บทที่ 3

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทดลองและผลของการทดลอง

1. การเก็บสารตัวอย่าง

ซีรัมที่ใช้เป็นสารตัวอย่างสำหรับหาปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนแบ่งเป็น 2 พวกคือ

1.1 ซีรัมที่ได้จากควายตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน ($PGF_{2\alpha}$) โดยทำการเจาะเลือดระหว่าง 10 วันก่อนและ 30 วันหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดินเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 10:00 นาฬิกาของทุกๆ วัน แต่จะเพิ่มเก็บทุก 24 ชั่วโมงในวันแรก ทุก 12 ชั่วโมงในวันที่สองและทุก 3 ชั่วโมงในวันที่สามหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดิน

1.2 คอนโทรลซีรัม (control serum) เป็นซีรัมธรรมดาที่ได้จากการเจาะเลือดควายโดยเลือกเอามา 3 ตัวอย่างที่มีระดับของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนต่างกัน 3 ระดับ ใช้สำหรับควบคุมมาตรฐานการปฏิบัติงาน

ซีรัมทั้ง 2 พวกได้จากการเจาะเลือดแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 4-6 ชั่วโมงแล้วจึงปั่นแยกซีรัมออกมาซีรัมที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมน้ำยาและอุปกรณ์ในการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลาย 0.07 M. บาบิทูรอล บัฟเฟอร์ พีเอช 8.6 ใช้บาร์บิทอลโซเดียม 14.433 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่า 8.6 ด้วยกรดเกลือหรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.2 การเตรียมสารละลาย 0.5 M.ฟอสเฟท บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ใช้ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟทได-ไฮเดรท 74.5 กรัมและโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟท

11.2 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรปรับพีเอชให้ได้ค่า 7.5 ด้วยกรดเกลือหรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.3 การเตรียมสารละลาย 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ใช้ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟท ได-ไฮเดรท 7.44 กรัมและ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟท 1.117 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรปรับพีเอชให้ได้ค่า 7.5 ด้วยกรดเกลือหรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.4 การเตรียมสารละลาย 0.01 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ใช้ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟท ได-ไฮเดรท 1.45 กรัมและ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.223 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรปรับพีเอชให้ได้ค่า 7.5 ด้วยกรดเกลือหรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.5 การเตรียมแอลบูมินบัฟเฟอร์ ใช้แอลบูมินจากมนุษย์ 500 มิลลิกรัมละลายใน 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

2.6 การเตรียมสารละลายของซีรัมควายความเข้มข้น 1 : 4 ใช้ซีรัมของควายที่มีปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนต่ำ 1 ส่วนละลายด้วย 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาณ 4 ส่วนโดยปริมาตร

2.7 การเตรียมแอนติบอดีชนิดแรก ความเข้มข้น 1 : 70,000 ร่วมกับซีรัมของกระต่ายปกติ ความเข้มข้น 1 : 300 ใช้แอนติบอดีชนิดแรกคือ AS-LH 901 ความเข้มข้น 1 : 100 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรและซีรัมกระต่ายปกติ 0.24 มิลลิลิตร ละลายรวมกับแอลบูมินบัฟเฟอร์ 69.66 มิลลิลิตรซึ่งได้ปริมาตรทั้งหมด 70 มิลลิลิตร

2.8 การเตรียมแอนติบอดีชนิดที่สอง ความเข้มข้น 1 : 21 ใช้แอนติบอดีชนิดที่สองคือ anti-rabbit γ-globulin from sheep 1 ส่วนละลายด้วยแอลบูมินบัฟเฟอร์ 21 ส่วนโดยปริมาตร

2.9 การเตรียมเครื่องแก้วเคลือบด้วยซิลิโคน เครื่องแก้วพวกหลอดทดลอง ปลาสเตอร์ปิเป็ทและคอลัมน์ต้องเคลือบด้วยซิลิโคนก่อนที่จะใช้โดยละลายซิลิโคนใน อัลกอฮอร์หรืออะซิโทน (ใช้ซิลิโคน 0.2 เปอร์เซนต์) เทลงเคลือบภายในช่องเครื่องแก้ว แล้วเทออกให้หมดนำไปทำให้แห้งโดยอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงระวังอย่าให้กระทบกับความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสทันทีเพราะจะทำให้ ซิลิโคนไหม้

2.10 การเตรียมเซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตรยาว 15-20 เซนติเมตรละลายเซฟาเดกซ์ จี- 50 ปริมาณ 1.5 กรัมใน ในสารละลาย 0.07 M. บาร์บิทูรอลบัฟเฟอร์ พีเอช 8.6 เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 4 องศาเซลเซียสค้างคืนแล้วเติมลงในคอลัมน์หลังจากนั้นจึงผ่านคอลัมน์ด้วย สารละลายของแอลบูมินจากมนุษย์ 20 กรัมละลายใน 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5

2.11 การเตรียมเซลลูโลสคอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตรยาว 25 เซนติเมตรละลายเซลลูโลสใน 0.01 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือ 4 องศาเซลเซียสค้างคืนแล้วเติมลงใน คอลัมน์ให้ได้ขนาดความสูงประมาณ 10-12 เซนติเมตร

3. การติดฉลากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยไอโอดีน- 125

3.1 วิธีการติดฉลาก

3.1.1 เติม 0.5 มิลลิคูรีของ $Na^{125}I$ ใน 50 ไมโครลิตรของ 0.5 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 ลงในหลอดทดลองสำหรับใช้ในการติดฉลากรังสี

3.1.2 เติมสารมาตรฐานลูทีไนซิ่งฮอร์โมน [LH(bLH - DSA)] 5 ไมโครกรัมใน 25 ไมโครลิตรของ 0.5 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5

3.1.3 เขย่าให้เข้ากันเล็กน้อยด้วยเครื่องเขย่า

3.1.4 เติมคลอรามีน-ที (ละลายคลอรามีน-ที 20 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตรของ 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5) ลงไป 25 ไมโครลิตร

3.1.5 เขย่าให้เข้ากันทันทีโดยใช้เครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 วินาที

3.1.6 หยุดปฏิกริยาโดยการเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ (ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 2 มิลลิกรัมใน 10 มิลลิลิตรของ 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5) 200 ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.1.7 เติมโปแตสเซียมไอโอไดด์ (ละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ 20 มิลลิกรัมใน 0.05 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร) ลงไป 200 ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากันเล็กน้อย

3.1.8 ดูดสารละลายทั้งหมดเติมลงในเซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์ด้วยหลอดปาสเตอร์ปิเป็ทที่เคลือบด้วยซิลิโคนแล้ว

3.1.9 ล้างหลอดทดลองด้วยโปแตสเซียมไอโอไดด์ในข้อ 3.1.7 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรแล้วเติมลงในคอลัมน์อีก

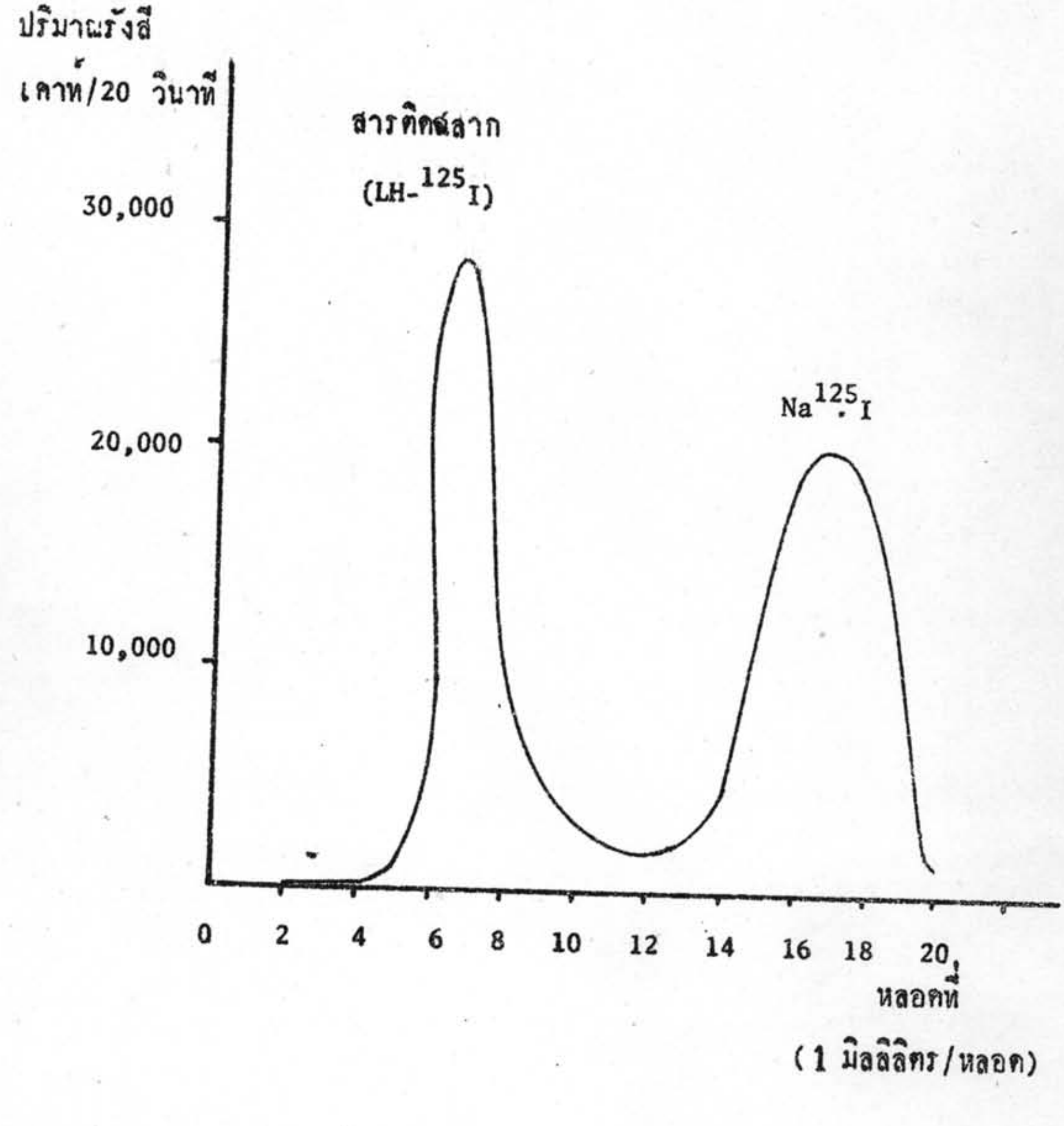
3.2 <u>การทำสารติดฉลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1</u>

หลังจากเติมสารที่ติดฉลากแล้วก็เปิดคอลัมน์โดยการผ่านคอลัมน์ด้วย 0.05 M ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาในหลอดทดลองขนาด 3 มิลลิลิตรหลอดละ 1 มิลลิลิตรเก็บทั้งหมดประมาณ 20 หลอด (ในหลอดที่ 4-10 ควรจะเติมแอลบูมินบัฟเฟอร์ลงไปหลอดละ 0.1 มิลลิลิตรก่อนเพื่อรองรับสารละลายที่ได้จากคอลัมน์) หลังจากนั้นนำแต่ละหลอดไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา จากการผ่านเซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์ สารติดฉลากที่ได้จะออกมาก่อนเป็นส่วนแรกประมาณหลอดที่ 6-10 และส่วนของไอโอดีนที่ไม่ได้ทำปฏิกริยาจะออกมาเป็นส่วนที่สองประมาณหลอดที่ 14-19 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทำสารติดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 ด้วยเซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์

หลอดที่ (1 มิลลิลิตร/หลอด)	ปริมาณรังสี (เคาท์/ 20 วินาที)	
1	33	
2	39	
3	37	
4	33	
5	32	
6	8,028	
7	28,168	$LH-^{125}I$
8	13,686	(สารที่ติดฉลากได้)
9	5,817	
10	3,387	
11	2,642	
12	1,998	
13	1,909	
14	3,340	
15	7,809	
16	14,109	$Na^{125}I$
17	16,397	
18	9,871	
19	4,019	
20	2,367	

รูปที่ 1 กราฟแสดงผลของการทำสารติดฉลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 (ด้วยเซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์)



3.3 การทำสารติดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2

การทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 นี้ใช้เซลลูโลสคอลัมน์โดยการเติมสารติดสลากที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งแรก (คือสารรังสีในหลอดที่ 6-10 จากตารางที่ 1) ลงในเซลลูโลสคอลัมน์ที่เตรียมไว้แล้วผ่านคอลัมน์ด้วย 0.01 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ด้วยหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตรหลอดละ 3 มิลลิลิตรคอยตรวจปริมาณรังสีในหลอดทดลองที่เก็บได้แต่ละหลอดโดยใช้เครื่องวัดรังสีแกมมาซึ่งส่วนของฮอร์โมนที่ถูกทำลายจะออกมาเป็นส่วนแรกเก็บต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งปริมาณรังสีที่วัดได้ลดลงจึงเติมซีรัมม้าปกติ 2 มิลลิลิตรซึ่งละลายด้วย 4 มิลลิลิตรของ 0.5 M. ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ลงไปในคอลัมน์เพื่อเป็นตัวดึงเอาส่วนของสารติดสลากที่ติดอยู่ในคอลัมน์ออกมา เก็บสารละลายที่ได้ออกมาในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตรเช่นเดิม สารติดสลากที่ได้จะออกมาพร้อมกับสารละลายของซีรัมม้าปกติที่เติมลงไป ตรวจได้จากปริมาณรังสีที่ออกมาโดยการวัดด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมาเช่นเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

