

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

เทสทอสเตอร์โรน (Testosterone, Sigma T-1500), ซัคซินิก แอนไฮไดรย (Succinic anhydride, Sigma S-7626), ฮิวแมน ซีรัม อัลบูมิน (Human serum albumin, HSA; Sigma A-1653), โซเดียมเอธิลเมอร์คิวไรไทโอซาลิไซเลต (Sodium ethylmercurithiosalicylate, Thimerosal, Sigma T-5125), พี-เทอร์เฟนิล (p-Terphenyl, Sigma T-1250), พีโอพีไอพี [POPOP, 2,2-p-phenylene-bis (5-phenyloxazole), Sigma P-3754], โปรเจสเตอร์โรน (Progesterone, Sigma 0130), 11อัลฟา-ไฮดรอกซีโปรเจสเตอร์โรน (11 α -Hydroxyprogesterone, Sigma H-5502), 17-อะซีโตซีโปรเจสเตอร์โรน (17 α -Acetoxypregesterone, Sigma A-4125), เพรีกนีโนโลน (Pregnenolone, Sigma P-9129), ไฮโดรคอร์ติโซน (Hydrocortisone, Sigma H-4001), แอนโดรสทีนไดโอน (Androstenedione, Sigma A-9630), 11บีตา-แอนโดรสทีนไดโอน (11 β -Androstenedione, Sigma A-3009), 17บีตา-เอสตราไดอล (17 β -Estradiol, Sigma E-8875), เอสโตรน (Estrone Sigma E-9750), Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma 7-9[®]; Sigma T-1378), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDPC, Sigma E-6383), Mineral oil (Heavy white oil) (Sigma No. 400-5), Saponin จาก Quillaja Bark (Sigma S-7900), Testosterone-3-(O-carboxymethyl) oxime (Sigma T-8390) และ N,N-Dimethyl formamide (Sigma D-4254) ผลิตโดยบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา, โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, NaH₂PO₄·H₂O; Art. 6345), โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, Art. 6404), เจลาติน (Gelatin, Art. 4070), กัมมันต์คาร์บอน (Charcoal activated, Art. 2186), ไพริดีน (Pyridine, Art. 9728), คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และ โทลูอีน (Toluene, Art. 8325) ผลิตโดยบริษัท Merk ประเทศเยอรมัน, ไดโซเดียม

ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ผลิตโดยบริษัท May and Baker, เมทานอล (Methanol Absolute) ผลิตโดยบริษัท J.T. Berker ประเทศสหรัฐอเมริกา, โซเดียม ซัลเฟต แอนไฮดรัส (Sodium sulphate anhydrous) ผลิตโดยบริษัท BDH Chemical ประเทศอังกฤษ, โซเดียม ไฮโดรเจน คาร์บอเนต (Sodium hydrogen carbonate, 31437) ผลิตโดยบริษัท Riedel-deHaen ประเทศเยอรมัน, แด็กซ์เตรน โซเดียม ซัลเฟต (Dextran sodium sulfate, 31395) และเอ็ททิลีนไดอะมิโนเตตราอะซิติก แอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA; 03609) ผลิตโดยบริษัท Fluka Biochemica ประเทศสวิตเซอร์แลนด์, โปรเจสเตอโรน ดิคลอกลาสารกัมมันตรังสีตรีเทียม $[(1, 2, 6, 7\text{-}^3\text{H})\text{Progesterone}, ^3\text{H-P4}]$ และเทสโทสเตอโรน ดิคลอกลาสารกัมมันตรังสีตรีเทียม $[(1, 2, 6, 7\text{-}^3\text{H}) \text{Testosterone}, ^3\text{H-Testosterone}]$ ผลิตโดยบริษัท Amersham ประเทศอังกฤษ, แอนติซีรัมต่อโปรเจสเตอโรน (Progesterone-11-HSA) ของกระต่าย R5 (ที่เตรียมโดย เพทาย และพันทิพา, 2535) และแอนติซีรัมต่อเทสโทสเตอโรน (Testosterone-3-HSA) ของกระต่าย N29 (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก).

