ชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นางสาวสุนิสา แก้ววิเศษ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PROGESTERONE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE

Miss Sunisa Kaewviset

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์
โดย	นางสาวสุนิสา แก้ววิเศษ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุนิสา แก้ววิเศษ : ชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (PROGESTERONE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม:ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส, 119 หน้า.

โพรเจสเทอโรนเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์ ซึ่งหลั่งออกมาในนมและเลือดช่วงระยะการเป็นสัดและการตั้งครรภ์ในโคนม การตรวจโพรเจสเทอโรนสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี เช่น High performance liquid chromatography (HPLC) วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (ELISA) ซึ่งเทคนิค ELISA เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจโพรเจสเทอโรนในนม เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง ตรวจวัดง่าย สามารถตรวจพร้อมกันได้หลายตัวอย่าง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาชุดตรวจโพรเจสเทอโรน ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน จากการทดลองเปรียบเทียบ ELISA แบบต่างๆพบว่า ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) เหมาะสมที่สุด โดยสามารถวัดโพรเจสเทอโรนได้ในช่วง 1 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมระดับโพรเจสเทอโรนในระยะการเป็นสัดและการตั้งครรภ์ ชุดตรวจสอบต้นแบบนี้ มีค่าเฉลี่ย IC_{50} และ ปริมาณต่ำที่สุดที่ชุดตรวจสอบนี้สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 11.42 และ 2.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้มีความจำเพาะสูง โดยเกิดปฏิกิริยาข้ามกับฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์และสารปฏิชีวนะ น้อยกว่า 3% เมื่อนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปทดสอบกับตัวอย่างต่างๆ คือ น้ำนมโค และซีรัมโค พบว่า %recovery ที่ได้อยู่ในช่วง 85-119% และ 88-96% ตามลำดับ และจากการตรวจวัดปริมาณเปรียบเทียบโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ต้นแบบที่พัฒนาขึ้นเอง ชุดตรวจสอบ ELISA ที่มีจำหน่าย (EURO-DIAGNOSTICA)และเทคนิค HPLC พบว่าให้ค่าที่วัดได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้จากการทดสอบการแปรปรวนของการวัดของชุดตรวจสอบต้นแบบทั้งแบบ intra variation และ inter variation assay พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 4.45-16.72% และ 4.98–9.45% ตามลำดับ ผลการทดลองต่างๆแสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโพรเจสเทอโรน ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....สุนิสา.....แก้ววิเศษ.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....ดนาภัทร ปาลกะ.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

4972540323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS: PROGESTERONE / ELISA TEST KIT

SUNISA KAEWVISET: PROGESTERONE TEST KIT USING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY TECHNIQUE. ADVISOR: ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, Ph.D., CO ADVISORS: KITTINAN KOMOLPIS, Ph.D., 119 pp.

Progesterone is a steroid hormone secreted in milk and blood during estrus and pregnancy in bovine. Various analytical methods namely, chemical methods such as HPLC, and immunological methods such as RIA and ELISA, are applied for detection of progesterone. ELISA method has become the most popular method of choice for measurement of progesterone in bovine milk for detection of pregnancy due to its high sensitivity, high specificity, simplicity and appropriate format for screen large numbers of samples. The aim of this work is to develop a test kit for detection of progesterone using ELISA-based method, using monoclonal antibody highly specific for progesterone. Direct competitive ELISA (Ab captured) has been validated to be the most suitable method. The developed ELISA test kit could detect progesterone in the range of 1-50 ng/ml. The average IC_{50} value and limit of determination (LOD) obtained from ELISA kit in this study were 11.42 ng/ml and 2.20 ng/ml, respectively. The prototype test kit was highly specific to progesterone. The %cross-reactivity with other steroids hormone and antibiotics were less than 3%. The developed test kit was tested on different samples including cow milk and serum. It revealed the %recovery of 85-119% and 88-96%, respectively. Furthermore, comparative quantification of progesterone using the developed ELISA test kit, the commercially available test kit (EURO-DIAGNOSTICA) and HPLC technique showed that all three methods gave comparable results. In addition, the inter-assay and intra-assay variations of the developed test kit were also investigated and found to be 4.45-16.72% and 4.98–9.45%, respectively. These indicated that the prototype test kit can be used to accurately and efficiently determine the amount of progesterone.

Field of study: Biotechnology

Academic Year: 2008

Student's Signature Sunisa Kaewviset

Advisor's Signature Tanapat Palaga

Co-Advisor's Signature K. Komolpis

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง และ ดร.นันทิกา คงเจริญพร ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และอาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้บริหาร คณาจารย์ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย คำแนะนำ พร้อมทั้งความช่วยเหลือ

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ อย่างเต็มกำลังจนทำให้งานวิจัยสำเร็จได้

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนดลยีชีวภาพและวิศวกรรพันธุศาสตร์ ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอณุมาศ บัวเขียว คุณอุมาพร พิมพิทักษ์ รวมทั้งพี่ๆ และน้องๆ ในห้อง 803 ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงคำแนะนำและกำลังใจดีๆ ปลอบใจในยามที่ท้อแท้ และช่วยหาคำตอบของปัญหา ในทุกด้านเสมอมา ทำให้สามารถดำเนินงานมาได้อย่างราบรื่นและมีความสุขตลอดมา ตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนเสร็จสิ้น รวมทั้ง เพื่อนๆพี่ๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจและการสนับสนุนในทุกด้านด้วยดีตลอดมา

และที่สำคัญอย่างที่สุด ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตาและญาติพี่น้อง ที่เลี้ยงดูให้ความรัก ความห่วงใยและกำลังใจเสมอมา รวมถึงให้การสนับสนุนด้านการศึกษาอย่างไม่มีข้อแม้ใดๆ

สุดท้ายขอขอบคุณทุกอุปสรรคที่ผ่านเข้ามาระหว่างการทำวิจัย ที่ทำให้ได้รู้จักหาทางแก้ไข ช่วยฝึกให้ตัวเองมีความเข้มแข็งและกล้าเผชิญกับปัญหาในภายภาคหน้า ซึ่งทำให้ได้เรียนรู้ว่ารอยยิ้มหลังรอยน้ำตามันมีคุณค่าและความสุขมากมายจริงๆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฐ

บทที่ หน้า

1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตและวิธีการดำเนินงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี 4
2.1.1 กระบวนการสืบพันธุ์ในโค 4
2.1.2 วงรอบการเป็นสัดและพฤติกรรมการเป็นสัดของโค 5
2.1.3 การทำงานของฮอร์โมนที่ควบคุมการเป็นสัดและการตกไข่ 7
2.1.4 ความสัมพันธ์ของส่วนต่าง ๆ
ในการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ 9
2.1.5 การตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรน 15
2.1.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ 26
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 26
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 28
3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย 28

บทที่ หน้า

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 28
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 30
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 34
3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 34
3.4.2 การเตรียมสารเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับ BSA 36
3.4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 37
3.4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ 41
3.4.5 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ 48
3.4.6 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง 53
3.4.7 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ที่เตรียมได้ ชุดตรวจสอบทางการค้า และเทคนิค HPLC 54
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 56
4.1 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความไวสูงต่อโพรเจสเทอโรน 56
4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ 58
4.3 การเตรียมชุดตรวจสอบ 64
4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ 76
4.5 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง 84
4.6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA และเทคนิค HPLC 91
5 สรุปผลการทดลอง 99
รายการอ้างอิง 101
ภาคผนวก 104
ภาคผนวก ก 105
ภาคผนวก ข 113
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 119

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงต่อมไร้ท่อและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมนที่สำคัญในระบบสืบพันธุ์ 9

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 28

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 30

3.3 เวลาและอุณหภูมิที่ทำการทดสอบในการทำ ELISA 48

4.1 ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ผลิตโดยเซลล์ไฮบริโดรมา
ด้วยวิธี Indirect ELISA 57

4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อน
และหลังการทำให้บริสุทธิ์แล้ว 60

4.3 ผลการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์
ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 62

4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ
จากการทดสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA 63

4.5 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ Pr-HRPด้วยวิธี Direct ELISA
เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) 65

4.6 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ Pr-HRPด้วยวิธี Direct ELISA
เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)
ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ 67

4.7 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ Pr-BSA ด้วยวิธี Indirect ELISA
เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) 69

4.8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ Pr-BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน
ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ
Direct competitive ELISA (Ab captured) 72

4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ 76

4.10 ผลค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่า %B/B0
และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) ที่ได้จากการทำ Direct competitive ELISA
(Ag captured) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ 77

ตารางที่ หน้า

4.11 ผลของการศึกษาเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มแอนติบอดีกับ Pr-HRP และโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ 80
4.12 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross Reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ 82
4.13 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ 83
4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ 84
4.15 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation ในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 85
4.16 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation ในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 87
4.17 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation ในตัวอย่างซีรัมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 88
4.18 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation ในตัวอย่างซีรัมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ 90
4.19 สรุปผลการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง 91
4.20 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA 93
4.21 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA 94
4.22 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC 96
4.23 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC 97
ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารลายโปรตีนมาตรฐาน BSA 105
ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของแอนติบอดี 106
ก.3 ผลการหาความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่เหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน 107

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 ฮอร์โมนจากสมองส่วนไฮโพทาลามัสและต่อมใต้สมองของโค 8

2.2 ระดับโพรเจสเทอโรน (progesterone) และเอสโทรเจน (estrogen) ในรอบวงจรสัด 8

2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน..... 11

2.4 ระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโคระหว่างรอบวงจรสัด 13

2.5 ระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโคขณะตั้งท้อง 14

2.6 หลักการของ Direct ELISA 16

2.7 หลักการของ indirect ELISA..... 17

2.8 หลักการของ Competitive ELISA..... 19

2.9 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 21

4.1 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ
ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA 58

4.2 โครมาโตแกรมของการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี
ให้บริสุทธิ์โดยการใช้โครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์สัมภัคภาพของโปรตีนเอ
และการทำ ELISA ของลำดับส่วนที่ได้..... 59

4.3 ผลการวิเคราะห์แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยวิธี SDS-PAGE 61

4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระด้วยวิธี
Indirect competitive ELISA 64

4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระของอัตราส่วน
ระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) 66

4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระของอัตราส่วน
ระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)
ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู..... 68

4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระของอัตราส่วน
ระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-BSA ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (Ab captured)..... 71

4.8 ผลการทดสอบความไวของอัตราส่วนระหว่าง Pr-BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน
ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) 73

รูปที่ หน้า

4.9 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนด้วยโปรแกรม GraphPad Prism เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ 78
4.10 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) 78
4.11 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบในภาวะการบ่มต่างๆ 81
4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่าง น้ำนม และซีรัมโคที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA..... 95
4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่าง น้ำนม และซีรัมโคที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC 97
ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA 105
ก.2 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA..... 106
ก.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐาน ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 108
ก.4 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้โดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค 108
ก.5 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค 109
ก.6 กราฟมาตรฐานของวิธี HPLC ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค 109
ก.7 โครมาโตแกรมของโพรเจสเทอโรนมาตรฐานความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากเทคนิค HPLC 110
ก.8 โครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำนมโคที่เติมโพรเจสเทอโรนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC..... 111
ก.9 โครมาโตแกรมของตัวอย่างซีรัมที่เติมโพรเจสเทอโรนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC..... 112

คำย่อและสัญลักษณ์

Ab	antibody
AP	alkaline phosphatase
BCA assay	bicinchoninic acid assay
BSA	bovine serum albumin
CR	cross-reactivity
CV	coefficient of variation
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
g	gram
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IC50	inhibitory concentration 50%
Ig	immunoglobulin
LA	latex agglutination
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantitation
kDa	kilodalton
M	molar
ml	milliliter
N	normal
ng	nanogram
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
NP	1-napthyl phosphate
OD	optical density

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPD	*O*-phenylenediamine
PAGE	poly acrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffer saline
PNP	p-nitrophenyl phosphate
PMP	phenolphthalein monophosphate
Pr	progesterone
R_f	relative mobility
RIA	radioimmunoassay
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
v	volume
w	weight

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเลี้ยงวัวเป็นอาชีพที่สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรไทย ซึ่งในปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารจากนมและน้ำนมพร้อมดื่ม เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้นทั้งภายในและต่างประเทศ ทำให้มีความต้องการน้ำนมดิบเพิ่มมากขึ้น ในปีพ.ศ 2543 ประเทศไทยมีการผลิตนมพร้อมดื่มจำนวน 1,213,423 ตัน ขณะที่เกษตรกรผลิตน้ำนมดิบได้เพียง 494,692 ตัน ซึ่งคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการน้ำนมดิบทั้งประเทศ (วิโรจน์, 2546) ปัญหาสำคัญของเกษตรกรที่เลี้ยงโคนม คือ ขาดการจัดการด้านการขยายพันธุ์ของโคที่ดีจึงผสมพันธุ์ผิดพลาด ทำให้แม่โคท้องว่าง การให้นมก็จะเลื่อนกำหนดออกไปด้วย ดังนั้นการหาระยะเป็นสัดของโคเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้อง และการตรวจสอบการตั้งครรภ์จึงจำเป็นมากสำหรับการจัดการด้านการสืบพันธุ์ (ชวนิศนดากร, 2530)

การตรวจสอบการเป็นสัดและการตั้งครรภ์ของโคสามารถทำได้โดยการวัดระดับโพรเจสเทอโรน (Progesterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตอรอยด์ โดยแหล่งที่ทำการสังเคราะห์โพรเจสเทอโรน ได้แก่ คอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) รก และอาจสังเคราะห์ได้บ้างในรังไข่ อัณฑะและต่อมหมวกไต เมื่อสังเคราะห์แล้วจะหลั่งโพรเจสเทอโรนเข้าสู่กระแสเลือด และเกิดเมแทบอไลท์ในตับและกระแสเลือด สามารถตรวจวัดระดับของโพรเจสเทอโรนได้ ในเลือด และน้ำนมวัว (Drofman,1975) จากที่มีผู้ศึกษาการตรวจวัดระดับโพรเจสเทอโรนระหว่างวงรอบการเป็นสัดและในขณะตั้งท้องของโคนม พบว่าระดับโพรเจสเทอโรนในกระแสเลือดและน้ำนม จะสูงขึ้นถึงวันที่ 17 หรือ 18 ของรอบวงการเป็นสัด หลังจากนี้ระดับโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลง โดยระดับโพรเจสเทอโรนจะต่ำสุดในวันแสดงอาการสัด ซึ่งวงรอบการเป็นสัด 1 รอบ มีเวลาประมาณ 21 วัน หากมีการตั้งครรภ์ระดับโพรเจสเทอโรนจะยังคงสูงอยู่ แต่หากไม่มีการตั้งครรภ์ระดับโพรเจสเทอโรนจะลดลง ดังนั้นการวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจึงเป็นวิธีที่นำมาใช้เพื่อหาระยะเวลาการเป็นสัดของโค ทำให้กำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้อง และตรวจสอบการตั้งครรภ์ของโคได้ (Mcdonald,1975)

ในการตรวจวัดปริมาณโพรเจสเทอโรน สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง (Almeida, 2006) แต่ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนาน จึงทำการตรวจตัวอย่างได้น้อย ต้นทุนในการวิเคราะห์มีราคาสูง เนื่องจากเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการ

วิเคราะห์อีกด้วย จึงได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น โดยอาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (immunological method) ได้แก่ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay : RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) สำหรับหลักการของ RIA นั้นจะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ซึ่งมีการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง (Capezzuto, 2006) แต่เนื่องจากเทคนิคนี้มีการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น และอาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการใช้และการจัดการของเสียปนเปื้อนจากสารกัมมันตภาพรังสี (Yalow, 1987) จึงไม่เหมาะสมแก่การใช้งานภาคสนามและห้องปฏิบัติการทั่วไป ส่วนวิธี ELISA นั้นอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ซึ่งมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนสารกัมมันตภาพรังสี เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย สามารถนำมาตรวจสอบนอกห้องปฏิบัติการได้ จึงนำมาใช้ในฟาร์มได้ ให้ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ จึงมีการใช้อย่างแพร่หลาย (Nakao และคณะ 1980)

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีการพัฒนาชุดตรวจโพรเจสเทอโรนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ จึงต้องทำการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจโพรเจสเทอโรนที่อาศัยหลักการของ ELISA โดยชุดตรวจดังกล่าวจะต้องมีประสิทธิภาพในการตรวจที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับชุดตรวจที่นำเข้าจากต่างประเทศหรือการตรวจด้วยวิธี HPLC ทั้งนี้ในการพัฒนาชุดตรวจจะใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโพรเจสเทอโน ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะแก่การนำมาใช้งาน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เตรียมชุดตรวจโพรเจสเทอโรนโดยอาศัยหลักการของเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์แบบต่างๆ

1.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจต้นแบบและเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

1.3 ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1.3.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

1.3.2 เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน

1.3.3 ทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1.3.4 เตรียมชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนต้นแบบ

1.3.4.1 แบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

1.3.4.2 แบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่รองด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู

1.3.4.3 แบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

1.3.4.4 แบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

1.3.5 ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

1.3.6 วิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมวัว และซีรัมวัว ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ ชุดตรวจสอบที่มีจำหน่ายเชิงพานิชย์ และเทคนิค HPLC วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่อาศัยหลักการเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

ประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ และการผลิตน้ำนมของโค สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการเพิ่มอัตราการผสมติด (Conception rate) ซึ่งทำได้โดยการผสมเทียมให้ตรงกับระยะที่แม่โคเป็นสัด ดังนั้นการทราบระยะการเป็นสัด และการตรวจยืนยันการตั้งท้องที่ถูกต้องจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก ซึ่งสามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (Progesterone) ด้วยวิธีทางเคมีหรือวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดของวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นหลัก รายละเอียดทั้งหมดกล่าวได้ดังนี้

2.1.1 กระบวนการสืบพันธุ์ในโค

จุดมุ่งหมายหลักของการเลี้ยงโคนมคือการผลิตน้ำนม ซึ่งการสืบพันธุ์ของโคนมเป็นสิ่งสำคัญที่สุดที่จะทำให้โคผลิตน้ำนม การที่จะทำให้โคผลิตนมได้จำเป็นต้องทำให้โคนมมีการตั้งท้องจนกระทั่งคลอดลูกออกมา ซึ่งจะเป็นสัญญาณกระตุ้นให้โคนมเริ่มสร้างน้ำนมติดต่อกันไป โดยการให้นมจะเริ่มต้นตั้งแต่คลอดลูกตัวแรกไปจนกระทั่งลูกโคถึงระยะที่ไม่ต้องการนมจากแม่อีก แม่โคจะหยุดให้นม จนกว่าจะคลอดลูกตัวใหม่จึงให้นมครั้งใหม่เป็นเช่นนี้ไปจนกว่าจะไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ (ชวนิศนดากร, 2530) ศักยภาพแม่โคสามารถคลอดลูกได้ปีละตัวเพราะมีระยะอุ้มท้องเฉลี่ยนาน 285 วัน โดยหลังคลอด 60 วัน ควรทำการตรวจสัด และทำการผสมเทียมในระยะที่แม่โคเป็นสัด หลังจากนั้น 21-24 วัน ทำการตรวจท้อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์และการผลิตน้ำนม (ปราจีน, 2546) การสืบพันธุ์ของโคถูกควบคุมโดยการทำงานจากฮอร์โมนและระบบประสาท ให้ทำงานสัมพันธ์กัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ ได้แก่ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้นของอากาศ อาหาร และการดูแล เป็นต้น การตั้งท้องของโคนมจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการผสมของตัวอสุจิกับไข่ ไข่ที่ใช้ในการผสมจะถูกสร้างมาจากรังไข่ โดยเมื่อโคนมเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์พร้อมที่จะผสม Folicle Stimulating Hormone (FSH) ซึ่งถูกหลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior pituitary gland) จะทำให้ฟอลลิเคิล (Follicle) ที่อยู่ในรังไข่เจริญเติบโตขยายตัวขึ้นมาบริเวณผิวหนังของรังไข่ ช่วงนี้ฟอลลิเคิลจะมีการสร้าง ฮอร์โมนเอสโทรเจน (Estrogen) ขึ้นมาด้วย ซึ่งทำให้โคแสดงอาการเป็นสัด เมื่อฟอลลิเคิลขยายตัวมากขึ้น

ถึงจุดหนึ่ง ต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะสร้าง Luteinizing Hormone (LH) จะทำให้ฟอลลิเคิลแตกพร้อมกับไข่ ที่อยู่ภายในจะหลุดออกมาและตกลงไปในท่อนำไข่เพื่อรอรับการผสมจากตัวอสุจิ ส่วนตัวฟอลลิเคิลจะเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นคอร์ปัสลูเทียม (Corpus luteum) พร้อมกับเปลี่ยนหน้าที่ไปสร้างฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้โคนมมีการตกไข่อีกถ้ามีการตั้งท้องเกิดขึ้น หากไข่ไม่ได้รับการผสมกับอสุจิ คอร์ปัสลูเทียมจะสลายตัวไป และรังไข่จะผลิตไข่ใบใหม่ขึ้นมาและเริ่มเข้าสู่รอบการเป็นสัดใหม่ต่อไป (สมชาย, 2541)

2.1.2 วงรอบการเป็นสัดและพฤติกรรมการเป็นสัดของโค

วงรอบการเป็นสัด (Estrus period) หมายถึงระยะที่ร่างกายของโคเจริญเติบโตพร้อมที่จะรับการผสมพันธุ์และตั้งท้องต่อไป ซึ่งถูกควบคุมโดยฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นและหลั่งออกมาอย่างเป็นระบบ รอบวงรอบการเป็นสัดของโคมีระยะโดยเฉลี่ย 18 –22 วัน โคสาวเมื่อเป็นสัดครั้งแรกมักไม่แสดงอาการแม้ว่าจะมีการตกไข่ (Silent heat) (วิโรจน์, 2546) ช่วงระยะเวลาของวงรอบการเป็นสัดมีความแปรปรวนได้ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ ฤดูกาล ความสมบูรณ์ของร่างกาย ถ้าโคไม่ตั้งท้องโคนมจะกลับมาแสดงอาการเป็นสัดเฉลี่ยทุก 21 วัน ในช่วงระยะที่โคใกล้จะแสดงอาการเป็นสัดประมาณ 3 วันก่อนแสดงอาการเป็นสัด FSH จะหลั่งออกมาเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลซึ่งทำให้โคแสดงอาการเป็นสัดพร้อมที่จะรับการผสม การตกไข่จะเกิดขึ้นในช่วงสุดท้ายที่โคยืนนิ่งพร้อมรับการผสมโดยอิทธิพลของ LH หลังการตกไข่ฟอลลิเคิลจะเปลี่ยนไปเป็นคอร์ปัสลูเทียมซึ่งจะเจริญเติบโตไปเป็นระยะเวลานาน 16 วัน ก่อนที่จะฝ่อไปโดยอิทธิพลของฮอร์โมนโพรสทาแกลนดิน (Prostaglandin) ซึ่งสร้างจากผนังมดลูก การฝ่อของคอร์ปัสลูเทียมเป็นช่วงสุดท้ายของวงรอบการเป็นสัด หลังจากนั้นรอบการเป็นสัดใหม่ก็จะเกิดขึ้นอีกครั้งหนึ่งถ้าโคมีสุขภาพปกติ (สมชาย, 2541)

วงรอบการเป็นสัดแบ่งเป็น 4 ระยะ ตามลักษณะพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงอวัยวะสืบพันธุ์ การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน ที่มีความสอดคล้องกัน ซึ่งระยะทั้ง 4 คือ

1. ระยะก่อนการเป็นสัด (Proestrus)

อยู่ช่วงระหว่างวันที่ 17-20 หลังการเป็นสัด เป็นระยะที่โคเข้าสู่การเป็นสัดรอบใหม่ ระบบสืบพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลง โดยฟอลลิเคิลจะเจริญอย่างรวดเร็ว ในขณะที่คอร์ปัสลูเทียม (Corpus luteum) จากการเป็นสัดในรอบที่แล้ว ฝ่ออย่างรวดเร็ว มดลูกมีการเปลี่ยนแปลง มีเลือดเลี้ยงมาก

ต่อมสร้างสารคัดหลั่งเจริญขยายตัวในส่วนคอมดลูก (Cervix) และช่องคลอด (Vagina) โดยช่องคลอดจะบวมแดงมีเมือกใสเหนียวไหลจากช่องคลอดจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน

2. ระยะเป็นสัด (Estrus or heat)

ในวันแรกของการเป็นสัด เป็นระยะที่ ฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (Dominant follicle) มีการเจริญเติบโตเต็มที่ และเกิดการตกไข่ตามมา (Ovulation) โคจะแสดงการเป็นสัดโดยเฉลี่ยประมาณ 4-24 ชั่วโมง และ โคจะแสดงการยอมรับการผสม และยืนนิ่งเมื่อมีตัวอื่นปีน (Standing heat) ระยะการเป็นสัด โคจะแสดงอาการต่าง ๆ เช่น กระวนกระวาย ถ้าเป็นวัวระยะให้นมจะมีการสร้างน้ำนมลดลง การยืนนิ่งยอมเป็นปีนของตัวอื่น พบเมือกหรือสารคัดหลั่งจากมดลูก คอมดลูก และช่องคลอดมีมากที่สุด เยื่อเมือกของปากช่องคลอดจะแดงมีเลือดคลั่ง ในระยะนี้ ระดับฮอร์โมน LH จะเพิ่มขึ้นสูงมากก่อนที่จะตกไข่ ตามมาหลังจากที่แสดงอาการเป็นสัด ประมาณ 30 ชั่วโมง ส่วนการผสมเทียมระยะที่เหมาะสมคือ 12-18 ชั่วโมง หลังการยืนนิ่ง (Standing heat)

3. ระยะหลังการเป็นสัด (Metoestrus)

อยู่ช่วงระหว่างวันที่ 2-4 ของการเป็นสัด ในระยะนี้โคจะหยุดแสดงอาการเป็นสัด และรังไข่มีการสร้าง คอร์ปัสลูเตียม (Corpus luteum) และเริ่มมีการแสดงฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ในบางครั้งอาจจะพบว่าเลือดออกมาจากช่องคลอด (Metoestrus bleeding) ได้ในระยะนี้ ปกติพบประมาณ 90% และไม่เกิน 45% ในแม่วัว ซึ่งเป็นลักษณะเมือกปนเลือดพบติดตามหลังหรือบริเวณช่องคลอดด้านนอก

