ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

1. การเตรียม Dialysing tube

ตัด Dialysing tube ความยาวตามต้องการที่จะใช้งาน แช่น้ำกลั่น นานประมาณ 10 นาที และนำไปต้มในสารละลาย EDTA (10 มิลลิโมล, mM) ให้เดือดประมาณ 30 นาที ล้าง Dialysing tube ด้วยน้ำกลั่น และนำไปต้มในสารละลายโซเดียม ไบคาร์บอเนต (10 mM) นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง และต้มในน้ำกลั่น ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำกลั่น ประมาณ 10 นาที และเก็บไว้ในเอธานอล (Ethanol) ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์.

2. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 M สำหรับการเก็บตัวอย่างเลือด

ชั่ง EDTA 196.125 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล. และปรับ pH ให้ได้ 8.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)

3. สารละลายพีบีเอส (Phosphate-buffered saline, PBS)

เตรียมจากสารละลาย 3 ชนิด คือ ก. ละลายโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรท 78.004 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร (0.5 โมล), ข. ละลาย ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต จำนวน 35.814 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร (0.1 โมล), ค. ละลายโซเดียมคลอไรด์ 61.365 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร และเติมโซเดียม เอ็ททิลเมอร์คิวรีไธโอซาลิไซเล็ท 0.75 กรัม นำสารละลายทั้ง 3 ชนิด ก ข และ ค มาผสมกันในสัดส่วน 6.66, 66.67 และ 133.30 มล. ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มล. ปรับ pH 7.4 และนำเจลลาติน 1 กรัม เติมสารละลายพีบีเอส 50 มล. นำไปอุ่นให้เจลลาตินละลายจนหมด แล้วเติมกลับลงไปในสารละลายพีบีเอส pH 7.4 ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ.

4. สารละลายกัมมันตคาร์บอน (Charcoal suspension)

เตรียมจากเด็กซ์แตรน โซเดียมซัลเฟต (Dextran sodium sulfate) 0.0625 กรัม และผงกัมมันตคาร์บอน (Charcoal activated) 0.625 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. ปั่นด้วยเครื่องปั่นแมกนิติค สเตอร์เรอร์ ในอ่างน้ำแข็ง ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน.

5. สารละลายสำหรับวัดพลังงานรังสี หรือซินทิเลเตอร์ (Scintillator)

เตรียมจากละลาย สารพี-เทอร์ฟีนิล (p-terphenyl) 3 กรัม และ พีโอพีโอพี (POPOP) 0.1 กรัม ในโทลูอีน (Toluene) 1 ลิตร เขย่าในเข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืนก่อนใช้งาน.

6. สารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน และเทสทอสเตอร์โรนมาตราฐาน (Standard)

6.1 สารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนมาตราฐาน นำสารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม (มก.) ละลายในเอธานอล 1 มล. มา 10 มคล. เจือจางด้วยสารละลายพีบีเอส 10 มล. และเจือจางสารละลายที่ได้ ด้วยสารละลายพีบีเอส ให้ได้สารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนมาตราฐาน ที่มีความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 พคก./ 50 มคล.

6.2 สารละลายฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรนมาตราฐาน เตรียมเช่นเดียวกับสารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนมาตราฐาน.

7. สารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน และเทสทอสเตอร์โรนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม

7.1 สารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม [(1,2,6,7-^{3}H) Progesterone, ^{3}H-P4] เตรียมได้โดย เจือจางฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม ที่มีความ

เข้มข้น 250 ไมโครคิวรี่ (μCi) ด้วยเบนซีน 50 มล. และเจือจางด้วยสารละลายพีบีเอส วัดค่าพลังงานรังสี ให้ได้ประมาณ 6,000 ครั้งต่อนาที (Count per minute, CPM).

7.2 สารละลายฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม [(1,2,6,7-^{3}H) Testosterone, ^{3}H-Testosterone) เตรียมได้เช่นเดียวกับ สารละลายฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนที่ติดฉลากด้วยตริเตียม โดยมีค่าพลังงานรังสีประมาณ 6,000 CPM.

8. การเตรียมแอนติบอดีต่อเทสทอสเตอร์โรนสำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรน

แอนติเจน T-3-HSA ที่เตรียมจากการเชื่อม Testosterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime เข้ากับโปรตีน HSA ตามวิธีการในบทที่ 3 ข้อ 3.2.1.2 ได้อัตราส่วน 22 โมลสเตียรอยด์ต่อโมลของโปรตีน เตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระต่าย ในปริมาณ 1 มก. ผสม Saponin 1 มก. ละลายในสารละลายพีบีเอส ที่มี Mineral oil ผสมอยู่ 63 เปอร์เซ็นต์ กระตุ้นภูมิภูมิคุ้มกันทุกๆ 2 สัปดาห์.