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) แบบ UV-Visible โมเดล DU[®] Series 7000 บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex mixer) โมเดล K-550 GE บริษัท Labinco, เครื่องปั่นแยก (Centrifuger) โมเดล Megafuge 1.0 บริษัท Heraeus ประเทศเยอรมัน, เครื่องปั่นแยกชนิดที่ปรับอุณหภูมิได้ โมเดล Mistral 3000 บริษัท MSE Co. ประเทศอังกฤษ, เครื่อง Lyophilized Model TDS-3D-DP-O บริษัท FTS System, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา, เครื่องวัดพลังงานรังสีชนิดบีตา แบบ Liquid Scintillation Counter (1209 RACKBETA) บริษัท LKB WALLAC ประเทศฟินแลนด์, เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 4 ตำแหน่ง) โมเดล 2842 บริษัท Sartorius GmbH ประเทศเยอรมัน, เครื่องเขย่า (Shaker) โมเดล GFL Type 3015 บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik m.b. H&Co. ประเทศเยอรมัน, ไมโครปิเปต (Micropipet) ขนาด 1000, 200 และ 20 ไมโครลิตร Pipetman บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส, Dialysing tube (ไม่ให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุล ตั้งแต่ 12,000-14,000

ขึ้นไปผ่าน), บริษัท Viskase ประเทศสหรัฐอเมริกา, หลอดทดลองขนาด 10x75 และ 100x150 มม.

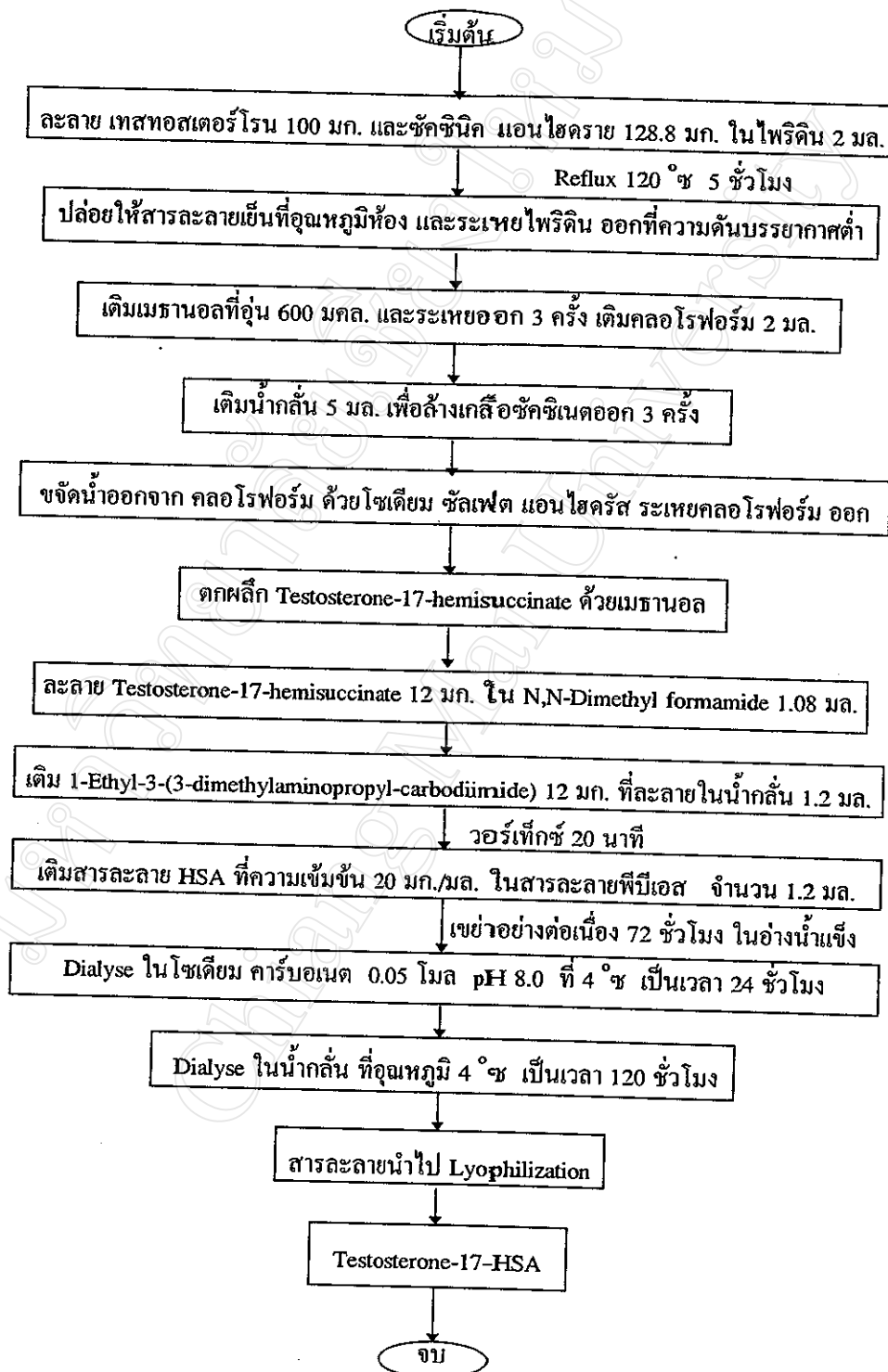
3.2 วิธีการเตรียมแอนติเจน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