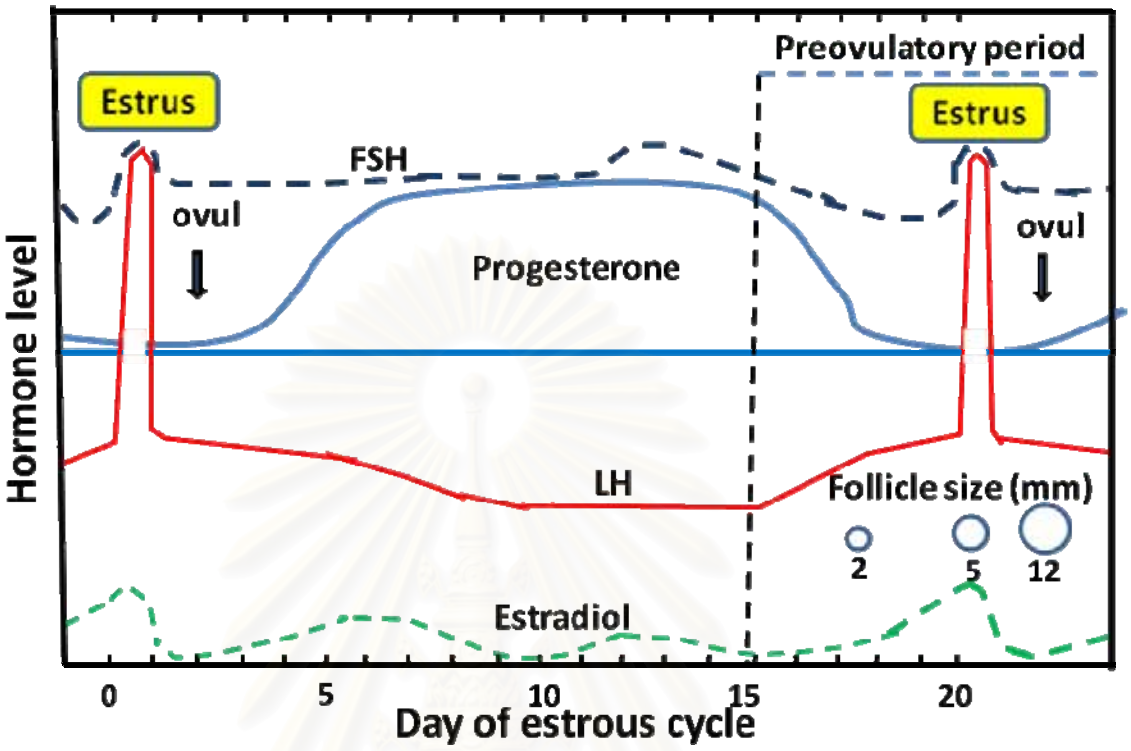
4. ระยะไม่เป็นสัดในวงรอบ (Dioestrus)

อยู่ในช่วงระหว่างวันที่ 5-17 หลังจากการเป็นสัด เป็นระยะที่มีคอร์ปัสลูเทียมเจริญเติบโตเต็มที่ มดลูกพร้อมรับการตั้งท้อง มีระดับโพรเจสเทอโรน (Progesterone) สูง คอมดลูกปิดมีเมือกเหนียวปิดอยู่ เยื่อเมือกช่องคลอดค่อนข้างซีด ในช่วงท้ายของระยะนี้ถ้าโคไม่มีการตั้งท้อง ก็จะมีการสร้างฮอร์โมนโพรสทาแกลนดิน (Prostaglandin) จากมดลูก (Uterus) มาสลายคอร์ปัสลูเทียม หลังจากนั้นก็จะมีการเริ่มขบวนการเป็นสัดในรอบใหม่

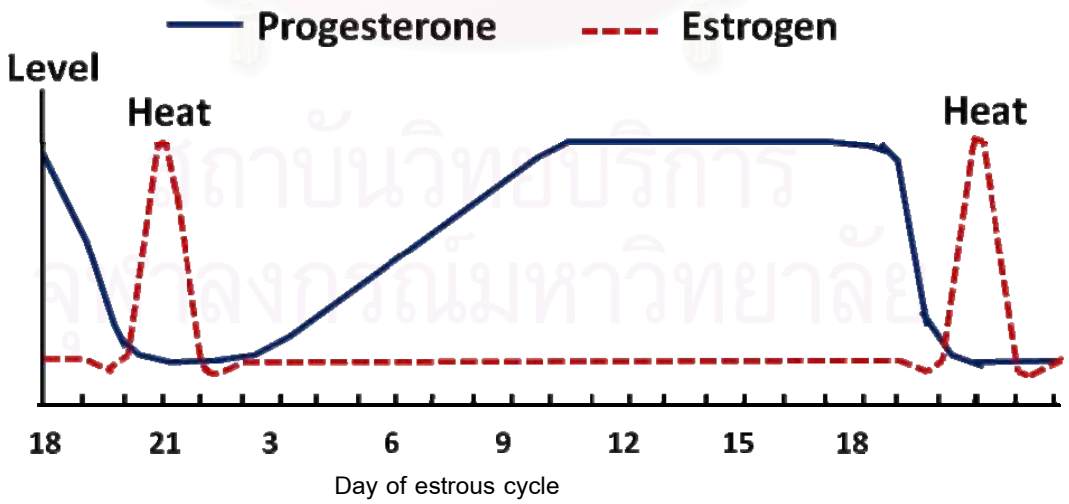
2.1.3 การทำงานของฮอร์โมนที่ควบคุมการเป็นสัดและการตกไข่

ขบวนการทั้งหมดที่เกิดขึ้นในวงรอบการเป็นสัดของโคจะถูกควบคุมโดยกลไกของฮอร์โมน (Hormone mechanism) ซึ่งมีฮอร์โมนที่สำคัญได้แก่ FSH, LH และเอสโทรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 หน้าที่อย่างอื่นของเอสโทรเจน คือช่วยขับ Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) โดยพบว่าเมื่อระดับของ เอสโทรเจน ในเลือดเปลี่ยนแปลงจะทำให้สมองขับ GnRH ออกมา ในทางกลับกัน GnRH จะช่วยในการขับฮอร์โมน LH จากต่อมใต้สมองโดย LH จะถูกขับออกมาหลังจากโคเริ่มเป็นสัดแล้ว 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นประมาณ 30 ชั่วโมง ตั้งแต่โคเริ่มยืนนิ่งให้ตัวอื่นปีนผสม ฮอร์โมน LH จะกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ ไข่ที่ตกแล้วจะอยู่ในสภาพสมบูรณ์พร้อมที่ผสมได้นานประมาณ 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นหากไม่ได้ผสมจะทำให้ผสมติดยาก อย่างไรก็ตามยังมีการค้นพบว่าถึงแม้ตกไข่ไปแล้ว 12 ชั่วโมง ก็ยังสามารถปฏิสนธิได้อยู่ ในการผสมเพื่อให้มีโอกาสปฏิสนธิได้ดีที่สุดควรผสมหลังจากโคเริ่มยืนให้ตัวอื่นผสม 12-24 ชั่วโมง ภายหลังจากการตกไข่แล้วผนังของกระเปาะไข่จะฝ่อตัว จากนั้นฮอร์โมน LH จะกระตุ้นให้มีการสร้างคอร์ปัสลูเทียมขึ้น จนกระทั่งผลิตโพรเจสเทอโรนเพิ่มขึ้น และประมาณวันที่ 4-5 ของการตกไข่จะตรวจโพรเจสเทอโรนพบในกระแสเลือด โดยจะมีระดับโพรเจสเทอโรนในกระแสเลือดสูงสุดหลังจากเป็นสัด 9-10 วัน ความเข้มข้นระดับนี้ยังสูงจนถึงวันที่ 17-19 ความเข้มข้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้วงรอบการเป็นสัดของโคเกิดขึ้นอีกครั้งหนึ่ง สาเหตุที่ระดับโพรเจสเทอโรนต่ำลงก็เพราะการฝ่อตัวของคอร์ปัสลูเทียมในกรณีที่โคได้รับการผสมแล้วเกิดการตั้งท้องขึ้นคอร์ปัสลูเทียมจะไม่ฝ่อตัวและจะผลิตโพรเจสเทอโรนไปเรื่อยๆ จนเกือบตลอดระยะเวลาการตั้งท้อง (ตรีพล และคณะ, 2527)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.1 ฮอร์โมนจากสมองส่วนไฮโพทาลามัสและต่อมใต้สมอง ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัดของโค (Sorensen, 1979)



รูปที่ 2.2 ระดับโพรเจสเทอโรน (Progesterone) และเอสโทรเจน (Estrogen) ในรอบวงจรสัด (Sorensen, 1979)

2.1.4 ความสัมพันธุ์ของส่วนต่าง ๆ ในการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์

ระบบการสืบพันธุ์ของโคจะถูกควบคุมโดยฮอร์โมนต่าง ๆ ซึ่งสร้างจากต่อมไร้ท่อและอวัยวะที่เกี่ยวข้องต่างๆดังนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงต่อมไร้ท่อและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการผลิตฮอร์โมนที่สำคัญในระบบสืบพันธุ์

ต่อมไร้ท่อและอวัยวะที่เกี่ยวข้อง	**ฮอร์โมน**	**หน้าที่หลักของฮอร์โมน**
ไฮโปธาลามัส (Hypothalamus)	GnRH	กระตุ้นการหลั่ง FSH และ LH จาก ต่อมใต้สมอง
ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior Pituitary gland)	FSH	กระตุ้นการเจริญของกระเปาะไข่และไข่สุก
	LH	กระตุ้นกระเปาะไข่สุก ทำให้เกิดการตกไข่สร้างและรักษาสภาพ corpus luteum
มดลูก (Uterus)	Prostaglandin	การสลาย corpus luteum
รังไข่ (Ovary)	Estrogens	กระตุ้นอาการเป็นสัดกระตุ้นการหลั่ง GnRH ก่อนการตกไข่
	Progesterone	เตรียมเยื่อบุมดลูกเพื่อการฝังตัวของตัวอ่อน รักษาสภาพการตั้งท้อง ลดการหลั่ง GnRH จึงเป็นการยับยั้งการตกไข่

ที่มา : สรรเพชญ โสภณ, 2530

2.1.4.1 Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)

เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากไฮโปธาลามัส โดย GnRH จะกระตุ้นการหลั่ง FSH และ LH จากต่อมใต้สมอง หน้าที่สำคัญของ GnRH จะช่วยกระตุ้นการพัฒนาฟอลลิเคิล (มงคล, 2543)

2.1.4.2 Follicle Stimulating Hormone (FSH)

เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดย FSH เป็นตัวกระตุ้นให้รังไข่สร้างกระเปาะไข่และถุงไข่ฟอลลิเคิลเจริญเติบโตขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เทสโทสเทอโรนเปลี่ยนไปเป็นเอสโทรเจนชนิด เอสไทรออล, เอสโทรน และ เอสทราไดออล (มงคล, 2543)

2.1.4.3 Luteinizing Hormone (LH)

เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดย LH จะกระตุ้นให้รังไข่สร้างฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน และทำหน้าที่ให้เกิดการตกไข่ (Ovulation) และทำให้ไข่สร้างคอปัสลูเทียมด้วย ถ้าเป็นโคตัวผู้จะกระตุ้นให้สร้างฮอร์โมนเพศผู้ (Testosterone) (มงคล, 2543)

2.1.4.4 Prostaglandin

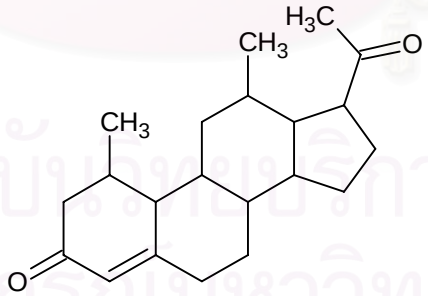
เป็นฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดโพทาโนอิก (Protanoic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยปกติกรดโพทาโนอิก จะไม่อยู่โดด ๆ แต่จะมีกลุ่มต่าง ๆ เข้าไปต่อเป็นโพรสทาแกรนดิน กลุ่มที่พบอยู่บ่อย ๆ ได้แก่ A, B, E และ F ส่วนกลุ่มอื่น ๆ ก็เกิดขึ้นได้เช่นกันโพรสทาแกรนดินที่ใช้กันมีชื่อสามัญ คือ โพรสทาแกรนดิน เอฟทู แอลฟา (prostaglandin $F_2\alpha$) หรือ PG $F_2\alpha$ ปัจจุบันพบโพรสทาแกรนดินหลายชนิดในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีโพรสทาแกรนดิน เอฟทู แอลฟา มีบทบาทในการควบคุมวงรอบการเป็นสัดในสัตว์หลายชนิด โดยโพรสทาแกรนดินจะหลั่งมาจากมดลูก ไปออกฤทธิ์ทำให้คอร์ปัสลูทียมฝ่อ เป็นเหตุให้ระดับโพรเจสเทอโรนลดลง โพรสทาแกรนดิน เอฟทู แอลฟา ที่เกิดจากคอร์ปัสลูเทียม จะไปกระตุ้นเยื่อบุภายในมดลูกให้สร้างสารขึ้นมาทำลายตัวเองซึ่งเกิดขึ้นหลังระยะกลางของวงรอบการเป็นสัด (วิโรจน์, 2546)

2.1.4.5 Estrogens

เอสโทรเจนผลิตจากเนื้อเยื่อที่อยู่ล้อมรอบฟอลลิเคิล ฮอร์โมนนี้ทำหน้าที่ควบคุมพฤติกรรมที่แสดงออกทางเพศ คือพฤติกรรมการเป็นสัด และกระตุ้นให้ระบบสืบพันธุ์ เป็นตัวการที่ทำให้ตัวเมียมีอวัยวะเพศเมียเจริญจนพร้อมที่จะสืบพันธุ์ได้ โดยช่วยให้มดลูกเตรียมพร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ และการฝังตัวของไข่ที่ได้รับการผสมติด ในระยะก่อนและระหว่างเป็นสัด ฮอร์โมนนี้จะกระตุ้นให้มีการผลิตน้ำเมือกไหลซึมมาทางปากช่องคลอด เพื่อเป็นการหล่อลื่น และเตรียมพร้อมสำหรับการผสมพันธุ์ อิทธิพลของฮอร์โมนนี้ยังมีผลต่อการกระตุ้นให้คลายตัว โดยกล้ามเนื้อปากช่องคลอดจะบวมแดงในระหว่างที่เป็นสัด กระตุ้นให้กล้ามเนื้อปากมดลูกคลายตัว เพื่อให้อสุจิผ่านเข้าไปผสมกับไข่ได้ และยังช่วยให้กล้ามเนื้อรอบมดลูกบีบตัวช่วยพาให้ไข่ และอสุจิเคลื่อนที่เข้าหากันได้เร็วขึ้น เป็นการเพิ่มโอกาสในการผสมพันธุ์ ซึ่งฮอร์โมนนี้มีมากในระยะที่ไข่แก่ (วิโรจน์, 2546)

2.1.4.6 Progesterone

โพรเจสเทอโรนเป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อการควบคุมทำงานของระบบสืบพันธุ์ จัดเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormone) สูตรโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 21 อะตอม มีชื่อทางเคมี คือ Δ^4-pregnene-3,20-dione สูตรโครงสร้างของโพรเจสเทอโรนแสดงดังรูปที่ 2.4 โพรเจสเทอโรนจัดเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในวงรอบการเป็นสัดและในการตั้งท้อง แหล่งที่ทำการสังเคราะห์โพรเจสเทอโรน คือ คอร์ปัสลูเทียม รังไข่ รก และอาจสังเคราะห์ได้บ้างในระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมนตัวอื่น ได้แก่ ฮอร์โมนเพศ (Sex hormone) ในรังไข่ ในอัณฑะ และคอร์ทิโคสเตอรอยด์ (Corticosteroid) ในต่อมหมวกไต ทำให้สามารถตรวจระดับโพรเจสเทอโรนในคอร์ปัสลูเทียม ในรก ในเปลือกต่อมหมวกไต ในน้ำเลือด และในน้ำนม เป็นต้น (Drofman, 1975) โพรเจสเทอโรนเป็นฮอร์โมนที่ช่วยพยุงการตั้งท้องเตรียมเยื่อบุผนังให้พร้อมที่จะรับการฝังตัวของตัวอ่อน และยับยั้งการตกไข่ขณะตั้งท้อง โดยทำงานร่วมกับเอสโทรเจนไปยับยั้งการหลั่งโกนาโดโทรพินจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า นอกจากนี้จะทำงานร่วมกับเอสโทรเจนกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มถุงน้ำนมเหนี่ยวนำให้เกิดการคลอด เมื่อครบกำหนดคลอดโพรเจสเทอโรนจึงลดระดับต่ำลง เอสโทรเจนจะมีผลร่วมกับออกซิโทซินจากต่อมใต้สมองส่วนหลังกระตุ้นการบีบตัวของมดลูกขับลูกออกมา (วิโรจน์, 2546)



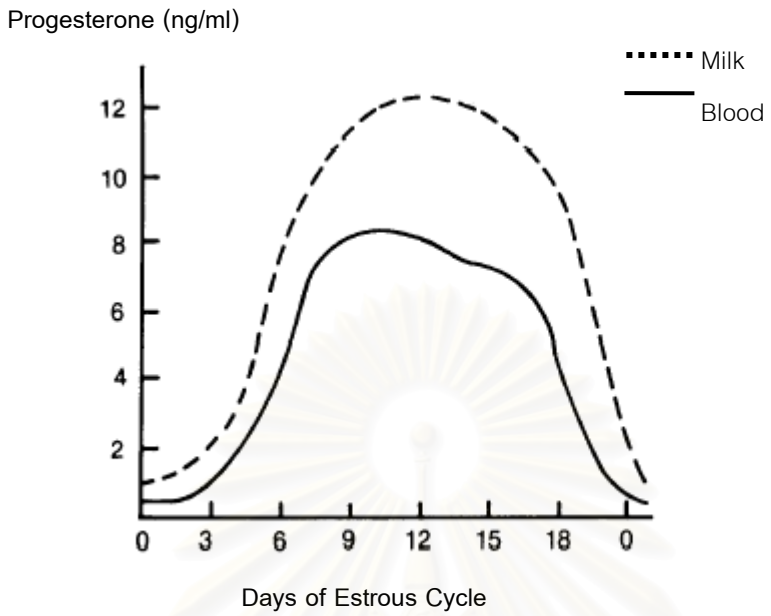
รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน

2.1.4.6.1 ระดับโพรเจสเทอโรนในระยะวงรอบการเป็นสัด

การเป็นสัดหมายถึงสัตว์ตัวเมียแสดงอาการยอมรับการผสมพันธุ์จากตัวผู้และมีการตกไข่ การเป็นสัดจะเกิดขึ้นนานประมาณ 10 ถึง 24 ชั่วโมง ถ้าโคไม่ได้รับการผสมหรือผสมแล้วไม่ติด อาการเป็นสัดของโคจะปรากฏอีกในเวลา 20 ถึง 22 วันต่อมา วงรอบการเป็นสัด ถูก

ควบคุมด้วยฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้น โดยหลั่งออกมาอย่างเป็นระบบ วงรอบการเป็นสัดของโค โดยปกติมีเวลาโดยเฉลี่ยประมาณ 21 วัน ต่อรอบ โดยนับเวลาตั้งแต่วันเริ่มเป็นสัดวันแรก จนถึงการเป็นสัดครั้งที่สองติดต่อกันไป ทั้งนี้การสังเคราะห์โพรเจสเทอโรนมีความสัมพันธ์กับการเจริญของคอร์ปัสลูเทียมตามขั้นตอนต่อไปนี้ ภายในรังไข่จะมีไข่จำนวนมากฝังตัวอยู่ภายในเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มเซลล์ที่ล้อมรอบไข่ ต่อมาจะเจริญเติบโตเป็นฟองไข่ เมื่อไข่โตเต็มที่ฟองไข่จะแตกออก ปล่อยไข่ออกจากรังไข่ เรียกว่าการตกไข่ แล้วเซลล์ของฟองไข่รอบ ๆ จะสร้างคอร์ปัสลูเทียม มีลักษณะเป็นแผ่น ซึ่งจะขยายตัวขึ้นและผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ประมาณวันที่ 5 ของวงรอบการเป็นสัด ต่อมาเซลล์ทีคาอินเทอนาจะทำการแบ่งตัว ทำให้ขนาดและน้ำหนักของคอร์ปัสลูเทียมเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของโพรเจสเทอโรนเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด จากงานวิจัยที่ผ่านมาวัดปริมาณโพรเจสเทอโรน ในพลาสมาจะน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันแสดงอาการสัด และคงระดับต่ำประมาณ 3-4 วัน จากนั้นมีระดับสูงขึ้นและสูงสุดโดยเฉลี่ย 6-7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 16-17 ของการเป็นสัดซึ่งคอร์ปัสลูเทียมอาจมีขนาด 2 เซนติเมตร หลังจากนี้ระดับโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลง (Moeljono และ คณะ, 1977) สรุปแล้วระดับโพรเจสเทอโรนลดต่ำสุดในวันแสดงอาการสัด และสูงสุดในวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด และตั้งแต่วันที่ 17 เป็นต้นไประดับโพรเจสเทอโรนจะลดลงเรื่อย ๆ จนต่ำสุดจนถึงวงรอบการเป็นสัดใหม่ เนื่องจากอิทธิพลของโพรสทาแกลนดินเอฟทูแอลฟา ซึ่งสังเคราะห์จากเยื่อบุผนังมดลูก ผ่านเส้นเลือดดำระหว่างมดลูกกับรังไข่ (Utero – Ovarian vein) เข้าสู่คอร์ปัสลูเทียม เป็นเหตุให้คอร์ปัสลูเทียมเสื่อมสลายภายใน 40 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มรอบวงจรสัดครั้งต่อไป ซึ่งระดับระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาและในน้ำนม ระหว่างรอบวงจรสัดแสดงดังรูปที่ 2.4

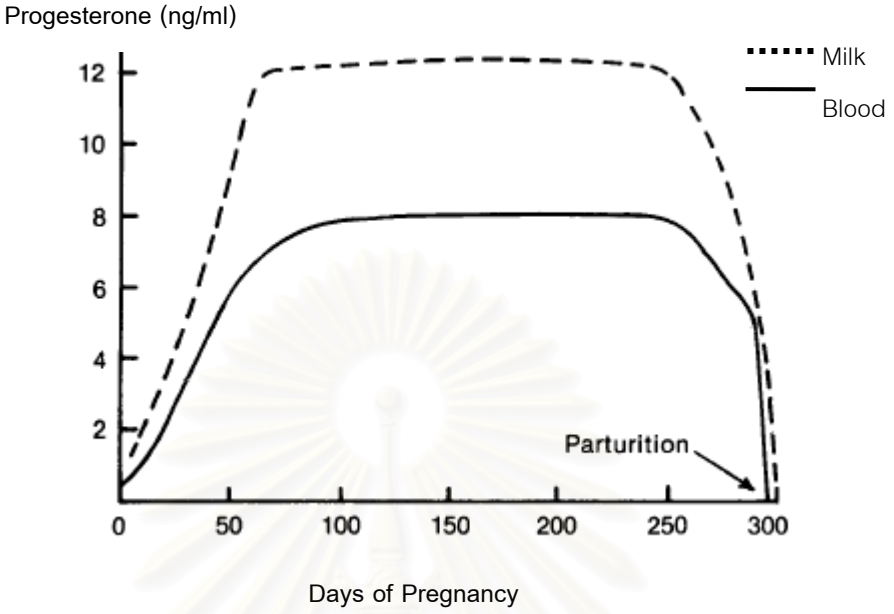
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 ระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมา และ ในน้ำนมโคระหว่างวงรอบการเป็นสัด

2.1.4.6.2 ระดับโพรเจสเทอโรนตลอดการตั้งท้อง

การเปลี่ยนแปลงของระดับโพรเจสเทอโรน หลังจากที่โคได้รับการผสมพันธุ์ คอร์ปัสลูเทียมทำหน้าที่ในการผลิตฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนเพื่อช่วยพยุงการตั้งท้อง ในระยะเริ่มต้นของการตั้งท้อง ระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาจะมีค่าใกล้เคียงกับวันที่ 14 – 16 ของวงรอบการเป็นสัด แต่ระดับของโพรเจสเทอโรนอาจสูงขึ้นบ้าง และจะคงระดับเช่นนี้ตลอดการตั้งท้อง ประมาณวันที่ 20 – 30 ก่อนคลอดจะเริ่มมีระดับลดลงอย่างช้าๆ และมีระดับต่ำสุดในวันที่คลอด Fairclough และคณะ (1975) ศึกษาระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาของโคที่ตั้งท้อง พบว่าระดับของโพรเจสเทอโรนเพิ่มสูงขึ้นจาก 1.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 8.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 9.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ในวันที่ 3 – 12 ของการตั้งท้อง) โดยระดับโพรเจสเทอโรนจะคงสูงอยู่ตลอดการตั้งท้อง จนกระทั่ง 1 วันก่อนคลอดระดับโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลงถึง 0.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในรูป 2.5



รูปที่ 2.5 ระดับโพรเจสเทอโรนในพลาสมาและในน้ำนมโคขณะตั้งท้อง

2.1.4.6.3 การใช้ระดับโพรเจสเทอโรนในนมตรวจการตั้งท้อง

ในปัจจุบันการตรวจการตั้งท้องจะอาศัยความแตกต่างของระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนม ตั้งแต่วันที่ 20 หลังการผสมเทียมเป็นต้นไป เพราะในโคที่ไม่ตั้งท้องระดับของโพรเจสเทอโรนจะลดต่ำลง เนื่องจากการเสื่อมสลายของคอร์ปัสลูเทียม ส่วนในโคที่ตั้งท้องระดับโพรเจสเทอโรนจะมีค่าสูงใกล้เคียงกับวันที่ 14 – 15 ของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งได้ผลดีในการวิเคราะห์หาระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมเพื่อตรวจการตั้งท้อง (วิโรจน์, 2546)

2.1.4.6.4 การใช้ระดับโพรเจสเทอโรนตรวจการแสดงอาการเป็นสัด

การเป็นสัดหลังคลอดของโคขึ้นกับการคืนตัวของสภาพมดลูกที่บอบช้ำเนื่องจากการคลอดสู่สภาพปกติและขึ้นกับการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ ที่หล่อเลี้ยงต่อมใต้สมองและมดลูกซึ่งควบคุมการผลิตฮอร์โมนโกนาโดโทรพิน (FSH และ LH) ไปควบคุมการทำงานของรังไข่ให้สร้างฮอร์โมนเอสโทรเจนและโพรเจสเทอโรนไปควบคุมสภาพมดลูก ให้เตรียมพร้อมต่อการผสมติดครั้งต่อไป ตามปกติโคนมจะเป็นสัดและตกไข่หลังคลอด 30 – 72 วัน เมื่อได้รับการเลี้ยงดูและให้อาหารอย่างดี การวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมสามารถตรวจอาการสัดได้ หากระดับของโพรเจสเทอโรนต่ำลงสุด จะเป็นเวลาที่โคเริ่มเป็นสัด ทำให้สามารถกำหนดเวลาผสมเทียมได้ (วิโรจน์, 2546)

2.1.5 การตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรน

เทคนิคการตรวจวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนนั้น สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมี และวิธีทางอิมมูโนวิทยา

2.1.5.1 การตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนโดยวิธีทางเคมี ได้แก่ เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ สามารถวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนปริมาณน้อยๆได้ และมีประสิทธิภาพสูง (Almeida และ Nogueira, 2006) แต่เทคนิคเหล่านี้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างนาน จึงทำการตรวจตัวอย่างได้น้อย ต้นทุนในการวิเคราะห์มีราคาสูง เนื่องจากเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง จำเป็นต้องวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ อีกทั้งยังต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการวิเคราะห์อีกด้วย