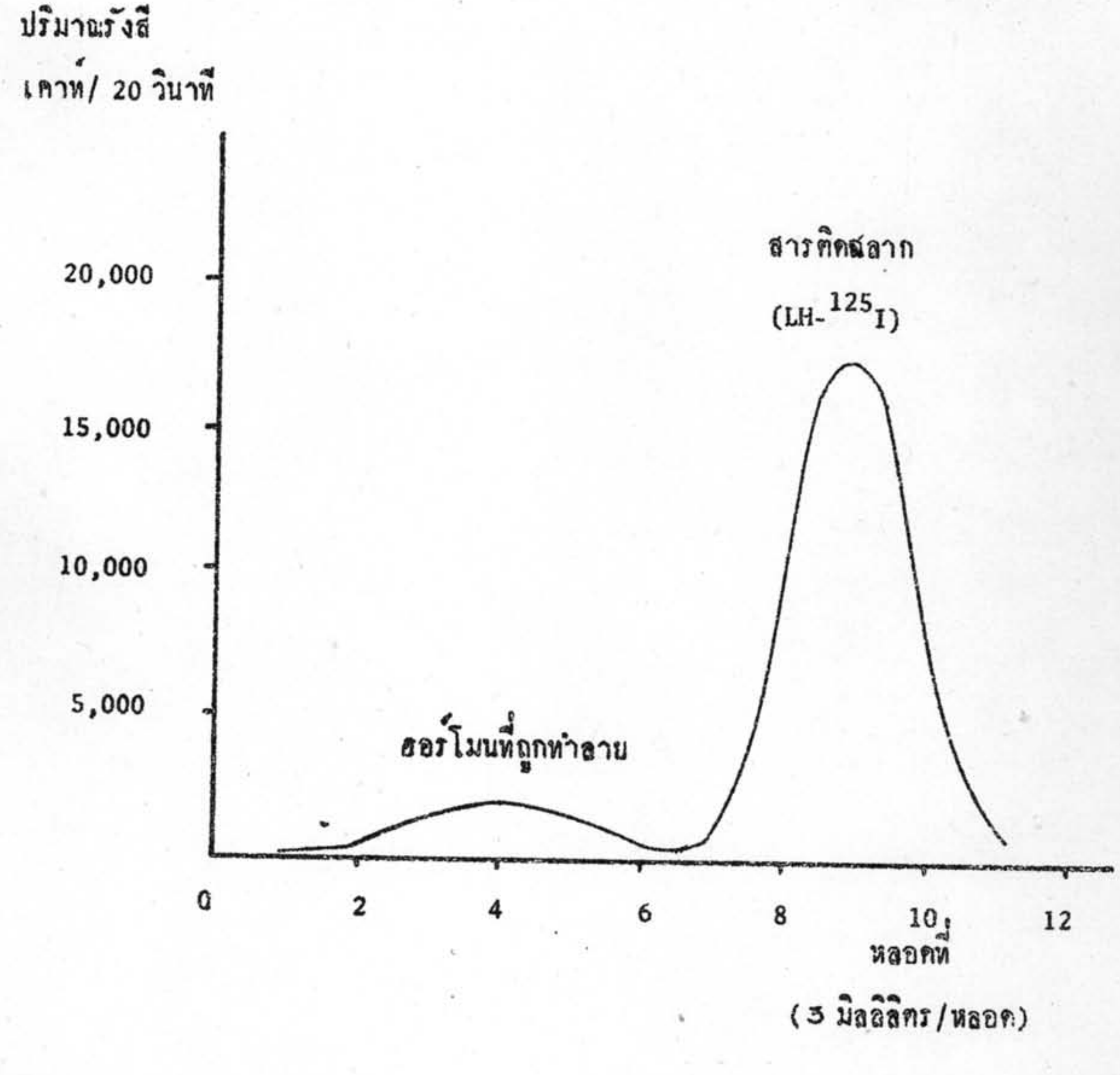
004964

i 17432017

ตารางที่ 2 ผลการทำสารติดสลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วยเซลลูโลสคอลัมน์

หลอดที่ (3 มิลลิลิตร/หลอด)	ปริมาณรังสี เคาท์/ 20 วินาที	
1	36	
2	27	
3	1,371	ฮอร์โมนที่ถูกทำลาย
4	1,636	
5	726	
6	413	
7	415	
8	12,149	สารติดสลากที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว
9	17,609	
10	5,166	
11	1,026	

รูปที่ 2 กราฟแสดงผลของการทำสารติดฉลากให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2
(ด้วยเซลลูโลสคอลัมน์)



3.4 การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากที่ได้

การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดฉลาก ทำการทดลองโดยการใช้วิธีของเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซิส (paper electrophoresis) และแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.4.1 การหาผลผลิตของสารติดฉลาก

3.4.2 การหาความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 แล้วโดยการผ่านเซฟาเดกซ์ จี-50 คอลัมน์

3.4.3 การหาความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 โดยการผ่านเซลลูโลสคอลัมน์

วิธีการทดลองเปเปอร์อีเลคโตรโฟรีซิส (Sargent, 1969) ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ความยาว 30 เซนติเมตรกว้าง 4 เซนติเมตรใช้เส้นดินสอแบ่งกระดาษกรองออกเป็น 19 ช่องๆ ละ 1 เซนติเมตรและให้อยู่บริเวณส่วนกลางของความยาวของกระดาษกรองจุ่มกระดาษกรองลงในบาร์บิโทนบัฟเฟอร์ พีเอช 8.6 แล้ววางลงในถาดอีเลคโตรโฟรีซิสซึ่งบรรจุบาร์บิโทนบัฟเฟอร์ไว้โดยให้ปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์คนละด้านของถาดปล่อยให้กระแสไฟฟ้าผ่านตลอดกระดาษกรองประมาณ 15 นาทีเพื่อให้อยู่ในภาวะสมดุลหลังจากนั้นจึงหยอดสารตัวอย่างด้วยไมโครปิเป็ทประมาณ 10 ไมโครลิตรลงไประหว่างกลางช่องที่ 1 ของกระดาษกรองที่แบ่งไว้ซึ่งอยู่ชิดทางด้านขั้วลบแล้วปล่อยให้กระแสไฟฟ้าไหลผ่านใช้กระแส 240 มิลลิแอมแปร์ใช้เวลาทั้งหมด 45 นาที หลังจากนั้นนำกระดาษกรองออกมาผึ่งให้แห้งแล้วจึงตัดแบ่งออกเป็นช่องๆ ตามที่แบ่งไว้นำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมาโดยวัดทีละช่องซึ่งผลของการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การหาผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดสลาก

กระดาษกรองช่องที่	$Na^{125}I$ เคาท์/5 วินาที		สารติดสลาก (หลังจากการติดสลาก) เคาท์/ 5 วินาที		สารติดสลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 เคาท์/5 วินาที		สารติดสลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 เคาท์/5 วินาที	
1	68		94,170	สารติดสลาก 122,493	5,902	สารติดสลาก 10,548	7,877	สารติดสลาก 23,389
2	66		9,463		3,372		6,904	
3	62		9,836		704		5,802	
4	69		9,024		570		2,806	
5	58		1,674		134		230	
6	57		2,158		136		123	
7	57		2,174		153		118	
8	65		2,770		85		102	
9	554	$Na^{125}I$ 63,777	8,549	$Na^{125}I$ 99,089	59		246	$Na^{125}I$ 711
10	521		45,101		459	$Na^{125}I$ 912	308	
11	15,894		41,407		453		157	
12	45,372		4,032		96		92	
13	1,436		74		92		80	
14	63		64		70		64	
15	57		62		63		67	
16	57		58		59		60	
17	60		68		60		62	
18	59		70		58		58	
19	62		69		63		56	
รวม	64,637		230,823		12,288		25,089	

การคำนวณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดฉลาก (คำนวณจากค่าในตารางที่ 3)

เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของ $Na^{125}I$ ที่ใช้ $= \frac{63,777}{64,637} \times 100 = 98.67$ %

เปอร์เซนต์ผลผลิตของการติดฉลาก $= \frac{122,493}{230,823} \times 100 = 53.07$ %

เปอร์เซนต์ $Na^{125}I$ หลังจากการติดฉลาก $= \frac{99,089}{230,823} \times 100 = 42.93$ %

เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1

$$= \frac{10,548}{12,288} \times 100 = 85.83 \%$$

เปอร์เซนต์ $Na^{125}I$ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 $= \frac{912}{12,288} \times 100 = 7.42$ %

เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2

$$= \frac{23,389}{25,089} \times 100 = 93.22 \%$$

เปอร์เซนต์ $Na^{125}I$ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 $= \frac{711}{25,089} \times 100 = 2.83$ %

สูตรที่ใช้คำนวณหาค่าทางสถิติ

ค่าที่อ่านได้จากการทดลอง	X	หน่วย
จำนวนครั้งของการทดลอง	n	ครั้ง

ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) $= \sum_{i=1}^{n} \frac{Xi}{n}$

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.) $= \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$

ตารางที่ 4 สถิติของผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากที่คำนวณได้จากการทดลอง

การทดลองที่	เปอร์เซนต์ของการติดฉลาก	เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1	เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของสารติดฉลากหลังจากทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2
1	53.07	85.83	93.22
2	50.13	72.45	90.14
3	65.24	82.16	94.60
4	70.05	85.64	95.03
5	62.72	80.74	91.06
6	54.83	79.18	90.84
7	68.96	81.86	93.17
ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	60.71	81.12	92.58
SD.	8.01	4.53	1.92

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การจัดมาตรฐานการวัดด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเส

หลักในการทดลอง คือ ให้สารฮอร์โมนที่ติดฉลากแล้วและฮอร์โมนที่มีอยู่ในซีรัม หรือฮอร์โมนมาตรฐานที่เตรียมขึ้นทำปฏิกริยากับแอนติบอดีชนิดแรกอินคิวเบทระยะเวลาหนึ่ง แล้วแยกส่วนที่ทำปฏิกริยาและส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยาออกจากกันโดยใช้ตกตะกอนด้วยแอนติบอดีชนิดที่สอง วัดปริมาณรังสีของสารส่วนที่ทำปฏิกริยาเกาะเกี่ยว (bound) เพื่อใช้ในการทดลองคำนวณหาเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยว

สูตรคำนวณที่ใช้ในการทดลองช่วงนี้

$$\text{เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยว} = \frac{B}{B_T} \times 100$$

เมื่อ B = ปริมาณรังสีที่วัดได้ในหลอดทดลอง ซึ่งคือปริมาณรังสีของสารส่วนที่ทำปฏิกริยาเกาะเกี่ยว