3.2.1 การเตรียม Testosterone-17-hemisuccinyl-HSA

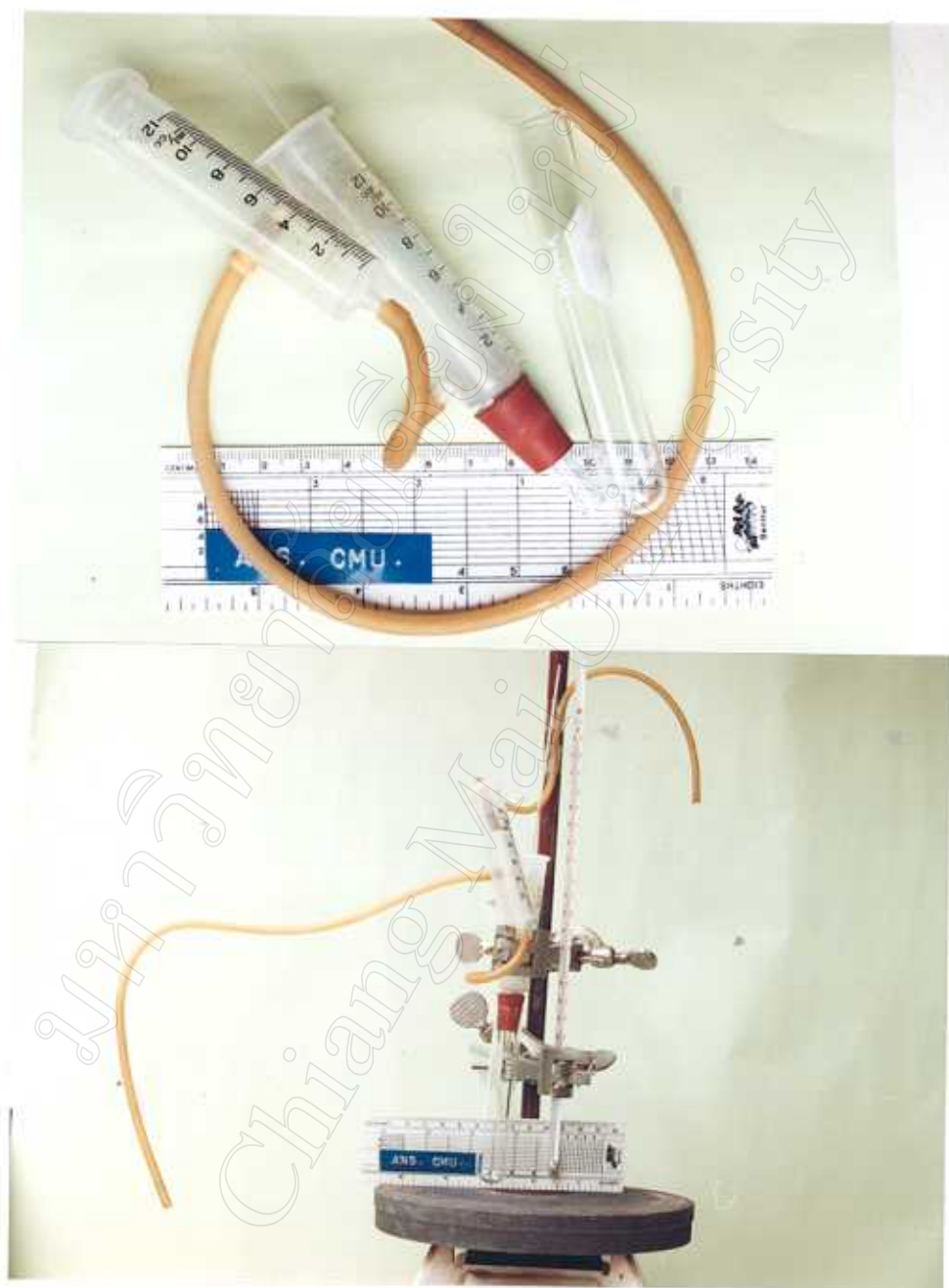
ขั้นตอนแรกเปลี่ยนเทสโทสเตอโรนให้อยู่ในรูป Testosterone-17-hemisuccinate (ดัดแปลงจากวิธีการของ Erlanger *et al.*, 1959; Abraham *et al.*, 1971; Besch *et al.*, 1986) ขั้นตอนที่สอง นำ Testosterone-17-hemisuccinate เชื่อมกับ HSA โดยมี 1-Ethyl-3,3-diethyl-aminopropyl-carbodiimide (EDPC) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ตามวิธีการ Lindner *et al.*, 1972; Dobson, 1983) ตามแผนผังวิธีการในภาพที่ 8. โดยมีรายละเอียดดังนี้ :