9. การคำนวนอัตราส่วน Steroid : Protein conjugate (ตามวิธีการคำนวณของ Erlanger *et al.*, 1957; Dobson, 1983)

O.D. ที่ 250 nm

T-17-HSA ใน 0.05M Tris buffer (pH 8.5) มีความเข้มข้น 45 mg/l	= 0.1762
HSA ใน 0.05M Tris buffer (pH 8.5) มีความเข้มข้น 45 mg/l	= 0.0233
ความแตกต่างของ O.D. ของ T-17-HSA กับ HSA	= 0.1529
ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ T-17-hemisuccinate	= 15,360
มวลโมเลกุล ของ T-17-hemisuccinate	= 388.5
มวลโมเลกุล ของ HSA	= 70,000

จากสมการ O.D. = ECl (Bree's Law)

เมื่อ O.D. = ค่าดูดกลืนแสง (Optical density)

E = สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (ต่อโมล-ซม.)
(Molar extinction coefficient , M^{-1} cm^{-1})

C = ความเข้มข้นของสารละลาย(โมล) (Concentration of solution, g/l; M)

1 = ระยะทางที่แสงส่องผ่านสารละลาย (ซม.) (Lenght of light path, cm)

แทนค่า 0.1529 = 15,360 x C x 1

C = 0.1529 / (15,360 x 1)

= 9.95×10^{-6} โมล

∴ ความเข้มข้น T-17-hemisuccinate = 9.95×10^{-6} x 388.5 โมล (ก./ล.)

= 3.867×10^{-3} โมล

= 3.867 มก./ล. (mg/l)

ความเข้มข้น HSA ที่ใช้ = 45 มก./ล.

∴ ความเข้มข้น HSA ที่เหลือ = 45 - 3.867 มก./ล.

= 41.132 มก./ล.

= 4.1132×10^{-2} ก./ล.

= $(4.1132 \times 10^{-2}) / 70,000$

= 5.876×10^{-7} โมล

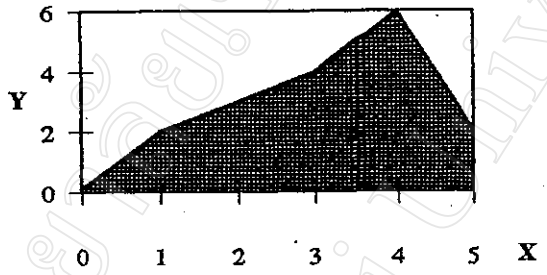
∴ อัตราส่วน T-17-hemisuccinate : HSA = $9.95 \times 10^{-6} / 5.876 \times 10^{-7}$

= 16.93 โมล

∴ อัตราส่วนสเตียรอยด์ต่อโปรตีน ประมาณ 17 โมล สเตียรอยด์ต่อโมลโปรตีน.

10. การหาพื้นที่ใต้กราฟโดยโปรแกรมสำเร็จรูป AutoCAD Release12 For Windows มีวิธีการดังนี้: ตัวอย่าง ต้องการหาพื้นที่ใต้กราฟที่มีจุด (x,y) คือ

x	0	1	2	3	4	5
y	0.1	2	3	4	6	2



Command : point (Enter)

Point : 0,0 (Enter)

Command : area (Enter)

<First point>/Enter/Add/Subtract : nod (Enter)

of : 0,0 (Enter)

Next point : 0,0.1 (Enter)

Next point : 1,2 (Enter)

Next point : 2,3 (Enter)

Next point : 3,4 (Enter)

Next point : 4,6 (Enter)

Next point : 5,2 (Enter)

Next point : 5,0 (Enter) (Enter)

Area = 16.0500

. . จะได้พื้นที่ใต้กราฟ = **16.0500** ตารางหน่วย

ตารางผนวกที่ 1. แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Tris buffer (0.05 M, pH 8.5), Testosterone-17-hemisuccinate, HSA, Testosterone-17-HSA, และ Testosterone-3-HSA ใน Tris buffer ที่ความคลื่นแสง 200-300 นาโนเมตร.