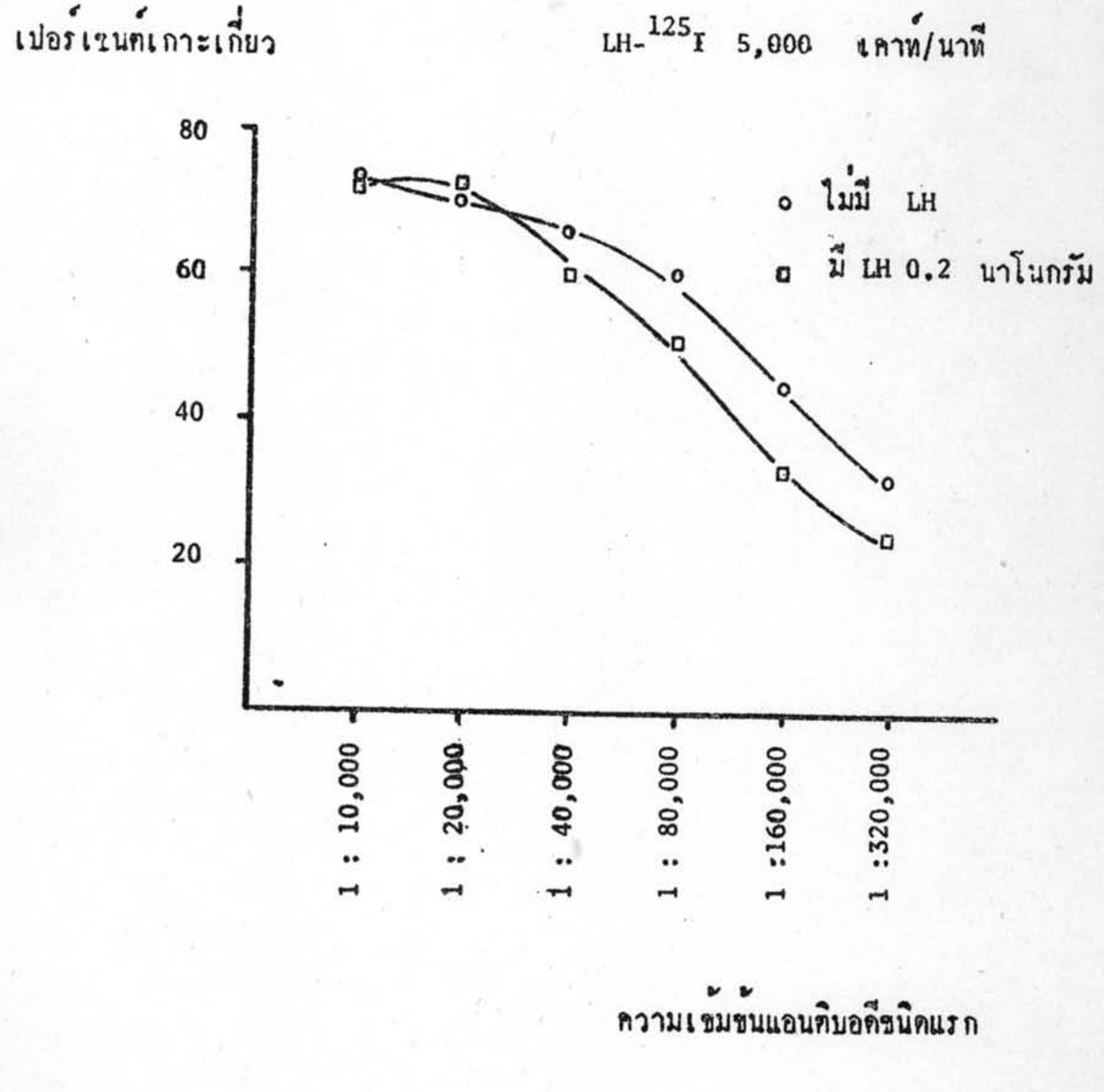
B_T = ปริมาณรังสีทั้งหมดในหลอดทดลอง

การทดลองมีขั้นตอนที่สำคัญดังต่อไปนี้

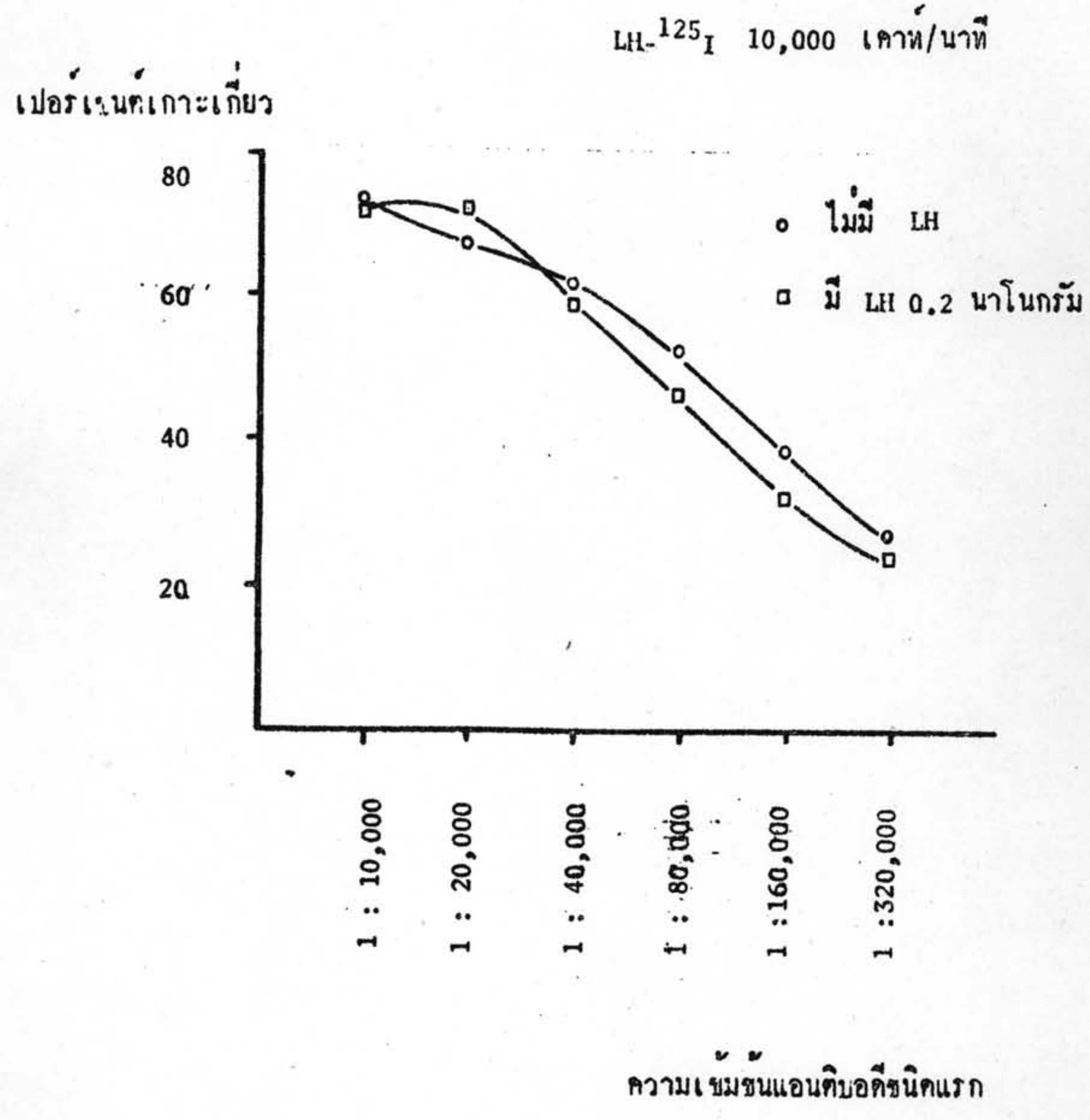
4.1 การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดแรก

แอนติบอดีที่ใช้คือ AS-LH 901 นำมาทดลองทำกราฟความเข้มข้นของแอนติบอดี (antibody dilution curve) โดยการใช้สารติดฉลากทำปฏิกริยากับแอนติบอดีที่ความเข้มข้นต่างๆ กันเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดมาใช้ในการวัดปริมาณฮอร์โมน ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองคือ 1 : 10,000, 1 : 20,000, 1 : 40,000, 1 : 80,000, 1 : 160,000 และ 1 : 320,000 ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้นี้ใช้ควบคู่ไปกับซีรัมของกระต่ายปกติในอัตราความเข้มข้น 1 : 300 การทดลองจะแสดงโดยกราฟระหว่างเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวของสารติดฉลากและแอนติบอดีกับความเข้มข้นของแอนติบอดี กราฟแสดงผลการทดลองอยู่ในรูปที่ 3

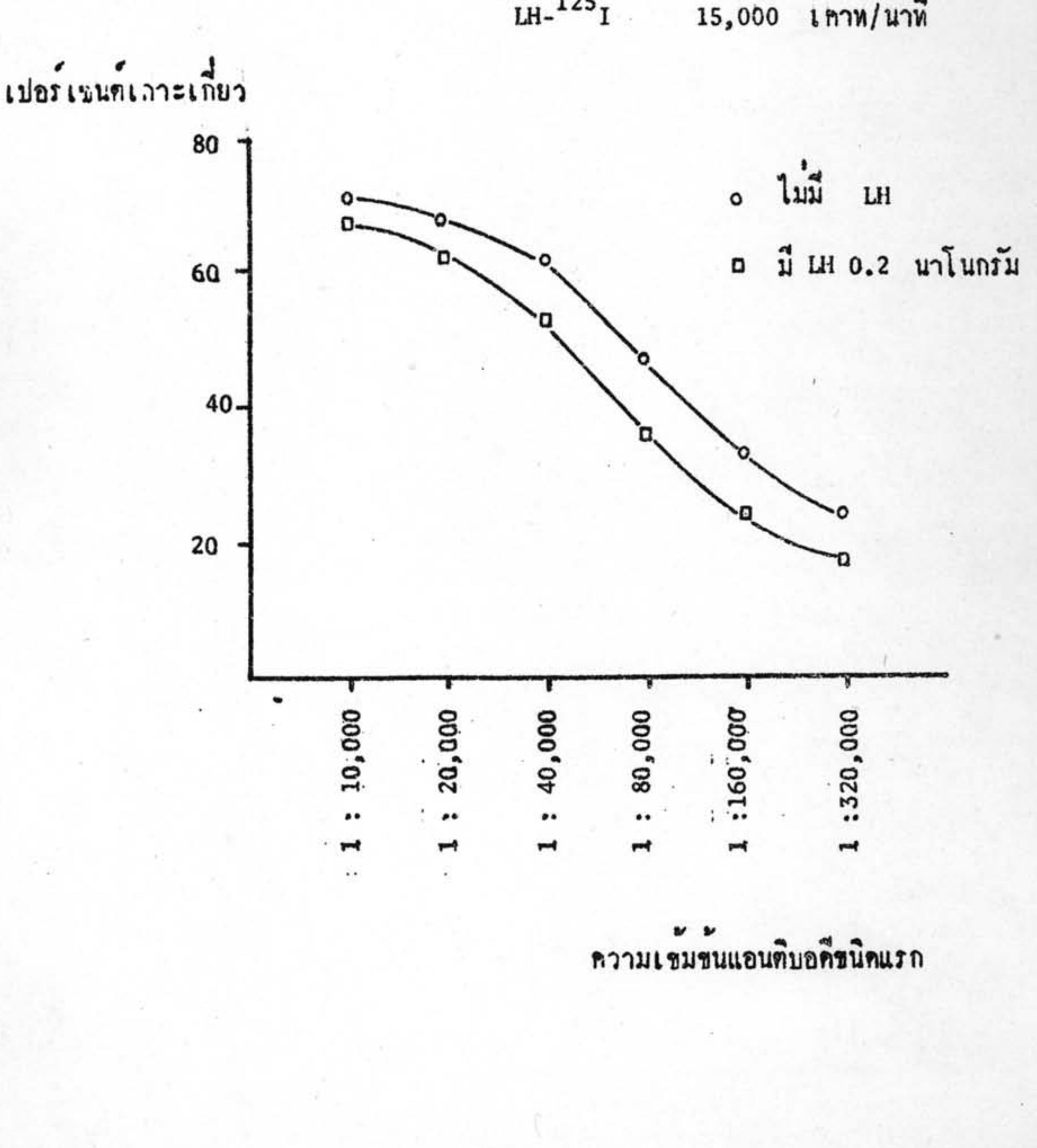
รูปที่ 3 ก. แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดฉลากปริมาณต่างกัน



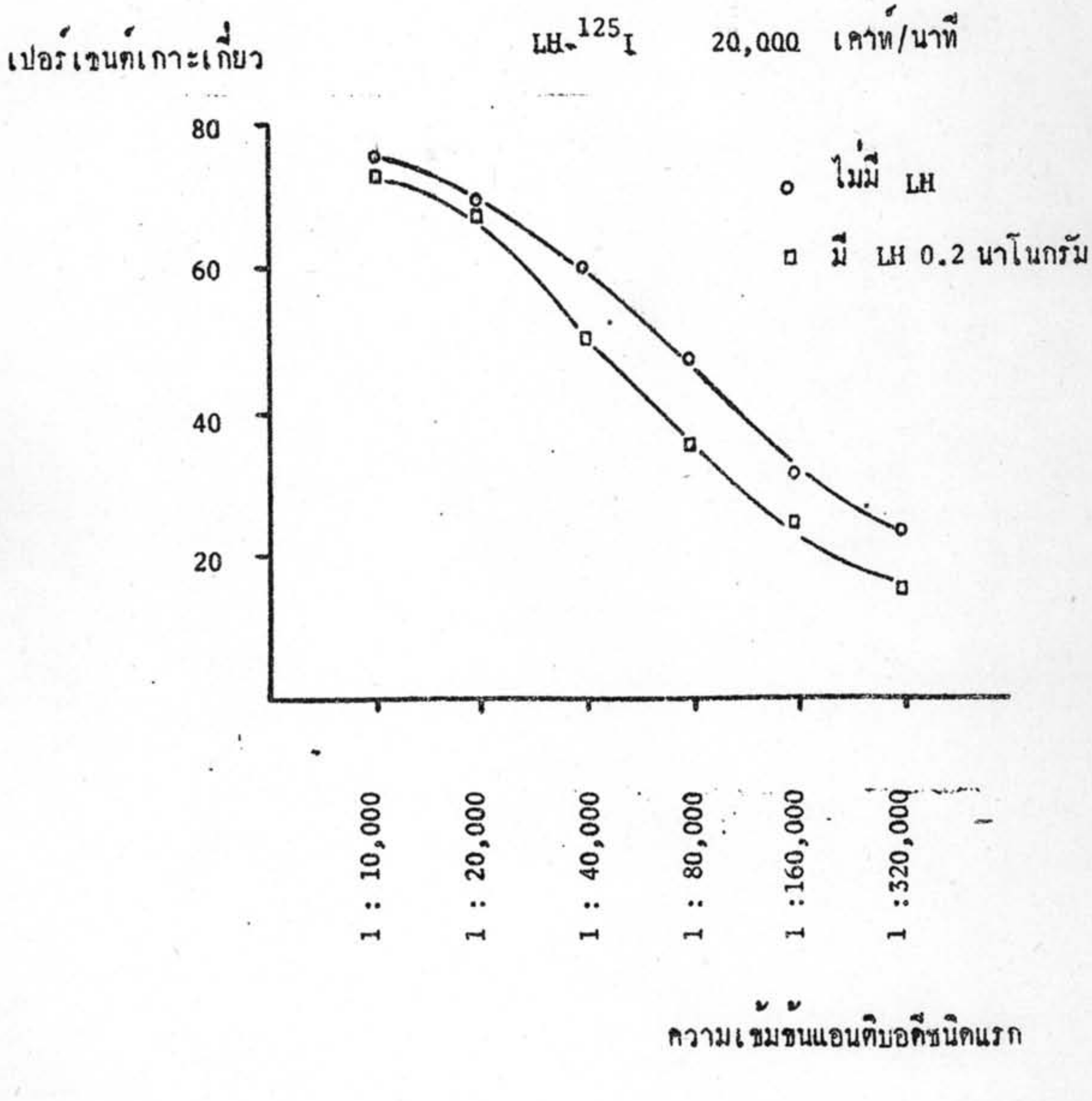
รูปที่ 3 ข. แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดฉลากปริมาณต่างกัน