3.2.1.1 การเตรียม Testosterone-17-hemisuccinate

1. ชั่งเทสโทสเตอโรน 100 มก. และซัคซินิก แอนไฮไดรด์ 128.8 มก. ละลายในไพริดีน จำนวน 2 มล.
2. Reflux ที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 5 ชั่วโมง (ภาพที่ 9.)
3. สารละลายจะเปลี่ยนสี จากใสเป็นสีน้ำตาล เมื่อ Reflux สิ้นสุดลง
4. ปลอ่ยให้สารละลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. ระเหยไพริดีน ออกที่ความดันบรรยากาศต่ำ
6. เติม เมธานอลที่อุ่น จำนวน 600 ไมโครลิตร และระเหยออก ทำซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง
7. เติม คลอโรฟอร์ม จำนวน 2 มล. จะมีตะกอนที่ไม่ละลายเหลืออยู่
8. เติมน้ำกลั่นจำนวน 5 มล. เพื่อล้างเกลือซัคซิเนต (Succinate salt) ออกจำนวน 3 ครั้ง
9. ขจัดน้ำออกจาก คลอโรฟอร์ม ด้วย โซเดียม ซัลเฟต แอนไฮไดรต์
10. ระเหย คลอโรฟอร์ม ออก ให้แห้งที่ความดันบรรยากาศต่ำ



ภาพที่ 8. แผนผังวิธีการเตรียมแอนติเจน Testosterone-17-HSA (ดัดแปลงจาก Erlanger et al., 1959; Abraham et al., 1971; Lindner et al., 1972; Dobson, 1983; Besch et al., 1986).



ภาพที่ 9. แสดงชุดเครื่องมือ Reflux สำหรับเตรียมฮอร์โมน Testosterone-17-hemisuccinate.

11. ตกผลึก Testosterone-17-hemisuccinate ด้วยเมทานอล
12. นำไปหาจุดหลอมเหลว
13. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 200-300 นาโนเมตร ใช้ Tris-buffer 0.05 โมล (pH 8.5) เป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (มก.)/มล. เพื่อหาความยาวคลื่นแสงที่ดูดกลืนได้สูงสุด (λ_{max}).

3.2.1.2 การเตรียม Testosterone-HSA Conjugates

1. ชั่ง Testosterone-17-hemisuccinate (เตรียมได้จากวิธีการข้างต้น) 12 มก. ละลายใน N,N-Dimethyl formamide 1.08 มล.
2. ชั่ง 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-carbodiimide) 12 มก. ละลายในน้ำกลั่น 1.2 มล.
3. เติมสารละลาย ข้อ 2. ลงในข้อ 1. อย่างช้าๆ ผสมให้เข้ากัน ด้วย วอร์เท็กซ์ 20 นาที
4. เติมสารละลาย HSA ที่ความเข้มข้น 20 มก./มล. ในสารละลายฟอสเฟต (Phosphate-buffer saline, PBS; pH 7.8) จำนวน 1.2 มล. ลงในสารละลายข้อ 3.
5. แช่หลอดสารละลาย ข้อ 4. ในอ่างน้ำแข็ง (Ice bath) เขย่าอย่างต่อเนื่อง 72 ชั่วโมง
6. นำสารละลายที่ได้ใส่ Dialysing tube นำไปแช่ในสารละลายโซเดียม คาร์บอเนต ที่ความเข้มข้น 0.05 โมล pH 8.0 จำนวน 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และแช่ในน้ำกลั่น จำนวน 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง (เปลี่ยนน้ำกลั่นใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง) เพื่อให้สารโมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่ต้องการ ออกจากสารละลายแอนติเจน
7. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำภายใต้สภาพสุญญากาศ (Lyophilization)
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร โดยใช้ความเข้มข้น 45 มก./ล. (ในสารละลาย Tris-buffer 0.05 โมล, pH 8.5) เพื่อนำไปคำนวณหาอัตราส่วนการเชื่อมระหว่าง Testosterone-17-hemisuccinate กับ HSA ตามวิธีการของ Erlanger et al., 1957. (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก).

3.2.2 วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน

ละลายแอนติเจน Testosterone-17-HSA (T-17-HSA) ที่เตรียมได้จากวิธีการข้างต้น 1 มก. ในสารละลายฟิซีเอส (pH 7.4) 2 มล. ซึ่งมี Mineral oil ผสมอยู่ 63 เปอร์เซ็นต์ และเติม Saponin 1 มก. เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenized) จนได้เป็นสีขาวขุ่น ส่วนกลุ่มควบคุมจะได้รับเฉพาะ HSA 1 มก. ที่ละลายในสารละลายฟิซีเอส 2 มล. ซึ่งผสม Mineral oil 63 เปอร์เซ็นต์ และ Saponin 1 มก. เช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง นำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอและไหล่ 4-6 จุด.