ความยาวคลื่นแสง (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.)				
	Tris-buffer	Testosterone-17-hemisuccinate[1]	HSA[2]	Testosterone-17-HSA[2]	Testosterone-3-HSA[2]
200	-0.0129	0.3075	0.3066	0.4432	0.2648
201	-0.0173	0.3144	0.2896	0.3812	0.3121
202	-0.0169	0.3349	0.281	0.3583	0.364
203	-0.0061	0.3702	0.3072	0.3954	0.2849
204	-0.019	0.3715	0.2911	0.4577	0.2734
205	0.0005	0.3365	0.2934	0.3984	0.2666
206	0.0074	0.3211	0.2786	0.3827	0.2637
207	0.0026	0.3193	0.2686	0.4013	0.2739
208	0.0034	0.3096	0.2923	0.3958	0.2987
209	-0.0026	0.3129	0.2837	0.3931	0.2563
210	0.0001	0.3422	0.2743	0.3784	0.2753
211	-0.0029	0.3441	0.2882	0.3933	0.2848
212	-0.0039	0.3192	0.3236	0.4323	0.2989
213	-0.0002	0.2818	0.3789	0.4916	0.3334
214	-0.0012	0.2416	0.4605	0.5787	0.374
215	0.0018	0.221	0.5541	0.647	0.4095
216	0.0004	0.2138	0.6109	0.6904	0.4246
217	-0.0004	0.2147	0.6286	0.7018	0.4242
218	-0.0004	0.2206	0.6265	0.6957	0.4170
219	-0.0004	0.2294	0.6179	0.6851	0.4092
220	-0.0003	0.2403	0.5982	0.6673	0.3971
221	-0.0003	0.2491	0.5703	0.6405	0.3837
222	-0.0003	0.2538	0.5393	0.6106	0.3688
223	-0.0003	0.2552	0.5094	0.5825	0.3547

[1] Testosterone-17-hemisuccinate 10 มคก./มล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5).

[2] HSA, Testosterone-17-HSA, และ Testosterone-3-HSA 45 มก./ล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5)

ตารางผนวกที่ 1. (ต่อ).

ความยาวคลื่นแสง (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.)				
	Tris-buffer	Testosterone-17-hemisuccinate[1]	HSA[2]	Testosterone-17-HSA[2]	Testosterone-3-HSA[2]
224	-0.0004	0.2562	0.4819	0.5579	0.3428
225	-0.0004	0.2617	0.4532	0.5312	0.3309
226	-0.0004	0.2712	0.4246	0.5049	0.3192
227	-0.0003	0.2833	0.3996	0.4814	0.3094
228	-0.0003	0.2989	0.3737	0.4569	0.2991
229	-0.0003	0.3167	0.3465	0.4326	0.2883
230	-0.0005	0.3358	0.3212	0.4104	0.2788
231	-0.0003	0.3552	0.2946	0.3873	0.2689
232	-0.0004	0.3774	0.2667	0.3638	0.2591
233	-0.0005	0.4028	0.2363	0.3385	0.2483
234	-0.0006	0.4255	0.2103	0.3170	0.2388
235	-0.0005	0.4492	0.1861	0.2977	0.2310
236	-0.0004	0.4738	0.1607	0.2775	0.2229
237	-0.0004	0.4997	0.1369	0.2594	0.2159
238	-0.0004	0.5247	0.1159	0.2435	0.2098
239	-0.0004	0.5482	0.0984	0.2308	0.2055
240	-0.0004	0.5738	0.0825	0.2201	0.203
241	-0.0004	0.5959	0.0684	0.2096	0.2002
242	-0.0005	0.6165	0.0579	0.2023	0.1993
243	-0.0005	0.6353	0.0499	0.1967	0.1997
244	-0.0005	0.6542	0.0434	0.1923	0.2015
245	-0.0005	0.6728	0.0379	0.1885	0.204
246	-0.0005	0.6852	0.0325	0.184	0.2043
247	-0.0005	0.6956	0.0287	0.1811	0.2056
248	-0.0004	0.7022	0.0257	0.1784	0.2073
249	-0.0004	0.7065	0.0233	0.1762	0.2097

[1]Testosterone-17-hemisuccinate 10 มคก./มล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5).

[2]HSA, Testosterone-17-HSA, และ Testosterone-3-HSA 45 มก./ล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5)

ตารางผนวกที่ 1. (ต่อ).

ความยาวคลื่นแสง (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.)				
	Tris-buffer	Testosterone-17-hemisuccinate[1]	HSA[2]	Testosterone-17-HSA[2]	Testosterone-3-HSA[2]
250	-0.0005	0.7086	0.0214	0.1743	0.2124
251	-0.0006	0.7073	0.02	0.1719	0.2138
252	-0.0005	0.7028	0.0191	0.1691	0.215
253	-0.0005	0.6932	0.0184	0.1643	0.2141
254	-0.0005	0.6808	0.0178	0.1591	0.2127
255	-0.0004	0.6657	0.0172	0.1544	0.2112
256	-0.0005	0.6477	0.0168	0.1506	0.2094
257	-0.0005	0.6276	0.0171	0.1487	0.209
258	-0.0005	0.6013	0.0172	0.1435	0.2049
259	-0.0004	0.574	0.0174	0.1358	0.1988
260	-0.0004	0.546	0.0175	0.1274	0.1916
261	-0.0005	0.517	0.0176	0.1196	0.1840
262	-0.0005	0.4858	0.0177	0.1139	0.1778
263	-0.0004	0.4502	0.0182	0.1096	0.1710
264	-0.0004	0.4144	0.0188	0.1045	0.1632
265	-0.0004	0.3803	0.0193	0.0977	0.1539
266	-0.0004	0.3494	0.0195	0.0901	0.1441
267	-0.0003	0.3183	0.0197	0.0828	0.1342
268	-0.0002	0.285	0.0199	0.0765	0.1240
269	-0.0003	0.2521	0.0205	0.0715	0.1142
270	-0.0004	0.2202	0.021	0.067	0.1048
271	-0.0003	0.1932	0.0214	0.0634	0.0967
272	-0.0002	0.1687	0.0218	0.0607	0.0892
273	-0.0003	0.145	0.0222	0.0585	0.0818
274	-0.0003	0.1235	0.0229	0.0568	0.0752
275	-0.0003	0.1035	0.0235	0.0552	0.0688

[1]Testosterone-17-hemisuccinate 10 มคก./มล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5).