รูปที่ 3 ค. แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดสลากปริมาณต่างกัน



รูปที่ 3 ง. แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดแรกกับสารติดสลากปริมาณต่างกัน



4.2 การทดลองหาปริมาณสารติดสลากที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาทางเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

เนื่องจากปริมาณของสารติดสลากที่ใช้จะมีผลต่อปฏิกิริยาทางเรดิโอ-อิมมิวโนแอสเสย์จึงได้ทำการทดลองใช้สารติดสลากที่มีค่าปริมาณรังสีต่าง ๆ กันดังนี้คือ 5,000, 10,000, 15,000 และ 20,000 เคาท์/นาที (cpm) เพื่อเลือกค่าปริมาณรังสีที่เหมาะสม

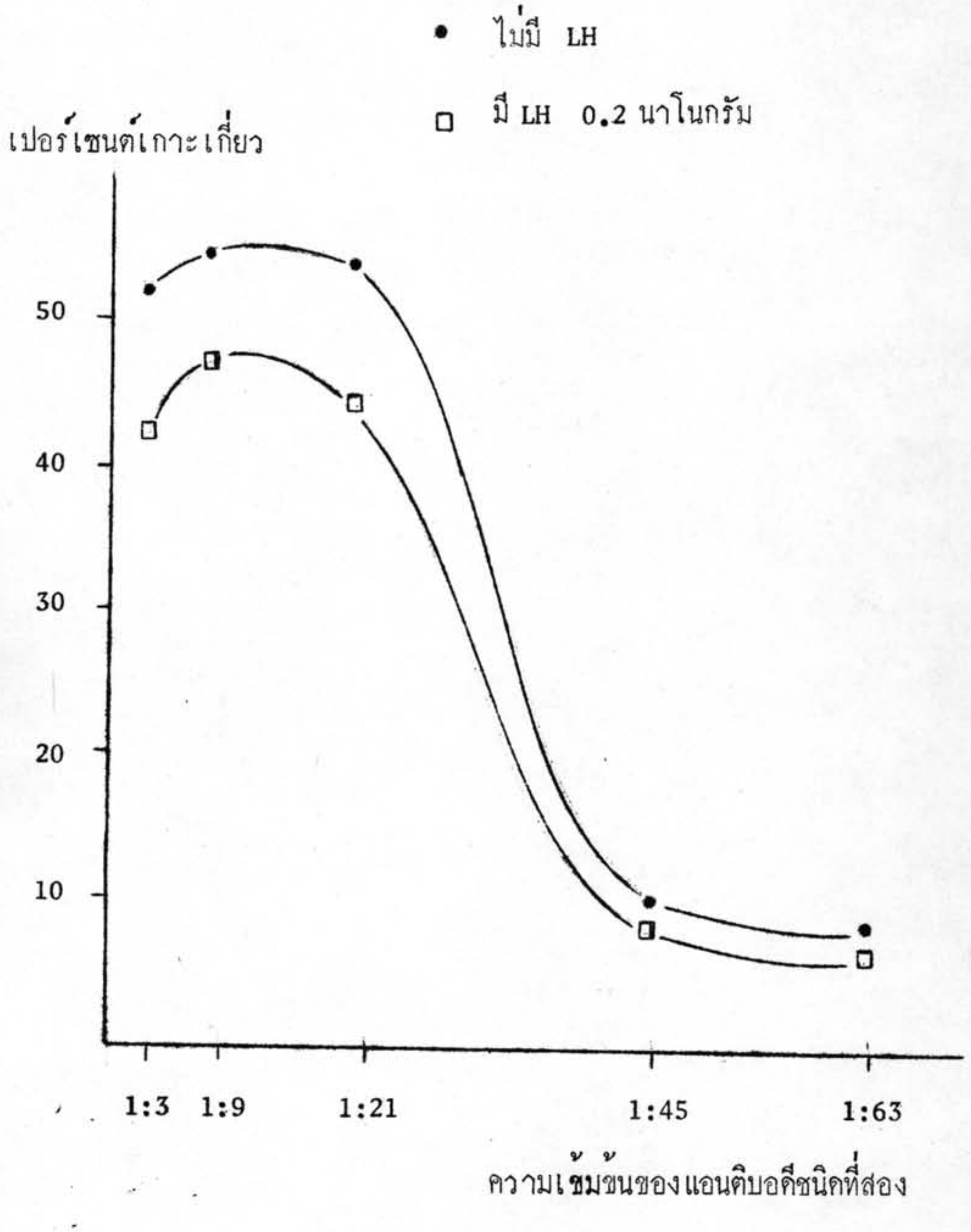
จากการทดลองซึ่งได้แสดงด้วยกราฟในรูปที่ 3 (ก, ข, ค และ ง) ข้างต้นนั้นจะพบว่าเมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดีในหลอดทดลองมากขึ้นจะสามารถรวมกับสารติดสลากหรือสารมาตรฐานได้มากขึ้น ดังนั้นเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวจะสูงขึ้นตามลำดับ แต่การที่จะเลือกความเข้มข้นของแอนติบอดีเท่าใดนั้นจะขึ้นอยู่กับว่าควรจะใช้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ให้เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวสูงพอสมควรซึ่งจะทำให้ได้กราฟมาตรฐานที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนได้ ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 70,000 และใช้ควบคู่กับซีรัมของกระต่ายปกติความเข้มข้น 1 : 300 ส่วนในการเลือกใช้ปริมาณของสารติดสลากเมื่อพิจารณาดูจากกราฟในรูปที่ 3 ทั้งหมดแล้วจะเห็นได้ว่าความแตกต่างของการรวมตัวของแอนติบอดีและสารติดสลากในสภาวะที่เติมกับไม่ได้เติมสารลูทีไนซิงฮอร์โมนมาตรฐานลงไปจะมีค่าแตกต่างกันพอจะเห็นได้ชัดแต่ในช่วงปริมาณรังสีของสารติดสลาก 15,000 เคาท์/นาที จะมีค่าความแตกต่างของการรวมตัวระหว่างกราฟทั้ง 2 เส้นมากที่สุดและลักษณะของกราฟทั้งสองก็ไม่แตกต่างกันดังนั้นในการทดลองจึงได้เลือกใช้สารติดสลากที่มีปริมาณรังสีในช่วงประมาณ 15,000 เคาท์/นาที

4.3 การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดีชนิดที่สอง

ในการทดลองใช้แอนติบอดีในรูปแกมมาโกลบูลินของแอนติบอดีชนิดแรกที่ได้จากแกะ (anti-rabbit γ-globulin from sheep) ทำการทดลองโดยใช้

แอนติบอดีตัวนี้ในความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้ คือ 1 : 3, 1 : 9, 1 : 21, 1 : 45 และ 1 : 63 เขียนกราฟการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4 ระหว่างเปอร์เซ็นต์เกาะเกี่ยวและค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สองนี้

รูปที่ 4 แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของแอนติบอดีชนิดที่สองที่ความเข้มข้นต่างกัน

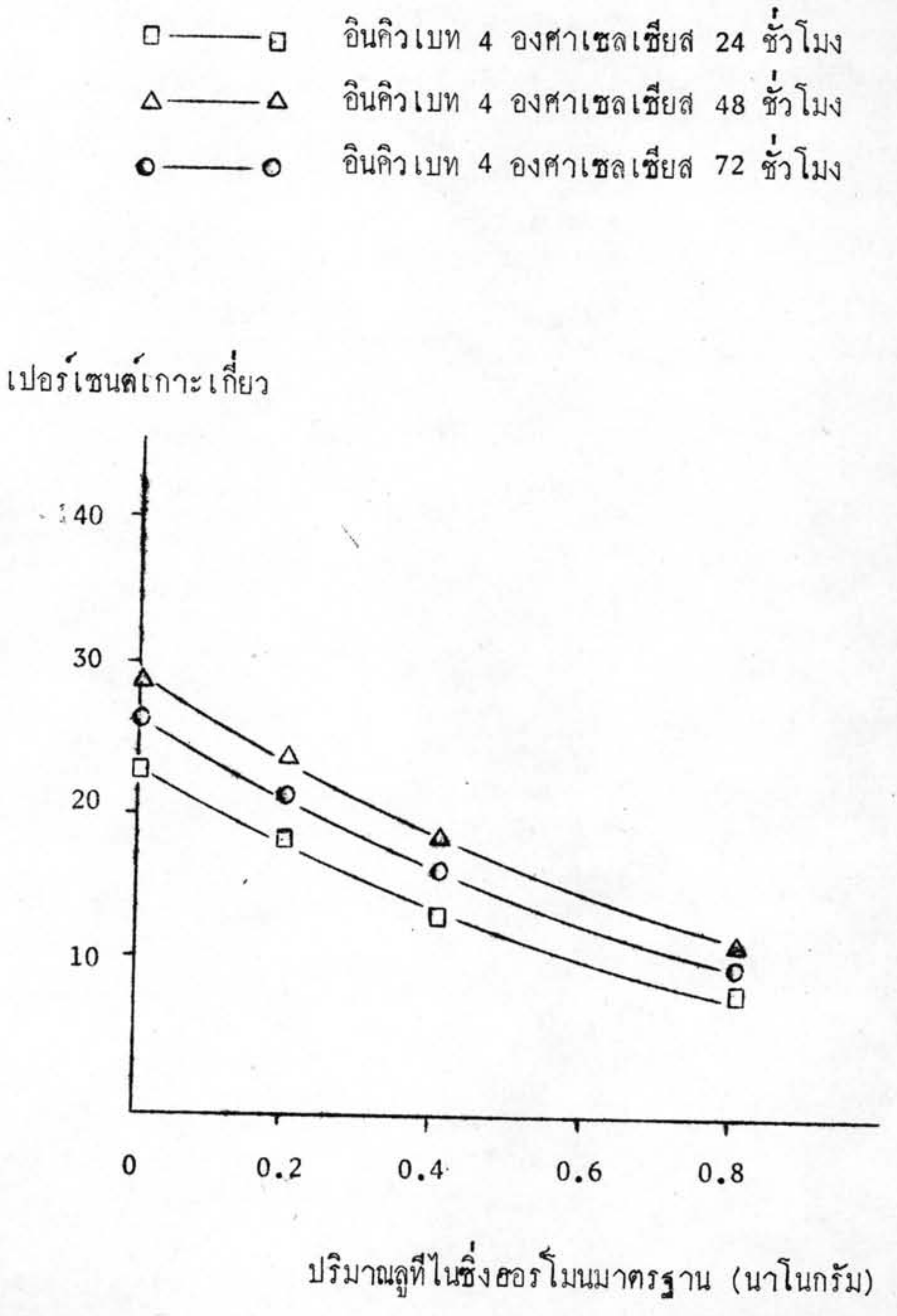


จากกราฟในรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สองสูงขึ้นเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวซึ่งแสดงถึงปฏิกริยาในการรวมตัวจะสูงขึ้นตามลำดับ แต่ค่าความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สองที่ทำปฏิกริยาให้ได้เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวสูงพอที่จะใช้งานได้นั้นจะมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 : 21 ขึ้นไป ดังนั้นในการทดลองจึงได้เลือกใช้ค่าระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีชนิดที่สอง 1 : 21 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถจะใช้งานในการทดลองได้