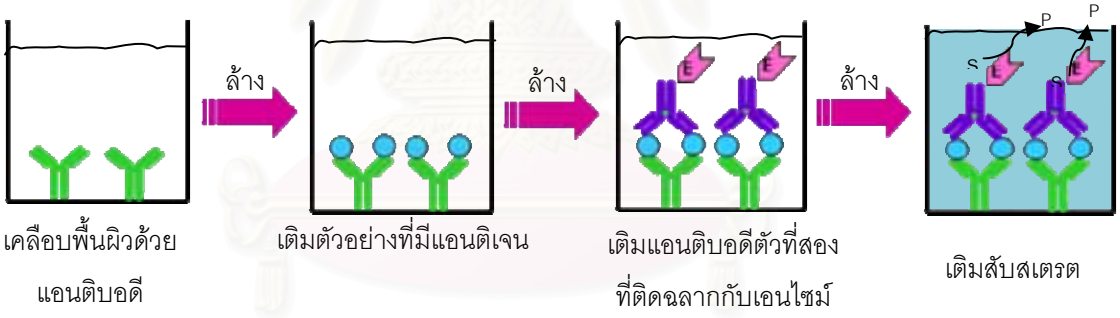
2.1.5.2 การตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ในปัจจุบันมีการพัฒนาการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น โดยอาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (Immunological method) ได้แก่ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay, RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) สำหรับหลักการของ RIA คืออาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ซึ่งมีการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี แล้วติดตามปริมาณโพรเจสเทอโรนจากเครื่องนับปริมาณรังสี เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะ (Specificity) สูง เนื่องจากอาศัยการจับกันของแอนติเจนกับแอนติบอดี (Capezzuto, 2006) แต่เนื่องจากเทคนิคนี้ต้องใช้เครื่องมือในการตรวจวัดสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น และอาจก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการใช้และการจัดการของเสียปนเปื้อนจากสารกัมมันตภาพรังสี (Yalow และ Berson, 1978) ส่วนหลักการของเทคนิค ELISA นั้นอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนซึ่งมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์แทนสารกัมมันตภาพรังสี โดยใช้แอนติเจนหรือแอนติบอดีเคลือบติดกับพื้นผิว (Solid support) ทำให้เกิดการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ตรวจวัดการจับกันของเอนไซม์ที่ติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดี ซึ่งเอนไซม์จะเป็นตัวช่วยในการขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้น จึงเป็นปฏิกิริยาที่มีความไว ความจำเพาะสูง และมีความเหนียวแน่นในการจับ (Affinity) เทคนิค ELISA นี้เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันมีความนิยมมากในปัจจุบัน สามารถใช้ในการวัดระดับสารที่ต้องการตรวจวัดได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะและ

ความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาตรวจสอบนอกห้องปฏิบัติการได้จึงนำมาใช้ในฟาร์มได้ ให้ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ และมีการใช้อย่างแพร่หลาย (Nakao และคณะ 1980)

2.1.5.2 เทคนิค ELISA สามารถแบ่งออกได้เป็น

2.1.5.2.1. Direct ELISA

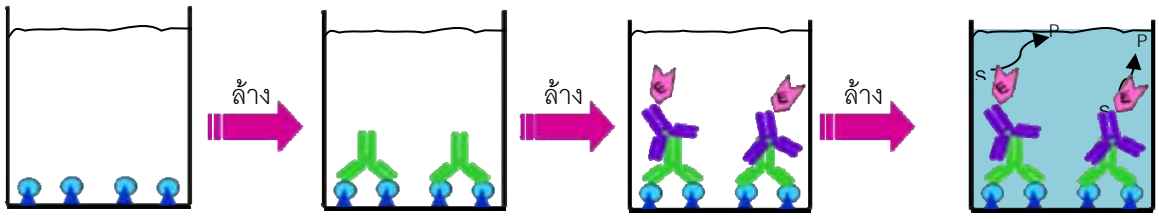
สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณแอนติเจน ได้โดยเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการในตัวอย่าง เมื่อเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบแอนติเจนนั้นก็จะจับกับแอนติบอดีดังกล่าว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจและติดฉลากด้วยเอนไซม์ (conjugate) ลงไปในปริมาณที่มากพอ ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้วจึงเติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ



รูปที่ 2.6 หลักการของ Direct ELISA

2.1.5.2.2. Indirect ELISA

สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ โดยทำการเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ แล้วทำการเติมตัวอย่างที่มีแอนติบอดีลงไปแอนติบอดีที่จำเพาะเท่านั้นที่จะจับกับแอนติเจนที่เคลือบไว้ แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ไว้ โดยแอนติบอดีตัวที่สองนี้ จะจับแบบจำเพาะกับแอนติบอดีที่ต้องการตรวจหา หลังจากล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของแอนติบอดีในตัวอย่างที่ตรวจสอบ



รูปที่ 2.7 หลักการของ Indirect ELISA

2.1.5.2.3. Competitive ELISA

เป็นวิธีการทดสอบที่มักจะใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย โดยอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เป็นตัวทำปฏิกิริยาทำให้เกิดการแข่งขันกันขึ้น ในการทดสอบจะเคลือบจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดี แล้วเติมแอนติเจนติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หากมีแอนติเจนในตัวอย่างจะเกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีที่พื้นผิวระหว่างแอนติเจนกับแอนติเจนที่ติดฉลาก ทำให้แอนติเจนติดฉลากที่เติมลงไปส่วนหนึ่งจับกับแอนติบอดีได้น้อย แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

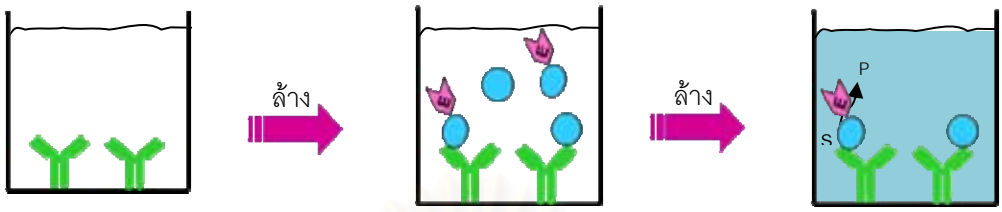
ถ้าใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ในการตรวจวัดแอนติเจน จะทำการเคลือบจาน 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่ พร้อมกับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

นอกจากนี้สามารถเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Competitive ELISA โดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยทำการเคลือบจาน 96 หลุมด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีติดฉลากด้วย biotin ซึ่งจำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบอยู่ พร้อม

กับเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบหาปริมาณแอนติเจน หรือเติมพร้อมกับแอนติเจนมาตรฐาน ซึ่งจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นแต่ไม่ได้ติดฉลากด้วย biotin แอนติบอดีที่ติดฉลากจะเกิดการแย่งจับระหว่างแอนติเจนในตัวอย่างกับแอนติเจนที่เคลือบบนพื้นผิว แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติมสับสเตรตของเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้น การเปลี่ยนแปลงสีของสับสเตรตจะแปรผกผันกับปริมาณของแอนติเจนในตัวอย่างที่ตรวจสอบ

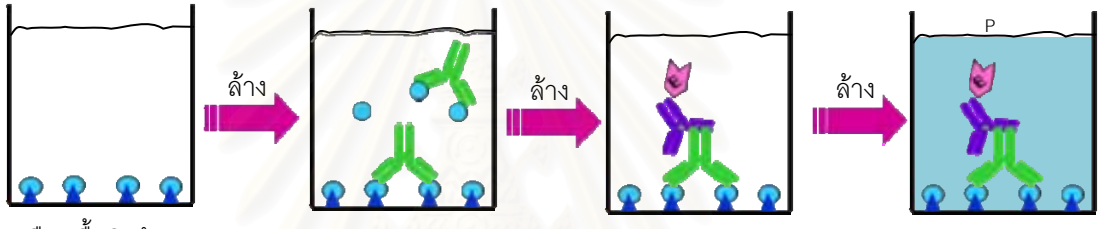
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)



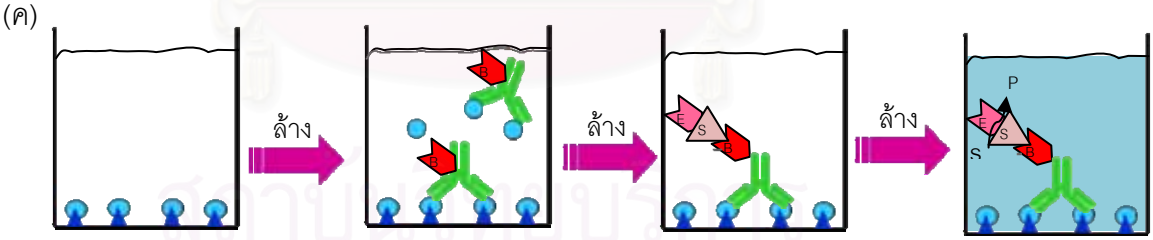
เคลือบพื้นผิวด้วย แอนติบอดี | เติมแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ พร้อมกับตัวอย่างที่มีแอนติเจน | เติมสับสเตรต

(ข)



เคลือบพื้นผิวด้วย แอนติเจน | เติมแอนติบอดีพร้อมกับ ตัวอย่างที่มีแอนติเจน | เติมแอนติบอดีตัวที่สอง ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

(ค)



เคลือบพื้นผิวด้วย แอนติเจน | เติมแอนติบอดีที่ติดฉลาก biotin พร้อมตัวอย่างที่มีแอนติเจน | เติม streptavidin ที่ติด ฉลากด้วยเอนไซม์ | เติมสับสเตรต

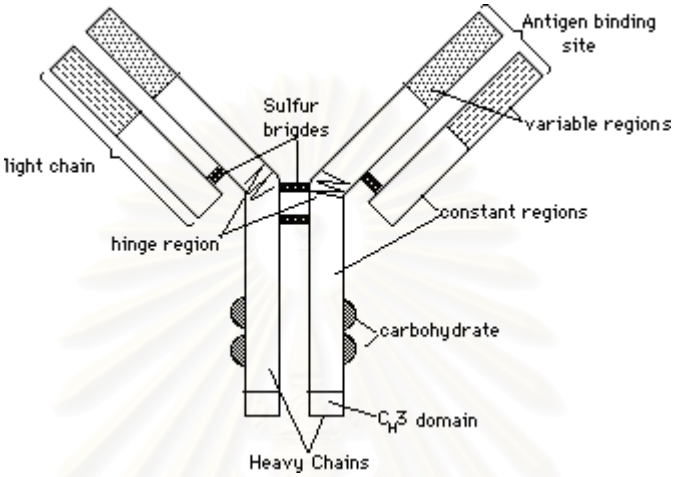
รูปที่ 2.8 หลักการของ Competitive ELISA (ก) ใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ข) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (ค) ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย biotin (หมายเหตุ คือแอนติบอดี, คือแอนติเจนเชื่อมโปรตีน, คือแอนติเจนอิสระ คือแอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์, คือแอนติบอดีติดฉลากด้วย biotin คือ streptavidin ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์)

2.1.5.3 องค์ประกอบที่สำคัญของชุดตรวจ ELISA

2.1.5.3.1 แอนติบอดี (Antibody)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig) เป็นไกลโคโปรตีนในระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์สร้างขึ้น มีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะของมันคือ แอนติเจน (Antigen) โดยแอนติบอดีจะจับแอนติเจนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีตรงบริเวณที่เรียกว่าอิพิโทป (Epitope) ของแอนติเจน แอนติบอดีสร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิดบี-ลิมโฟไซต์ที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อทำหน้าที่หลั่งแอนติบอดีเรียกว่าพลาสมาเซลล์ (Plasma cell) แอนติบอดีที่หลั่งเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตจะตรวจจับและสลายพิษ (Neutralization) แล้วกำจัดแอนติเจนออกจากร่างกาย ส่วนแอนติบอดีที่อยู่บนผิวเซลล์ของบี-ลิมโฟไซต์เป็นตัวบ่งชี้ความจำเพาะของบี-ลิมโฟไซต์ การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีบนผิวเซลล์เป็นการกระตุ้นให้โคลนของบี-ลิมโฟไซต์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเหมือนกับแอนติบอดีที่อยู่บนผิวเซลล์ การเพิ่มปริมาณแอนติบอดีที่สนใจสามารถทำได้โดยฉีดโปรตีนหรือเส้นเพปไทด์ ซึ่งเราเรียกว่าแอนติเจนเข้าไปในสิ่งมีชีวิต เช่น หนู กระต่าย แพะ หรือ แกะ เป็นต้น แอนติเจนเป็นสิ่งแปลกปลอมที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ต่อมาระบบภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (Humoral immune system) ของสัตว์เหล่านี้ก็จะสร้างแอนติบอดีตอบสนองอย่างจำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีอยู่ในรูปตัววาย (Y shape) ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 82 – 96 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต 4 – 18 เปอร์เซ็นต์ แอนติบอดีส่วนใหญ่อยู่ในเซรุ่มส่วนแกมมาโกลบูลิน (Gamma globulin) ถ้านำซีรัมของคนปกติมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) จะแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 5 ส่วนใหญ่ ๆ คือ แอลบูมิน และ โกลบูลินอีก 4 ส่วน คือ แอลฟา 1(α_1), แอลฟา 2(α_2), บีตา (β) และแกมมา (γ) โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล (Monomer) แสดงในรูปที่ 2.9 ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 สาย คือ heavy (H) chain 2 สายที่เหมือนกัน และ light (L) chain 2 สายที่เหมือนกัน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) แรงยึดนี้สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยสารเมอร์แคปโทเอทานอล (Mercaptoethanol) ปลายข้างหนึ่งของสายพอลิเพปไทด์ เรียก NH_2 หรือ amino terminal ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งเรียกว่า COOH หรือ carboxy terminal โดยทุกสายจะหันปลายข้าง NH_2 หรือ COOH ไปทางเดียวกัน โดยอาศัยความแตกต่าง H chain สามารถแบ่งอิมมูโนโกลบูลิน ได้เป็น 5 ไอโซไทป์ คือ IgG IgA IgM IgD และ IgE ตามลำดับ H chain ของอิมมูโนโกลบูลินแต่ละไอโซไทป์มีความแตกต่างกันในน้ำหนัก

โมเลกุล ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต antigenic determinant คุณสมบัติทางชีวภาพ และการเคลื่อนที่เมื่อทำอิเล็กโทรฟอเรซิส เช่นเดียวกันสามารถแบ่ง L chain ออกได้เป็น 2 type คือ kappa (k) และ lamda (λ) (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2537)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน

2.1.5.3.1.1 พอลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody)

เป็นแอนติบอดีที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อแอนติเจนโดยสามารถทำปฏิกิริยาได้กับอิพิโทปหลายตำแหน่งบนแอนติเจน เนื่องจากแอนติบอดีเหล่านี้ถูกสร้างมาจากบี-ลิมโฟไซต์และพลาสมาเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยแอนติบอดีต่อหลายอิพิโทปของแอนติเจนรวมกันในเลือดของสัตว์เป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี สัตว์ที่นิยมใช้ในการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีมักเป็นสัตว์ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ได้แก่ กระต่าย แพะ ม้า หมู เป็นต้น

2.1.5.3.1.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีคือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งกำเนิดมาจากบี-ลิมโฟไซต์เซลล์เดียว ทำให้ทุกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการทั้งในด้านความจำเพาะต่ออิพิโทปของแอนติเจน และในด้านของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดรวมกัน ซึ่งเรียกว่า พอลิโคลนอลแอนติบอดี สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายใน

ห้องปฏิบัติการ และที่นำไปใช้ในการรักษาโรคเป็นชนิดที่ผลิตขึ้นในห้องทดลองด้วยวิธีต่าง ๆ กัน ที่สำคัญมี 2 วิธี คือ somatic hybridization ซึ่งเป็นการหลอมรวมเซลล์ 2 เซลล์เข้าด้วยกัน โดยเซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ อีกเซลล์หนึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่หยุดยั้ง วิธีการนี้ทำให้ได้กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า ไฮบริโดมา (Hybridoma) ซึ่งป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดี และมีชีวิตยืนยาว (Immortalize) สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่มีสิ้นสุด ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อแยกเอายีนอิมมูโนโกลบูลิน ออกมาดัดแปลงแล้วนำกลับใส่เข้าไปในเซลล์ใหม่ เป็นการดัดแปลงในระดับยีน ทำให้โมเลกุลแอนติบอดีมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามที่ต้องการ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยวิธีนี้เรียกว่า แอนติบอดีที่ดัดแปลงพันธุกรรม (สุทธิพันธ์และคณะ, 2537)

ชุดตรวจสอบส่วนใหญ่นิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมากกว่าพอลีโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากว่ามีความจำเพาะมากกว่า และสามารถควบคุมคุณภาพและปริมาณของแอนติบอดีที่ใช้การผลิตชุดตรวจสอบได้ ซึ่งความแตกต่างระหว่างพอลีโคลนอลแอนติบอดีและโมโนโคลนอลแอนติบอดีแบ่งได้เป็น 4 ประการ คือ

1. แหล่งกำเนิดและวิธีการผลิต

โมโนโคลนอลแอนติบอดี ไม่ว่าจะผลิตจากวิธี somatic hybridization หรือโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมก็ตาม ต้องอาศัยเทคโนโลยีจำเพาะ และต้องใช้กระบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายสูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งผลิตโดยการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของคนหรือสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจน ให้สร้างแอนติบอดีที่ต้องการออกมาในกระแสเลือด หลังจากนั้นจึงแยกแอนติบอดีออกจากซีรัม การผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดี จึงมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าและทำได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตในสัตว์ต่างชนิดหรือแม้แต่ในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่คนละตัวกันก็อาจได้แอนติบอดีที่แตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้พอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้แต่ละครั้งจะมีปริมาณจำกัดและอาจต้องใช้คนหรือสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตจึงต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพของพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นทุก ๆ ครั้ง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้น สามารถผลิตได้อย่างไม่จำกัดในด้านปริมาณและคุณภาพ เนื่องจากทั้งยีนและเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีนั้นจะถูกเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป

2. ความจำเพาะต่อแอนติเจน (Antigen specificity)

โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่ออิพิโทปชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจเป็นอิพิโทปที่จำเพาะหรืออิพิโทปที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้าม (Cross-reactive epitope) ก็ได้ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี ประกอบด้วยแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิด ที่แต่ละโมเลกุลมีความจำเพาะต่ออิพิโทปของตน ซึ่งทำให้พอลิโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อหลายอิพิโทปต่าง ๆ กันบนโมเลกุลของแอนติเจน

3. สัมพรรคภาพ (Affinity) และ อะวิดิตี (Avidity) ของแอนติบอดี

สัมพรรคภาพ คือ ค่าการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเพียง 1 ตำแหน่ง (Binding site) และ อะวิดิตี คือ ผลรวมแต่ละตำแหน่งของการจับกับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งสัมพรรคภาพและอะวิดิตี เป็นคุณสมบัติภายในของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุล กำหนดโดยลักษณะโครงสร้างของส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนของโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งก็คือส่วนของบริเวณแปรผัน (Variable region) นั่นเอง สัมพรรคภาพเป็นคุณลักษณะจำเพาะของแอนติบอดีแต่ละชนิดและเป็นผลของขบวนการที่เกิดในธรรมชาติ โดยในระหว่างพัฒนาการของบี ลิมโฟไซต์ จะมีการจัดเรียงตัวใหม่ (Rearrange) ของยีนอิมมูโนโกลบูลินในแบบต่าง ๆ ทำให้เกิดแอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพมากน้อยต่างกันได้

ดังนั้นหากต้องการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้มีสัมพรรคภาพดีมากน้อยเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับวิธีการในการคัดเลือกเซลล์ต้นกำเนิดของโมโนโคนอลแอนติบอดีนั้น นอกจากนี้ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ทำให้สามารถเปลี่ยนแปลงสัมพรรคภาพของแอนติบอดีนั้นๆ ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงที่ระดับยีนของอิมมูโนโกลบูลิน ทำให้ได้แอนติบอดีที่มีสัมพรรคภาพดีขึ้นกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากบี ลิมโฟไซต์ ที่สร้างแอนติบอดีขึ้นเองตามธรรมชาติ ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีอะวิดิตีที่เป็นผลรวมของสัมพรรคภาพของแอนติบอดีแต่ละโมเลกุลที่ประกอบกันขึ้นมาเป็นพอลิโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งก็มักอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

4. Effector function

Effector function คือคุณสมบัติที่จะถูกกำหนดด้วยส่วนบริเวณคงที่ (Constant region) ของ H chain เป็นคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีแต่ละชนิด ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นคอมพลีเมนต์ การจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินบนผิวเซลล์ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซไทป์และสับคลาสของ

อิมมูโนโกลบูลินนั้น ๆ ซึ่งจะกำหนดคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละชนิด ให้มีคุณสมบัติทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ แตกต่างกัน ส่วนพอลิโคลนอลแอนติบอดี มักจะมีความสามารถในด้าน effector function ในระดับปานกลางถึงดีในทุกด้านเนื่องจากอาศัยคุณสมบัติของแอนติบอดีหลาย ๆ ชนิดมาเฉลี่ยกัน

2.1.5.3.2 แอนติเจน

แอนติเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดคุณสมบัติของชุดตรวจสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เนื่องจากในชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันนั้นอาศัยปฏิกิริยาการจับกันแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นกลไกหลักในการตรวจ โดยแอนติเจนจะชักนำให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีและสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับแอนติบอดี แล้วสามารถจดจำสารนั้นได้ ในชุดตรวจสอบที่ใช้แอนติเจนขนาดเล็กที่เรียกว่าแฮปเทน (Hapten) มักต้องทำการเชื่อมต่อเข้ากับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า ในลักษณะของ hapten carrier conjugate เพื่อชักนำในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่าอิมมูโนเจน (Immunogen) นอกจากนี้การเชื่อมต่อแอนติเจนกับสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า ช่วยให้การเคลือบพื้นผิวบนจานหลุมชนิด 96 หลุมมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.1.5.3.3 ระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา

ชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน อาศัยการทำปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ซึ่งสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์และสับสเตรต ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของปฏิกิริยา ส่วนใหญ่มักจะวัดสีที่เกิดขึ้นโดยอ่านค่าเป็นการดูดกลืนแสง (Absorbance หรือ Optical Density; O.D.) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะมากหรือน้อย ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์และสับสเตรต

2.1.5.3.3.1 เอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารสำคัญที่ใช้ในชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นส่วนของระบบการตรวจวัดปฏิกิริยา ใช้โดยการเชื่อม (Conjugate) หรือติดฉลาก (Label) เอนไซม์เข้ากับแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ใช้เป็นตรวจวัด เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากในชุดตรวจสอบมี 2 ชนิด คือ Horseradish Peroxidase (HRP) และ Alkaline Phosphatase (AP)

เนื่องจากมีคุณสมบัติเหมาะสมกับชุดตรวจสอบเกือบทุกรูปแบบ นอกจากนี้อาจสามารถเพิ่มความแรงของสัญญาณการตรวจวัดปฏิกิริยาทำให้ชุดตรวจมีความไวสูงขึ้น โดยอาศัยการจับกันระหว่าง biotin และ streptavidin ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ เนื่องจากระบบของ biotin-streptavidin มีสัมพรรคภาพสูงกว่าแอนติบอดีกับแอนติเจน

2.1.5.3.3.2 สับสเตรต

สับสเตรตแต่ละชนิดจะอ่านผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน และการใช้สับสเตรตขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจวัดด้วย เช่น เมื่อใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase สับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 415 นาโนเมตร, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร และ OPD (o-phenylenediamine) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร ส่วนเอนไซม์ alkaline phosphatase สับสเตรตที่ใช้ ได้แก่ PNP (p-nitrophenyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร, PMP (Phenolphthalein monophosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร และ 1NP (1-napthyl phosphate) อ่านผลที่ค่าการดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

2.1.5.4 พื้นผิวสำหรับการยึดตรึง

ชุดตรวจโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบัน นิยมใช้การเคลือบแอนติเจนหรือแอนติบอดีเข้ากับพื้นผิวในรูปแบบของ solid phase โดยทั่วไปที่เป็นมาตรฐานคือ จานชนิด 96 หลุม หรือ microtitre plate หรือ 96 well-plate ซึ่งอาจอยู่ในรูปเพลทอันเดียวกันที่มี 96 หลุม หรืออยู่ในรูปที่สามารถหักแบ่งเป็นแถบๆ (Strip) แถบละ 8 หลุมจำนวน 12 แถบ หรือแถบละ 16 หลุม จำนวน 6 แถบ

2.1.6 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ

ข้อมูลสำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบโดยวิธีทางด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1. ความไว (Sensitivity) บ่งบอกความสามารถที่จะตรวจพบสารในปริมาณต่ำสุด (lower limit of detection; LOD) ที่สามารถวัดได้ด้วยชุดตรวจสอบนั้น

2. ความแม่นยำ (Precision) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลเหมือนกันเมื่อทดสอบหลายๆ ครั้ง โดยทั่วไปจะระบุเป็น %CV (percent coefficient of variation) และ SD (standard deviation)

3. ความถูกต้อง (Accuracy) บ่งบอกความสามารถที่จะให้ผลใกล้เคียงกับค่าจริงหรือค่ามาตรฐาน โดยทั่วไปจะระบุเป็น %Recovery

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากการทราบระยะการเป็นสัด และการตรวจยืนยันการตั้งท้องที่ถูกต้องจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก ซึ่งสามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน ด้วยวิธีทางเคมีหรือวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการวัดโพรเจสเทอโรน ดังนี้ Munro และ Stabenfeldt (1984) ได้ผลิตแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน โดยทำการเชื่อมโพรเจสเทอโรนเข้ากับ bovine serum albumin (BSA) แล้วฉีดเข้ากระต่าย หลังจากนั้นนำพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็นชุดตรวจโดยวิธี ELISA แบบ competitive โดยใช้โพรเจสเทอโรนติดฉลากกับเอนไซม์ horseradish peroxidase เป็นตัวแข่งขัน ซึ่งให้ค่า sensitivity limit ที่ระดับ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมา Romagnolo และ Nebe (1993) ได้ทำการตรวจโพรเจสเทอโรนในน้ำนมก่อนและหลังการตั้งครรภ์จากวัว 82 ตัวในประเทศอิตาลี ด้วยเทคนิค ELISA โดยเปรียบเทียบกับเทคนิค latex agglutination (LA) และเทคนิค RIA เมื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากการวัดระดับโพรเจสเทอโรนในวันที่ 19, 21 และ 23 หลังวันผสมเทียม ของวัวที่มีการตั้งครรภ์ พบว่าเทคนิค ELISA มีความถูกต้องเฉลี่ย 92.3%, เทคนิค LA มีความถูกต้องเฉลี่ย 84.7% และเทคนิค RIA มีความถูกต้องเฉลี่ย 78.5%เมื่อตรวจสอบความแม่นยำโดยทำ inter-assay พบว่าเทคนิค ELISA มีค่าความแม่นยำ 100% และเทคนิค LA มีค่า 74.6 % ตามลำดับ จากนั้นวิไลวรรณและคณะ (2547) ได้ทำการหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยเทคนิคเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ที่พัฒนาขึ้น โดยกองผลิตไอโซโทป สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ เทคนิคที่ใช้ได้แก่วิธี coated tubes ด้วยแอนติบอดี โดยใช้เวลาในการบ่มปฏิกิริยา 3 ชั่วโมง ชุดน้ำยาที่ผลิตได้มีความไวในการวิเคราะห์ 0.38 นาโนโมลต่อลิตร มีความถูกต้องและความแม่นยำสูง และจากการวิเคราะห์

เปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง (FAO/IAEA method) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ สหสัมพันธ์ (Correlation factor) เท่ากับ 0.9631 หลังจากนั้น Comin และคณะ (2005) ได้ใช้เทคนิค direct ELISA ในการตรวจโพรเจสเทอโรนที่ปนเปื้อนในหางนม (Milk Whey) พบว่าเทคนิคนี้สามารถนำมาตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่ปนเปื้อนได้ระหว่าง 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่า sensitivity limit ที่ระดับ 1.5 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบความแม่นยำโดยทำ intra และ inter-assay พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 8% และ 12% ตามลำดับ ในปีต่อมา Anupam และคณะ (2006) ได้ทำการตรวจโพรเจสเทอโรนในซีรัม โดยอาศัยเทคนิค ELISA ในการตรวจวัด ซึ่งได้มีการทดสอบการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ และเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับโปรตีนชนิดต่างๆ เพื่อมาพัฒนาชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูง ผลการทดลองพบว่าโพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ เอนไซม์ alkalinephosphatase และ โพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA ดีที่สุด ซึ่งให้ค่า sensitivity limit ที่ระดับ 0.11 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบความแม่นยำโดยทำ intra-assay และ inter-assay พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเท่ากับ 5.1% และ 9.6% ตามลำดับ