3.3 การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในโคที่รังไข่มีการทำงานผิดปกติ.

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในโคที่มีรังไข่มีการทำงานผิดปกติ เพื่อศึกษาการทำงานของรังไข่โค.

สัตว์ทดลอง : โคนมพันธุ์ลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเซียน (Holstein-Friesian) สายเลือด 75-80 เปอร์เซ็นต์ อายุเฉลี่ย 7.91 ปี ซึ่งมีระยะท้องว่าง (Open days) เฉลี่ย 482.66 วัน จัดเป็นโคที่มีปัญหาทางด้านการสืบพันธุ์ (ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในพลาสมาต่ำกว่า 3 นนก./มล.) จำนวน 20 ตัว จากภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) แบ่งโคออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 10 ตัว โคกลุ่มแรก จำนวน 10 ตัว จะได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA และโคจำนวน 10 ตัว ที่เหลือเป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับเฉพาะ HSA ฉีดแอนติเจนให้โคแต่ละตัวจำนวน 5 ครั้ง โดยกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์.

การเก็บข้อมูล และการวัดผลการทดลอง : เก็บตัวอย่างเลือด ในวันที่ฉีดแอนติเจนครั้งแรก ตั้งแต่เดือนเมษายน 2538 สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ห่างกัน 3-4 วัน เป็นเวลา 135 วัน เพื่อวิเคราะห์หา

ระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน และเทสโทสเตอร์โรน. กำหนดหาพื้นที่ใต้กราฟของระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน และเทสโทสเตอร์โรน ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป AutoCAD Release 12 For Windows.

3.4 การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรนที่มีต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ของสุกร

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย โดยศึกษาผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเทสโทสเตอร์โรน ที่มีต่อสุกรเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ (การพัฒนาของกระเปาะไข่ และอัตราการตกไข่) จะศึกษาในสุกรสาว ส่วนจำนวนลูกต่อครอก จะศึกษาในแม่สุกรที่ให้ลูกมาแล้ว.

3.4.1 การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน ที่มีต่อสุกรเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ (การพัฒนาของกระเปาะไข่ และอัตราการตกไข่) ในสุกรสาว.

สัตว์ทดลอง : สุกรเพศเมียที่อยู่ในช่วงก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ (Prepubertal gilts) พันธุ์ลูกผสมลาร์จไวท์-แลนแรนซ์ (Large White-Landrace) อายุเฉลี่ย 139.40 ± 1.48 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 60.80 ± 1.20 กก. จำนวน 20 ตัว ของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ กลุ่มแรกจะได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA จำนวน 10 ตัว ฉีดแอนติเจนจำนวน 3 ครั้ง แต่ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มควบคุม 10 ตัว จะได้รับแอนติเจนเป็น HSA ในปริมาณ และช่วงห่างแต่ละครั้งเช่นเดียวกับกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA.

การเก็บข้อมูล และวัดผลการทดลอง : เก็บตัวอย่างเลือด ในวันที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก ตั้งแต่เดือนเมษายน 2538 สัปดาห์ละครั้ง จนกระทั่งสุกรแสดงอาการเป็นสัด เพื่อวัดระดับโปรเจสเตอร์โรน เทสโทสเตอร์โรน และระดับแอนติบอดี กำหนดหาพื้นที่ใต้กราฟของระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน และเทสโทสเตอร์โรน

มาสุกรหลังแสดงอาการเป็นสัปดาห์ 7-15 วัน เพื่อเก็บรังไข่ มาชั่งน้ำหนัก นับจำนวนกระเปาะไข่ ขนาด 1-3, 4-6, 7-10 และ มากกว่า 10 มม. ชั่งน้ำหนัก วัดขนาด และนับจำนวนของ คอร์ปัสลูเทียม (Corpus luteum) บันทึกอายุเมื่อรังไข่เริ่มทำงาน (ระดับโปรเจสเตอโรนมากกว่า 1 นนก./มล.) และอายุเมื่อแสดงอาการเป็นสัปดาห์ครั้งแรก.

3.4.2 การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ที่มีต่อจำนวนลูกต่อครอกในแม่สุกร.

สัตว์ทดลอง : เป็นสุกรเพศเมียที่ให้ลูกมาแล้ว พันธุ์ลูกผสมลาร์จไวท์-แลนแรซ (Large White-Landrace) ให้ลูกมาแล้ว 2-4 ครอก จำนวน 20 ตัว ของภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ กลุ่มแรกจะได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA จำนวน 10 ตัว ส่วนกลุ่มควบคุม 10 ตัว จะได้รับแอนติเจนเป็น HSA สัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม จะฉีดแอนติเจน จำนวน 3 ครั้ง ครั้งแรกฉีดก่อนคลอด 28 วัน และฉีดซ้ำก่อนคลอด 14 วันและหลังคลอด 7 วัน.