4.4 <u>การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท</u>

เนื่องจากเวลาอินคิวเบทในช่วงหลังจากเติมสารติดสลากลงไปในหลอดทดลองแล้ว จะเป็นช่วงที่มีความสำคัญต่อปฏิกริยาการรวมตัวที่จะเกิดขึ้น ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อจะหาช่วงระยะเวลาที่ทำให้ปฏิกริยาถึงจุดสมดุลโดยการอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟในรูปที่ 5

รูปที่ 5 แสดงอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบท



หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองซึ่งแสดงโดยกราฟในรูปที่ 5 นั้นจะได้กราฟที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่การอินคิวเบทหลังจากเติมสารติดฉลากแล้วในช่วงระยะเวลา 48 ชั่วโมงจะให้เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวที่สูงที่สุดถึงแม้ว่าจะเพิ่มเวลาอินคิวเบทขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง แต่เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวไม่ได้สูงเพิ่มขึ้นอีกเลย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการอินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสในช่วงระยะเวลา 48 ชั่วโมงจะเป็นช่วงที่เกิดปฏิกริยาในการรวมตัวได้สูงที่สุด

5. <u>การวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส</u>

ขั้นตอนที่สำคัญของการทดลองมีตามลำดับดังนี้ คือ

5.1 <u>วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน</u>

เตรียมจากลูทีไนซิ่งฮอร์โมนมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/0.1 มิลลิลิตร นำมาทำอนุกรมการละลายดังตารางอนุกรมการละลายสำหรับการเตรียมฮอร์โมนมาตรฐานเพื่อให้ได้ปริมาณของฮอร์โมนมาตรฐานต่างๆ กันในแต่ละหลอดทดลอง

อนุกรมการละลายสำหรับการเตรียมฮอร์โมนมาตรฐาน

1.	0.2 ml	ของสารมาตรฐาน	+ 0.8 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 1.0 ml - 200 ng/0.1 ml	(1)
2.	0.5 ml	(1)	+ 4.5 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 5.0 ml - 20 ng/0.1 ml	(2)
3.	0.5 ml	(2)	+ 2.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.5 ml - 4.0 ng/0.1 ml	(3)
4.	0.3 ml	(2)	+ 1.7 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml - 3.0 ng/0.1 ml	(4)
5.	0.5 ml	(2)	+ 4.5 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 5.0 ml - 2.0 ng/0.1 ml	(5)
6.	1.0 ml	(4)	+ 1.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml - 1.5 ng/0.1 ml	(6)
7.	2.0 ml	(5)	+ 2.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 4.0 ml - 1.0 ng/0.1 ml	(7)
8.	1.0 ml	(3)	+ 4.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 5.0 ml - 0.8 ng/0.1 ml	(8)
9.	0.5 ml	(4)	+ 2.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.5 ml - 0.6 ng/0.1 ml	(9)
10.	0.5 ml	(3)	+ 4.5 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 5.0 ml - 0.4 ng/0.1 ml	(10)
11.	1.0 ml	(9)	+ 1.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml - 0.3 ng/0.1 ml	(11)
12.	1.0 ml	(10)	+ 1.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml - 0.2 ng/0.1 ml	(12)
13.	1.0 ml	(12)	+ 1.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml - 0.1 ng/0.1 ml	(13)
14.	1.0 ml	(13)	+ 1.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml -0.05 ng/0.1 ml	(14)
15.	1.0 ml	(14)	+ 1.0 ml	แอลบูมินบัฟเฟอร์	= 2.0 ml -0.025 ng/0.1 ml	(15)

หลังจากเตรียมอนุกรมการละลายของฮอร์โมนมาตรฐานแล้วดำเนินการทดลองต่อไปตามข้อ 5.2 เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน

5.2 <u>วิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเส</u>

ขั้นตอนและรายละเอียดของวิธีการทำมีดังต่อไปนี้

5.2.1 เตรียมหลอดพลาสติคขนาด 3 มิลลิลิตรบรรจุลูทีไนซิ่งฮอร์โมนมาตรฐานตามลำดับความเข้มข้นจากการทำอนุกรมการละลายตั้งแต่ 0 ถึง 1.5 นาโนกรัม/หลอดทดลอง อย่างละ 3 หลอดหลอดละ 0.1 มิลลิลิตรแล้วเติมแอลบูมิน-บัฟเฟอร์ลงไปหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร และเติมซีรัมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 หลอดหลอดละ 0.2 มิลลิลิตร

5.2.2 เตรียมแอนติบอดีชนิดแรกคือ AS-LH 901 ความเข้มข้น 1 : 70,000 ร่วมกับซีรัมของกระต่ายปกติความเข้มข้น 1 : 300 เติมสารละลายที่เตรียมได้ดังกล่าวลงในหลอดทดลองในข้อ 5.2.1 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร

5.2.3 เติมซีรัมของควายที่มีปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนต่ำความเข้มข้น 1 : 4 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตรทุกหลอด

5.2.4 อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน (16-24 ชั่วโมง)

5.2.5 เติมลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ติดสลากแล้วในปริมาณรังสีประมาณ 15,000 เคาท์/นาทีต่อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

5.2.6 อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 48 ชั่วโมง

5.2.7 เติมแอนติบอดีชนิดที่สองความเข้มข้น 1 : 21 ลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร

5.2.8 อินคิวเบทที่ 4 องศาเซลเซียสค้างคืน (16-24 ชั่วโมง)

5.2.9 เติม 0.05 M.ฟอสเฟทบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ลงไปหลอดละ 1.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปแยกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียสความเร็ว 3,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 20 นาที

5.2.10 เทส่วนของน้ำใสออกแล้วเช็ดบริเวณปากหลอดให้แห้งแล้วนำตะกอนที่ติดอยู่ที่ก้นหลอดทดลองไปวัดค่าปริมาณรังสีด้วยเครื่องวัดรังสีแกมมา

ผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นแสดงไว้ในตารางที่ 5 ก. และตารางที่ 5 ข.

ตารางที่ 5 ก. ปริมาณรังสีทั้งหมดในหลอดทดลอง (ก่อนแยก)
(เลือกนำมาวัดประมาณ 10 หลอดเพื่อหาค่าเฉลี่ย)

หลอดที่	ปริมาณรังสี เคาท์/นาที
1	12,721
2	12,305
3	12,660
4	12,565
5	12,637
6	12,595
7	12,544
8	12,709
9	12,479
10	12,807
ปริมาณรังสีโดยเฉลี่ย =	12,602 เคาท์/นาที

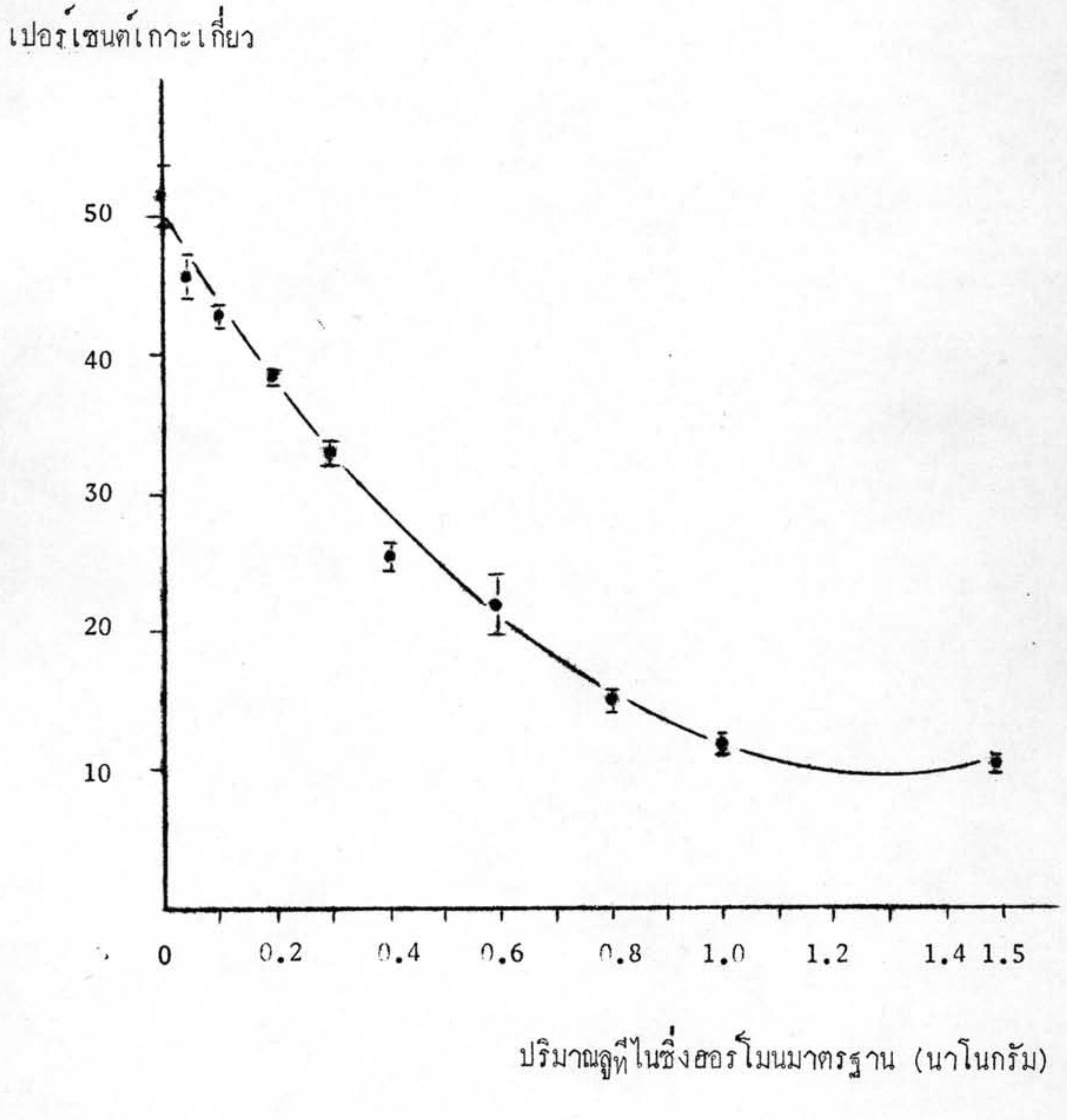
ตารางที่ 5 ข. ปริมาณรังสีในหลอดทดลองหลังจากแยกเอาส่วนที่ไม่ตกตะกอนออกแล้ว

หลอดทดลองที่มีฮอร์โมนมาตรฐาน นาโนกรัม/หลอด	ปริมาณรังสี เคาท์/นาที	เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยว	เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	6,231	49.4	
0	6,891	54.7	51.8 ± 2.7
	6,453	51.2	
	5,750	45.6	
0.05	5,663	44.9	46.1 ± 1.5
	6,018	47.7	
	5,508	43.7	
0.1	5,720	45.2	43.7 ± 1.5
	5,325	42.3	
	4,884	38.8	
0.2	4,902	38.9	38.8 ± 0.1
	4,881	38.7	
	4,256	33.8	
0.3	4,167	33.1	33.2 ± 0.6
	4,114	32.6	
	3,383	26.8	
0.4	3,199	25.4	25.8 ± 0.8
	3,192	25.3	