[2]HSA, Testosterone-17-HSA, และ Testosterone-3-HSA 45 มก./ล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5)

ตารางผนวกที่ 1. (ต่อ).

ความยาวคลื่นแสง (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.)				
	Tris-buffer	Testosterone-17-hemisuccinate[1]	HSA[2]	Testosterone-17-HSA[2]	Testosterone-3-HSA[2]
276	-0.0003	0.0872	0.024	0.0538	0.0632
277	-0.0002	0.0734	0.0246	0.0528	0.0583
278	-0.0003	0.0611	0.0251	0.0518	0.0539
279	-0.0003	0.0504	0.0254	0.0511	0.0497
280	-0.0003	0.0406	0.0251	0.0500	0.0454
281	-0.0003	0.033	0.0245	0.0488	0.0419
282	-0.0002	0.0272	0.0237	0.0477	0.0387
283	-0.0002	0.0288	0.0226	0.0464	0.0359
284	-0.0002	0.0196	0.0218	0.0456	0.0335
285	-0.0001	0.0168	0.0206	0.0445	0.0312
286	-0.0001	0.0142	0.0193	0.0432	0.0287
287	-0.0001	0.0119	0.0176	0.0413	0.0262
288	-0.0001	0.0103	0.0155	0.0391	0.0239
289	0.0000	0.0091	0.0132	0.037	0.0217
290	-0.0002	0.0078	0.0106	0.0349	0.0196
291	-0.0002	0.0068	0.0079	0.0328	0.0176
292	-0.0001	0.0059	0.0051	0.0306	0.0155
293	-0.0001	0.005	0.0026	0.0285	0.0136
294	0.0000	0.0043	0.0003	0.0266	0.0120
295	-0.0001	0.0038	0.0014	0.0248	0.0108
296	-0.0001	0.0035	-0.0028	0.0234	0.0097
297	-0.0001	0.0033	-0.004	0.0223	0.0088
298	-0.0001	0.003	-0.005	0.0213	0.0081
299	-0.0001	0.0025	-0.006	0.0205	0.0074
300	0.0000	0.0023	-0.0066	0.0198	0.0070

[1]Testosterone-17-hemisuccinate 10 มคก./มล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5).

[2]HSA, Testosterone-17-HSA, และ Testosterone-3-HSA 45 มก./ล. ใน Tris buffer (0.05 โมล, pH 8.5)

ตารางผนวกที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในพลาสมาของโค.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	4.52±0.15	4.43±0.12
21	3.91±0.42	19.34±2.72**
32	4.43±0.12	6.87±0.77*
46	3.85±0.34	8.35±0.72**
60	4.38±0.12	9.88±1.14**
74	4.59±0.15	13.30±3.04*
88	4.26±0.14	9.47±17.4*
102	4.67±0.12	6.86±0.75*
119	4.59±0.13	6.14±0.52*
137	4.42±0.18	5.51±0.30*

*$p<0.05$

**$p<0.01$

ตารางผนวกที่ 3. ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนเฉลี่ย (นนก./มล. ± SE.) ในพลาสมาโค.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	0.26±0.09	0.48±0.18
4	0.27±0.13	0.23±0.07
7	0.44±0.11	0.80±0.30
11	0.76±0.21	0.53±0.28
14	0.98±0.24	0.86±0.20
17	0.59±0.15	0.40±0.19
21	0.65±0.17	1.61±0.46
25	1.57±0.43	2.49±0.42
28	1.97±0.53	1.55±0.36
32	0.96±0.24	1.99±0.73
35	0.61±0.23	0.46±0.20
39	0.38±0.10	0.34±0.13
42	0.43±0.10	0.69±0.18
46	0.93±0.30	1.03±0.19
49	0.99±0.28	1.39±0.32
53	0.61±0.17	0.75±0.21
56	0.52±0.14	0.55±0.22
60	0.45±0.12	0.48±0.19
63	0.23±0.05	0.32±0.08
67	0.25±0.05	0.32±0.07

ตารางผนวกที่ 3. (ต่อ).