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีการพัฒนาชุดตรวจโพรเจสเทอโรนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ จึงต้องทำการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาชุดตรวจโพรเจสเทอโรน โดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ ซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการพัฒนาของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (สุปรีชา, 2548) ที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง จากการกระตุ้นหนูด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมกับ BSA (Bovine serum albumin) โดยแอนติบอดีที่ได้สามารถวัดปริมาณโพรเจสเทอโรนได้ต่ำสุด (Lower limit of detection; LOD) เท่ากับ 0.13 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โมโนโคนอลแอนติบอดีที่ได้มีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a} จึงนำมาเตรียมชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนด้วยเทคนิค ELISA เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไฮบริโดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน พัฒนาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
1. เครื่องมือ	
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)	Nikon Corporation, Japan
- เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Ultrasonicator)	D.S.C. group Co.,Ltd, Taiwan
- เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)	Corning, USA
- เครื่องชั่ง (Electronic balance)	Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไตเตอร์เพลท (Multi-detection microplate reader)	BIO-TEK® Instruments, Inc, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter)	Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Top bench centrifuge)	M.S.E. Ltd, England
- เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan, Finland
- ตู้บ่มบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์	Yamato Scientific Co.,Ltd., Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Scientific Supply Co., Ltd., Thailand
- ปิเปตต์อัตโนมัติ	Gilson, France
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	Memmert, Germany

วัสดุอุปกรณ์	แหล่งที่มา
3. อุปกรณ์ต่างๆ	
- กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร	Nipro, Thailand
- ขวดแก้ว	Boro, Germany
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 250 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark Nipro, Thailand
- เข็มฉีดยาขนาด 18G และ 21G	Nunc, Denmark
- จานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม	Techne, USA
- ชุดเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมเครื่องกวน (Spinner culture vessel and biological stirrer) ขนาด 1 ลิตร	HBG, Germany
- ปิเปตต์แก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร	Axygen, USA
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Nunc, Denmark
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
1. Acetonitrile	เฟสเคลื่อนที่ใน HPLC	Sigma-Aldrich, USA
2. Aldosterone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
3. Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide	เชื่อมต่อกับแอนติบอดี	Zymed, USA
4. Ammoniumpersulfate (APS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS PAGE	Sigma-Aldrich, USA
5. BCA protein assay kit	วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	Sigma-Aldrich, USA
6. Bovine serum albumin	โปรตีนมาตรฐานและใช้เชื่อมกับโพรเจสเทอโรน	Sigma-Aldrich, USA
7. Bromophenol blue	เตรียมตัวอย่าง SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA
8. Cholesterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
9. Citric acid	เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
10. Clenbuterol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
11.Coomassie Brilliant blue R-250	ย้อมเจล SDS-PAGE	Pierce, USA
12. Corticosterone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
13. Diethyl ether	สกัดตัวอย่างจากซีรัม	Sigma-Aldrich, USA
14. Dimethyl sulfoxide	เตรียมอาหารเก็บเซลล์	Fluka, Switzerland
15. Disodium hydrogenphosphate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Carloerba, USA
16. Enrofloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
17. Estradiol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
18. 1-Ethy-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide (EDC)	สารเชื่อมต่อ	Sigma-Aldrich, USA
19. Ethanol	ตัวทำละลาย	BDH, England
20. Fetal calf serum (FCS)	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Invitromex, USA
21. Hydrogen peroxide	เตรียมสับสเตรต	Fluka, Switzerland
22. Hydrochloric acid	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA
23. L-Glutamine	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์	Sigma-Aldrich, USA

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
24. N-Hydroxysuccinimide (NHS)	สารเชื่อมต่อ	Fluka, china
25. Norfloxacin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
26. *O*-Phenylenediamine	สารตั้งต้นของปฏิกิริยา	Abkem Iberia S.L., Spain
27. Penicllin G	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
28. Peroxidase-Goat Anti-Mouse IgG (Gamma chain Specific)	ทดสอบ ELISA	Zymed, USA
29. Progesterone	เป็นแฮปเทนและ ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
30. Progesterone-3-(*O*-carboymethyl)oxime (P-3cmo)	เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA	Sigma-Aldrich, USA
31. Progesterone-17α hydroxy	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
32. RPMI 1640 medium	อาหารเลี้ยงเซลล์	Biochrom AG, Germany
33. Salbutamol	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
34. Sodium bicarbonate	ส่วนประกอบของ สารละลายบัฟเฟอร์	Sigma-Aldrich, USA
35. Sodium carbonate	เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	Merck, Germany

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	ลักษณะการใช้งาน	แหล่งที่มา
36. Sodium chloride	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany
37. Sodium dihydrogen phosphate	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Carlo erba, USA
38. Sodium dodecyl sulphate (SDS)	เตรียมเจลในเทคนิค SDS-PAGE	Sigma-Aldrich, USA
39. Streptomycin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
40. Sulfuric acid	หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์	Merck, Germany
41.Testosterone	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
42. Tetracyclin	ทดสอบปฏิกิริยาข้าม	Sigma-Aldrich, USA
43. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	สารทำให้เกิดสีของปฏิกิริยา	Sigma-Aldrich, USA
44. Tween 20	สารลดแรงตึงผิวสำหรับล้างจานหลุม	Sigma-Aldrich, USA
46. Tris (hydroxymethyl) aminomethane	ส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์	Merck, Germany

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา

3.4.1.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เก็บเป็นระยะเวลานานมาเลี้ยง

นำหลอดที่เก็บเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน รหัสโคลน 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/F7-F4, และ 5/G7-F4 (สุปรีชา, 2549) ออกมา จากการเก็บในไนโตรเจนเหลว หรือตู้แช่เยือกแข็ง -70 องศาเซลเซียส นำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ทันที เมื่อน้ำยาแช่แข็งในหลอดละลายหมด จึงถ่ายเซลล์ลงหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เพื่อล้างน้ำยาแช่แข็งออกจากเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงไว้ประมาณ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวด จึงทำการถ่ายเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี fetal calf serum (FCS) 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยแบ่งใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร 2 ขวด เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนแอนติบอดีต่อไป และอีกส่วนนำไปเก็บอย่างถาวรในไนโตรเจนเหลว

3.4.1.2 การเก็บเซลล์ไฮบริโดมาเป็นระยะเวลานาน

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากข้อ 3.4.1.1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี FCS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มาปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อยู่ด้านบนทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรผสมอยู่ ขณะเย็น ลงไป 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตเป่าขึ้นลงเบาๆ จนเซลล์เข้ากันดีกับน้ำยาแช่แข็งเซลล์ จากนั้นถ่ายเซลล์ลงในหลอดแช่แข็งขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้ายไปเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่ง DMSO จะทำหน้าที่ป้องกันการเกิดผลึกอันจะส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายระหว่างการแช่เย็น

3.4.1.3 การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความไวสูงต่อโพรเจสเทอโรน

นำอาหารจากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนจากข้อ 3.4.1.1 ที่มีรหัสโคลน 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/F7-F4, และ 5/G7-F4 มาทดสอบความจำเพาะและความไวต่อ โพรเจสเทอโรน โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการเคลือบหลุมของจาน 96 หลุมด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween (PBST) 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง นำอาหารจากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 4 โคลน มาเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:5 – 1:400 แล้วเติมลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (HPR-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:5,000 ลงไปในหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ H_2O_2 เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer (pH 6) ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} และ LOD ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 เพื่อเปรียบเทียบความไวของแอนติบอดีจากทั้ง 4 โคลนดังกล่าว แล้วคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่มีความไวสูงสุดโดยให้ค่า IC_{50} และ LOD ต่ำที่สุด มาเพิ่มจำนวนแอนติบอดีต่อไป

3.4.1.4 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความไวสูงสุดที่ได้จากข้อ 3.4.1.3 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 แล้วทำการย้ายเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวนขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปั่นกวนด้วยความเร็ว 20 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7-10 วัน จนกระทั่งได้ปริมาณแอนติบอดีมากพอ จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอน ที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.4.2 การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ BSA

3.4.2.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับ BSA (Hong และ Myung, 2002)

เนื่องจากโพรเจสเทอโรนเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมีคุณสมบัติเป็นแฮปเทน (hapten) ไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและใช้ในการเคลือบจาน 96 หลุมที่ผลิตจากพลาสติกได้ ต้องมีการเชื่อมแฮปเทนกับสารโมเลกุลใหญ่เช่น โปรตีน จึงทำการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับ BSA โดยใช้ NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ (coupling agent) โดยเริ่มจากการนำโพรเจสเทอโรน คาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ (P3cmo) 8 มิลลิกรัม NHS 6 มิลลิกรัม และ EDC 6 มิลลิกรัม ละลายใน DMF 1 มิลลิลิตร เขย่าช้า ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย BSA 8 มิลลิกรัม ใน 0.5 M carbonate buffer pH 9.6 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปทีละหยด กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำไป ไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง

3.4.2.2 การวัดปริมาณโปรตีนของโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA

ทำการหาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ BSA ที่เชื่อมต่อกับโพรเจสเทอโรนคาร์บอกซีเมทิลออกไซม์ (Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay) โดยใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) เริ่มจากเตรียม Working reagent ด้วยการผสมรีเอเจนต์ A กับ รีเอเจนต์ B ในอัตราส่วน 50:1 จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน BSA เจือจางที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารตัวอย่าง (โพรเจสเทอโรนเชื่อมต่อกับ BSA) โดยทำการเจือจางด้วย PBS ซึ่งสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างเจือจางที่ความเจือจาง 2, 4, และ 8 เท่า แล้วเติมสารมาตรฐานและสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 25 ไมโครลิตร เติม Working reagent ลงไปในหลุมที่มีสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าจานชนิด 96 หลุมเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ก่อนนำไปเข้าตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

นาที จากนั้นนำ จานชนิด 96 หลุมออกมาวางไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.2.3 การหาเปอร์เซนต์การจับของโพรเจสเทอโรนต่อ BSA

เนื่องจากในการเชื่อมต่อกันระหว่าง BSA กับโพรเจสเทอโรน เป็นการจับกันระหว่างหมู่คาร์บอกซี (carboxylic group) ของโพรเจสเทอโรนและ หมู่เอมีน (amino group) ของ BSA ดังนั้นจึงสามารถวัดปริมาณหมู่เอมีนของ BSA ที่ไม่จับกับโพรเจสเทอโรนได้โดยใช้วิธี 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid (TNBS) โดยมีวิธีการดังนี้ ละลาย BSA และ สารโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ให้มีความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน sodium bicarbonate buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 8.5 เติมสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในจานชนิด 96 หลุม แล้วเติมสารละลาย TNBS ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10% (w/v) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง microtiterplate reader ที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับกันระหว่างโพรเจสเทอโรนต่อ BSA จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของ BSA ที่มีโพรเจสเทอโรนจับ จากค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ในรูปอิสระ

3.4.3 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

3.4.3.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A affinity chromatography

เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากรหัสโคลน 5/G7-F4 มีไอโซไทป์ IgG2a ซึ่งมีสัมพรรคภาพสูงกับโปรตีน เอ (โปรตีน เอ 1 โมเลกุล สามารถจับกับแอนติบอดีได้ 2 โมเลกุล) จึงเลือกใช้คอลัมน์โปรตีน เอ เซฟาโรส (protein A sepharose) ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีน เอ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* สามารถเกิดอันตรกิริยากับแอนติบอดีได้โดยมีสัมพรรคภาพสูงที่ค่า pH 8.0 เมื่อค่า pH ต่ำลง อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน เอ กับแอนติบอดีจะมีสัมพรรคภาพต่ำลง จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกได้โดยมีวิธีการทำดังนี้

โดยนำโปรตีน เอ เซฟาโรส 0.5 กรัม มาทำให้พองตัว โดยแช่ใน PBS 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่คอลัมน์ ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม

0.1 M phosphate buffer, pH 8 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ ลงในคอลัมน์โปรตีน เอ เซฟาโรส ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.4.1.4 ให้เท่ากับ 8.1 โดยใช้ 1 M Tris buffer, pH 9.0 แล้วเติมลงในคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะแอนติบอดีออกโดยใช้ 0.1 M citrate buffer, pH 3.0 ปริมาตร 3 เท่าของคอลัมน์ ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที พร้อมกับเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร และปรับ pH สารละลายในหลอดทดลองให้เป็น 7.4 โดยใช้ 1 M Tris buffer, pH 9.0 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลโดยเติม 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0 ปริมาตร 5 เท่าของคอลัมน์ หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง (Hudson และ Hay, 1980)

3.4.3.2 การหาปริมาณแอนติบอดีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

หาปริมาณแอนติบอดีตามวิธีของ Johnstone และ Thrope (1987) โดยนำสารละลายที่ไดแอไลซ์แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแอนติบอดีจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของแอนติบอดี (IgG)(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร}}{\text{extinction coefficient ของ IgG}}$$

<u>หมายเหตุ</u> ค่า extinction coefficient ของสารละลาย IgG 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่า 1.35 (Johnstone และ Thrope, 1987)

3.4.3.3 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

ทำการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีด้วยการใช้ชุดทดสอบ BCA™ Protein Assay Kit เช่นเดียวกันกับในการทดลองที่ 3.4.2.1 โดยเจือจางแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วที่อัตราการเจือจาง 2, 4 และ 8 เท่า แล้ววิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเทียบกับสารมาตรฐาน BSA

3.4.3.4 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA

นำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเจือจางให้มีปริมาณ IgG เข้มข้น 0-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (จาก 3.4.3.2) ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนโดยวิธี Indirect ELISA สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ได้กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร จากนั้นหาปริมาณแอนติบอดีในอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้

3.4.3.5 การหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

การหามวลโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วนิยมใช้เทคนิค SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ซึ่งมีหลักการคือ ใช้สนามไฟฟ้าแยกโปรตีนผ่าน polyacrylamide ซึ่งมีรูพรุนขนาดต่างๆ กัน เป็นผลให้เกิด sieving properties โดยโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับ 2-Mecaptoethanol (2-ME) ทำให้พันธะไดซัลไฟด์แตกออก และโปรตีนถูกทำให้มีประจุเป็นลบโดย SDS ทำให้โปรตีนที่มีขนาดต่างกัน จะมีการเคลื่อนตัวที่ไม่เท่ากัน ตัวเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลกว่า เมื่อทำ electrophoresis เสร็จแล้วจะนำเจลมาย้อมสีหาแถบโปรตีน เมื่อทำเทียบกับโปรตีนที่รู้ขนาดแน่นอน ทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างได้ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลจะทำให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของสายพอลิเปปไทด์ของแอนติบอดีที่ได้ (คู่มือปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา 322 หน้า 49-53)

ในการเตรียมเจลเพื่อใช้แยกแอนติบอดี จะเตรียม 10% separating gel (แสดงในภาคผนวก ข) ด้วย Miniprotean II Dual Slab Cell (Bio-Rad) โดยมีความกว้าง 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และหนา 1.5 มิลลิเมตร เติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ข้างละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ separating gel เกิด polymerization อย่างสมบูรณ์ เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว เท 5% stacking gel ที่ด้านบนของ separating gel ตั้งทิ้งไว้ให้ stacking gel เกิด polymerization อย่างน้อย 30 นาที

ทำการแยกแอนติบอดีโดย นำชุดของเจลที่เตรียมได้ไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งส่วนบนและล่างของ chamber นำตัวอย่างแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์และหลังทำให้บริสุทธิ์ มีปริมาณโปรตีนรวมหลุมละ 5 ไมโครกรัม มาเติม loading dye ที่มี 10% beta-mercaptoethanal ในอัตราส่วน ตัวอย่าง ต่อ loading dye (1:1 (โดยปริมาตร))

นำไปต้มที่ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง thermo mixer compact ส่วนหลุมของ marker มีปริมาณ 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำชุดของเจลไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี electrode buffer ทั้งส่วนบนและล่างของ chamber เริ่มการแยกโปรตีนโดยให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จนแถบสีของ 1x loading dye เคลื่อนไปจนเกือบถึงปลายเจลจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า นำเจลที่ได้ไปย้อมสีด้วย Coomassie blue เป็นเวลา 15 นาที และล้างสีออกจนหมดด้วยสารละลาย destain

3.4.3.6 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้ทำการทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความสามารถในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี indirect ELISA ซึ่งในการทำ indirect ELISA ไม่สามารถเคลือบโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระบนจานชนิด 96 หลุมได้โดยตรงจะต้องใช้โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้นั้นสามารถจับแบบจำเพาะกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ จึงต้องใช้หลักการแย่งจับโดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เตรียมสาร โพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับแอนติบอดีโดยผสมในอัตราส่วน 1:1 (โดยปริมาตร) แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.1.3 โดยทำการเติมแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แทนอาหารเลี้ยงเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบ

ทำการออกแบบชุดตรวจสอบทั้งหมด 4 แบบ คือ

- Direct competitive ELISA (Ag captured)
- Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์
- Indirect competitive ELISA (Ab captured)
- Direct competitive ELISA (Ab captured)

โดยชุดตรวจสอบแต่ละแบบมีขั้นตอนการเตรียมที่แตกต่างกัน และมีการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อให้ได้ชุดชุดตรวจสอบต้นแบบที่มีความไวต่อโพรเจสเทอโรนสูงสุด จึงออกแบบชุดตรวจสอบทั้ง 4 แบบตามขั้นตอนดังนี้

3.4.4.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) เตรียมโดยเริ่มจากการเคลือบแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนบนจานชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween จำนวน 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรน ในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่าง ๆใน PBS ลงไปพร้อมกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS ที่มี 0.05% Tween จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader

ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) นี้ต้องทำการเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ hoseradish peroxidase (HRP) เพื่อใช้เป็นตัวแข่งขันกับ โพรเจสเทอโรนในรูปอิสระซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.4.4.1.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (Progesterone-HRP)

การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนเข้ากับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส ทำได้โดยอาศัยเทคนิคคาร์โบไดไมด์ (Cabodiimide) นำสาร NHS (N-hydroxysuccinamide) 6 มิลลิกรัม และ EDC (1-ethyl-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide 6 มิลลิกรัม มาเติมลงในโพรเจสเทอโรน 8 มิลลิกรัมที่ละลายใน Dimethylformamide (DMF) 1 มิลลิลิตร เขย่าช้า ๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นเติมสารละลาย HRP 11.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไป กวนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยวิธี Direct ELISA ในข้อ 3.4.4.1

3.4.4.1.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP

หลังจากทำการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดสแล้ว ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP สำหรับการวิเคราะห์ ด้วยวิธี Direct ELISA ก่อนที่จะนำมาทดสอบกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ เริ่มจากการเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมของจานชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร และทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:1,000–1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.4.1.3 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ โดยทำการแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระตั้งแต่ 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับแอนติบอดีและโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เลือกมาทั้ง 3 ค่า จาก 3.4.4.1.2 ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรนที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วนที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบแบบอื่นต่อไป

3.4.4.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เตรียมโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวในแต่ละหลุมบนจานชนิด 96 หลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู หลุมละ 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 50 ไมโครลิตร กับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP หลุมละ 25 ไมโครลิตร และแอนติบอดีหลุมละ 25 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBSTจำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.4.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดี และโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP

ทำการหาอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ

HRP ที่เหมาะสมสำหรับการการวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct ELISA โดยเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่เจือจาง 1:500 และทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เจือจาง 1:4,000 ถึง 1:64,000 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกันกับขั้นตอน ในข้อ 3.4.4.2

3.4.4.2.2 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

ทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ โดยศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ เริ่มจากการแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระตั้งแต่ 0-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปทดสอบกับแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP ที่เลือกมาทั้ง 3 ค่า จากข้อ 3.4.4.2.1 ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรนที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปหาความไวของแต่ละอัตราส่วน เพื่อนำไปเลือกเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.4.4.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

ชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) เตรียมโดยเริ่มจากเคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม ด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4.2.1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำแต่ละหลุมมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป 50 ไมโครลิตร และแอนติบอดี หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู เชื่อมอยู่กับ HRP (HPR-labelled goat anti-mouse IgG) ที่เจือจาง 1:5,000 ใน PBS หลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1

ชั่วโมง ล้างหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรต ของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.4.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA และแอนติบอดี

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA โดยการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดี 10, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร กับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.25, 0.5, 0.75, 1 และ 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.4.3

3.4.4.3.2 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (Ab captured)

ทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) โดยศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.4.3.1 มาทดสอบกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรนที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วน เพื่อนำไปเลือกเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.4.4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

ทำการเคลือบโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA บนพื้นผิวในของจานชนิด 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเจือ

จางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน จากข้อ 3.4.4.4.1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1:4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน sodium acetate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.4.4.1 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน (คู่มือการใช้งานสาร Aminohexanoyl-Biotin-*N*-Hydroxysuccinimide (Zymed))

การเชื่อมต่อแอนติบอดี กับไบโอติน เริ่มจากนำแอนติบอดี 1.5 มิลลิกรัม ไปไดแอไลซิสใน 0.1 M carbonate buffer pH 8.4 ข้ามคืน แล้วทำการเติมไบโอติน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO กวนเบาเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปไดแอไลซิสใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยน PBS 3 ครั้งทุกๆ 6 ชั่วโมง

3.4.4.4.2 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมแก่การเตรียมเป็นชุดตรวจสอบ ทำโดยการแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000 และ 1:64,000 แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี Direct ELISA โดยเริ่มจากการเคลือบพื้นผิวด้านในหลุมของจาน 96 หลุมด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับ ไบโอติน ที่ได้จากข้อ 3.4.4.4.1 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ลงไปที่ความเข้มข้น 1:4000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มนาน 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส

แล้วล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน sodium acetate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.4.4.3 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured)

ทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ นำอัตราส่วนระหว่างโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ได้จากข้อ 3.4.4.4.2 มาทดสอบกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 0-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรนที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หาความไวของแต่ละอัตราส่วน เพื่อนำไปเลือกเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบต่อไป

3.4.4.5 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ (ธารารัชต์, 2545)

ทำการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบต่างๆทั้ง 4 แบบข้างต้น ดังนี้

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาคำนวณหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism 4.03 โดยสมการที่ใช้ในการคำนวณคือ

$$IC_{50} = 50\%\ B/B_0$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่มีแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงจาก ELISA ที่ไม่มีแอนติเจน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.5 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured)

จากการเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบทั้ง 4 แบบข้างต้น กับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ พบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่มีความเหมาะสมมากที่สุด คือ ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) จึงนำมาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยทำการศึกษาในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.4.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเคลือบโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนพื้นผิวในของจานชนิด 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายนมพร่องมันเนย 5% หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม โพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้น 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ความเข้มข้น 1:8,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP ซึ่งจำเพาะต่อไบโอตินที่ความเข้มข้น 1:4,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างแต่ละหลุมด้วย PBST 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน sodium acetate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ แล้วทำการวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader

3.4.5.2 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไบโอติน และโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

ในการเตรียมชุดตรวจสอบ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไบโอติน และโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ คือ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งในการปฏิบัติงานจริงจะต้องเตรียมชุดตรวจสอบให้สะดวกต่อการใช้งานมากที่สุด จึงทำการแปร อุณภูมิและเวลาดังในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เวลาและอุณหภูมิที่ทำการทดสอบในการทำ ELISA

	เวลาที่ใช้ในการบ่ม (ชั่วโมง)	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (องศาเซลเซียส)
1	2	37
2	2	อุณหภูมิห้อง
3	1:30	37
4	1:30	อุณหภูมิห้อง
5	1	37
6	1	อุณหภูมิห้อง

3.4.5.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรน (ธารารัชต์, 2545)

ทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์และนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ตามวิธีในข้อ 3.4.5.1 สารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ โพรเจสเทอโรน-17 แอลฟาไฮดรอกซี (Progesterone-17α hydroxyl) เทสโทสเทอโรน (Testosterone) คอร์ทิโคสเทอโรน (Corticosterone) เอสทราไดออล (Estrdiol) คอเลสเทอรอล (Cholesterol) และแอลโดสเทอโรน (Aldosterone) ส่วนสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่ทดสอบมีดังนี้ เพนิซิลลินจี (Penicillin G) เททราไซคลิน (Tetracycline) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) นอร์ฟลอกซาซิน (Norfloxacin) เอนโรฟลอกซาซิน (Enrofloxacin) เคลนบูเทรอล (Clenbuterol) และซัลบูทามอล (Salbutamol) โดยใช้ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากผล ELISA มาหาค่า IC_{50} ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยคิดเป็น 50% B/B_0

$$IC_{50} = 50\%\ B/B_0$$

เมื่อ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้ามที่ความเข้มข้นต่างๆ

B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผล ELISA ที่ไม่มีแอนติเจนที่ต้องการวัดปฏิกิริยาข้าม

เมื่อทดสอบความจำเพาะของชุดตรวจสอบต่อสารโพรเจสเทอโรนและทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารต่างๆ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม (%Cross-reactivity) โดยสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม} = \frac{IC_{50} \text{ ของโพรเจสเทอโรน} \times 100}{IC_{50} \text{ ของสารที่ทดสอบ}}$$

3.4.5.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยพิจารณาความไว (Sensitivity) ความแม่นยำ (Precision) และความถูกต้อง (Accuracy) ของชุดตรวจสอบ ดังนี้

3.4.5.4.1 หาค่าความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ (ธารารัชต์, 2545)

ทำการหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยรายงานเป็นค่า LOD (Limit of detection; LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ และค่า LOQ (Limit of quantitation; LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้อย่างถูกต้อง ซึ่งค่า LOD และ LOQ หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n = 9) โดยวิธี direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน(B_0) มาลบออกจาก 3 และ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรนเพื่อแปลงเป็นความเข้มข้นของ โพรเจสเทอโรนซึ่งค่าความเข้มข้นที่ได้นี้คือ ค่าความไวของชุดตรวจสอบ จากข้อมูลในการทดลองที่ 3.4.5.1 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนและแกน Y เป็นค่า $\%B/B_0$

$$LOD = B_0 - 3SD$$

$$LOQ = B_0 - 10SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

3.4.5.4.2 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจสอบ

การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจสอบ จะได้จากการศึกษาความแปรปรวนของการทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (Intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (Inter-variation assay) ดังนี้

3.4.5.4.2.1 Intra-variation assay (ธารารัชต์, 2545)

จากการทดลองในขั้นตอน 3.4.5.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่า Intra-variation assay ของชุดตรวจสอบโดยทำการหาค่า Mean SD และ %CV ของการวิเคราะห์ 12 ซ้ำ โดย %CV คือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\%CV = \frac{SD \times 100}{mean}$$

โดยที่ mean คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) เมื่อมีโพรเจสเทอโรนและไม่มีโพรเจสเทอโรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

3.4.5.4.2.2 Inter-variation assay หรือ Between-assay (ธารารัชต์, 2545)

ทำการทดลองเหมือนในขั้นตอน 3.4.5.1 แต่ทำการทดสอบตัวอย่างเดียวกัน 4 ครั้งที่เวลาต่างกันโดยที่แต่ละครั้งทำ 12 ซ้ำ เมื่อทำทุกครั้งรวมกันแล้วได้ 48 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า Mean, SD และ %CV ของทั้ง 48 ซ้ำนั้น