การเก็บข้อมูล และวัดผลการทดลอง : เก็บตัวอย่างเลือด ตั้งแต่เดือนเมษายน 2538 ในวันที่ 0, 14, 35, 42, 56 และ 70 วันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก เพื่อวัดระดับแอนติบอดี เก็บตัวอย่างอุจจาระหลังคลอดลูก ถึงหลังผสมพันธุ์ 1 เดือน สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ห่างกัน 3-4 วัน เพื่อวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเทสโทสเตอโรน และนับจำนวนลูกต่อครอก คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟของระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน, ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเทสโทสเตอโรน. เนื่องจากมีแม่สุกรทั้งสองกลุ่ม ถูกหย่านมลูกที่ 28 และ 35 วัน ทำให้จำเป็นต้องแยกคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเทสโทสเตอโรน เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองทั้งสอง ที่ถูกหย่านมในระยะเวลาเดียวกัน.

3.5 การเก็บตัวอย่างเลือดและอุจจาระ

เก็บตัวอย่างเลือด จากเส้นเลือดที่คอ (Jugular vein) 3-5 มล. (ดังภาพที่ 10.) ใส่หลอดทดลอง ที่สารป้องกันการแข็ง EDTA 0.5 โมล 200 ไมโครลิตร นำมาปั่นแยกพลาสมา (Plasma) ด้วยเครื่องปั่นแยก ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 5 นาที แยกเอาพลาสมาที่อยู่ส่วนบน ใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล. และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน และระดับแอนติบอดี.

การเก็บตัวอย่างอุจจาระ จะเก็บจากทวารหนักของสัตว์โดยตรง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะวิเคราะห์ฮอร์โมน.



ภาพที่ 10. การเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดที่คอ (Jugular vein) ของโค.