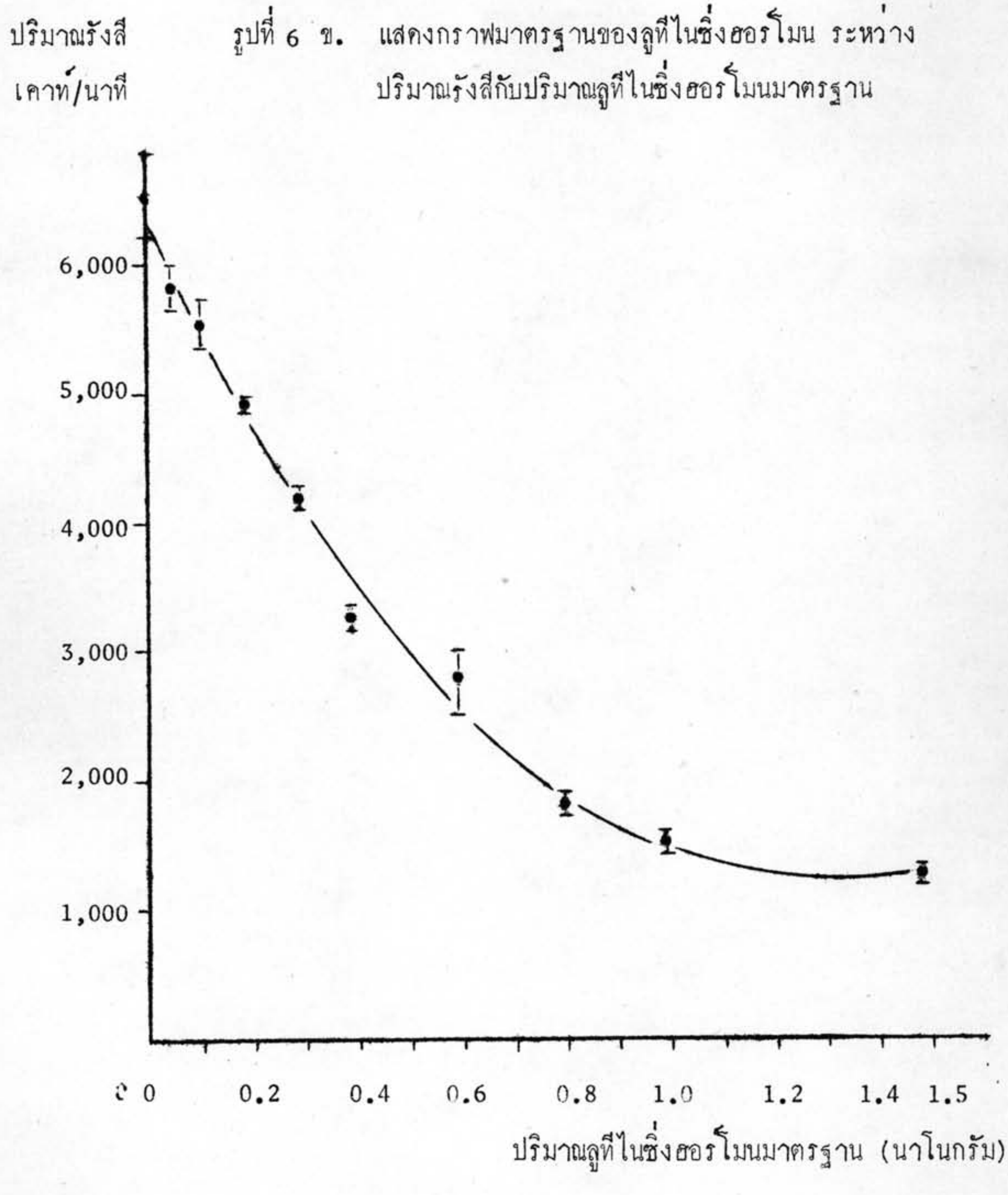
ตารางที่ 5 ข. (ต่อ) ปริมาณรังสีในหลอดทดลองหลังจากแยกเอาส่วนที่ไม่ตกตะกอนออกแล้ว

หลอดทดลองที่มีฮอร์โมนมาตรฐาน นาโนกรัม/หลอด	ปริมาณรังสี เคาท์/นาที	เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยว	เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	2,695	21.4	
0.6	2,614	20.7	22.3 ± 2.2
	3,127	24.8	
	1,852	14,7	
0.8	1,762	14.0	14.3 ± 0.4
	1,808	14.3	
	1,448	11.5	
1.0	1,583	12.6	11.9 ± 0.6
	1,480	11.7	
	1,242	9.8	
1.5	1,147	9.1	9.8 ± 0.7
	1,307	10.4	

รูปที่ 6 ก. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน ระหว่าง เปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวกับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนมาตรฐาน



รูปที่ 6 ข. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน ระหว่าง ปริมาณรังสีกับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนมาตรฐาน



5.3 การคำนวณหาปริมาณฮอร์โมน

จากการทดลองในข้อ 5.1 และ 5.2 ดังกล่าวข้างต้นจะทำให้ได้กราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนซึ่งใช้เป็นมาตรฐานในการวัดหรืออ่านค่าปริมาณฮอร์โมนนี้ในสารตัวอย่างได้ ตัวอย่างเช่น จากการทดลองในข้อ 5.1 สมมุติในหลอดของสารตัวอย่างเมื่อนำไปวัดค่าปริมาณรังสีได้ 3,500 เคาท์/นาทีจะหาปริมาณฮอร์โมนได้โดยอ่านจากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนนี้ซึ่งจากกราฟในรูปที่ 6 ข. ปริมาณรังสีที่วัดได้ 3,500 เคาท์/นาที สามารถเทียบอ่านได้เป็นปริมาณของฮอร์โมน 0.4 นาโนกรัม/หลอด แต่เนื่องจากสารตัวอย่างนำมาวัดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรดังนั้นปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในสารตัวอย่างนั้นจึงอ่านได้เท่ากับ 0.4 นาโนกรัม/0.2 มิลลิลิตร

5.4 วิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส อย่างเร็ว

ในการทดลองทางเรดิโออิมมิวโนเอสเส ดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าใช้เวลาในการทำปฏิกริยาในแต่ละขั้นตอนนานเกินไปซึ่งในทางปฏิบัติบางครั้งจำเป็นต้องร่นระยะเวลาในการทดลองให้สั้นลงจึงได้ทดลองในช่วงระยะเวลาที่สั้นเข้าโดยการอินคิวเบทที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง คือ 38 องศาเซลเซียส ซึ่งขั้นตอนของการทดลองส่วนใหญ่ก็ทำเช่นเดียวกับในวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเส ในข้อ 5.2 แต่ช่วงระยะเวลาในการอินคิวเบทและอุณหภูมิที่ใช้อินคิวเบทต่างกันเท่านั้น เช่น

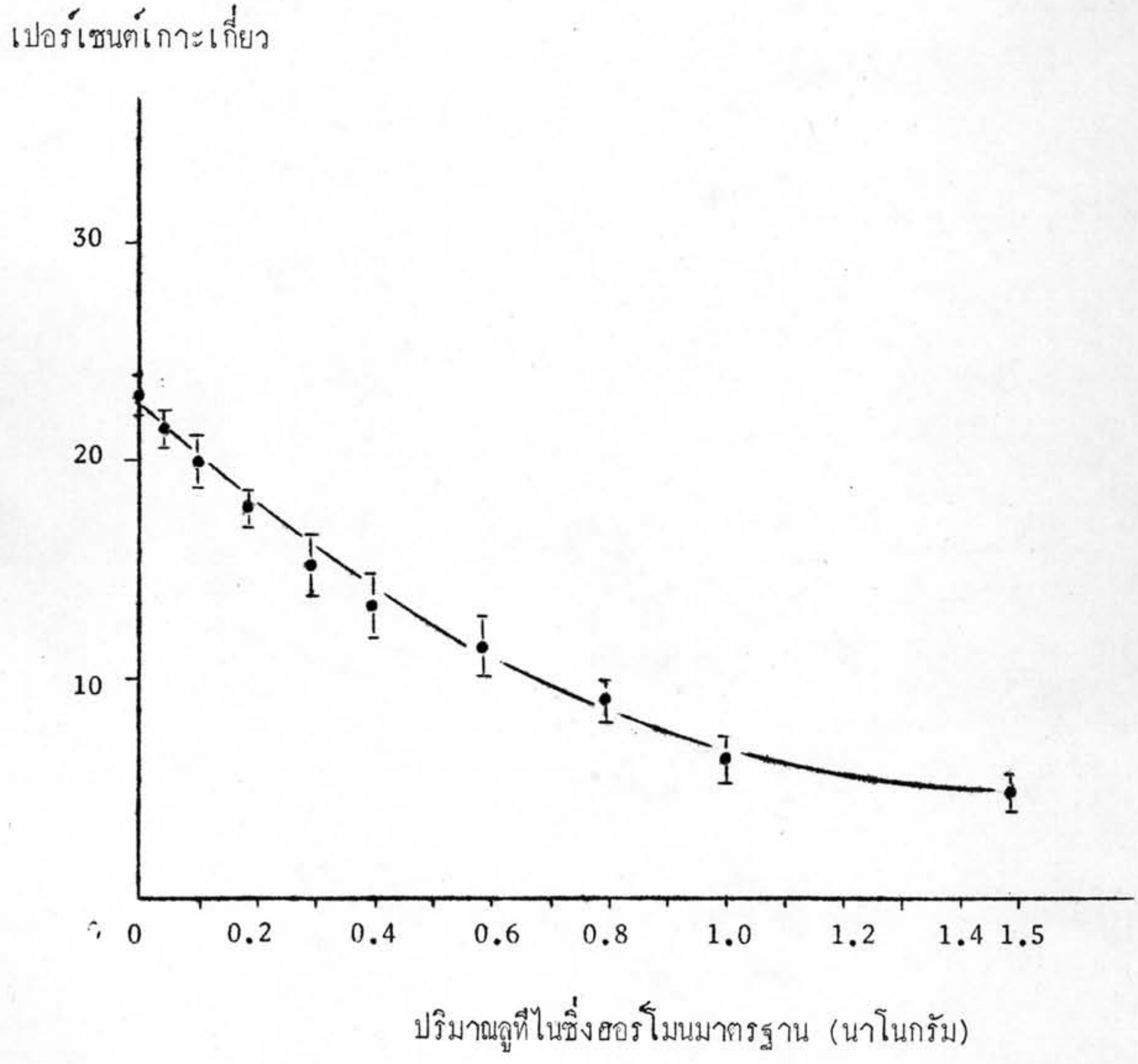
ในข้อ 5.2.4 เปลี่ยนเป็นอินคิวเบทที่ 38 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง

5.2.6 เปลี่ยนเป็นอินคิวเบทที่ 38 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

5.2.8 เปลี่ยนเป็นอินคิวเบทที่ 38 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง

ส่วนวิธีการหาปริมาณฮอร์โมนและการคำนวณก็ทำเช่นเดียวกัน

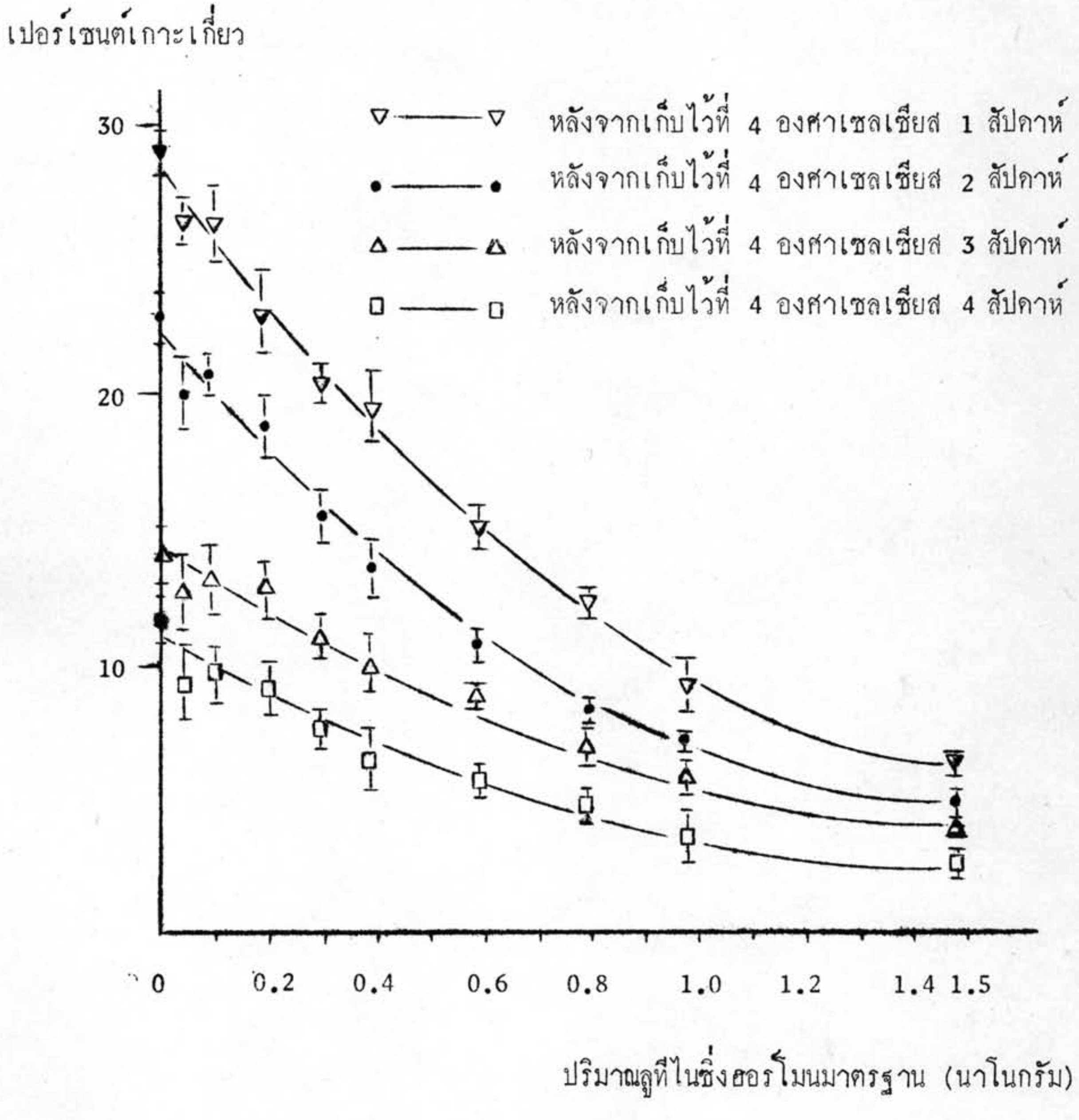
รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมน
โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์อย่างเร็ว



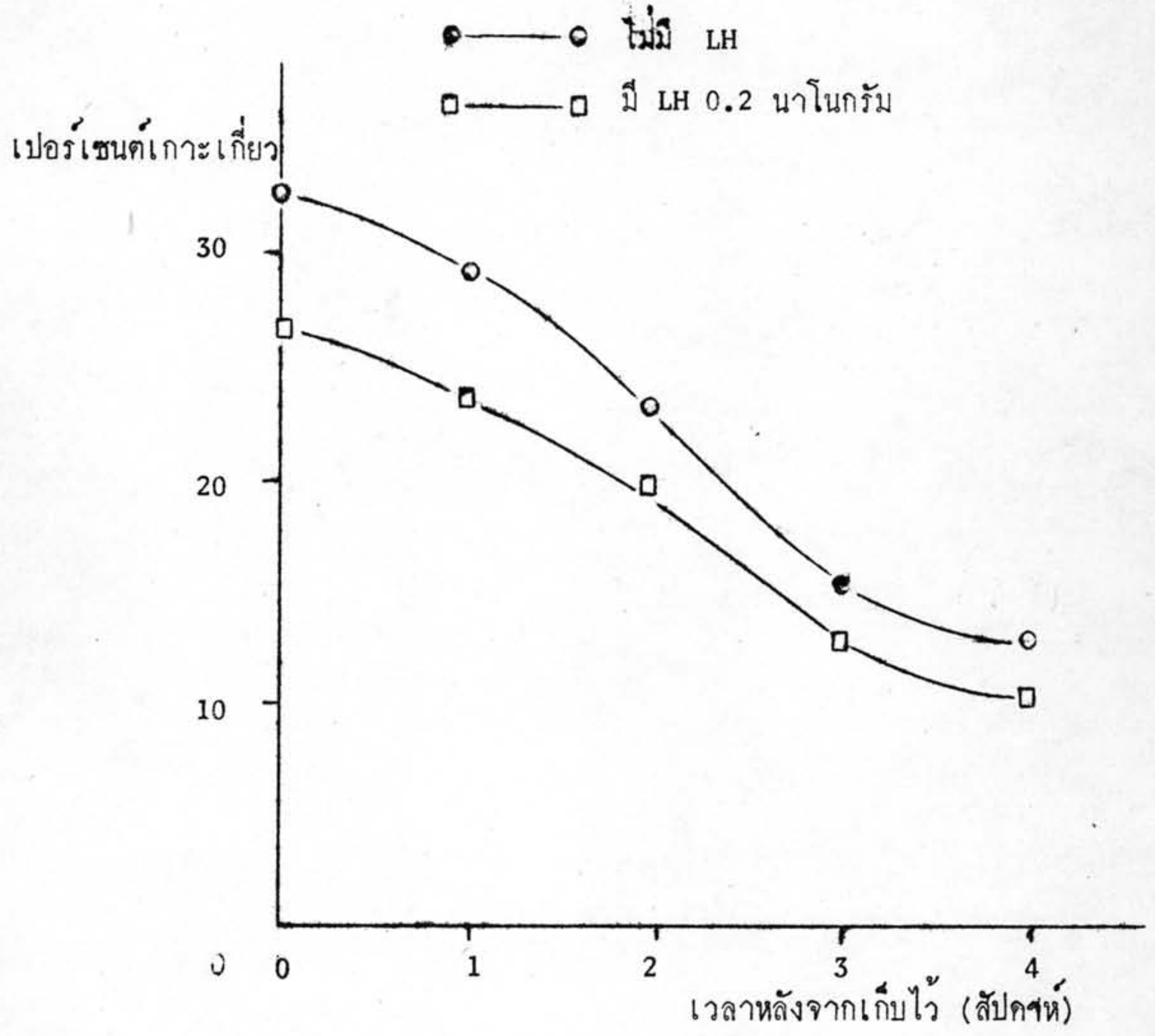
6. การศึกษาเสถียรภาพของสารติดสลาก

เนื่องจากปริมาณสารติดสลากที่เตรียมได้มักจะได้เป็นปริมาณมากๆ ในครั้งหนึ่งๆ ไม่สามารถจะใช้ในการทำปฏิกริยาทางเรดิโออิมมิวโนเอสเส ได้หมดในครั้งเดียว อาจจะเหลือสารติดสลากไว้อีกจึงจำเป็นต้องเก็บไว้เพื่อนำไว้ใช้ในครั้งต่อไปซึ่งในการเก็บไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งนั้นจะเป็นเวลานานเท่าใดย่อมขึ้นกับเสถียรภาพของสารติดสลากแต่ละชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบเสถียรภาพของสารติดสลากนี้ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาเสถียรภาพของสารติดสลากภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วยเซลลูโลสคอลัมน์แล้วโดยการศึกษาดูปฏิกริยาทางเรดิโอ-อิมมิวโนเอสเส จากกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนที่ได้จากการทำปฏิกริยาของสารติดสลากที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสในช่วงระยะเวลาต่างๆ กัน ดังนี้ คือ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ผลของการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 8 ก. และรูปที่ 8 ข.

รูปที่ 8 ก. แสดงกราฟมาตรฐานของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ได้จากการใช้สารติดฉลากที่เก็บไว้ในช่วงระยะเวลาต่างกัน



รูปที่ 8 ข. แสดงปฏิกริยาการรวมตัวของสารติดฉลากที่เก็บไว้ในระยะเวลาต่างกัน



เมื่อพิจารณาดูการทำปฏิกริยาของสารติดฉลากหลังจากเก็บไว้ในช่วงระยะเวลาต่างๆ กันโดยดูจากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 8 ก. และรูปที่ 8 ข. ค่าเปอร์เซนต์เกาะเกี่ยวและลักษณะความชันของกราฟมาตรฐานพอจะสรุปได้ว่า สารลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ติดฉลากแล้วจะใช้ได้ผลในช่วงระยะเวลาไม่ควรเกินจาก 2 สัปดาห์ เพราะหลังจาก 2 สัปดาห์แล้วประสิทธิภาพในการทำปฏิกริยาของสารติดฉลากจะลดลงไปมากจนไม่สามารถจะใช้งานให้ได้ผลดีได้

7. <u>การทดสอบความเชื่อถือได้และความแม่นยำของวิธีทดลอง</u>

7.1 <u>ความแม่นยำของวิธีทดลองมีวิธีทดสอบ 2 วิธีด้วยกัน</u> คือ

7.1.1 ดูจากความแตกต่างของปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในคอนโทรลซีรัมเมื่อทำการทดลองครั้งเดียวพร้อมกันหลายตัวอย่าง (within assay) ในการทดลองใช้คอนโทรลซีรัมที่มีค่าในระดับลดหลั่นต่างกัน 3 ค่าค่าละ 10 ตัวอย่างแสดงปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่วัดได้รวมทั้งค่าเฉลี่ย (mean, $\bar{X}$) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD.) และค่าสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปร (coefficient of variation, % CV)

สูตร สัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปร (% CV) $= \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$

ตารางที่ 6 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีทดลองในการตรวจวัดครั้งเดียวกัน

ตัวอย่างที่	ปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในคอนโทรลซีรัม 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร	ปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในคอนโทรลซีรัม 2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร	ปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในคอนโทรลซีรัม 3 นาโนกรัม/มิลลิลิตร
1	1.60	1.20	0.60
2	1.60	1.40	0.45
3	1.50	1.35	0.50
4	1.75	1.30	0.50
5	1.70	1.30	0.50
6	1.70	1.35	0.60
7	1.85	1.25	0.45
8	1.60	1.40	0.45
9	1.80	1.25	0.45
10	1.65	1.35	0.60
	$\bar{X}$ = 1.70 SD = 0.93 % CV = 5.47	$\bar{X}$ = 1.31 SD = 0.07 % CV = 5.34	$\bar{X}$ = 0.51 SD = 0.06 % CV =11.76

7.1.2 ดูจากความแตกต่างของปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในคอนโทรลซีรัม เมื่อทำการทดลองในต่างครั้งกัน (between assay) การทดลองใช้คอนโทรลซีรัม 3 ค่า เช่นเดียวกับในข้อ 7.1.1

ตารางที่ 7 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีทดลองในการตรวจวัดต่างครั้งกัน

	การทดลองครั้งที่ 1		การทดลองครั้งที่ 2		การทดลองครั้งที่ 3	
	นาโนกรัม/มิลลิลิตร $\bar{X} \pm SD$	% CV	นาโนกรัม/มิลลิลิตร $\bar{X} \pm SD$	% CV	นาโนกรัม/มิลลิลิตร $\bar{X} \pm SD$	% CV
คอนโทรลซีรัม 1	1.78 ± 0.12	6.74	1.70 ± 0.08	4.70	2.14 ± 0.13	6.07
คอนโทรลซีรัม 2	1.02 ± 0.06	5.88	1.31 ± 0.06	4.58	1.49 ± 0.07	4.70
คอนโทรลซีรัม 3	0.43 ± 0.08	18.60	0.51 ± 0.06	11.76	0.31 ± 0.05	16.12

7.2 <u>การหาค่าเปอร์เซนต์รีคอเวอรี</u> (Percentage recovery) เป็นการทดลองเพื่อจะทดสอบประสิทธิภาพของวิธีทดลองว่าจะมีความถูกต้องเพียงใดโดยการเติมฮอร์โมนมาตรฐานปริมาณต่างๆ กันลงในซีรัมที่ทราบปริมาณฮอร์โมนแน่นอนแล้วนำค่าปริมาณฮอร์โมนที่อ่านได้มาคำนวณหาเปอร์เซนต์รีคอเวอรี

สูตรที่ใช้ในการคำนวณเปอร์เซนต์รีคอเวอรี

$$\text{เปอร์เซนต์รีคอเวอรี} = \frac{\text{ปริมาณฮอร์โมนทั้งหมดที่วัดได้}}{\text{ปริมาณฮอร์โมนในซีรัมเดิม} + \text{ปริมาณฮอร์โมนที่เติมลงไป}} \times 100$$

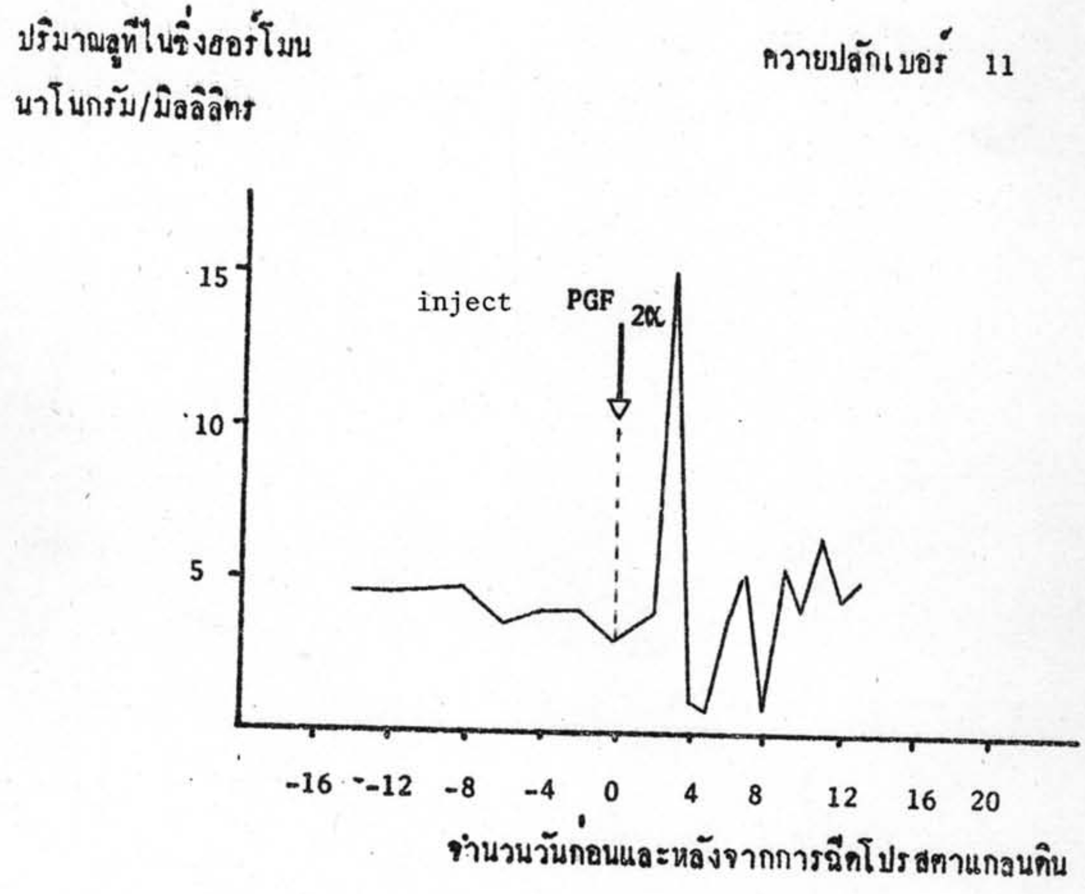
ตารางที่ 8 แสดงค่าเปอร์เซนต์รีคอเวอรีจากการทดลอง