3.4.5.4.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า %Recovery โดยนำตัวอย่างชนิดต่างๆ ที่มีการเติมโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากการสกัดตามขั้นตอน 3.4.5.5 มาทำการหาค่า %Recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำ

ผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % Recovery จากสูตรดังนี้

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป}} \times 100$$

3.4.5.5 การสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.4.5.5.1 วิธีการสกัดที่เหมาะสมจากตัวอย่างน้ำนมโค

ทำการทดลองโดยนำน้ำนมโคปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด แล้วเติมโพรเจสเทอโรนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นชั้นไขมัน (วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนของ EURO-DIAGNOSTICA) และนำส่วนที่เหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยเอทธานอล 2 เปอร์เซนต์ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้กับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน

3.4.5.5.2 การสกัดที่เหมาะสมจากตัวอย่างซีรัมโค

ทำการทดลองโดยนำซีรัมโคปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด แล้วเติมโพรเจสเทอโรนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาสกัดด้วยไดเอททิลอีเทอร์ 2 มิลลิลิตร และ PBS 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนบนของไดเอททิลอีเทอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาทำการระเหยภายใต้แก๊สไนโตรเจน (วิธีการตามคู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนของ EURO-DIAGNOSTICA) แล้วนำมาละลายด้วยเอทธานอล 2 เปอร์เซนต์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้กับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน

3.4.6 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง

3.4.6.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการเตรียมสารละลายโพรเจสเทอโรนใน 2 เปอร์เซนต์เอทธานอลที่ความเข้มข้น 0, 100, 250, 500, 1000, 2500 และ 5000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายโพรเจสเทอโรนแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในน้ำนมโคปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังนั้นตัวอย่างน้ำนมโค 1 มิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนบนที่เป็นชั้นไขมันทิ้งไป และนำส่วนที่เหลือปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาเจือจางด้วยเอทธานอล 2 เปอร์เซนต์ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.4.6.3 การเตรียมตัวอย่างซีรัมโคเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการเตรียมสารละลายโพรเจสเทอโรนใน 2 เปอร์เซนต์เอทธานอลที่ความเข้มข้น 0, 100, 250, 500, 1000, 2500 และ 5000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายโพรเจสเทอโรนแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในซีรัมโคปริมาตร 1 มิลลิลิตร โพรเจสเทอโรนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาสกัดด้วยไดเอททิลอีเทอร์ 2 มิลลิลิตร และ PBS 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนบนของไดเอททิลอีเทอร์มาทำการระเหยภายใต้แก๊สไนโตรเจน แล้วนำมาละลายด้วยเอทธานอล 2 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้กับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.7 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ที่เตรียมได้ ชุดตรวจสอบทางการค้า และเทคนิค HPLC

3.4.7.1 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบทางการค้า

นำตัวอย่างน้ำนมและซีรัมที่เติมโพรเจสเทอโรนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันทั้งหมด แล้วแบ่งวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนของชุดตรวจสอบทั้งสอง ซึ่งขั้นตอนและการเตรียมตัวอย่างของชุดตรวจสอบต้นแบบทำตามขั้นตอนในข้อ 3.4.5.1 และ 3.4.6 ตามลำดับ ส่วนชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ขั้นตอนในการวิเคราะห์และเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของคู่มือการใช้งานดังต่อไปนี้

3.4.7.1.1 ขั้นตอนการวิเคราะห์ของชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

เริ่มจากเติมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมของจาน 96 หลุม ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของกระต่ายที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนู จากนั้นเติมแอนติบอดี ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแต่ละหลุมด้วย ringing buffer 3 ครั้ง เติมสับสเตรต ของเอนไซม์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย stop solution นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.4.7.2 การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบและโดยใช้เทคนิค HPLC

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคและซีรัมโค ที่มีความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนเท่ากับ 0, 100, 250, 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาแบ่งวิเคราะห์ในชุดตรวจสอบต้นแบบและเทคนิค HPLC ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด C18-reverse phrase มีสารละลายน้ำ acetronitrile และ น้ำในอัตราส่วน 50:50 ถึง 70:30 โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา โดยกำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลด้วย UV ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตร ทำการกรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์กรอง ฉีด

ตัวอย่างเข้าสู่ระบบ ครั้งละ 50 ไมโครลิตร ซึ่งโพรเจสเทอโรนมี retention time ประมาณ 9 นาที นำผลวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ได้เทียบพื้นที่ใต้กราฟกับกราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรน ที่ความเข้มข้น 0, 100, 250, 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความไวสูงต่อโพรเจสเทอโรน

ทำการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมารหัสโคลน 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/F7-F4, และ 5/G7-F4 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FCS 10 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนด้วยวิธี Indirect ELISA ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานหลุมที่เคลือบด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับโปรตีน BSA (Pr-BSA) มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับจานหลุมที่เคลือบด้วยโปรตีน BSA และมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังไม่ได้ผ่านการเลี้ยงเป็นตัวควบคุมลบ และใช้ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรนเป็นตัวควบคุมบวก แสดงว่าเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 4 โคลนยังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาทั้ง 4 โคลน มาทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากตาราง 4.1 เพื่อคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ไวต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระสูงสุด ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.1 ซึ่งพบว่าไฮบริโดมารหัสโคลน 5/G7-F4 มีความไวต่อโพรเจสเทอโรนสูงที่สุด โดยให้ค่า IC_{50} และLOD เท่ากับ 56.36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 19.95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับไฮบริโดมารหัสโคลนอื่นๆ พบว่ามีค่า IC_{50} และLOD ต่ำที่สุด แสดงว่ามีความไวต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระสูงสุด จึงนำไฮบริโดมารหัสโคลน 5/G7-F4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อนำไปใช้เตรียมชุดตรวจสอบต่อไป

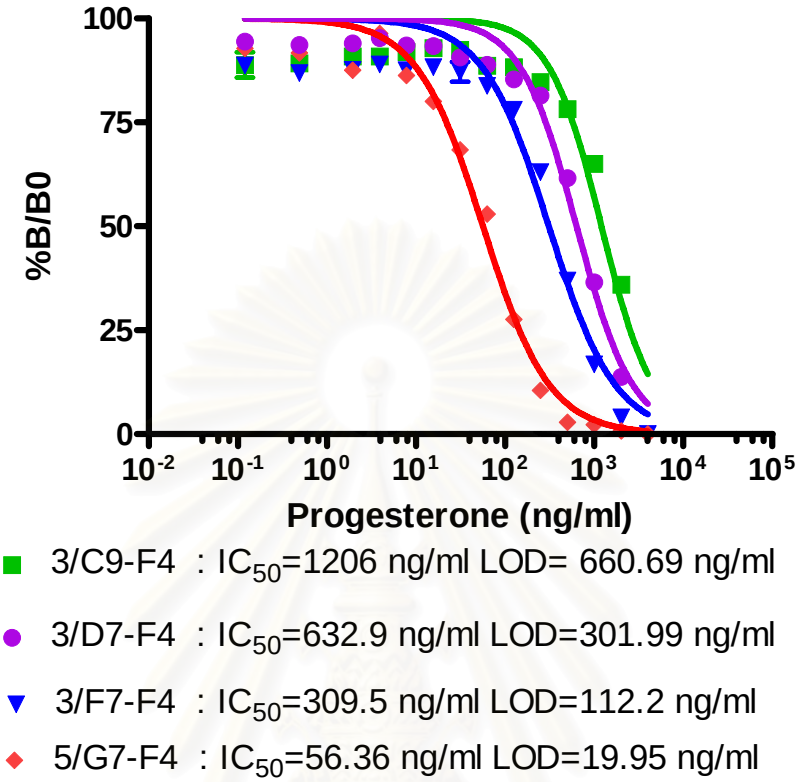
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ผลิตโดยเซลล์ไฮบริโดรมาด้วยวิธี Indirect ELISA

อัตราส่วนการเจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร							
	โคลน 3/C9-F4		โคลน 3/D7-F4		โคลน 3/F7-F4		โคลน 5/G7-F4	
	เคลือบจานหลุมด้วย P-BSA	เคลือบจานหลุมด้วย BSA	เคลือบจานหลุมด้วย P-BSA	เคลือบจานหลุมด้วย BSA	เคลือบจานหลุมด้วย P-BSA	เคลือบจานหลุมด้วย BSA	เคลือบจานหลุมด้วย P-BSA	เคลือบจานหลุมด้วย BSA
1:400	0.863	0.064	0.911	0.069	0.525	0.076	**1.459***	0.077
1:200	1.230	0.064	**1.337***	0.074	0.744	0.074	1.675	0.073
1:100	**1.488***	0.062	1.591	0.080	1.31	0.063	1.833	0.065
1:50	1.709	0.074	1.602	0.091	**1.397***	0.059	1.913	0.062
1:25	1.826	0.075	1.812	0.112	1.622	0.059	1.927	0.061
1:5	1.858	0.068	1.943	0.175	1.766	0.063	1.950	0.068
ซีรัมหนูที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น			0.074	0.091				
อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640			0.069	0.067				
ซีรัมหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน			1.631	1.981				

<u>หมายเหตุ</u> *ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



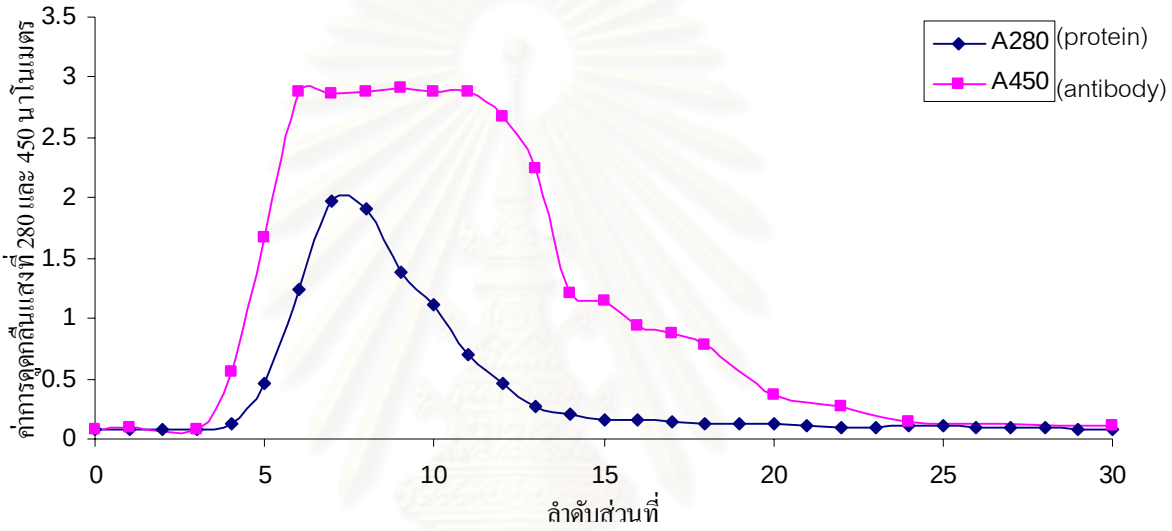
รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

4.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

4.2.1 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์สัมพรรคภาพของโปรตีน เอ เซฟาโรส

นำเซลล์ไฮบริโดมา 5/G7-F4 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่เติม FCS 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการปั่นกวน (Spinner flask) ขนาด 1 ลิตร จนได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีโปรตีน เอ เซฟาโรสบรรจุอยู่ เนื่องจากแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดรมามีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a} (สุปรีชา ,2548) จึงสามารถจับกับโปรตีน เอ เซฟาโรสได้ดีที่ pH 9 โดยที่โปรตีนและสารอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะไม่สามารถจับกับโปรตีน เอ เซฟาโรสได้ แต่ที่ค่า pH ต่ำลงการจับของแอนติบอดีต่อโปรตีน เอ เซฟาโรสจะลดลง แอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ดังกล่าวจะถูกชะออกจากคอลัมน์โปรตีน เอ ที่ค่า pH 3.5 จึงสามารถแยกแอนติบอดีออกจาก

โปรตีนชนิดอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ หลังจากนั้นจึงนำสารละลายบัฟเฟอร์และแอนติบอดีที่ถูกชะออกจากคอลัมน์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 4.2) จากการทดลองพบว่า มีโปรตีนถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 3 ถึง 12 และจากการทดสอบหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกัน แสดงว่ามีแอนติบอดีที่บริสุทธิ์อยู่ช่วงลำดับส่วนที่ 3 ถึง 12 จึงได้นำแอนติบอดีจากลำดับส่วนดังกล่าวมารวมกัน เพื่อหาปริมาณแอนติบอดีและโปรตีนต่อไป



รูปที่ 4.2 โครมาโตแกรมของการทำแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ให้บริสุทธิ์โดยการใช้โครมาโตกราฟฟีแบบคอลัมน์สัมพรรคภาพของโปรตีน เอ เซฟาโรส และการทำ ELISA ของลำดับส่วน ที่ได้

(—◆—) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

(—■—) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรจากการทดสอบแอนติบอดีด้วยเทคนิค Indirect ELISA

4.2.2 การวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA

จากการหาปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีด้วยวิธี BCA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA (รูปที่ ก.1 ในภาคผนวก ก) พบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์โคลน 3/G7-F4 ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีน 4.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณโปรตีน 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.2.3 การหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA

จากการหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.2 ในภาคผนวก ก) พบว่าปริมาณแอนติบอดีในอาหารเลี้ยงเซลล์โคลน 3/G7-F4 หลังการทำให้บริสุทธิ์คือ 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ (% Purity) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน คิดเป็นความบริสุทธิ์ 93.8 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 4.2

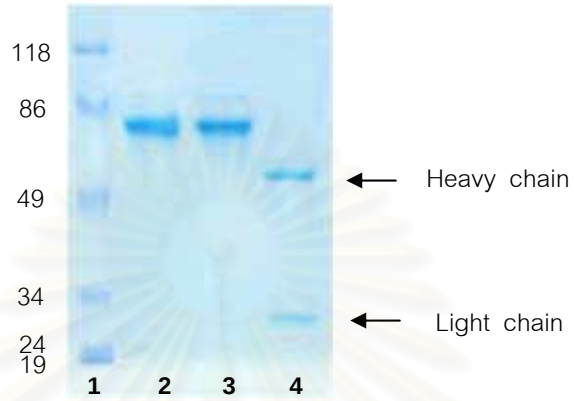
ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและแอนติบอดีของอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

	ปริมาณโปรตีน		ปริมาณแอนติบอดี		ปริมาตร	% recovery	% purity
	mg/ml	Total (mg)	mg/ml	Total (mg)	(ml)		
ก่อนทำให้บริสุทธิ์	4.27	2990	0.08	56.0	700	-	1.9%
หลังทำให้บริสุทธิ์	0.64	10.24	0.6	9.6	16	17.1%	93.8%

4.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์

ทำการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เมื่อนำแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE หลังจากย้อมด้วยสี coomassie blue เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน โดยแสดงผลในรูปที่ 4.3 ซึ่งคำนวณจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า relative mobility (R_f) กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ก.3 ในภาคผนวก ก) ทำให้ทราบถึงขนาดของหน่วยย่อยของสายพอลิเพปไทด์ของแอนติบอดีดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าในตัวอย่างแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์จะปรากฏแถบของโปรตีนอย่างชัดเจนที่บริเวณ 80 กิโลดาลตัน (lane 2) ในตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนของซีรัมที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเซลล์ (lane 3) ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่มาจากซีรัม แต่หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปรากฏว่ามีแถบของโปรตีนสาย Heavy chain และ Light chain ขนาด 60.72 และ 25.86 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (lane 4) (Harlow และ Lane, 1988) ทั้งนี้เนื่องจาก วิธี SDS-PAGE นี้จะมีการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ระหว่างโมเลกุลของแอนติบอดี ทำให้ส่วนของ heavy

chain และ light chain แยกออกจากกัน และไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่บริเวณอื่น แสดงว่าแอนติบอดีที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง



รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์แอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วด้วยวิธี SDS-PAGE ช่องหมายเลข 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน (Standard protein marker ปริมาณ 2.5 ไมโครกรัม) ช่องหมายเลข 2 คือ ซีรัมที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา (FCS ; 5 ไมโครกรัม) ช่องหมายเลข 3 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ก่อนทำให้บริสุทธิ์มี 10 % FCS (5 ไมโครกรัม) ช่องหมายเลข 4 คือ อาหารเลี้ยงเซลล์โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์แล้ว (5 ไมโครกรัม) ซึ่งมีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a} พบแถบของสาย Heavy chain และ Light chain ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ผลการหามวลโมเลกุลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

โปรตีน	มวลโมเลกุล (kda)	Relative mobility
β-galactosidase	118	0.24
BSA	86	0.36
Ovalbumin	49	0.60
Carbonic Anhydrase	34	0.84
β-lactoglobulin	24	0.96
Lysozyme	19	1.00
Heavy chain	60.72	0.52
Light chain	25.86	0.90

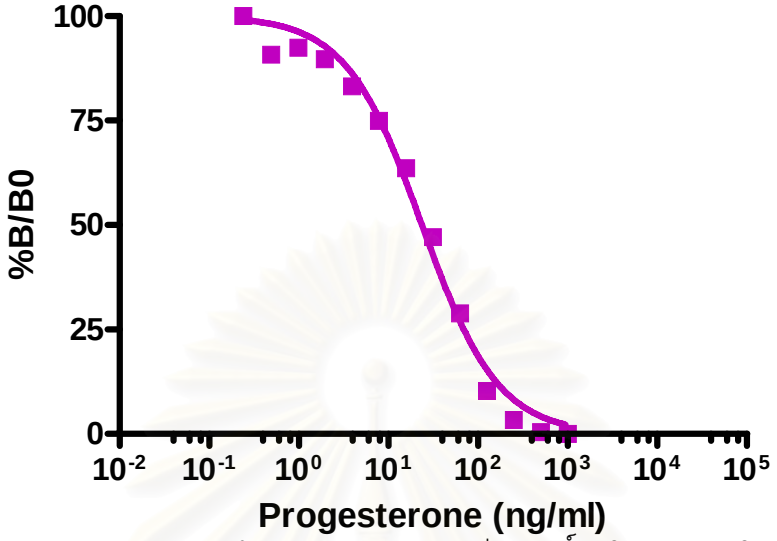
4.2.5 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

ทำการตรวจสอบความสามารถในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระของโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA โดยทดสอบกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีตัวควบคุมลบ คือ ซีรัมของหนูไมซ์ที่ไม่ได้มีการฉีดกระตุ้น และตัวควบคุมบวก คือ ซีรัมของหนูไมซ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะลดต่ำลงโดยแปรผกผันกับปริมาณของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระซึ่งใช้ในการแข่งขันที่เพิ่มสูงขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และกราฟรูปที่ 4.4 แสดงว่าแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ยังสามารถจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ใช้แข่งขัน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
แอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์	0	1.392
	0.24	1.386
	0.49	1.284
	0.98	1.269
	1.95	1.254
	3.9	1.170
	7.8	1.064
	15.6	0.919
	31.2	0.707
	62.5	0.473
	125	0.234
	250	0.145
	500	0.108
	1000	0.102
ซีรัมหนูไมซ์ที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้น		0.052
อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640		0.046
ซีรัมหนูไมซ์ที่ฉีดกระตุ้นด้วยโพรเจสเทอโรน		1.089



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีบริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระด้วยวิธี Indirect competitive ELISA

4.3 การเตรียมชุดตรวจสอบ

4.3.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

4.3.1.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP (Pr-HRP)

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับระหว่างแอนติบอดีที่เคลือบหลุมกับ Pr-HRP สำหรับการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีในช่วง 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจาง Pr-HRP อยู่ในช่วง 1:1,000-10,000 เท่า โดยมีเกณฑ์ในการกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ อัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงในการทำ Direct ELISA ประมาณ 1 หรือใกล้เคียง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน คือ แอนติบอดี 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Pr-HRP เจือจาง 1:4,000 และ 1:5,000 แอนติบอดี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Pr-HRP 1:10,000 ตามลำดับ จึงนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระต่อไป

ตารางที่ 4.5 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ Pr-HRP ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)

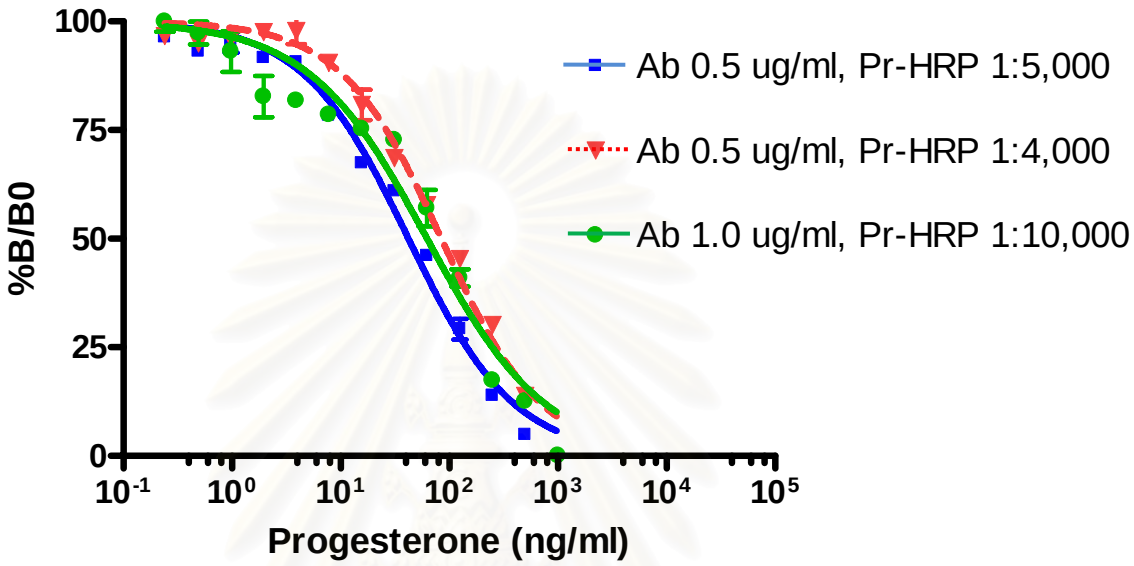
Pr-HRP (อัตราการเจือจาง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร					
	ความเข้มเข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	0	0.125	0.25	0.5	1	2
1:1,000	0.211	0.474	0.987	2.186	2.635	2.687
1:2,000	0.193	0.366	0.829	1.899	2.542	2.364
1:3,000	0.183	0.387	0.760	1.741	2.505	2.493
1:4,000	0.137	0.251	0.517	**1.407***	2.058	2.014
1:5,000	0.106	0.268	0.537	**1.347***	1.808	1.840
1:10,000	0.098	0.149	0.260	0.713	**1.230***	1.281

หมายเหตุ *ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

4.3.1.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่เคลือบหลุม และ Pr-HRP ที่หาได้ จากข้อ 4.3.1.1 และแปรปริมาณโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่มาแข่งขันการจับในช่วง 0-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อนำมาสร้างกราฟ $\%B/B_0$ โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่มีโพรเจสเทอโรนอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงในภาวะที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน จากนั้นทำการหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนอิสระที่ให้ค่า $\%B/B_0$ เท่ากับ 50% จากการทดลองพบว่าลักษณะและความชันของกราฟที่ภาวะต่างๆจะใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:4,000 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 84.62 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:5,000 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 42.12 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:10,000 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 62.45 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้จากทั้ง 3 ภาวะ พบว่าเมื่อ

ใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:5,000 จะให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้การตรวจมีความไวสูงสุด



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)

4.3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

4.3.2.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP

หาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP โดยวิธี direct ELISA โดยเคลือบหลุมของจานชนิด 96 หลุม ด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ที่เจือจาง 1:500 ก่อน แล้วจึงทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Pr- HRP ที่เจือจาง 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000 และ 1:64,000 พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 คือ แอนติบอดี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ Pr- HRP เจือจาง 1:4,000 แอนติบอดี 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับ

Pr- HRP เจือจาง 1:4,000 และ 1:8,000 ตามลำดับ แล้วนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระต่อไป

ตารางที่ 4.6 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ Pr-HRP ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

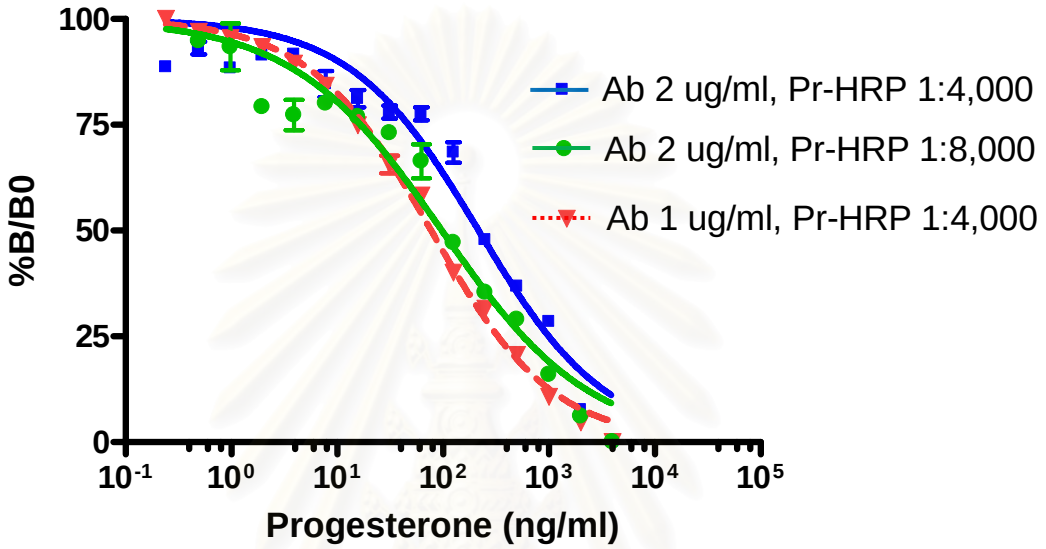
Pr-HRP (อัตราการเจือจาง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ความเข้มเข้นของแอนติบอดี (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)							
	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
1:4,000	0.223	0.974	1.097	1.036	**1.325***	**1.321***	1.108	0.880
1:8,000	0.090	0.682	0.890	0.995	0.963	**1.173***	0.792	0.612
1:16,000	0.068	0.694	0.847	0.906	0.836	0.716	0.525	0.359
1:32,000	0.057	0.552	0.650	0.724	0.639	0.488	0.343	0.279
1:64,000	0.048	0.331	0.408	0.426	0.374	0.285	0.198	0.146

หมายเหตุ *ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

4.3.2.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Direct competitive ELISA โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP 3 อัตราส่วนจาก 4.3.2.1 แล้วแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วง 0-4,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลในรูปของ $\%B/B_0$ ได้ผลดังแสดงในรูป 4.6 จากการคำนวณหาค่า IC_{50} ของแต่ละอัตราส่วน พบว่าในภาวะที่ใช้แอนติบอดี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:4,000 เท่า ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 77.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในภาวะที่ใช้แอนติบอดี 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:4,000 และ 1:8,000 เท่า จะให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 216.4 และ 97.34 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าอัตราส่วนที่ให้ความไวสูงสุด คือ แอนติบอดี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Pr-HRP ที่เจือจาง 1:4,000 เท่า นอกจากนี้ ยังพบว่าในภาวะที่ใช้แอนติบอดีและ Pr-HRP ที่มีความเข้มข้นต่ำจะให้ความไวที่สูงกว่าภาวะที่ใช้