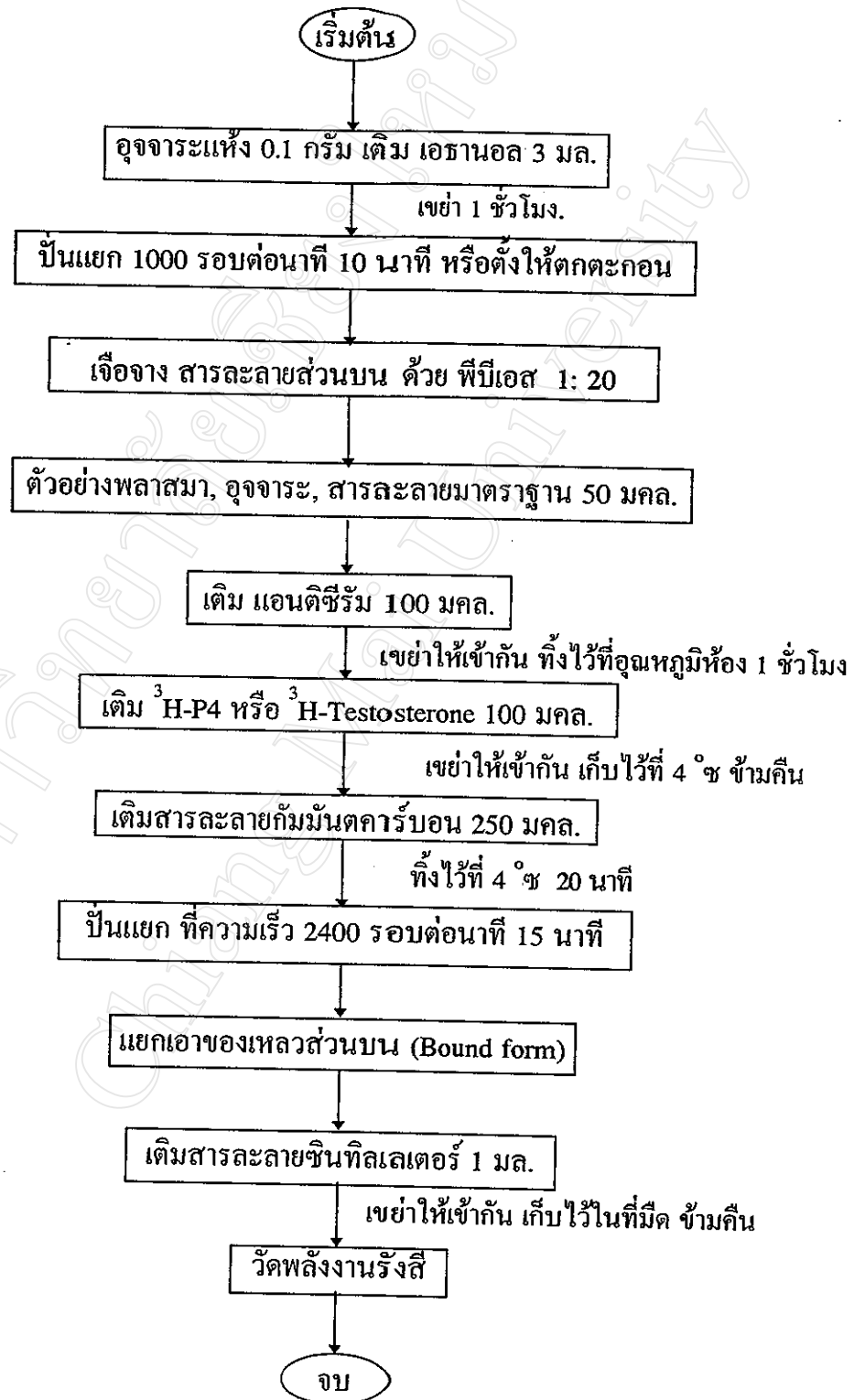
3.6 การสกัดฮอร์โมนจากตัวอย่างอุจจาระ

อุจจาระที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำแข็งละลาย และนำไปอบที่อุณหภูมิ $50-55^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบดด้วยครกให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.50 มม. เพื่อแยกสิ่งที่ยังคงค้างสัตว์ย่อยไม่ได้ออก อุจจาระที่ได้ นำมาสกัดฮอร์โมน ตามวิธีการของ ศุภมิตร (2537) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการ Wasser *et al.*, (1993) โดยซั่ง

อุจจาระแห้ง 0.1 กรัม และเติมเอทานอล 3 มล. ในหลอดทดลองขนาด 15x100 มม. ปิดจุกยาง เขย่าอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 60 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้ ตกตะกอน หรือนำไปปั่นแยก 1000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนบนที่ได้ มาเจือจางด้วยสารละลายฟิเบสในอัตราส่วน 1: 20 ก่อนนำไปวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน โดยวิธี เรดิโออิมมูโนโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA).

3.7 การวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเทสโทสเตอโรน

3.7.1 โปรเจสเตอโรนในพลาสมา และอุจจาระจะถูกวิเคราะห์ โดยวิธีเรดิโออิมมูโนโน-แอสเซ (RIA) ตามวิธีที่รายงานโดย เพทาย และทัศนีย์ (2533) ดังแผนผังวิธีการในภาพที่ 11. ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ : คูณสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 พิโคกรัม (พกก.) / 50 ไมโครลิตร (มคล.), ตัวอย่างพลาสมา และสารละลายที่สกัดได้จากอุจจาระ 50 มคล. ใส่หลอดทดลองขนาด 10x75 มม. เติมสารละลาย แอนติซีรัม (เตรียมจากกระต่าย R5 1: 1,638) 100 มคล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 60 นาที และเติม $^3\text{H-P4}$ 100 มคล. [มีค่าพลังงานรังสีประมาณ 6,000 Count per minute (CPM)] เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน แยกโปรเจสเตอโรนที่อยู่ใน รูปอิสระ (Free form) ออกจากโปรเจสเตอโรน ที่อยู่ในรูปที่เกาะเกี่ยวกับแอนติบอดี (Bound form) ด้วยการเติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน 250 มคล. ทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก ที่ความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที แยก ส่วนที่เป็นของเหลวใส ใส่ขวดสำหรับวัดพลังงานรังสี และเติมสารละลายซินทิลเลเตอร์ 1 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืนในที่มืด หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องวัดพลังงานรังสี ค่า CPM ที่ได้มาแปลงให้อยู่ใน รูป %Binding $[100 \times (\text{CPM} / \text{CPM ของสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐานที่ 0 พกก.})]$ นำค่า %Binding ของสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน มาสร้างกราฟโดยให้แกนตั้งอยู่ในมาตราเลขคณิต (Arithmetic scale) แทน %Binding และแกนนอนในมาตราลอการิทึม (Logarithmic scale) แทนระดับความเข้มข้นของสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตรฐาน เพื่อ



ภาพที่ 11. แสดงแผนผังวิธีการสกัดฮอร์โมนจากอุจจาระ และวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน, เทสโทสเตอโรน ในอุจจาระ และพลาสมาด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนโนแอสเซ.

อ่านค่าความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากพลาสมา (หน่วยนาโนกรัม/มิลลิลิตร, นนก./มล.) และในอุจจาระ (ไมโครกรัม/กรัมของอุจจาระแห้ง, มกก./ ก.).