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
72	0.17±1.13	0.58±0.17
74	0.37±0.13	0.21±0.15
77	0.98±0.44	0.32±0.11
81	0.20±0.09	0.38±0.11
84	0.19±0.07	0.42±0.10
88	1.21±0.50	2.90±0.92
91	4.08±1.56	4.20±1.72
95	6.25±1.41	3.12±1.41*
98	0.52±0.19	0.33±0.12
102	0.71±0.32	0.99±0.23
112	0.31±0.07	0.33±0.23
116	1.90±1.11	0.99±0.85
119	0.23±0.08	0.12±0.04
123	0.29±0.09	0.24±0.11
126	0.90±0.26	1.46±0.36
130	0.27±0.08	0.33±0.15
133	0.64±0.15	0.46±0.26
137	0.90±0.22	0.12±0.08

*$p<0.05$

ตารางผนวกที่ 4. ระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรนเฉลี่ย (พคก./มล. ± SE.) ในพลาสมาโค.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	277.50±80.09	359.50±92.20
7	886.00±601.20	307.00±62.15
14	368.20±102.83	937.60±225.16
21	274.10±48.67	727.70±441.10
28	916.90±385.46	528.00±388.24
35	1344.60±607.06	1619.60±880.84
42	2364.00±638.31	2342.20±828.09
49	2412.20±560.93	3730.00±918.00
56	953.60±514.00	583.90±447.85
63	502.89±338.33	1308.60±873.07
70	598.00±368.130	566.00±342.99
77	228.20±76.38	260.90±80.53
84	74.10±18.98	161.30±78.97
91	108.90±35.80	91.30±34.71
98	53.60±18.92	59.50±4.63
105	696.40±393.35	442.80±15.02
112	174.10±66.99	193.89±31.64
119	960.00±385.98	127.11±29.60
126	618.00±223.85	127.00±28.66
133	78.40±33.44	102.89±50.93

ตารางผนวกที่ 5. แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดี, ระดับโปรเจสเตอร์โรน และเทสทอสเตอร์โรนในพลาสมาของโค.

กลุ่ม	สัตว์ทดลอง	พื้นที่ใต้กราฟ[1]		
		%การเกาะเกี่ยว ^{3}H-Testosterone (%Binding x day)	โปรเจสเตอร์โรน (นนก./มล. x วัน)	เทสทอสเตอร์โรน (พคก./มล. x วัน)
กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	1	584.70	76.12	58,849.0
	2	577.09	67.01	87,633.0
	3	695.48	91.78	105,140.0
	4	571.32	382.86	103,054.0
	5	550.24	95.94	39,578.0
	6	598.02	127.77	115,941.0
	7	595.79	106.87	98,490
	8	540.17	91.60	67,977.0
	9	588.01	57.10	91,56.0
	10	626.09	155.54	141,921.0
กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Testosterone-17-HSA	11[2]	1136.36	228.02	54,138.0
	12	1241.31	206.88	54,887.0
	13	1883.78	40.58	67,909.0
	14	1492.87	81.52	87,255.0
	15	992.00	70.82	231,406.0
	16	848.12	149.06	90,860.0
	17	1081.58	119.69	132,720.0
	18	1612.98	106.19	117,974.0
	19	1022.66	135.99	103,747.0
	20	1184.91	104.94	64,953.0

[1] พื้นที่ใต้กราฟในระยะเวลา 137 วัน

[2] พื้นที่ใต้กราฟในระยะเวลา 105 วัน

ตารางผนวกที่ 6. แสดงเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในพลาสมาของสุกรสาว.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	8.79±0.34	10.18±0.8
7	12.23±1.12	12.39±0.73
14	10.84±0.65	14.31±1.35*
21	12.01±1.71	46.54±3.57***
28	13.49±1.13	45.51±3.16***
35	13.24±1.58	47.43±2.94***
42	9.87±0.61	42.50±3.34***
50	6.66±0.36	37.88±3.64***
56	9.59±0.43	41.46±3.59***
63	7.33±0.40	36.57±3.22***
70	10.22±1.38	21.19±3.54*
77	7.34±1.12	17.46±4.04*
84	6.56±0.23	17.15±3.08*
90	7.80±0.48	17.51±2.05*
98	9.34±0.76	15.55±1.70**

* $p<0.05$

** $p<0.01$

*** $p<0.001$

ตารางผนวกที่ 7. แสดงระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนเฉลี่ย (นนก./มล. ± SE.) ในสุกรสาว.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	0.16±0.05	0.28±0.07
7	0.20±0.09	0.42±0.15
14	0.70±0.55	0.26±0.07
21	1.05±0.09	0.02±0.01
28	0.16±0.05	0.03±0.01
35	1.43±0.80	0.05±0.02
42	1.93±1.14	0.04±0.02
50	2.34±1.26	0.17±0.13
56	3.20±1.40	0.07±0.06
63	1.71±0.74	0.10±0.02
70	3.61±1.03	0.96±0.40
77	4.99±1.16	1.49±0.59
84	4.96+1.18	1.48±0.58
90	4.01±1.22	1.62±0.65
98	4.19±1.55	2.88±0.75

ตารางผนวกที่ 8. ระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรนเฉลี่ย (พคก./มล. ±SE.) ในพลาสมาของสุกรสาว.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	20.10±0.10	25.80±3.98
14	25.60±6.62	103.0±53.20
28	86.60±27.23	61.00±21.75
42	63.00±16.29	73.10±43.31
56	173.20±62.68	194.20±92.62
70	74.60±24.21	443.10±373.49
84	123.20±37.02	306.70±133.01
98	61.00±15.63	321.56±176.16

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 9. แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดี, ระดับโปรเจสเตอร์โรน และเทสทอสเตอร์โรนในพลาสมาของสุกรสาว.

กลุ่ม	สัตว์ทดลอง	พื้นที่ใต้กราฟ		
		%การเกาะเกี่ยว ^{3}H-Testosterone (%Binding x day)	โปรเจสเตอร์โรน (นนก./มล. x วัน)	เทสทอสเตอร์โรน (พคก./มล. x วัน)
กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	1	966.56	234.47	3829.0
	2	1080.93	295.20	4900.0
	3	1056.17	273.28	10170.0
	4	866.59	300.16	9044.0
	5	1021.51	153.43	4186.0
	6	917.58	140.99	4508.0
	7	1025.36	168.61	9016.0
	8	938.71	135.75	14840.0
	9	777.06	428.91	4697.0
	10	905.00	229.12	7420.0
กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Testosterone-17-HSA	11	2492.98	103.31	66136.0
	12	3410.99	57.40	18396.0
	13	3276.17	82.93	17332.0
	14	3512.55	8.85	18340.0
	15	2555.44	87.97	11410.0
	16	2563.48	100.25	5138.0
	17	2343.62	116.70	9717.0
	18	2569.85	11.74	8568.0
	19	4112.43	52.03	7266.0
	20	1909.53	35.98	24654.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 10. แสดงข้อมูลลักษณะโครงสร้างรังไข่ ของสุกรสาว.

กลุ่ม	สัตว์ทดลอง	น้ำหนักรังไข่ (กรัม)	จำนวนไข่ที่ตก (ฟอง)	น้ำหนักคอร์ปัสลูเตียมเฉลี่ย (กรัม)	ขนาดคอร์ปัส-ลูเตียมเฉลี่ย (มม.)	จำนวนกระเปาะไข่ขนาด (มม.)			
						1-3	4-6	7-10	10 ขึ้นไป
	1	17.43	15	0.63	10.17±0.17	41	33	1	-
	2	6.58	12	0.15	7.23±0.31	9	7	-	-
กลุ่ม	3	20.75	14	0.76	11.07±0.35	61	44	-	-
กระตุ้น	4	14.83	14	0.45	9.82±0.17	21	12	5	-
ภูมิคุ้ม	5	20.28	14	0.56	10.48±0.14	91	25	-	-
กันต่อ	6	11.72	12	0.27	8.46±0.26	7	24	1	-
HSA	7	19.23	15	0.59	10.53±0.16	98	33	-	-
	8	14.10	11	0.42	9.21±016	26	33	3	-
	9	16.33	13	0.43	9.44±0.16	28	28	2	-
	10	16.05	13	0.48	9.81±0.36	8	15	14	-
	11	13.06	15	0.48	9.08±0.23	5	8	-	-
	12	15.00	15	0.33	8.90±0.20	22	34	-	-
กลุ่ม	13	10.35	10	0.31	8.80±0.20	9	15	-	1
กระตุ้น	14	18.64	15	0.53	10.20±0.19	34	35	1	2
ภูมิคุ้ม	15	12.65	16	0.48	10.11±0.18	5	11	13	-
กันต่อ	16	14.46	15	0.31	8.13±0.16	8	51	-	-
Testos-	17	18.52	16	0.58	10.00±0.13	1	15	8	-
terone-	18	14.09	10	0.58	10.47±0.36	48	54	-	-
17-HSA	19	14.86	12	0.57	10.04±0.22	39	46	-	-
	20	18.71	14	0.65	11.09±0.14	44	38	-	-

ตารางผนวกที่ 11. แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวของ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในพลาสมาของแม่สุกร.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	6.23±0.20	4.7±0.63
14	5.49±0.35	7.63±1.50
35	5.12±0.32	16.56±3.11**
42	5.53±0.70	14.22±2.25**
56	6.05±0.72	15.09±2.78**
70	6.57±0.54	10.24±1.89

**p<0.01

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 12. ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนเฉลี่ย (นนก./ก. ± SE.) ในอุจจาระแม่สุกร ในช่วงหลังคลอดถึงหย่านม.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	3,838.00±684.57	4,919.50±668.25
4	1,873.00±287.48	2,671.00±324.99
7	881.10±112.47	1,641±235.02
11	583.90±73.91	539.80±131.38
14	804.60±233.91	805.60±263.62
18	730.00±191.12	565.20±192.78
21	716.50±156.95	600.60±244.69
25	776.50±335.01	727.80±284.00
28	422.20±58.77	589.60±147.47
32	494.80±100.02	354.00±107.39
35	580.20±111.04	642.00±350.32

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 13. ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนเฉลี่ย (นนก./ก. ± SE.) ของอุจจาระแม่สุกรในช่วงหลังผสมพันธุ์ 1 เดือน.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
1	589.60±109.50	643.00±77.12
4	701.70±167.10	963.80±201.43
8	1,214.30±215.07	1,262.50±190.95
11	1,158.20±216.78	1,255.30±167.89
15	2,186.10±624.38	2,058.00±329.19
18	1,763.00±204.46	1,872.40±307.74
22	1,433.30±176.64	1,523.00±309.91
25	1,320.40±185.96	1,525.80±309.53
29	1,1167.80±222.49	1,435.40±272.36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 14. ระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรนเฉลี่ย (นนก./ก. ± SE.) ในอุจจาระแม่สุกรในช่วงหลังคลอดถึงหย่านม.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
0	375.40±46.18	396.50±65.55
4	236.00±33.41	290.60±56.66
7	172.10±42.62	194.30±36.74
11	164.80±44.15	97.66±19.23
14	168.60±36.37	139.99±37.60
18	163.00±27.73	79.02±11.53*
21	201.10±39.24	81.50±13.46*
25	109.46±38.43	106.52±32.70
28	145.40±22.82	104.00±19.04
32	146.52±32.99	50.87±14.21
35	261.40±47.48	92.83±50.52*

$p<0.05$

ตารางผนวกที่ 15. ระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรนเฉลี่ย (นนก./ก. ± SE.) ของอุจจาระแม่สุกรในช่วงหลังผสมพันธุ์ 1 เดือน.

จำนวนวันหลังกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (วัน)	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA
1	192.40±35.36	306.00±54.93
4	205.90±46.16	185.80±29.15
8	210.90±33.23	214.00±25.73
11	185.68±36.05	165.90±24.37
15	211.90±74.47	204.16±40.18
18	147.20±29.14	238.20±37.10
22	172.30±32.12	244.60±37.36
25	185.90±32.72	242.20±44.68
29	223.30±33.51	240.10±45.45

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ตารางผนวกที่ 16. แสดงพื้นที่ใต้กราฟของเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในพลาสมา, ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน และเทสทอส-เตอร์โรน ในอุจจาระของแม่สุกร.

กลุ่ม	สัตว์ทดลอง	พื้นที่ใต้กราฟ				
		เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวกับ ^{3}H-Testosterone (%Bindingxday)	ปริมาณฮอร์โมนหลังคลอดถึงหย่านม (นนก./ก. x วัน)		ปริมาณฮอร์โมนหลังผสมพันธุ์ 1 เดือน (นนก./ก. x วัน)	
			โปรเจส-เตอร์โรน	เทสทอส-เตอร์โรน	โปรเจส-เตอร์โรน	เทสทอส-เตอร์โรน
กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA	1	392.35	28,704.0	9,004.5	39,751.5	5,459.0
	2	374.01	42,740.0	3,725.2	43,369.0	4,033.0
	3	428.61	61,736.0	7,226.5	51,164.0	4,664.0
	4	429.84	29,922.5	4,406.0	32,472.5	6,152.5
	5	399.00	23,875.5	3,944.0	22,310.0	5,771.0
	6	423.47	17,905.0	6,390.5	27,650.0	4,930.0
	7	422.86	11,558.5	4,713.5	24,547.0	4,513.0
	8	385.39	33,120.0	8,069.0	68,373.5	11,055.0
	9	471.20	33,505.0	5,725.0	22,906.0	7,368.0
	10	417.34	26,465.0	8,055.0	47,488.0	4,303.0
กลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Testosterone-17-HSA	11	959.21	69,964.0	3,301.4	31,644.0	10,326
	12	495.18	44,275.0	7,267.1	48,354.0	5,946.0
	13	795.13	18,775.0	3,349.5	33,230.0	6,870.0
	14	1,469.54	28,446.0	4,293.6	39,005.0	8,794.5
	15	751.77	3,9276.0	3,485.1	71,800.0	8,006.8
	16	798.94	33,121.0	3,366.5	37,800.0	3,417.0
	17	879.48	35,007.0	4,105.7	30,894.0	5,747.0
	18	673.33	45,486.0	7,739.0	59,210.0	6,673.0
	19	642.22	50,662.0	5,912.0	27,454.0	7,247.5
	20	784.49	18,245.0	2,467.3	39,544.0	5,293.0

