fluid ด้วยสารละลาย 1% BSA และ 0.01% NaN_3 ใน PBS โดยให้มีความเข้มข้นเป็น 1:10,1:50,1:250,1:1250 และ 1:6250 แล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยา IFA บนสไลด์แอนติเจนที่มีเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ T9/94 S300.300 หรือ T9/94(M1-1)b3 ซึ่งเตรียมไว้ในข้อ 3.2

13. การจำแนกกลุ่ม Monoclonal Antibody

การจำแนกกลุ่ม MAb ที่ผลิตได้จากการเชื่อมเซลล์ 4 ครั้ง คือ CU 4, CU 6, CU 7 และ CU 8 โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ของ monoclone ต่างๆที่คัดเลือกไว้ซึ่งมี titre สูง และให้การเรืองแสงเข้ม โดยอาศัยหลักการจำแนกของ McBride และคณะ,1982 ; Hall และคณะ,1983 ; Khusmith และคณะ,1984

13.1 จำแนกตามความจำเพาะต่อระยะต่างๆของเชื้อมาลาเรีย (stage specific)

นำสไลด์แอนติเจนของเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ T9/94(M1-1)b3 ที่เจริญในแต่ละระยะมาทดสอบกับ MAb ที่ผลิตได้ด้วยวิธี IFA โดยทำการทดสอบอย่างน้อย 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำต่อน้ำเลี้ยงเซลล์จากแต่ละ monoclone

การอ่านผลจากสไลด์ใช้วิธีเช่นเดียวกับในข้อที่ 7.5.2 โดยดูเปรียบเทียบกับหลุมที่เป็น positive control ซึ่งจะเป็น MAb ที่ทำปฏิกิริยา IFA กับเชื้อมาลาเรียได้ทุกระยะ

13.2 จำแนกตามรูปแบบการเรืองแสงจากปฏิกิริยา IFA (IFA pattern)

เตรียมสไลด์เชื้อมาลาเรียแบบแผ่นฟิล์มบาง ซึ่งมีเชื้อมาลาเรียที่มีการเจริญอยู่ทุกระยะ ดูดเก็บเชื้อมาลาเรีย clone T9/94(M1-1)b3 ที่เพาะเลี้ยงไว้ใส่หลอดเซนตริฟิวก์ ปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง เจือจางให้เป็น 50% hematocrit ด้วย PBS แล้วหยดลงบนแผ่นสไลด์ใช้ขอบของแผ่นสไลด์อีกแผ่นแตะหยดเลือดทำมุม 45 องศา ไถสไลด์ที่ทำมุมอยู่นั้นไปทางปลายสไลด์อย่างเร็วและสม่ำเสมอทิ้งไว้ให้แห้ง นำไป fix ใน acetone นาน 1 นาที ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปย้อมด้วยวิธี IFA ตรวจดูลักษณะปฏิกิริยาการติดสีสารเรืองแสงของ MAb ของแต่ละ monoclone ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ด้วย objective 100 X โดยดูทั่วทั้งเซลล์ของเชื้อหรือเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียซึ่งจะเห็นรูปแบบการติดสีสารเรืองแสงแตกต่างกัน และดูเทียบกับสไลด์ที่ย้อมด้วยสีอิมซ่า เพื่อช่วยในการระบุตำแหน่งที่ติด

สีสารเรืองแสง บันทึกภาพด้วยฟิล์มสี Fuji ที่มีค่าความไวแสง (ISO) 100 หรือ 200

14. <u>การศึกษาความหลากหลายของแอนติเจนของเชื้อมาลาเรียไอโซเลตต่างๆที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทยกับ MAb ที่ผลิตได้</u>

เชื้อมาลาเรียจำนวน 18 ไอโซเลต (ในตารางที่ 6) ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้นำมาเพาะเลี้ยง โดยจากหน่วยวิจัยมาลาเรีย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีจำนวนของเชื้อสูงประมาณ 3-15% parasitemia โดยมีเชื้อทุกระยะการเจริญ (ring, schizont, merozoite และ gametocyte) ได้นำมาเตรียมเป็นสไลด์แอนติเจนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2 และ fix สไลด์ด้วย acetone ก่อนนำไปทดสอบกับ MAb ที่ได้คัดเลือกไว้จำนวน 18 monoclone จากการเชื่อมเซลล์ครั้งที่ 6-8 ซึ่งเป็น MAb ที่ได้ตรวจ พบแล้วว่าสามารถให้ปฏิกิริยา IFA อย่างชัดเจน และมีรูปแบบการติดสีสารเรืองแสงต่างๆกัน MAb แต่ละ monoclone จะนำมาทำการย้อมสไลด์เพื่อทดสอบปฏิกิริยา IFA ทั้งหมด 3 ซ้ำ

การอ่านผลและบันทึกผลที่ได้กำหนดให้มีสัญญลักษณ์ ดังนี้

■ หมายถึง การเรืองแสงที่มีความเข้มมาก

◪ หมายถึง การเรืองแสงที่มีความเข้มปานกลาง

□ หมายถึง ไม่พบการเรืองแสง