3.7.2 เทสโทสเตอโรนในพลาสมา และอุจจาระจะถูกละลายโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ มีวิธีการดังนี้ คัดสารละลายเทสโทสเตอโรนมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 พกค./ 50 มกค., ตัวอย่างพลาสมา และสารละลายที่สกัดได้จากอุจจาระ (เจือจางด้วยสารละลายฟีนีเอสในอัตราส่วน 1 : 20) 50 มกค. ใส่หลอดทดลองขนาด 10x75 มม. เติมสารละลายแอนติซีรัม (เตรียมจากกระต่ายที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-3-HSA ซึ่งมีไคเตอร์ 1 : 1408) เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และเติม ^3H -Testosterone 100 มกค. (ที่มีค่าพลังงานรังสีประมาณ 6,000 CMP) เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน แยกฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่อยู่ในรูปอิสระ ออกจากเทสโทสเตอโรนที่อยู่ในรูปที่เกาะเกี่ยวกับแอนติบอดี ด้วยสารละลายกัมมันตคาร์บอน 250 มกค. ทิ้งไว้ 20 นาที อุณหภูมิ 4 °C นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นแยก ที่ความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวใสส่วนบน ใส่ขวดสำหรับวัดพลังงานรังสี และเติมสารละลายซินทิลเลเตอร์ 1 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืนในที่มืด และนำเข้าเครื่องวัดพลังงานรังสี (Beta counter).

3.8 การวัดระดับแอนติบอดี

การวัดปฏิกิริยาของแอนติบอดีในพลาสมาตัวอย่าง (ดัดแปลงจากวิธีการของ Lermite et al., 1991) ทำได้โดยการดูพลาสมาตัวอย่าง 100 มกค. ผสมกับ ^3H -Testosterone (ค่าพลังงานรังสีประมาณ 6,000 CPM) 100 มกค. และเติมสารละลายฟีนีเอส 50 มกค. เขย่าให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน และเติมสารละลายกัมมันตคาร์บอน 250 มกค. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C 20 นาที นำเข้าเครื่องปั่นแยก ปั่นที่ความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C 15 นาที และแยกเอาสารละลายใสส่วนบนที่มี ^3H -Testosterone จับกับแอนติบอดีอยู่ ใส่ขวดสำหรับเครื่องวัดพลังงานรังสี และเติมสารละลายซินทิลเลเตอร์ 1 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืนในที่มืด นำเข้า

เครื่องวัดพลังงานรังสี ระดับของแอนติบอดีจะคิดเป็น %Binding ของ ^3H -Testosterone ที่จับกับแอนติบอดีในพลาสมา [%Binding = (ค่า CPM ของตัวอย่าง / ค่า CPM ของ Total counts) x 100] (IAEA, 1984).

3.9 การคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ

คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟของระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเทสโทสเตอโรนมีหน่วยเป็น %Binding x day (Mongkonpunya *et al.*, 1974; Thompson *et al.*, 1984) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป AutoCAD Release 12 For Windows.

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน, โปรเจสเตอโรน และระดับแอนติบอดีต่อเทสโทสเตอโรน ในช่วงระยะเวลาของการทดลองทั้งหมด วิเคราะห์ความแปรปรวน ในแผนการทดลองแบบ Split-plot โดยมีช่วงระยะเวลา (Time periods) เป็น Subplots (Gill and Hafs, 1971) ใช้ General Linear Model (GLM) procedures of SAS (SAS, 1985) และความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ช่วงเวลาเดียวกัน ทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้ LSD (Stell and Torrie, 1960).

เปรียบเทียบอายุเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักรังไข่ ขนาด และน้ำหนักของคอร์ปัสลูเตียม พื้นที่ใต้กราฟของระดับแอนติบอดี เทสโทสเตอโรน และโปรเจสเตอโรนระหว่างกลุ่มที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะ HSA ทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสองตัวอย่างตามวิธี Student's *t*-test จำนวนกระเปาะไข่ที่ขนาดต่างๆ ทดสอบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Chi-square. อัตราการตกไข่ และจำนวนลูกต่อครอก ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ ใช้ Mann-Whitney U-Test (Rhind *et al.*, 1985;

1986; 1987) วัดค่าสหสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างระดับแอนติบอดี กับระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน โปรเจสเตอร์โรน อายุที่เริ่มทำงานครั้งแรก และอายุที่แสดงอาการเป็นครั้งแรก. การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางสถิติ ทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS Release 6.08 (For Windows 3.10).

3.11 สถานที่ทำการทดลอง

1. ฟาร์มสัตว์ทดลอง สถานีวิจัย และฝึกอบรมทางการเกษตรแม่เหียะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.12 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือนมกราคม 2538 และสิ้นสุดการวิจัยเดือนกุมภาพันธ์ 2539.