แอนติบอดีและ Pr-HRP ที่มีความเข้มข้นสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก มีปริมาณของแอนติบอดีที่เหลืออยู่จะจับกับ Pr-HRP ที่เหลือจากการจับอยู่มากเกินไป ทำให้ส่วนที่เหลือนี้ไปจับกับแอนติบอดีที่เหลือบหลุมได้มาก ส่งผลให้เห็นความแตกต่างในการแข่งขันได้น้อยลง



รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-HRP ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์

4.3.3 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

4.3.3.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA (Pr-BSA)

ทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-BSA สำหรับวิธี Indirect ELISA โดยเคลือบพื้นที่ผิวในหลุมของจานชนิด 96 หลุม ด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 และ 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงทำการแปรความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ 10, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลือกอัตราส่วนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 3 อัตราส่วน คือ ภาวะที่ความเข้มข้นของแอนติบอดี 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA อยู่ที่

0.5, 0.75 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระต่อไป

ตารางที่ 4.7 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติบอดีกับ Pr-BSA ด้วยวิธี Indirect ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)

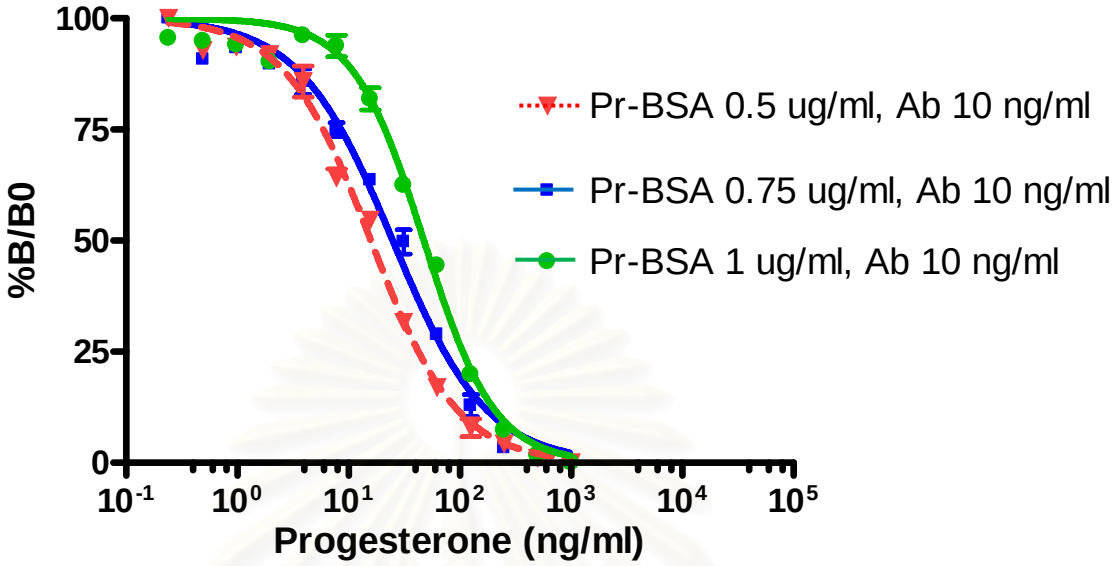
ความเข้มข้นของแอนติบอดี (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ความเข้มข้นของ Pr-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	0.25	0.5	0.75	1	1.5
0	0.113	0.121	0.171	0.447	0.153
10	0.990	**1.357***	**1.435***	**1.558***	1.808
50	2.206	2.385	2.409	2.102	2.536
100	2.417	2.579	2.586	2.441	2.623
150	2.506	2.633	2.636	2.104	2.696
200	2.533	2.580	2.597	2.439	2.683
250	2.553	2.631	2.626	2.509	2.692
300	2.574	2.656	2.641	2.573	2.676

หมายเหตุ *ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

4.3.3.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

หลังจากทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-BSA สำหรับทำ ELISA จึงทำการทดสอบหาความไวของแอนติบอดี โดยการใช้โพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาแข่งขันในการทำ Indirect competitive ELISA (Ab captured) ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อใช้ Pr-BSA 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับแอนติบอดี 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 15.88 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ Pr-BSA 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับแอนติบอดี 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 24.96 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ Pr-BSA 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับแอนติบอดี 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 47.49 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร สรุปได้ว่าเมื่อใช้ Pr-BSA 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จับกับแอนติบอดี 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนที่ให้ความไวมากที่สุด ให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เนื่องจากเมื่อทำการเคลือบหลุมด้วย Pr-BSA แล้วเติมแอนติบอดีลงไปพร้อมกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ โอกาสที่แอนติบอดีจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระนั้น มีมากกว่า Pr-BSA ที่เคลือบอยู่บนพื้นผิวของหลุม ซึ่งอัตราส่วนนี้มีปริมาณของแอนติบอดีและ Pr-BSA น้อยกว่าอัตราส่วนอื่น จึงไปจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระได้หมด ไม่เหลือแอนติบอดีไปจับกับ Pr-BSA จึงทำให้มีความไวสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่างแอนติบอดีกับ Pr-BSA ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (Ab captured)

4.3.4 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

4.3.4.1 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการจับกันระหว่าง Pr-BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน

ทำการหาอัตราส่วนในการจับที่เหมาะสมระหว่าง Pr-BSA ที่เคลือบหลุมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เหมาะสมในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยทำการแปรค่าความเข้มข้นของ Pr-BSA เท่ากับ 0, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน อยู่ในช่วง 1:1,000 - 1:64,000 เท่า และเมื่อนำแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบโดยไม่มีการเคลือบหลุมด้วย Pr-BSA พบว่าให้ผลเป็นลบซึ่งเป็นการยืนยันว่าแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินจะจับกับ Pr-BSA เท่านั้น อีกทั้งยังได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม 4 อัตราส่วน คือ Pr-BSA 0.125 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเจือจาง 1:8,000 เท่า และ Pr-BSA 0.25 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเจือจาง 1:16,000 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 นำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้ในการหาความไวต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระต่อไป

ตารางที่ 4.8 ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของ Pr-BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน ด้วยวิธี Direct ELISA เพื่อใช้ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

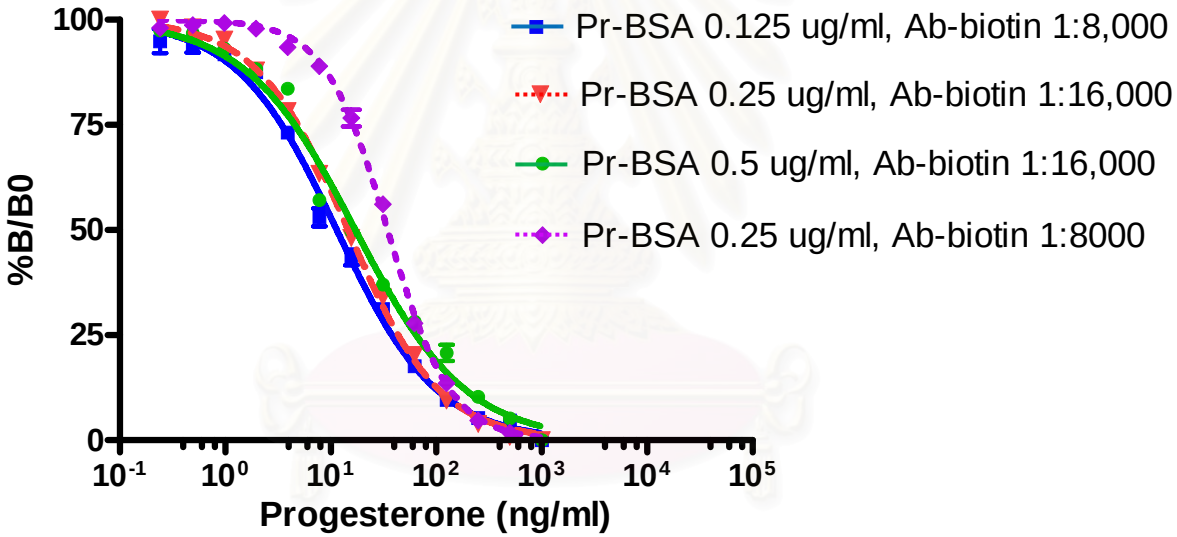
แอนติบอดี ที่เชื่อมต่อกับไบโอติน (อัตราการเจือจาง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ความเข้มข้นของ Pr-BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
	0	0.125	0.25	0.5	1
1:1,000	0.184	3.066	3.079	3.120	3.036
1:2,000	0.163	2.869	2.919	3.037	2.962
1:4,000	0.136	2.348	2.894	2.992	2.897
1:8,000	0.092	**1.178***	**1.781***	2.508	2.656
1:16,000	0.073	0.642	**1.112***	**1.614***	1.821
1:32,000	0.078	0.381	0.552	0.898	1.085
1:64,000	0.086	0.27	0.382	0.607	0.733

หมายเหตุ *ค่าที่แสดงโดยตัวเลขทึบ คือ ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ที่ใช้แอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

4.3.4.2 การทดสอบหาขีดความสามารถในการตรวจของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ทำการทดสอบหาความสามารถในการจับของแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระด้วยวิธี competitive ELISA จากอัตราส่วนที่เหมาะสม 3 อัตราส่วนในข้อ 4.3.2.1 แล้วแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วง 0-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลในรูปของ $\%B/B_0$ ดังแสดงในรูป 4.8 จากการคำนวณหาค่า IC_{50} ของแต่ละอัตราส่วน พบว่าในภาวะที่ใช้ Pr-BSA ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:8,000 เท่า ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 11.42 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในภาวะที่ใช้ Pr-BSA ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:8,000 เท่า ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 34.72 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน

ในภาวะที่ใช้ Pr-BSA ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:16,000 เท่า ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 14.62 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและในภาวะที่ใช้ Pr-BSA ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:16,000 เท่า ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 17.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นอัตราส่วนที่ให้ความไวมากที่สุดคือ Pr-BSA ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เจือจาง 1:8,000 เท่า นอกจากนี้ ยังพบว่า ในภาวะที่ใช้ Pr-BSA และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่มีความเข้มข้นต่ำจะให้ความไวที่สูงกว่าภาวะที่มีความเข้มข้นสูง และการใช้ไบโอตินจะช่วยขยายสัญญาณทำให้ชุดตรวจสอบวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) นี้ มีความไวสูง



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบความไวของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยแปรอัตราส่วนระหว่าง Pr-BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured)

4.3.5 การวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบทั้ง 4 แบบที่พัฒนาขึ้น โดยเทคนิค ELISA และเปรียบเทียบความไวของชุดตรวจสอบจากค่า IC_{50} และ LOD ได้ผลสรุปดังแสดงในตาราง 4.9 โดยพบว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) มีความไวสูงสุด เนื่องจากใช้ปฏิกิริยาระหว่าง biotin-streptavidin ทำให้เกิดการขยายสัญญาณได้โดย streptavidin ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ ถูกสร้างขึ้นโดย *Streptomyces avidinii* ซึ่ง streptavidin 1 โมเลกุลสามารถจับกับไบโอตินได้ 4 โมเลกุล ทำให้ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) นี้มีความไวสูงสุด (Diamandis และ Christopoulos, 1991)

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) ซึ่งมีความไวน้อยกว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.88 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการพิจารณาต้นทุนและความสะดวกในการใช้งาน จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) มีขั้นตอนและเวลาในการทดสอบนานกว่าชุดตรวจสอบแบบอื่น อีกทั้งต้องใช้ HPR-conjugated goat anti-mouse IgG เป็นแอนติบอดี ทุติยภูมิซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีปฏิยภูมิ ทำให้มีต้นทุนในการผลิตเพิ่มมากขึ้น ชุดตรวจสอบแบบนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนต้นแบบ

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ซึ่งมีความไวรองลงมา จากชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 42.12 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากการพิจารณาต้นทุนและความสะดวกในการใช้งาน จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) มีต้นทุนในการเตรียมต่ำกว่าชุดแบบอื่นๆ เนื่องจากใช้เพียงแอนติบอดี และPr-HRP เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคำนึงถึงความไวของชุดตรวจสอบ ชุดตรวจสอบแบบนี้จึงไม่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนต้นแบบ

เมื่อวิเคราะห์ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบหลุมด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ จะเหมือนกันกับชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) เพียงแต่มีการใช้แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ในการเคลือบหลุมก่อนเท่านั้น โดยคาดว่าเมื่อใช้แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ เคลือบหลุมก่อนเพื่อให้ส่วน Fc ของแอนติบอดีจับกับส่วนของ Fab ของแอนติบอดีของแพะ ส่งผลให้ส่วน Fab ของแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนได้มากขึ้น ทำให้ชุดตรวจสอบที่ได้มีความไวสูงมากขึ้น (Schneider และ Hammock, 1992) แต่พบว่าชุดตรวจสอบ

แบบนี้มีความไวน้อยกว่าชุดตรวจสอบแบบอื่นๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 77.19 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเนื่องมาจากการที่แอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูที่ใช้เคลือบหลุมนั้น ใช้ส่วนของ Fab ไปในการยึดติดกับพื้นผิว ทำให้เหลือส่วนของ Fab น้อย ทำให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนซึ่งจะจับ Fab สามารถจับได้ในปริมาณที่ลดลง ทำให้ความสามารถในการแข่งขันการจับของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระลดลง จึงส่งผลให้ ELISA ชนิดนี้มีความไวลดลง

อย่างไรก็ตามในการเตรียมชุดตรวจสอบไม่ว่าจะเตรียมชุดตรวจสอบแบบใด สิ่งที่เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด คือ ความสามารถเฉพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้เตรียมชุดตรวจสอบ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงกับความไวของชุดตรวจสอบที่ได้ และต้องพิจารณาความสะดวกในการใช้งานขั้นตอนและเวลาในการทดสอบง่ายและรวดเร็ว จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆทั้ง 4 แบบข้างต้นแล้ว จะเห็นได้ว่าชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) มีความไวสูงกว่า ELISA แบบอื่นๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.42 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOD เท่ากับ 2.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาความสะดวกในการใช้งานขั้นตอนและเวลาในการทดสอบก็มีความเหมาะสม ดังนั้นชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้งานในเชิงพาณิชย์ ดังนั้น จึงได้เลือก ELISA ระบบดังกล่าวสำหรับเตรียมเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ เพื่อทำการหาประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 สรุปผลการเปรียบเทียบชุดตรวจสอบ ELISA แบบต่างๆ

รูปแบบของชุดตรวจสอบ	อัตราส่วนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี	เวลาในการทดสอบ (ชั่วโมง)	IC_{50} (ng/ml)	LOD (ng/ml)
Direct competitive ELISA(Ag captured)	Ab 0.5 µg/ml Pr-HRP 1:5,000	1.30	42.12	5.44
Direct competitive ELISA (Ag captured) Pre coated with goat anti mouse Ig	Ab 1 µg/ml Pr-HRP 1:4,000 goat anti mouse 1: 500	1.30	77.19	8.47
Indirect competitive ELISA (Ab captured)	Pr-BSA 0.5 µg/ml Ab 10 ng/ml	3.30	15.88	3.50
Direct competitive ELISA (Ab captured)	Pr-BSA 0.125 µg/ml Ab-biotin 1:8,000	2.40	11.42	2.20

4.4 การเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured)

4.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

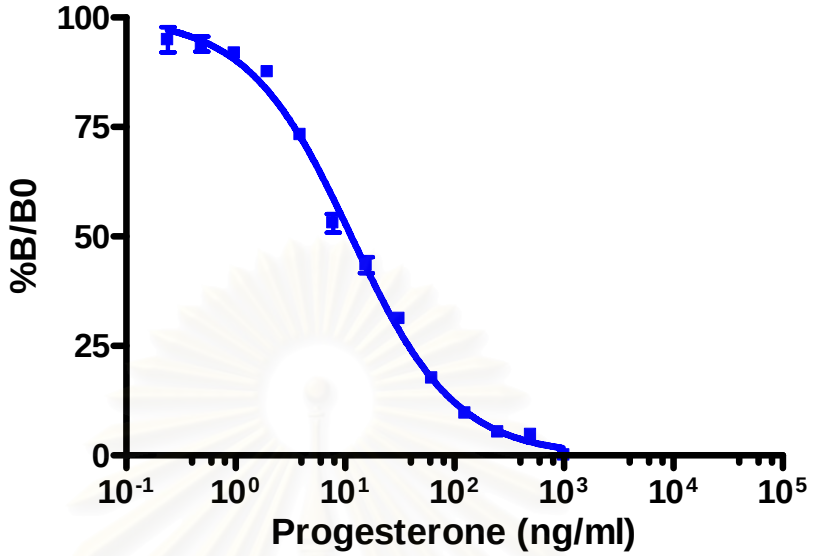
หลังจากการคัดเลือกชุดตรวจสอบที่มีความไวสูงสุดดังที่กล่าวข้างต้น จึงทำการเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.5.4 โดยใช้ความเข้มข้นของ Pr-BSA เคลือบหลุมเท่ากับ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน เจือจาง 1:8,000 เท่า และแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเป็นตัวแข่งขันในช่วง 0-1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ ก.3 ในภาคผนวก ก) แล้วนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสง ค่า $\%B/B_0$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ซึ่งแสดงผล

ในตารางที่ 4.10 และนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.03 โดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนมีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และแกน Y เป็น $\%B/B_0$ โดยที่ B คือค่าการดูดกลืนแสงโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ที่มีโพรเจสเทอโรนอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวแข่งขัน และ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนเป็นตัวแข่งขัน ได้กราฟแสดงดังรูปที่ 4.9 จากนั้นทำการเลือกช่วงความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่สามารถสร้างกราฟเส้นตรง พบว่า ช่วงความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่จะนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง คือช่วง 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้กราฟมาตรฐานแสดงดังรูปที่ 4.10

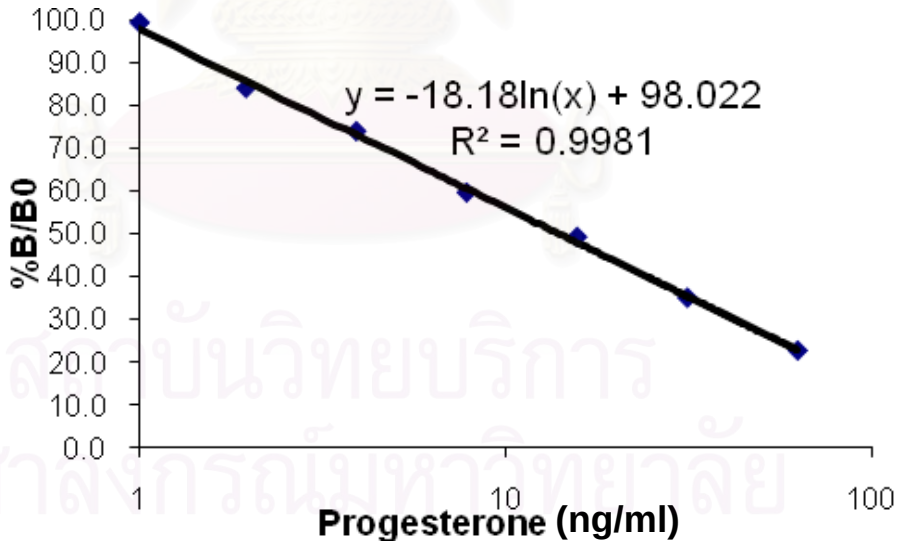
ตารางที่ 4.10 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่า $\%B/B_0$ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ได้จากการทำ Direct competitive ELISA (Ab captured) สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนต้นแบบ

ความเข้มข้นโพรเจสเทอโรน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร	$\%B/B_0$	SD
0	1.446	100.00	0.01
1	1.309	90.54	0.01
2.5	1.059	73.26	0.05
5	0.836	57.81	0.02
10	0.686	47.41	0.03
25	0.556	38.45	0.01
50	0.229	15.81	0.01

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.9 กราฟแสดงช่วงความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนด้วยโปรแกรม GraphPad Prism เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured)

4.4.2 การศึกษาปัจจัยของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไบโอติน และโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

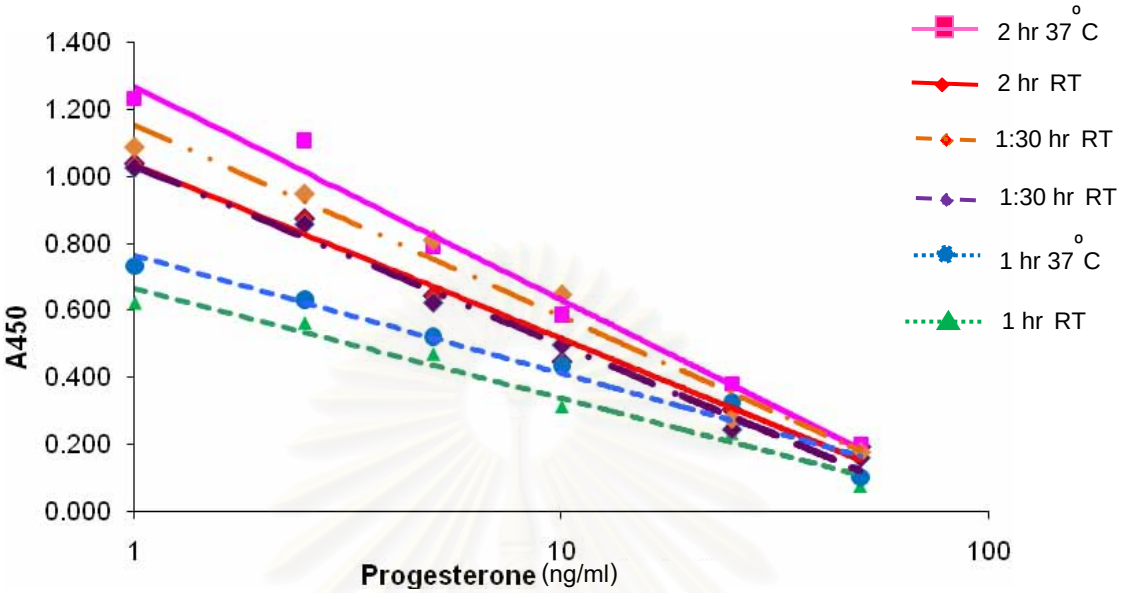
ในการพัฒนาชุดตรวจสอบสิ่งที่เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด คือ ความไวของชุดตรวจสอบ ความสะดวกในการใช้งาน ขั้นตอนและเวลาในการทดสอบที่ง่ายและรวดเร็ว ในการพัฒนาชุดตรวจสอบต้นแบบจึงต้องคำนึงถึงเวลาและอุณหภูมิที่สะดวกและง่ายต่อการใช้งาน โดยทำการแปรเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มตัวอย่างตามข้อ 3.4.5.2 โดยจะเลือกเวลาที่ใช้ในการบ่มที่เหมาะสมที่สุด และอุณหภูมิที่สะดวกต่อการใช้งานมากที่สุด จากผลการทดลอง พบว่า กราฟมาตรฐานของแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 4.11 ซึ่งพิจารณาจากค่า R^2 ที่มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาผลที่ทำการบ่ม 1 ชั่วโมง หลุมที่ไม่มีการเติมโพรเจสเทอโรนให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 1 ดังแสดงในตารางที่ 4.11 จึงไม่เหมาะสมในการบ่ม เมื่อพิจารณาอุณหภูมิจากการบ่มที่อุณหภูมิห้อง และบ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1:30 ชั่วโมงและ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่ามีค่า R^2 อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิในการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1:30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาน้อยที่สุดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียง 1 และอุณหภูมิที่สะดวกและง่ายต่อการใช้กับชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนต้นแบบด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 ผลของการศึกษาเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อ BSA กับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อไบโอติน และโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นโพรเจสเทอโรน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร					
	1 hr RT	1 hr 37 °C	1:30 hr RT	1:30 37 °C	2 hr RT	2 hr 37 °C
0	0.780	0.875	1.071	1.121	1.122	1.288
1	0.625	0.732	1.026	1.086	1.039	1.231
2.5	0.565	0.632	0.857	0.947	0.875	1.106
5	0.472	0.521	0.622	0.809	0.644	0.791
10	0.315	0.436	0.495	0.647	0.448	0.586
25	0.235	0.327	0.242	0.277	0.304	0.379
50	0.077	0.101	0.157	0.176	0.193	0.198
R^2	0.986	0.961	0.990	0.973	0.989	0.991

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.11 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) ในภาวะการบ่มต่างๆ

4.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนต้นแบบ

จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยทำการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรเจสเทอโรน ได้แก่ โพรเจสเทอโรน-17 แอลฟาไฮดรอกซี เทสโทสเทอโรน คอร์ทิโคสเทอโรน เอสทราไดออล คอเลสเทอรอล และแอลโดสเทอโรน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการแข่งขันสูงมากที่สุดที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงจากการทำ ELISA ยังลดต่ำลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งทำให้ค่า IC_{50} สูงมาก เมื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้าม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12 และทดสอบปฏิกิริยาข้ามของชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนกับสารนอกกลุ่มฮอร์โมน สเตอรอยด์ ได้แก่ เพนิซิลลิน เททราซัยคลิน นอร์ฟลอกซาซิน ซัลบูทามอล เอนโรฟลอกซาซิน สเตรปโตมัยซิน และเคลนบูเทรอล พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาข้ามต่ำกว่า 0.02 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์

ตารางที่ 4.12 ผลการทำปฏิกิริยาข้าม (Cross-reactivity; CR) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ ต่อสารในกลุ่มและนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์

	Competitors	CR (%)	IC_{50} (ng/ml)
สารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์	โพรเจสเทอโรน	100	4.74
	โพรเจสเทอโรน-17 แอลฟาไฮดรอกซี	2.9	316.9
	เทสโทสเทอโรน	2.2	430.5
	คอร์ทิโคสเทอโรน	0.05	1636.7
	เอสทราไดออล	<0.02	>20,000
	คอเลสเทอรอล	<0.02	>20,000
	แอลโดสเทอโรน	<0.02	>20,000
สารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์	เพนิซิลลิน	<0.02	>20,000
	เททราซัยคลิน	<0.02	>20,000
	นอร์ฟลอกซาซิน	<0.02	>20,000
	ซัลบูทามอล	<0.02	>20,000
	เอนโรฟลอกซาซิน	<0.02	>20,000
	สเตรปโตมัยซิน	<0.02	>20,000
	เคลนบูเทรอล	<0.02	>20,000

4.4.4 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

4.4.4.1 การหาค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

จากการทดสอบหาค่าความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ตามขั้นตอน 3.4.5.4 เมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟเส้นตรงโดยให้แกน X เป็นลอการิทึมของความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนและแกน Y เป็นค่า%B/B_0 แล้วทำการหาค่าความไวของชุดตรวจสอบ โดยนำค่า B_0 12 ค่า จากข้อมูลในตารางที่ 4.13 มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นคำนวณหาค่า LOD และ LOQ โดยโปรแกรม GraphPad Prism 4.03 แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบมีความไวหรือมีขีดจำกัดในการวัดปริมาณของโพรเจสเทอโรนต่ำที่สุด

(LOD) เท่ากับ 2.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีขีดจำกัดในการวัดปริมาณของโพรเจสเทอโรนต่ำที่สุดอย่างถูกต้อง (LOQ) เท่ากับ 14.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.13 ผลการหาค่า LOD และ LOQ ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ(B_0) (n=12)			Mean	SD	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
1.398	1.300	1.237	1.354	0.06	2.2	14.4
1.421	1.37	1.313				
1.455	1.379	1.317				
1.312	1.368	1.384				

