บทคัดย่อ

T 157769

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีอินไดเรคแซนด์วิช อิมมูนโนซอร์เบนท์แอสเซ (indirect sandwich ELISA) เพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยใช้โพลีโคลนอล และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโค เพื่อเปรียบเทียบระยะลูเทียลในช่วงเดือนตุลาคม-มีนาคม และเดือนเมษายน-มิถุนายน และระหว่างพันธุ์ลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซี่ยน และพัฒนาวิธี strip ELISA kit เพื่อตรวจวัดการตั้งท้องภาคสนาม เก็บตัวอย่างน้ำนมปริมาณ 30 มล. (ลูกผสม 30 ตัว และพันธุ์แท้ 30 ตัว) เก็บอาทิตย์ละ 2 ครั้ง ทุกวันจันทร์ และวันศุกร์จากโคนมในฟาร์มโคนม ณ ศูนย์วิจัย และบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ โคนมที่เก็บตัวอย่างเป็นโคนมที่เพิ่งคลอดไม่เกิน 15 วัน โดยเก็บติดต่อกันนาน 135 วัน หรือจนกระทั่งโคตั้งท้องครั้งใหม่ ภายในโรงเรือนจะติดพัดลม และสปริงเกอร์เพื่อลดความเครียดเนื่องจากความร้อนในช่วงฤดูร้อน เก็บข้อมูลทางด้านระบบสืบพันธุ์ เช่น วันคลอด วันแรกในการตรวจพบระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน วันผสมเทียมครั้งแรกหลังคลอด และระยะระหว่างวันคลอดจนถึงผสมติด และปริมาณน้ำนม วิธีการ indirect sandwich ELISA เริ่มต้นโดยการเคลือบเพลทด้วยซีรั่มกระต่าย และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากเซลล์ลูกผสมของหนูถีบจักรเป็นตัวจับ (capture) และใช้เอนไซม์ goat anti-mouse IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง สำหรับ ELISA kit เพื่อตรวจวัดการตั้งท้องจะใช้กระดาษกรองชนิด polyvinylidene fluoride (PVDF) สำหรับเป็นที่ยึดจับซีรั่มกระต่าย

ผลการศึกษาพบว่า ขบวนการ indirect sandwich ELISA ในห้องปฏิบัติการเสร็จสิ้นภายใน 8 ชั่วโมง ไม่พบ cross reaction กับฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ช่วงความไวของปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 100 พิโคกรัม/100 ไมโครลิตร ถึง 250 นาโนกรัม/ 100 ไมโครลิตร และเปอร์เซ็นต์ค่าเกาะเกี่ยวที่ 50 % มีค่าเท่ากับ 10 นาโนกรัม/100 ไมโครลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์ Intra- และ Interassay อยู่ที่ 7.2 และ 13.2 % ตามลำดับ เมื่อทดสอบการทำงานของ strip ELISA พบว่า ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 2 ชั่วโมง มีค่า cut off อยู่ที่ 5 นาโนกรัม/100 ไมโครลิตร ภายใต้สภาพดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี indirect sandwich ELISA ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีค่าตรวจวัดใกล้เคียงกัน 12 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่างคิดเป็น 80 % แต่มีค่าเป็น false positive จำนวน 3 ตัวอย่างคิดเป็น 20 %

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าวิธี indirect sandwich ELISA และ strip ELISA kit สามารถใช้ตรวจวัดระดับโปรเจสเตอโรนในน้ำนมโค และตรวจวัดการตั้งท้องภาคสนามได้อย่างถูกต้อง

ABSTACT

TE 157769

The objective of this study was to establish a new method for the determination of progesterone (P_4) in cow's milk by indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in laboratory using mono- and polyclonal antibodies against P_4 and, in addition, to develop the strip ELISA kit for the pregnancy diagnosis in the field as an application of the laboratory method. Comparisons of P_4 titers between October-March and April-June interval and between breeds of cows, purebred Holstein Friesian (HF) and Thai native-Friesian crossbred (TF), were also made.

Sixty 30 ml milk samples (30 from HF and 30 from TF) were collected in the evening every Monday and Friday at Chiang Mai Livestock Research and Breeding Center over the period from calving until 135 days postpartum or until cows were proved to become pregnant. The cows were kept in free stalls in which electric fans and water sprinklers were prepared for the alleviation of heat stress on cows in the hot season. For all cows reproductive data such as numbers of days from calving to the first rise in P_4 concentration (DTFRP) and conception (DTC), number of A.I. service needed for conception (NAIS) and milk production were also collected.

The indirect sandwich ELISA was performed by the use of polyclonal anti-P_4 rabbit serum for culture-plate coating, monoclonal anti-P_4 antibody made by mouse hybridoma for antigen capture and anti-mouse IgG goat antibody conjugated with horseradish peroxidase as second antibody. In the ELISA kit for the pregnancy diagnosis, thin strips of polyvinylidene fluoride (PVDF) filter paper were used as adsorbent of polyclonal antibody.

Whole process of the ELISA in the laboratory could be finished within 8 hours. No cross reaction with any other steroids was found. Good standard curve of the sigmoid form was obtained by plotting percentages of maximum binding against the log doses of P_4 over the range from 100 pg to 250 ng/100 µl and the point of 50 % binding was 10 ng/100 µl. Intra- and interassay coefficients of variation were 7.2 and 13.2 %, respectively. When the strip ELISA kit was tested, on the other hand, time for reaction was shortened to 2 hours in total and cut off point for pregnancy diagnosis was set at 5 ng/ml. Under this condition, the diagnosis fitted with results judged by full ELISA made in the laboratory in 13 of 15 samples (86.7 %), but showed false positive response in 2 cases (13.3 %).

It was concluded that both indirect sandwich ELISA and strip ELISA kit were well usable for the precise measurement of milk P_4 concentration and pregnancy diagnosis in the field, respectively.