ปริมาณฮอร์โมนในซีรัมเดิม นาโนกรัม/มิลลิลิตร	ปริมาณฮอร์โมนที่เติมลงไป นาโนกรัม/มิลลิลิตร	ปริมาณฮอร์โมนที่วัดได้ นาโนกรัม/มิลลิลิตร	เปอร์เซนต์รีคอเวอรี	เปอร์เซนต์รีคอเวอรีเฉลี่ย ± SD
1.05	0	1.05	100.00	
1.05	0.50	1.25	80.64	85.14 ± 4.39
1.05	1.00	1.75	85.36	
1.05	1.50	2.28	89.41	

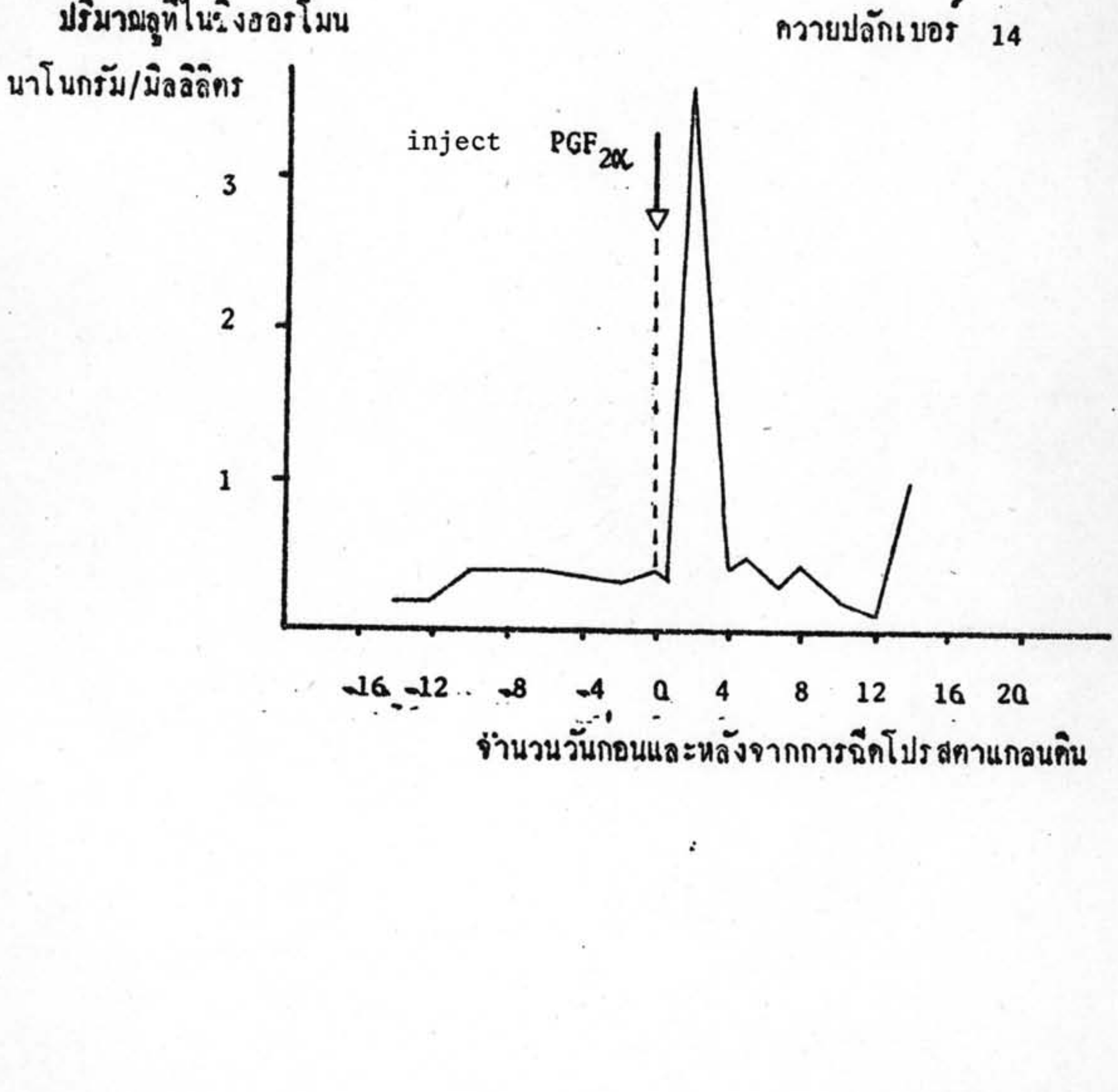
8. ผลการวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลัก

ซีรัมที่นำมาวิเคราะห์เป็นซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน การฉีดโปรสตาแกลนดินเป็นสาเหตุให้คอร์ปัส ลูเทียม (corpus luteum) เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและปริมาณของซีรัมโปรเจสเตอโรนจะลดลงสู่ระดับปกติภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดิน การเป็นสัด (oestrous phenomena) ก็จะปรากฏให้เห็นบ้างจะมีน้ำเมือกไหล (mucous discharge) ภายใน 48-72 ชั่วโมงภายหลังฉีดและจะหมดไปภายใน 4-5 วันหลังจากนั้น (Kamonpatana และคณะ, 1979) ซึ่งในช่วงระยะเวลาอันค่อนข้างยาวของการเป็นสัดนั้นทำให้เป็นการยากต่อการที่จะทำการผสมเทียม ดังนั้นจึงต้องมีการพิจารณาถึงระดับของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนซึ่งมีความจำเป็นในการที่จะกำหนดช่วงระยะเวลาที่ดีที่สุดในการฉีดน้ำเชื้อซึ่งปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนจะสูงขึ้นหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดินแล้วประมาณ 57-102 ชั่วโมงระดับปกติของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ตรวจพบในควายคือ 0.74 ± 0.15 นาโนกรัม/มิลลิลิตรและระดับปริมาณของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ขึ้นสูงที่ตรวจพบจะอยู่ระหว่าง 8.90 ± 10.22 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Kamonpatana และคณะ, 1978) ซึ่งตัวอย่างผลของการวัดปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดินแสดงไว้ในรูปที่ 9 ก., รูปที่ 9 ข., รูปที่ 9 ค. และรูปที่ 9 ง.

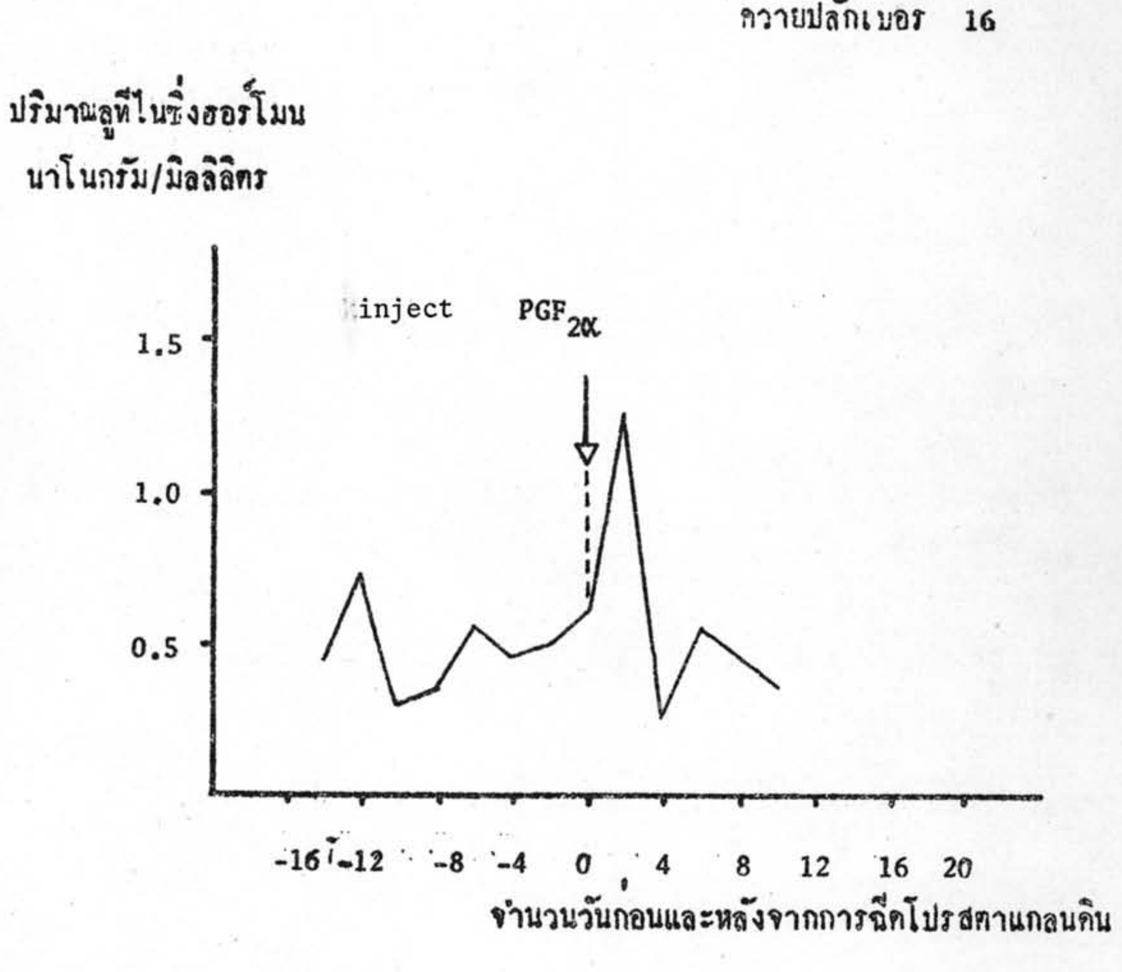
รูปที่ 9 ก. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน



รูปที่ 9 ข. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน



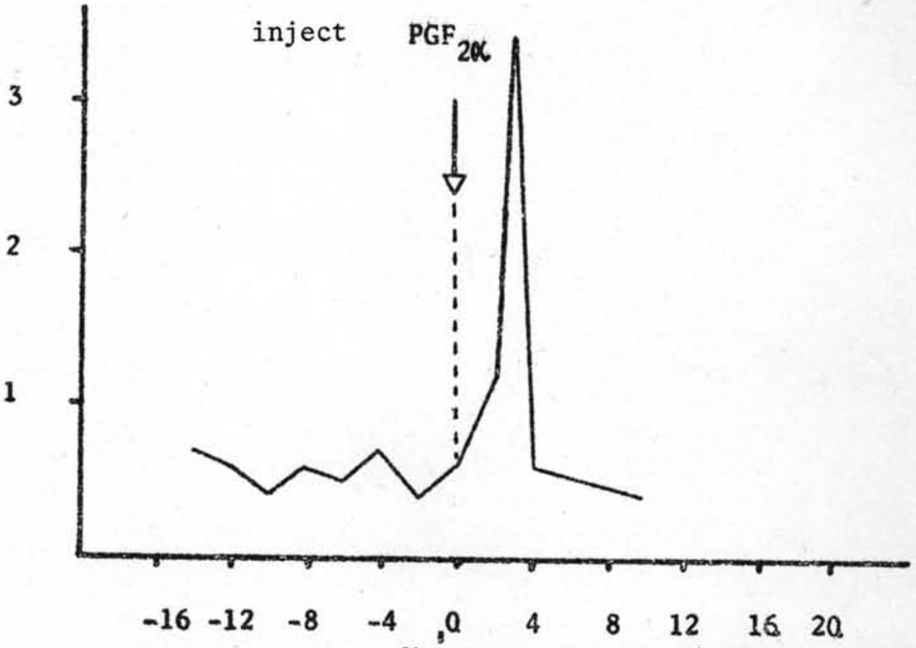
รูปที่ 9 ค. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน



รูปที่ 9 ง. แสดงระดับปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมนในซีรัมของควายปลักตัวเมียที่ได้รับการฉีดโปรสตาแกลนดิน

ปริมาณลูทีไนซิ่งฮอร์โมน
นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ควายปลักเบอร์ 19



จำนวนวันก่อนและหลังจากการฉีดโปรสตาแกลนดิน

ตารางที่ 9 แสดงเวลาและระดับสูงสุดของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการฉีดโปรสตาแกลนดิน

ควายปลักเบอร์	เวลาที่เกิดระดับลูทีไนซิ่งฮอร์โมนสูงสุดหลังจากฉีดโปรสตาแกลนดิน (ชั่วโมง)	ระดับสูงสุดของลูทีไนซิ่งฮอร์โมนที่ตรวจพบ (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)
11	63	15.00
14	54	3.65
16	48	1.25
19	63	3.40
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	57.00 ± 7.35	5.82 ± 6.21