4.4.4.2. ค่าความแม่นยำ (precision) ของชุดตรวจสอบต้นแบบ

การหาค่าความแม่นยำของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) สามารถวิเคราะห์ได้จากการทำ intra-variation assay และ inter-variation assay แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient variation; %CV) พบว่า intra-variation assay จากการทำซ้ำของจำนวนตัวอย่าง 12 ซ้ำ ได้ค่าอยู่ในช่วง 4.45-16.72 ส่วน inter-variation assay จากการทำซ้ำของจำนวนครั้งการทดลอง 4 ครั้ง ได้ค่าอยู่ในช่วง 4.98–9.45 ดังแสดงในตารางที่ 4.14 ซึ่งต่ำกว่า 20 จึงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (Krotzky และ Seeh, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	intra-variation assay (n=12)			inter-variation assay (N=4)		
	mean	SD	%CV	mean	SD	%CV
0	1.258	0.118	9.419	1.230	0.074	6.004
1	1.218	0.074	6.080	1.166	0.063	5.394
2.5	1.028	0.109	10.604	1.030	0.065	6.286
5	0.884	0.039	4.450	0.870	0.043	4.979
10	0.641	0.076	11.787	0.603	0.055	9.170
25	0.462	0.063	13.667	0.453	0.034	7.490
50	0.237	0.040	16.716	0.265	0.025	9.453

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.5 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง

4.5.3 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบมาวิเคราะห์กับตัวอย่างน้ำนมโค ที่มีการเติมโพรเจสเทอโรนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการวิเคราะห์ตามขั้นตอนในข้อ 3.4.6.1 แล้วนำผลการทดลองที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.4 ภาคผนวก ก) เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน %recovery และ %CV จากการทดลองทั้งหมด ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์ได้ให้ค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่เติมลงไป และ %recovery ที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ การหา intra-variation assay และ inter-variation assay สามารถคำนวณหา %CV ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 1.52-6.81 และ 2.56-4.66 ดังแสดงในตารางที่ 4.15 และ 4.16 ตามลำดับ ดังนั้น ชุดตรวจสอบต้นแบบมีความสามารถวัดโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโคได้อย่างถูกต้อง

4.5.4 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างซีรัม

สำหรับตัวอย่างซีรัมโคที่นำมาวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบได้ทำการเติมโพรเจสเทอโรนให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยไดเอททิลอีเทอร์ดังข้อ 3.4.6.3 แล้วจึงนำไปวิเคราะห์กับชุดตรวจสอบต้นแบบตามขั้นตอนในข้อ 3.4.6.2 พบว่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ทำการวิเคราะห์ได้หลังจากนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก. 4 ภาคผนวก ก) มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่เติมลงไปข้างต้น ซึ่งเมื่อคำนวณหา %recovery พบว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แล้วหา intra-variation assay และ inter-variation assay โดยคำนวณหา %CV พบว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ 1.09-3.98 และ 1.83-2.59 ดังแสดงในตารางที่ 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบสามารถวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างซีรัมโคได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation ในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

Experiment no.	Fortified conc. (ng/ml)	Intra-variation assay (n=12)		
		Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery	%CV
I	1	1.15±0.03	114.54	2.47
	2.5	2.79±0.02	111.42	2.16
	5	5.42±0.04	108.45	2.30
	7.5	8.28±0.01	110.41	4.69
	10	11.75±0.02	117.49	1.52
	25	27.74±0.03	110.95	2.93
	50	59.48±0.09	118.95	5.43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

II	1	0.89±0.04	89.21	2.19
	2.5	2.79±0.02	118.96	3.75
	5	5.42±0.03	117.57	1.31
	7.5	8.28±0.02	101.10	3.95
	10	11.75±0.01	98.46	3.12
	25	27.74±0.05	90.05	2.38
	50	59.48±0.08	119.24	3.55
III	1	0.85±0.04	85.20	2.84
	2.5	2.28±0.02	91.22	2.28
	5	5.37±0.03	107.42	3.01
	7.5	8.91±0.02	118.93	3.15
	10	9.51±0.01	95.12	3.72
	25	21.41±0.05	85.66	2.70
	50	57.98±0.08	115.97	4.30
IV	1	0.93±0.07	93.49	6.63
	2.5	2.13±0.04	85.32	4.28
	5	4.59±0.03	91.90	3.68
	7.5	8.60±0.02	114.77	2.86
	10	11.14±0.02	111.49	3.32
	25	22.07±0.03	88.29	4.96
	50	56.20±0.06	112.40	6.81

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation ในตัวอย่างน้ำนมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

Fortified conc. (ng/ml)	Inter-variation assay (N=4)		
	Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery	%CV
1	0.96±0.03	95.61	3.83
2.5	2.54±0.04	101.73	2.56
5	5.32±0.02	106.33	3.84
7.5	8.35±0.03	111.30	2.65
10	10.56±0.05	105.64	3.09
25	23.44±0.02	93.74	4.15
50	58.32±0.06	116.64	4.66

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ Intra-variation ในตัวอย่างซีรัมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

Experiment no.	Fortified conc. (ng/ml)	Intra-variation assay (n=12)		
		Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery	%CV
I	1	0.80±0.04	80.11	2.77
	2.5	2.21±0.06	88.42	2.41
	5	4.90±0.02	98.57	1.34
	7.5	6.73±0.05	89.77	3.91
	10	9.56±0.04	95.67	1.30
	25	24.18±0.02	96.76	1.93
	50	48.44±0.08	96.88	2.73
II	1	0.94±0.04	94.32	2.91
	2.5	2.31±0.04	92.44	3.34
	5	4.30±0.02	85.99	2.14
	7.5	6.62±0.01	88.22	1.75
	10	9.43±0.01	94.25	1.28
	25	22.68±0.05	90.74	2.43
	50	49.36±0.08	95.94	2.95

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

III	1	0.90±0.03	90.25	2.49
	2.5	2.10±0.01	83.87	1.12
	5	4.30±0.02	85.90	2.38
	7.5	6.23±0.02	83.12	2.58
	10	8.86±0.03	88.60	2.66
	25	23.02±0.04	92.07	1.09
	50	47.39±0.07	94.78	1.41
IV	1	0.97±0.04	96.87	3.65
	2.5	2.21±0.03	88.32	3.18
	5	4.54±0.03	90.88	3.98
	7.5	7.16±0.01	95.43	1.78
	10	9.53±0.01	95.35	1.80
	25	20.50±0.03	81.98	2.06
	50	48.22±0.06	96.45	2.44

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ Inter-variation ในตัวอย่างซีรัมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ

Fortified conc. (ng/ml)	Inter-variation assay (N=4)		
	Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery	%CV
1	0.90±0.03	90.39	2.59
2.5	2.21±0.04	88.26	2.51
5	4.52±0.02	90.34	2.54
7.5	6.69±0.03	89.14	2.39
10	9.35±0.05	93.47	1.84
25	22.60±0.02	90.39	1.83
50	48.01±0.06	96.01	2.28

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.19 สรุปผลการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	%Recovery	%CV intra-assay (n=12)	%CV (inter-assay) (N=4)
น้ำนมโค	85.20-119.24	1.52-6.81	2.56-4.66
ซีรัมโค	88.26-96.01	1.09-3.98	1.83-2.59

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

N คือ จำนวนครั้งของการทดลอง โดยในแต่ละครั้งของการทดลองจะทำ 4 ซ้ำ

4.6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยการใช้ชุดตรวจสอบ ELISA ทางการค้าและเทคนิค HPLC

4.6.1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างการใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบทางการค้า

ทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโคและซีรัมโค ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) กับชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA เพื่อประเมินความถูกต้องและประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้ โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธีเดียวกันทั้งหมด แล้วแบ่งมาวิเคราะห์ตามขั้นตอนของชุดตรวจสอบทั้งสองแบบดังข้อ 3.4.7.1

ทำการเติมโพรเจสเทอโรนลงในตัวอย่างน้ำนมโคและซีรัมโคให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.20 และ 4.21 พบว่าชุดตรวจสอบทั้งสองแบบสามารถวิเคราะห์ปริมาณของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง ได้ค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่เติมลงไปในตัวอย่าง ถึงแม้ว่าผลการทดลองในชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ก.5 ภาคผนวก ก) ให้ปริมาณของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์ได้ต่ำกว่าปริมาณของโพรเจสเทอโรนที่เติมลงไป เห็นได้จาก %recovery ที่ได้ต่ำกว่าที่มาตรฐานกำหนดไว้ เช่น ในตัวอย่างน้ำนมโคที่เติมโพรเจสเทอโรนลงไป 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการวิเคราะห์เท่ากับ 40.97 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %recovery ที่ได้เท่ากับ 81.94 ชุดตรวจสอบทั้ง 2 ชุดสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนม และซีรัมโค ได้ %recovery อยู่ในช่วงที่กำหนด (80-120%) จากนั้นนำผลการวิเคราะห์จากตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด ที่ได้จากชุด

ตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนม และซีรัมโคโดยชุดตรวจสอบต้นแบบและชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ให้แกน X เป็นความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และแกน Y เป็นความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ดังแสดงในรูปที่ 4.12 ในตัวอย่างน้ำนม และซีรัมโค นำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ได้เท่ากับ 0.9869 และ 0.9976 ตามลำดับ โดยค่า r เป็นค่าที่แสดงถึงความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA ทั้งสองแบบ ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.85 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน (Saita และคณะ, 2003) จากผลการทดลองพบว่าค่า r ที่ได้มีค่ามากกว่า 0.85 แสดงให้เห็นว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA ให้ผลที่สอดคล้องและใกล้เคียงกัน ดังนั้น ชุดตรวจสอบต้นแบบมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างได้เทียบเท่ากับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบของงานวิจัยนี้ (n=3)		ชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนจากบริษัท EURO-DIAGNOSTICA (n=3)	
	Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery	Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery
0	0.09±0.04	-	0.02±0.01	-
1	0.86±0.03	86.44	0.83±0.01	82.97
2.5	2.65±0.05	106.05	2.22±0.03	88.94
5	4.18±0.02	83.73	4.38±0.01	87.76
10	9.10±0.02	91.05	11.48±0.03	114.84
25	28.46±0.02	113.86	24.00±0.02	96.01
50	41.85±0.03	83.71	40.97±0.01	81.94

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

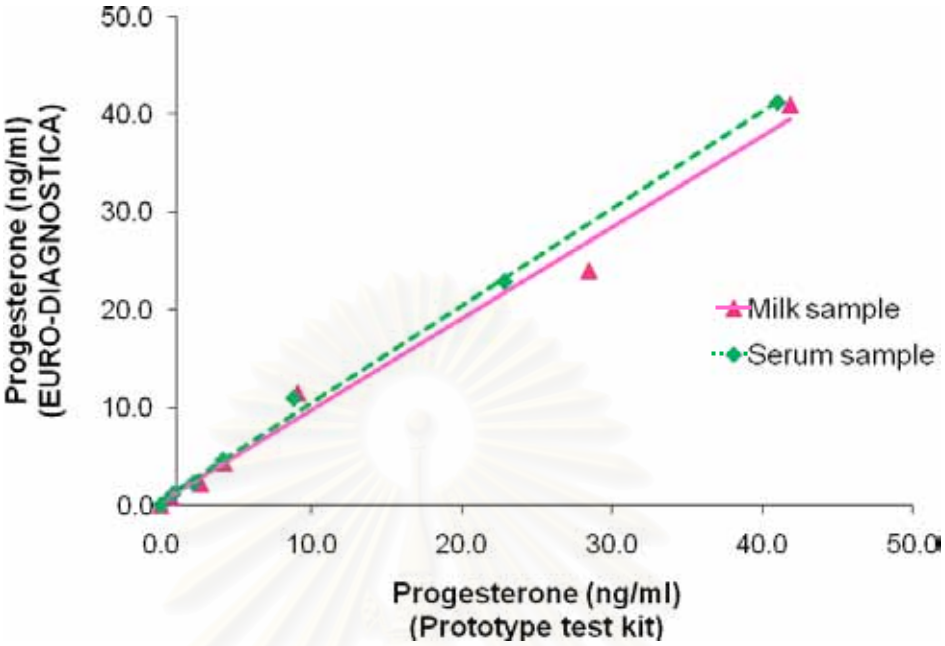
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.21 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบของงานวิจัยนี้ (n=3)		ชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนจากบริษัท EURO-DIAGNOSTICA (n=3)	
	Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery	Measured conc. ± SD (ng/ml)	%Recovery
0	0.05±0.04	-	0.03±0.02	-
1	0.81±0.03	81.39	1.13±0.03	113.29
2.5	2.18±0.04	87.20	2.26±0.03	90.53
5	4.14±0.03	82.80	4.59±0.02	91.92
10	8.84±0.04	88.40	10.93±0.02	109.37
25	22.83±0.02	91.32	22.86±0.03	91.45
50	40.97±0.02	81.94	41.20±0.02	82.40

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนม และซีรัมโคที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และชุดตรวจสอบ EURO-DIAGNOSTICA

4.6.2 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบและวิธี HPLC

ในการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ ระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) กับวิธี HPLC เนื่องจากวิธี HPLC เป็นวิธีทางเคมี ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง และเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากงานวิจัยนี้ จึงทำการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างเดียวกันแล้วแบ่งวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี โดยทำการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนในข้อ 3.4.6 เตรียมความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 0, 100, 250, 500 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของวิธี HPLC (รูปที่ ก.6 ภาคผนวก ก) จะเห็นว่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่นำใช้ในการทดลองนี้ มีค่าสูงกว่าการเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA เนื่องมาจากในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC นี้ มีความสามารถในการตรวจวัดโพรเจสเทอโรนได้ต่ำที่สุด เท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเลือกความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนดังที่กล่าวมาในข้างต้น ใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิคทั้งสอง พบว่าปริมาณของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์ได้ให้ค่าใกล้เคียงกันกับปริมาณของโพรเจสเทอโรนที่เติมลงไป และคำนวณหา %recovery ของทั้งชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC ได้ไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 4.22 และ 4.23 และนำผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมและซีรัม ที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ โพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนม และซีรัมโคโดยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และแกน Y เป็นความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่วิเคราะห์จากเทคนิค HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ในตัวอย่างน้ำนมและซีรัมโค คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ได้เท่ากับ 0.9907 และ 0.9982 ตามลำดับ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดให้ค่า r มากกว่า 0.85 แสดงว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบกับเทคนิค HPLC ให้ผลที่สอดคล้องและใกล้เคียงกัน ดังนั้นชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้เมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC มีความสามารถในการวิเคราะห์ตัวอย่าง น้ำนม และซีรัมโคได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

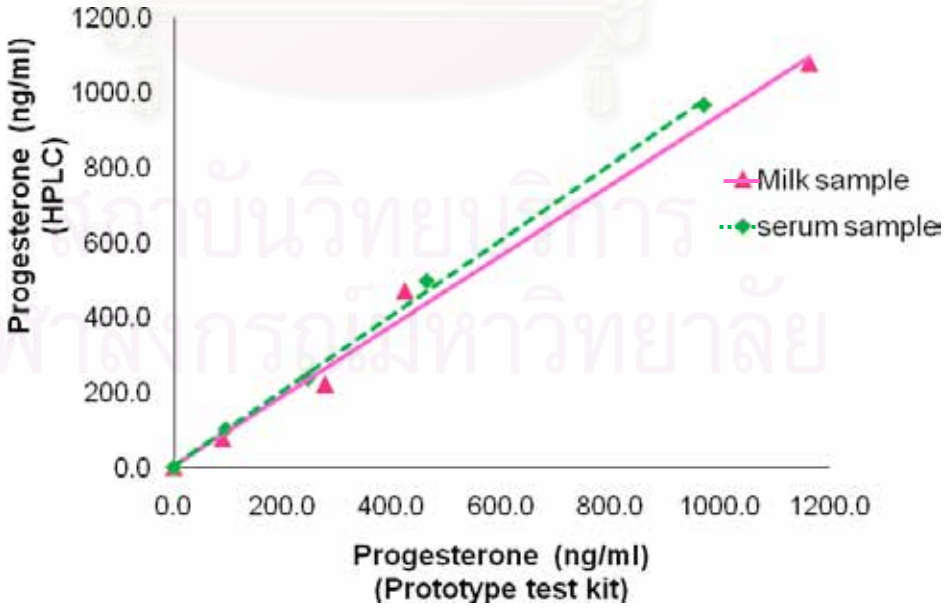
ตารางที่ 4.22 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโค ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบของงานวิจัยนี้ (n=3)		เทคนิค HPLC (n=3)	
	Measured conc. ±SD (ng/ml)	%Recovery	Measured conc. ±SD (ng/ml)	%Recovery
0	0.86±0.04		0.000	
100	90.02±0.03	90.02	105.87±6.50	105.87
250	277.84±0.03	111.13	223.68±9.40	89.47
500	423.68±0.03	84.73	435.38±11.23	87.08
1000	1163.86±0.02	116.38	1131.30±6.76	113.13

ตารางที่ 4.23 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมโคด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

Fortified conc. (ng/ml)	ชุดตรวจสอบต้นแบบของงานวิจัยนี้ (n=3)		เทคนิค HPLC (n=3)	
	Measured conc.±SD (ng/ml)	%Recovery	Measured conc. ±SD (ng/ml)	%Recovery
0	0.98±0.05		0.000	
100	96.06±0.06	96.06	105.97±10.07	105.97
250	246.13±0.01	98.45	232.61±19.90	93.04
500	463.43±0.03	92.68	422.62±13.86	84.52
1000	970.16±0.04	97.01	946.90±23.11	94.69

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่าง



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนม และซีรัมโคที่ได้จากชุดตรวจสอบต้นแบบ และเทคนิค HPLC

จากประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ได้ สามารถตรวจวัดโพรเจสเทอโรนได้ครอบคลุมระยะการเป็นสัด และช่วงการตั้งครรภ์ของโค ซึ่งมีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง มีขั้นตอนการวิเคราะห์ง่ายสะดวก และใช้เวลาในการตรวจวัดน้อยตรวจวัดได้ครั้งละหลายๆตัวอย่างพร้อมกัน โดยตรวจวัดโพรเจสเทอโรนได้ทั้งในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค รวมทั้งให้ผลการตรวจวัดที่ใกล้เคียงกับชุดตรวจสอบที่มีจำหน่าย และเทคนิค HPLC ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ได้จากการวิจัยนี้ จึงสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างเพื่อตรวจวัดการเป็นสัดและการตั้งครรภ์ของโคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ทำการทดสอบความสามารถของแอนติบอดีจากโคลน 3/C9-F4, 3/D7-F4, 3/F7-F4, และ 5/G7-F4 ในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระและความไวของแอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีจากโคลน 3/G7-F4 มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระและมีความไวสูงกว่าโคลนอื่นๆ จึงคัดเลือกมาทำการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ โดยการผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ เซฟาโรส ซึ่งเป็นการแยกแบบ affinity chromatography เมื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีน พบว่าแอนติบอดีที่ผ่านคอลัมน์โปรตีน เอ เซฟาโรส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจาก 1.87 เปอร์เซ็นต์ เป็น 93.75 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และมวลโมเลกุลของแอนติบอดีที่ได้จากการทำ SDS-PAGE พบว่าแอนติบอดีโคลน 3/G7-F4 (IgG2a) จะให้แถบของ Heavy chain และ Light chain ขนาด 60.72 และ 25.86 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากนั้นจึงนำมาใช้ในการศึกษาและพัฒนาชุดตรวจโพรเจสเทอโรนต่อไป

สำหรับการเปรียบเทียบชุดตรวจโพรเจสเทอโรนด้วยวิธี ELISA 4 แบบ พบว่าชุดตรวจสอบที่ให้ความไวมากที่สุดคือชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยมีค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 11.42 และ 2.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ Indirect competitive ELISA (Ab captured) ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 15.88 และ 3.50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 42.12 และ 5.44 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดตรวจสอบที่มีความไวน้อยที่สุด คือชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured) ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีของแพะที่จำเพาะต่อแอนติบอดีของหนูไมซ์ ให้ค่า IC_{50} และ LOD เท่ากับ 77.19 และ 8.47 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงเลือกชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) ซึ่งมีความไวสูงที่สุดมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ โดยชุดตรวจสอบต้นแบบนี้สามารถตรวจโพรเจสเทอโรนได้ในช่วงความเข้มข้น 1 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมช่วงที่ต้องการวัดระดับปริมาณโพรเจสเทอโรน โดยใช้โพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA เคลือบหลุมที่ความเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินเจือจาง 1:8,000 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม คืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1:30 ชั่วโมง ได้กราฟ

มาตรฐานครอบคลุมความเข้มข้นในช่วง 1-50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และชุดตรวจมีความไวในการตรวจวัดความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนต่ำที่สุดเท่ากับ 2.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจวัดโพรเจสเทอโรนได้อย่างถูกต้องที่ความเข้มข้น 14.40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และทำปฏิกิริยาข้ามกับสารในกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์บางตัว คือโพรเจสเทอโรน-17 แอลฟาไฮดรอกซีและเทสโทสเทอโรน 2.9 และ 2.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับสารนอกกลุ่มฮอร์โมนสเตอรอยด์ เมื่อทดสอบความแม่นยำของชุดตรวจสอบโดยคำนวณจากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ intra-variation assay และ inter-variation assay อยู่ในช่วง 4.45-16.71 และ 5.39–9.45 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากการนำชุดตรวจสอบต้นแบบไปวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างต่างๆ ได้แก่ น้ำนมและซีรัมโค โดยต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ ซึ่งวิธีการในการเตรียมตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ แล้วคำนวณปริมาณที่ตรวจวัดได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณหาค่า %recovery และ %CV ของ intra และ inter-variation assay ในตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ในการนำชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้วัดปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมและซีรัมโค เปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบทางการค้าของบริษัท EURO-DIAGNOSTICA และเทคนิค HPLC พบว่าทั้ง 3 วิธีสามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณโพรเจสเทอโรนได้ถูกต้องใกล้เคียงกัน สรุปได้ว่าชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรน Direct competitive ELISA (Ab captured) ต้นแบบที่ได้มีความสามารถในการตรวจวัดโพรเจสเทอโรนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ความถูกต้องและความแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังใช้ขั้นตอนและเวลาในการทดสอบสั้น สะดวกต่อการใช้งาน

สิ่งที่ควรทำต่อไปหากจะพัฒนาในเชิงการค้า คือ ศึกษาการเคลือบโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA บนจานชนิด 96 หลุม การเตรียมแอนติบอดี เอนไซม์และสับสเตรตที่พร้อมใช้งานได้ทันที ตลอดจนศึกษาอายุการใช้งานของชุดตรวจสอบ เพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนที่สามารถผลิตจำหน่ายได้ในประเทศ ซึ่งช่วยลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ชวนิศนดากร วรวรรณ,ม.ร.ว. 2530. การเลี้ยงโคนม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

ไซแอนติฟิกซัพพลาย. 2545. คู่มือการใช้งานชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรน. Euro Diagnostica B.V.: Netherlands.

ตรีพล เจาะจิตต์ และคณะ. 2527. การเลี้ยงโคนม. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เกษตรไทย.

ธารารัชต์ ธารากุล. 2545. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บางกอกบล็อก.

นภาธร บานชื่น. 2536. ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. ครั้งที่ 2. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปราจีน วีรกุล. 2546. ความรู้โคนม 2003. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โลกปศุสัตว์และสุกร.

ไพศาล สิทธิกรกุล.2548. วิทยาภูมิคุ้มกัน สำหรับการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

มงคล เตชะกำพุ. 2543. เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรงพันธุ์ในปศุสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2546. โคนม. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิไลวรรณ ตันจ้อย. 2547. พัฒนาการผลิตน้ำยาตรวจวิเคราะห์โพรเจสเตอโรนในน้ำนมโค. กรุงเทพฯ: กองผลิตไอโซโทป สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ และคณะ. 2537. อิมมูโนวิทยา. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุปรีชา ฉัตรทอง. 2548. การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมชาย จันทร์ผ่องแสง, 2541. การเลี้ยงโคนม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Almeida, C., and Nogueira, J.M. 2006. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 16(4):1303-11.

Anupam, B., Tulsidas, G., and Saumen, K.M. 2006. A direct antigen heterologous enzyme immunoassay for measuring progesterone in serum without using displacer. Steroids. 71(3) :222-230.

Capezzuto, A., Chelini, M.O., Felippe, E.C., and Oliveira C.A. 2006. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. Animal Reproduction Science. 11:001.

Comin, A., Renaville, B., Marchini, E., Maiero, S., Cairoli, F., and Prandi, A. 2005. Direct Enzyme Immunoassay of Progesterone in Bovine Milk Whey. American Dairy Science Association. 88 : 4239-4242.

Drofman, I.R. 1975. Syntex research, Standard industrial park, Palo Alto. Steroid hormones. California. 385-395.

Fairclough, R. J. , Hunter, J. T. and Welch, R. A. S. 1975. Peripheral plasma progesterone and utero-ovarian prostaglandin F concentrations in cow around parturition. Prostaglandins. 6(10): 901-909.

Giraudi, G., Giovannoli, C., Anfossi, L., and Tozzi, C. 2000. Effect of homologous and heterologous spacer arms of progesterone-horse radish peroxidase conjugates on the equilibrium constants for an immobilised anti-progesterone antiserum. Analytica Chimica Acta. 417: 95–100.

Harlow, E., and Lane, D.P. 1988. Antibodies a laboratory manual. New York: Cold spring harbor laboratory.

Hong, J.Y., and Choi, M., J. 2002. Development of one-step fluorescence polarization immunoassay for progesterone. Biological Pharmaceutical Bulletin. 25(10): 1258-1262.

Hudson, L. and Hay, F. C. 1980. Practical immunology. London: Blackwell Scientific publication.

Johnstone, A. and Thrope, R. 1987. Immunochemistry in practice. Cambridge: Cambridge university press.

Mcdonald, L.E. 1975. Veterinary Endocrinology and Reproduction. 2nd edition. Philadelphia: Lea and Febiger. 42: 158-172.

Moeljono, M. P., Thatcher, W. W., Brazer, F. W., Frank, M. Owen, L. J. and Wilcox, C. J. 1977. A study of prostaglandin F2 as the luteolysin in swine, It characterization and comparison of prostaglandin F, estrogen and progestin concentrations in utero-ovarian vein plasma of non-pregnant and pregnant glits. Prostaglandins.14: 543-555.

Munro, C., and Stabenfeldt, G. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. Endocrinology. 101: 41–49.

Nakao, T. 1980. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. Acta Endocrinol. 93(2): 223-7.

Romagnolo, D., and Nebe, R.L. 1993. The accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination progesterone test for the validation of estrus and early pregnancy diagnosis in dairy cattle. Theriogenology. 39: 112 -128.

Sorenson, J. 1979 Animal reproduction principle and practices. New York: McGraw-Hill Book.