ตารางผนวกที่ 17. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในโค.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	980.51	980.51	37.10	0.0001
Error	17	443.18	26.07		
Within Subject effects					
Time	9	942.49	104.72	14.47	0.0001
TretxTime	9	1069.65	118.85	16.43	0.0001
Error	252	1107.00	7.24		

ตารางผนวกที่ 18. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนในโคที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	11.09	11.09	0.72	0.4093
Error	17	269.48	15.50		
Within Subject effects					
Time	37	498.74	13.48	8.20	0.0001
TretxTime	37	104.02	2.81	1.71	0.0063
Error	629	1034.50	1.64		

ตารางผนวกที่ 19. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรน ในโคที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	0.05	0.05	0.02	0.8897
Error	17	46.60	2.74		
Within Subject effects					
Time	19	300.04	15.79	8.16	0.0001
TretxTime	19	19.44	1.02	0.53	0.9493
Error	98	625.56	1.94		

ตารางผนวกที่ 20. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในสุกรสาว.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	25974.54	25974.54	79.74	0.0001
Error	18	5863.34	325.74		
Within Subject effects					
Time	14	16503.97	1178.85	44.23	0.0001
TretxTime	14	13034.64	931.05	34.93	0.0001
Error	252	6716.78	26.65		

ตารางผนวกที่ 21. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน ในสุกรสาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	146.10	146.10	21.52	0.0002
Error	18	122.18	6.79		
Within Subject effects					
Time	12	252.69	21.06	10.13	0.0001
TretxTime	12	106.00	8.83	4.25	0.0001
Error	216	448.86	2.08		

ตารางผนวกที่ 22. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรน ในสุกรสาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	0.10	0.10	0.16	0.70
Error	14	8.52	0.61		
Within Subject effects					
Time	7	37.63	5.38	5.32	0.0001
TretxTime	7	8.19	1.17	1.16	0.3342
Error	98	99.04	1.01		

ตารางผนวกที่ 23. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ ^{3}H-Testosterone กับแอนติบอดีในแม่สุกร.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	933.31	933.31	24.74	0.0001
Error	18	679.12	37.73		
Within Subject effects					
Time	5	545.42	109.08	8.46	0.0001
TretxTime	5	588.13	117.63	9.12	0.0001
Error	90	1160.91	12.90		

ตารางผนวกที่ 24. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนในแม่สุกรที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA ซึ่งหย่านม 28 วัน.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	0.45	0.45	0.23	0.6420
Error	10	19.42	1.94		
Within Subject effects					
Time	8	3.69	0.46	1.34	0.2348
TretxTime	8	2.17	0.27	0.79	0.6130
Error	80	27.50	0.34		

ตารางผนวกที่ 25. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน ในสุกรสาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA ซึ่งหย่านม 35 วัน.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	0.06	0.06	0.03	0.8638
Error	6	10.39	1.73		
Within Subject effects					
Time	10	3.05	0.30	0.74	0.6830
TretxTime	10	4.24	0.42	8.61	0.4284
Error	60	24.67	0.41		

ตารางผนวกที่ 26. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรน ในแม่สุกรที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA ซึ่งหย่านม 28 วัน.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	3.48	3.48	4.14	0.0693
Error	10	8.41	0.84		
Within Subject effects					
Time	8	2.74	0.34	0.98	0.4591
TretxTime	8	2.98	0.37	1.06	0.3970
Error	80	28.06	0.35		

ตารางผนวกที่ 27. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรน ในสุกรสาวที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA ซึ่งหย่านม 35 วัน.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	7.70	7.70	4.38	0.0813
Error	6	10.55	1.76		
Within Subject effects					
Time	10	13.14	1.31	5.68	0.0001
TretxTime	10	19.91	1.99	8.61	0.0001
Error	60	13.87	0.23		

ตารางผนวกที่ 28. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน ในแม่สุกรที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ T-17-HSA และ HSA หลังผสมพันธุ์.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	0.73	0.73	0.51	0.4834
Error	18	25.72	1.43		
Within Subject effects					
Time	8	4.37	4.37	1.76	0.0894
TretxTime	8	0.68	0.08	0.27	0.9738
Error	144	44.69	0.31		

ตารางผนวกที่ 29. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนเทสทอสเตอร์โรน ในแม่สุกรที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HSA และ T-17-HSA หลังผสมพันธุ์.

SOV	df	SS	MS	Fvalue	F>pr
Between subject effects					
Tret	1	7.97	7.97	1.10	0.3079
Error	18	130. 37	7.24		
Within Subject effects					
Time	8	1.52	0.19	0.71	0.6791
TretxTime	8	2.00	0.25	0.94	0.4842
Error	144	38.40	0.27		

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายศุภมิตร เมฆฉาย
วัน เดือน ปี เกิด	8 มกราคม 2514
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 ที่โรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปีการศึกษา 2527 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 ที่โรงเรียนสุโขทัยวิทยาคม จังหวัดสุโขทัย เมื่อปีการศึกษา 2532 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2536

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University