Yalow, R.S, and Berson, S.A. 1978. A probe for the fine structure of biologic systems. Radioimmunoassay. 200: 1236-45.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

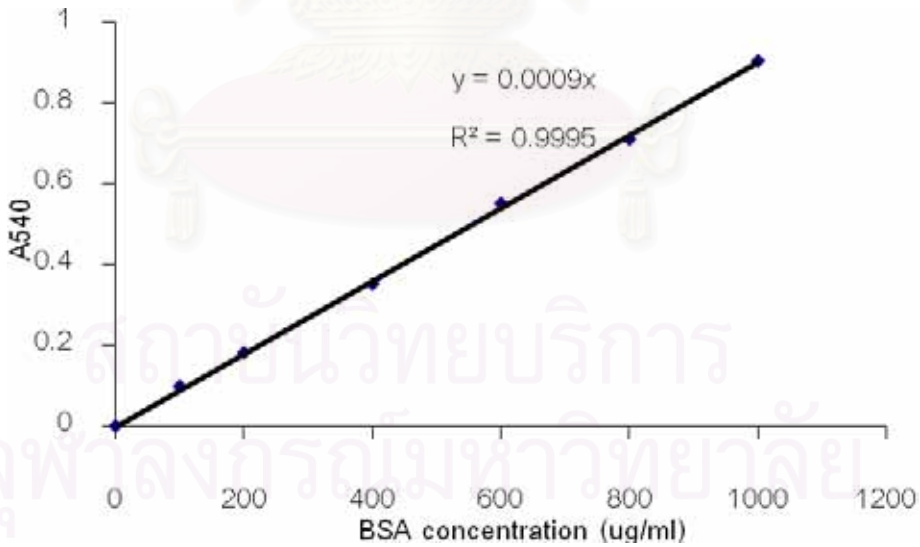
ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยวิธี BCA

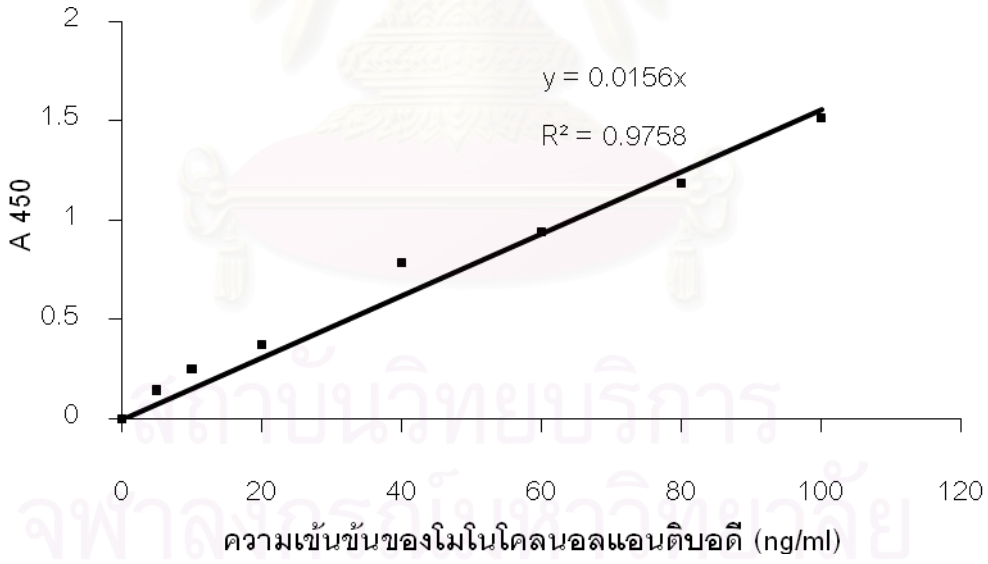
ความเข้มข้นแอนติบอดี (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0	0
100	0.143
200	0.250
400	0.372
600	0.787
800	0.942
1000	1.184



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA โดยวิธี BCA

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ของแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

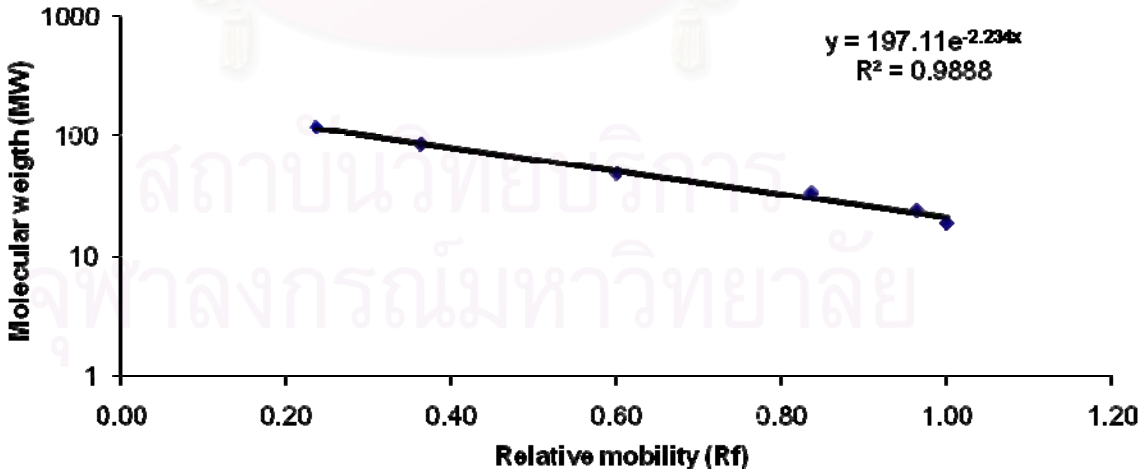
ความเข้มข้นแอนติบอดี (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร
0	0
5	0.143
10	0.250
20	0.372
40	0.787
60	0.942
80	1.184
100	1.513



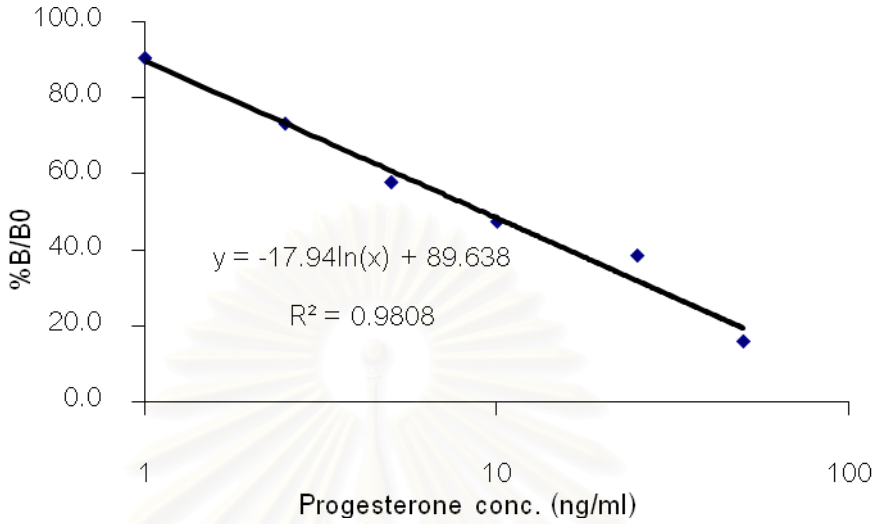
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของการวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA

ตารางที่ ก.3 ผลการหาความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่เหมาะสมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

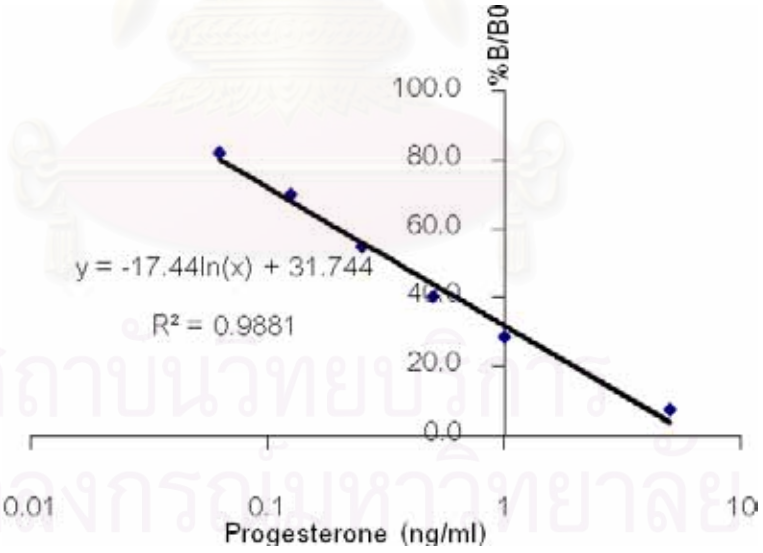
ความเข้มข้นโพรเจสเทอโรน (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร		
0	1.402	1.348	1.377
0.24	1.391	1.369	1.398
0.49	1.261	1.275	1.266
0.98	1.287	1.281	1.298
1.95	1.241	1.269	1.251
3.9	1.176	1.168	1.167
7.8	1.063	1.100	1.030
15.63	0.933	0.913	0.910
31.25	0.715	0.710	0.696
62.5	0.477	0.474	0.468
125	0.234	0.232	0.235
250	0.146	0.143	0.146
500	0.106	0.108	0.110
1000	0.097	0.111	0.097



รูปที่ ก.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Rf กับน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของโปรตีนมาตรฐาน ใช้ในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของแอนติบอดีหลังจากทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

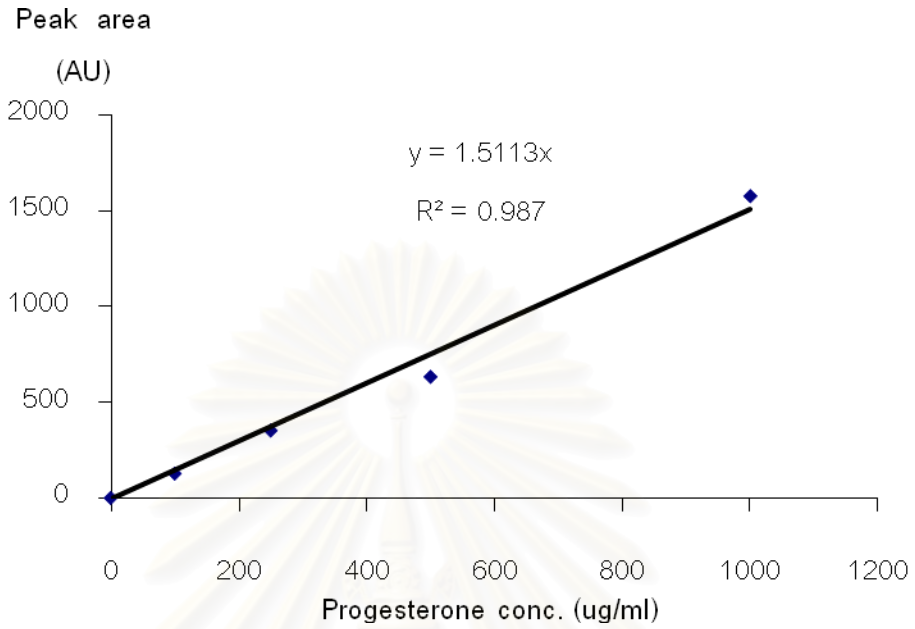


รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบที่เตรียมได้โดยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค



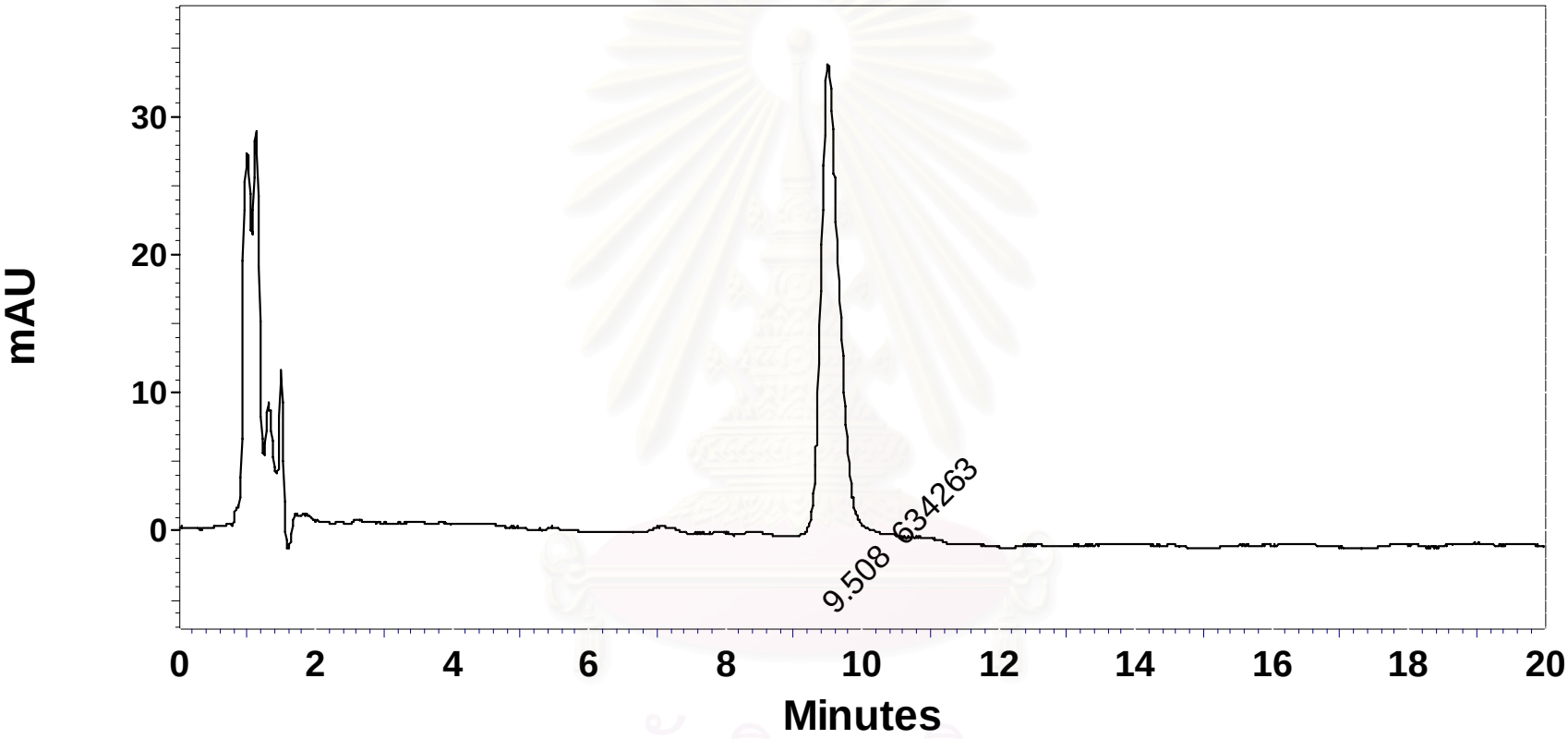
รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของชุดตรวจสอบ EURO-DIANOSTICA ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



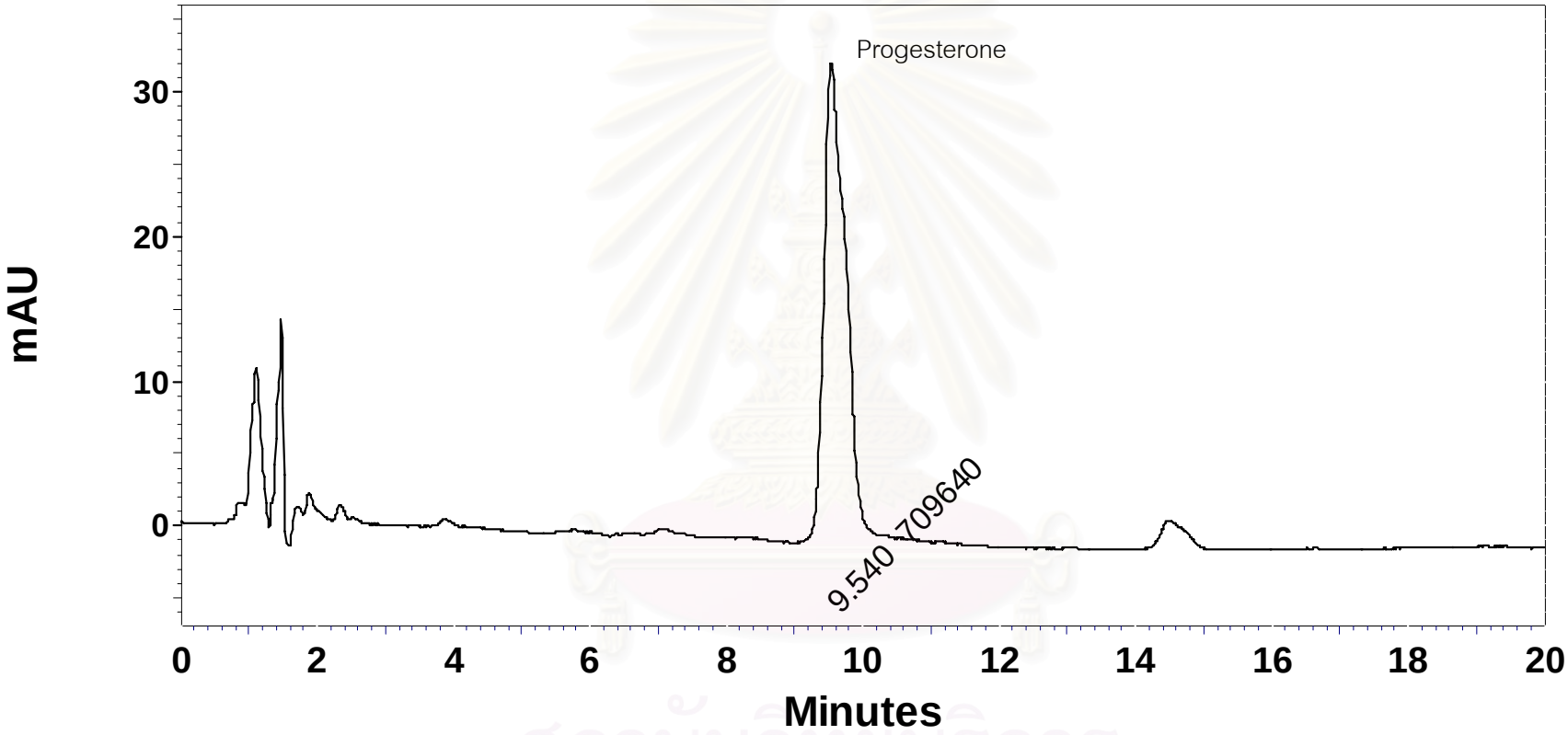
รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของวิธี HPLC ที่ใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรน ในตัวอย่างน้ำนมโค และซีรัมโค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



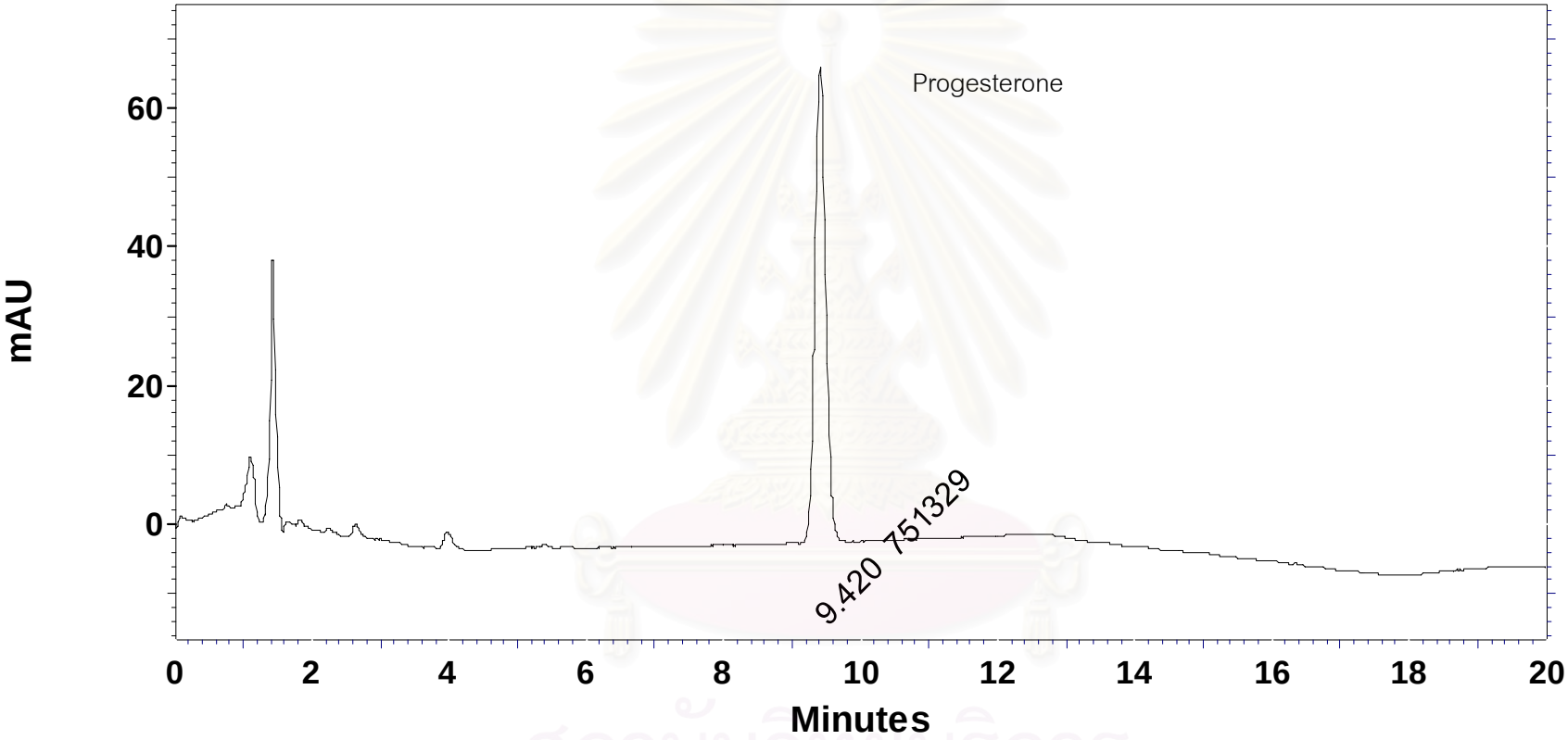
รูปที่ ก.8 โครมาโตแกรมของโพรเจสเทอโรนมาตรฐานความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ก.9 โครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำนมโคที่เติมโพรเจสเทอโรนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ก.10 โครมาโตแกรมของตัวอย่างซีรัมที่เติมโพรเจสเทอโรนให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรที่ได้จากเทคนิค HPLC

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

ชั่ง	RPMI 1640	10.4	กรัม
	$NaHCO_3$	2	กรัม
	L-glutamin	0.1	กรัม
	Glucose	2	กรัม
	Pyruvic acid	0.11	กรัม
	น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารทุกอย่างในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาเก็บเซลล์อย่างถาวรในสภาวะแช่แข็ง (Freezing medium)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640	65	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum	25	มิลลิลิตร
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	10	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (ขณะที่ใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง)

3. การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์ BCA protein assay

<u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

Bovine serum albumin (BSA)	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

นำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ BCA protein assay เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

<u>BCA™ Reagent A และ BCA™ Reagent B</u> (BCA™ Protein Assay Kit ของบริษัท PIERCE) ก่อนใช้ผสม Reagent A : B ในอัตราส่วน 50:1

4. การเตรียมสารละลาย สำหรับใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

1. <u>0.1 M citrate buffer, pH 6 4.5 3.5 และ 3</u>

citric acid 0.1 โมลลาร์ (M)

Na_2HPO_4 0.1 โมลลาร์ (M)

ไตเตรตกรดด้วยด่างจนได้ pH 6 4.5 3.5 และ 3 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2. <u>0.1 M Phosphate buffer, pH 8</u>

ชั่ง NaH_2PO_4 13.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Na_2HPO_4 35.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 8 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3. <u>1 M Tris HCl buffer, pH 9</u>

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 121 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Hydrochloric acid (HCl) 1 M

ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 9 แล้วจึงนำไปกรองด้วย Millipore ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การเตรียมสารสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stracking gel and Separating gel

Reagent	Stacking gel (5%)	Separation gel (10%)
Sterile distilled water (ml)	1.46	3.84
40% Acrylamide gel (ml)	0.25	2.0
1.5 M Tris , pH 8.8 (ml)	-	2.0
1.0 M Tris , pH 6.8 (ml)	0.25	-
10% SDS (ml)	0.02	0.08
10% APS (ml)	0.02	0.08
TEMED (ml)	0.002	0.0032
final volume (ml)	2	8

2. Sample buffer

SDS	2 %
60 mM Tris (pH 6.8)	
Bromophenol blue	0.01 %
Glycerol	10 %
beta-mercaptoethanol	10 %

3. Running buffer(1X) 1 L

Tris	3.02 กรัม
Glycine	18.8 กรัม
SDS	1.0 กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. Coomassie brilliant blue (250 ml)

Coomassie Brilliant blue R-250	0.25%
Methanol	50%
Acetic acid	10%

5. Destaining solution (1 L)

Methanol	5%
Acetic acid	10%

6. การเตรียมสารละลายสำหรับวัดประสิทธิภาพการเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรน กับโปรตีนพาหะ

1. 0.1 M Sodium bicarbonate buffer, pH 8.5

Na_2CO_3	0.027	โมลลาร์ (M)
$NaHCO_3$	0.063	โมลลาร์ (M)
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. 0.05% TNBS (Picrylsulfonic acid)

Stock 5% TNBS (w/v) ละลายใน methanol

- Picrylsulfonic acid	5	กรัม
- methanol	100	มิลลิลิตร

เจือจาง Stock 5% TNBS เป็น 0.05% TNBS ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 0.1 M Sodium bicarbonate, pH 8.5

3. 10% SDS (Sodium dodecyl sulphate)

SDS	1	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4. 1 N HCl

Conc. HCl	7.7	มิลลิลิตร

ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการเตรียม

1. นำสารละลาย 0.05% TNBS ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
2. เติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ หรือ สารละลายมาตรฐาน ที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 75 ไมโครลิตร
4. เติมสารละลาย 1 N HCl ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 335 นาโนเมตร
6. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของการเชื่อมติด

$$\% \text{ การเชื่อมติด} = \frac{[(\text{ค่าดูดกลืนแสงโปรตีนพาหะ} - \text{ค่าดูดกลืนแสงสารที่เชื่อมติดกับโปรตีน}) \times 100]}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนพาหะ}}$$

7. การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในเทคนิค ELISA

1. 0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4 (Stock reagent)

   ชั่ง NaH_2PO_4 27.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ชั่ง Na_2HPO_4 71.63 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

   ไตเตรตด่างด้วยกรด จนได้ pH 7.4 แล้วเก็บเป็น stock

2. 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), pH 7.4

0.2 M Phosphate buffer, pH 7.4	1	ลิตร
NaCl	175.2	กรัม
น้ำกลั่น	18	ลิตร

   ผสมให้เข้ากัน

3. PBS-Tween 20 (ใช้ Tween 20 ความเข้มข้น 0.05%)

Tween 20	500	ไมโครลิตร
PBS	1000	มิลลิลิตร

4. 5% นมพร่องมันเนย

นมพร่องมันเนย ยี่ห้อ mission	5	กรัม
PBS	100	มิลลิลิตร

   ละลายนมพร่องมันเนยใน PBS (เตรียมใหม่ก่อนใช้งาน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. 0.1 M Sodium acetate buffer, pH 6.0

$C_2H_3O_2$ Na.$3H_2O$ 27.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ไตเตรตด้วย Glacial acetic acid จนได้ pH 6.0 แล้วเก็บใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Substrate TMB

3,3',5,5'- tetramethylbenzidine	1	มิลลิกรัม
0.15 M Phosphate citrate buffer	10	มิลลิลิตร
DMSO	100	ไมโครลิตร
30% H_2O_2	3.4	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7. 1 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	102	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	898	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สุนิสา แก้ววิเศษ เกิดเมื่อวันที่ 10 กันยายน พ.ศ. 2526 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549 และได้นำเสนอผลงานเรื่องชุดตรวจสอบโพรเจสเทอโรนโดยใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์ ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9 มหาวิทยาลัยบรูพา เมื่อวันที่ 14-15 มีนาคม 2551

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย