รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

(Development of progesterone assay in bovine milk using enzyme-linked immunosorbent assay technique)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

นางทรงจันทร์ ภู่ทอง	หัวหน้าโครงการ
นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์	ผู้ร่วมโครงการ
อ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส	ผู้ร่วมโครงการ
นายอณุมาศ บัวเขียว	ผู้ร่วมโครงการ
ร.ศ.ดร.พลกฤษ์ แสงวณิช	ที่ปรึกษาโครงการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2554

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการ ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา โดย นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ นุสสรา วัฒนกุล กลุ่มวิจัยการผสมเทียมและความสมบูรณ์พันธุ์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้การอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมโคในการทำโครงการวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

โพรเจสเทอโรนเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมน (C21 steroid, pregn-4-ene-3, 20 dione) ซึ่งถูกผลิตและหลั่งมาอยู่ในน้ำเลือดและน้ำนมโดยคอร์ปัสลูเทียมหลังจากการตกไข่ระหว่างวงรอบการเป็นสัด เป็นที่ทราบกันว่าระดับความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนสามารถใช้ระบุการเข้าสู่วงรอบการเป็นสัดและการตั้งครรภ์ของโคได้โดยมีความถูกต้องอยู่ที่ 75 – 96% ดังนั้นวิธีการตรวจหาทางระบบภูมิคุ้มกันจึงได้รับการพัฒนาและนำไปใช้ในการตรวจหาระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน โดยการใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งถือว่าเป็นหนึ่งในวิธีการที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ ความไวสูง สามารถทำได้ง่าย และมีความจำเพาะสูง ในการศึกษานี้ได้พัฒนาชุดตรวจแบบ antibody-captured competitive ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 5/G7-F4 ที่ถูกสร้างมาจากการใช้โพรเจสเทอโรน 3-(o-carboxymethyl) oxime (P3-CMO) ในการกระตุ้น มาตรวจโพรเจสเทอโรนในรูป P3-CMO และ P4 (pregn-4-ene-3, 20 dione) จากการทดลองพบว่าความไวของการตรวจในรูปค่าความเข้มข้นในการยับยั้งที่ 50% (IC_{50}) และค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) สำหรับโพรเจสเทอโรน P3-CMO มีค่า 2.18 และ 0.12 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การตรวจโพรเจสเทอโรน P4 มีค่าเท่ากับ 4.85 และ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลที่ได้นี้ ชี้ให้เห็นว่า ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีความไวสูงพอที่จะใช้ตรวจโพรเจสเทอโรนในระหว่างรอบการเป็นสัดและการตั้งครรภ์ (มีค่าโดยประมาณระหว่าง 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อมาจึงได้นำ ELISA ที่พัฒนาขึ้นไปตรวจโพรเจสเทอโรน (P3-CMO) ที่ถูกเติมลงใน skim milk โดยค่าความถูกต้องของการตรวจจะแสดงในรูปของค่าร้อยละของการนำกลับ (%recovery) และค่าความแม่นยำของการตรวจจะแสดงในรูปของร้อยละของสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%coefficient of variation, % CV) ซึ่งพบว่ามีค่า 85-103 % และ 0.01-0.18 % ตามลำดับ จากการหาค่า %CV ของการวิเคราะห์ในการทดลองเดียวกัน (intra-variation assay) และระหว่างการทดลอง (inter-variation assay) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.04-1 % และ 0.01-0.18 % ตามลำดับ เมื่อนำ ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจโพรเจสเทอโรนในรูป P4 ในส่วนไขมันหลัก (core fat) ที่สกัดจากน้ำนมดิบพบว่ามีค่าค่าร้อยละของการนำกลับและร้อยละของสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนอยู่ในช่วง 80%-118% และ 0.03%-3.33% ตามลำดับ โดยปริมาณโพรเจสเทอโรนที่ตรวจควรมีค่าอยู่ในช่วง 1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นได้ใช้ ELISA ที่พัฒนาขึ้นตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคดิบจากพระราชวังสวนจิตรลดา พบว่า สามารถตรวจสอบปริมาณโพรเจสเทอโรนที่อยู่ใน core fat และ skim milk ได้ แต่ปริมาณที่ตรวจได้จะให้ค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยชุดตรวจสอบทางการค้า อย่างไรก็ตามชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้บอกระดับการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของโพรเจสเทอโรนในแต่ละวันได้สอดคล้องกับชุดตรวจสอบทางการค้า จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ELISA ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในนมดิบได้โดยมีความถูกต้องและแม่นยำอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

Abstract

Progesterone is a steroid hormone (C21 steroid, pregn-4-ene-3, 20 dione) which is produced and released into plasma and milk by corpus luteum after ovulation during estrous cycle. It has been known that the concentration level of progesterone can be used to identify cow heat period and pregnancy at 75 - 96% accuracy. Therefore, immunological method has been developed and applied for progesterone detection. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is considered to be one of the most suitable methods due to its high sensitivity, simplicity and specificity. In this study, an antibody-captured competitive ELISA was developed using the monoclonal antibody clone 5/G7-F4 which was raised against progesterone 3-(o-carboxymethyl) oxime (P3-CMO) to detect progesterone P3-CMO and P4 (pregn-4-ene-3, 20 dione). The sensitivity in terms of the 50% inhibition concentration (IC_{50}) and the limit of detection (LOD) for P3-CMO were found at 2.18 and 0.12 ng/ml, respectively. While those for P4 were found at 4.85 and 0.5 ng/ml, respectively. These results indicated that the developed ELISA was sensitive enough to detect progesterone during the estrous cycle and pregnancy period (approximately ranged between 1 ng/ml and 25 ng/ml). Later, the developed ELISA was applied to detect progesterone in fortified skim milk samples. The accuracy of the test was quantified in term of %recovery and the precision was quantified in term of %coefficients of variation (%CV) which were found at 85- 103 % and 0.01-0.18 %, respectively. Moreover, the %CV of both intra-assay and inter-assay was also quantified and found in the range of 0.04-1% and 0.01-0.18%, respectively. The developed ELISA was used to detect progesterone P4 in core fat extract from whole milk in which the %recovery and the %CV was found in the range of 80-118% and 0.03-3.33%, respectively. The concentration of progesterone should be in the range of 1-100 ng/ml. The developed was applied to detect progesterone in whole milk samples collected from cows at the Chitarada Royal Palace. The result showed that it could quantify the concentration of progesterone in both core fat and skim milk. But the concentrations detected were comparatively higher than those found by a commercially available ELISA test kit. However, the developed ELISA could identify the increase or decrease level of progesterone during the test period as compared to the commercial test kit. These results suggested that the developed ELISA could be used to detect progesterone in whole milk with an acceptable range of accuracy and precision.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ฏ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. วิธีดำเนินการวิจัย	5
2.1. การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ BSA	5
2.1.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับ BSA	5
2.1.2 การวัดปริมาณโปรตีนของโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA	5
2.1.3 การหาเปอร์เซนต์การจับของโพรเจสเทอโรนต่อ BSA	5
2.2. การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์	6
2.2.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์	6
2.2.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A affinity chromatography	6
2.2.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ	7
2.3 การเตรียมชุดตรวจสอบ	7
2.3.1 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ag captured)	7
2.3.1.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส (Progesterone-HRP)	8
2.3.1.2 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)	8
2.3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect competitive ELISA (Ab captured)	8
2.3.2.1 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน	9
2.3.2.2 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบด้วยวิธี Indirect competitive ELISA(Ab captured)	9
2.3.3 การทดสอบความไว (Sensitivity)	9
2.4. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ	9
2.4.1 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มของชุดตรวจสอบต้นแบบ	9
2.4.2 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ	10

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

2.4.2.1 หาค่าความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ 10

2.4.2.2 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจสอบ 10

2.4.2.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ 10

2.5 การสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ 11

2.6 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค 11

3. ผลการวิจัย 13

3.1 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์ 13

3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบ 13

3.2.1 แบบที่1 Competitive Indirect ELISA (Antibody capture; โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน) 13

3.2.1.1 การเชื่อมติดแอนติเจน P3 (3-(o-carboxymethyl)oxime) กับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA 13

3.2.1.2 การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน 14

3.2.1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมและทดสอบความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 1 14

3.2.2 แบบที่ 2 Competitive direct ELISA (Antigen capture; โพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP) 16

3.2.2.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับเอ็นไซม์ HRP (Progesterone-HRP) 16

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ 17

3.3.1 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ 17

3.3.1.1 หาค่าความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ 17

3.3.1.2 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจสอบ 18

3.3.1.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ 18

3.4 การปรับระบบที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ 24

3.4.1 การปรับปรุงวิธีการทดสอบเพื่อลดผลของ Matrix ในน้ำนม 24

3.4.1.1 ปรับบัฟเฟอร์เป็น Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal (PBSCTT) 24

3.4.1.2 ปรับโปรตีนที่นำมาใช้บล็อกเพลท 29

3.5 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค 36

3.5.1 การสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ 36

3.5.1.1 ทดสอบผลขององค์ประกอบของสารสกัด ต่อชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ (Matrix Effect) 36

3.5.2 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมดิบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ 40

4. สรุปและอภิปรายการทดลอง 46

บรรณานุกรม 48

ภาคผนวก 50

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย 52

สารบัญตาราง (List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC50 และ LOD ในการพัฒนาชุดต้นแบบด้วยวิธี ELISA แบบต่างๆ ต่อฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน 18

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1 20

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี antigen captured direct competitive ELISA (Progesterone-HRP; แบบที่ 2) 22

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี antigen captured direct competitive ELISA (Progesterone-HRP; แบบที่ 2) 23

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรน P3,P4 และ 17α ที่ละลายใน PBST และตัวอย่างน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา ด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่ 2)โดยใช้บัฟเฟอร์ PBSCTT 26

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรน P3 ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 ด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1 โดยใช้บัฟเฟอร์ PBSCTT 29

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อใช้แอนติเจน P3-OVA และ P3-BSA เคลือบจาน 96 หลุม 32

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อเติมโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1 34

ตารางที่ 9 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ในตัวอย่างไขมันจากน้ำนมดิบ ด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) เมื่อบล็อกด้วย 1% Gelatin และ 1% Casein 37

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 และ P3 ในตัวอย่างไขมันจากน้ำนมดิบ ด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ 38

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมดิบ 39

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ในไขมันน้ำนมด้วยชุดตรวจต้นแบบ 40

สารบัญภาพ (List of Illustration)

หน้า

รูปที่ 1 แสดงฮอร์โมนในร่างกายโคในระหว่างรอบการเป็นสัดของโค 3

รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนในการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 1) 16

รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนในการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 2) 17

รูปที่ 4 กราฟมาตารฐานแสดงปริมาณความเข้มข้นฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนที่ได้จากการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 1) 19

รูปที่ 5 แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนสำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณของโพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมเพื่อทดสอบประสิทธภาพของชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 2) 21

รูปที่ 6 แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่ 2) โดยใช้บัฟเฟอร์ PBSCTT 26

รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานโพรเจสเทอโรน P3 (A) ละลายใน PBST (B) ละลายในน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 (C) โพรเจสเทอโรน P4 ละลายใน PBST 28

รูปที่ 8 แสดงกราฟเปรียบเทียบการวัดปริมาณโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ละลายใน PBS, 1%Skim milk, 5%Skim milk น้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 35

รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยตรวจโพรเจสเทอโรนจากการสกัด Core fat ด้วยชุดตรวจต้นแบบ 41

รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยตรวจโพรเจสเทอโรนจาก Skim milk ด้วยชุดตรวจต้นแบบ 42

รูปที่ 11 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยตรวจโพรเจสเทอโรนจาก Skim milk ด้วยชุดตรวจ Euro 42

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดาในวงรอบ 1 เดือน 44

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบค่าของปริมาณโพรเจสเทอโรนของชุดตรวจต้นแบบกับชุดตรวจของ Euro ที่ระยะต่างๆในวงรอบการเป็นสัดของแม่โค 45

สัญญลักษณ์และคำย่อ

Ab	Antibody
Ag	Antigen
BCA assay	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine Serum Albumin
CMO	Carboxy-methyl-oxime
CV	Coefficient of
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradise peroxidase
IC50	half maximal inhibitory concentration
LOD	limiting of detection
M	molar
ml	milliliter
MRLs	maximum residue limits
ng	nanogram
NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
OVA	Ovalbumin
P3	P-3-O-Carboxymethyloxime
P4	Pregn-4-ene-3, 20-dione
PBS	phosphate buffer saline
PBSCTT	Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal
PBST	phosphate buffer saline tween
RIA	Radioimmunoassay
RT	Room temperature
TMB	3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid

1.บทนำ (Introduction)

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เกษตรกรรมเลี้ยงโคนมเป็นอาชีพหลักอาชีพหนึ่งที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรไทย ปัญหาสำคัญของเกษตรกรที่เลี้ยงโคนม คือ ขาดการจัดการด้านการขยายพันธุ์ที่ดี จึงทำให้การผสมพันธุ์ขาดประสิทธิภาพและเกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นการหาระยะเวลาการเป็นสัดของโคเพื่อกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้อง และการตรวจสอบการตั้งท้อง จึงมีความสำคัญในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรกรรมเลี้ยงโคนมเป็นอย่างมาก ซึ่งสามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (Progesterone) ในกระแสเลือดหรือน้ำนม โดยระดับโพรเจสเทอโรนจะสูงสุดในวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด และหลังวันที่ 17 จะลดลงเรื่อยๆ จนต่ำสุดเมื่อถึงวงรอบการเป็นสัดใหม่ ซึ่งระดับโพรเจสเทอโรนในช่วงนี้จะให้ค่าต่ำสุด ทำให้สามารถกำหนดเวลาในการผสมเทียมได้ถูกต้องแม่นยำ หากมีการตั้งท้องระดับของโพรเจสเทอโรนยังคงสูงอยู่ใกล้เคียงกับวันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัดและจะคงระดับเช่นนี้ตลอดการตั้งท้องโดยประมาณวันที่ 20-30 ก่อนคลอดจะเริ่มมีระดับลดลงอย่างช้าๆ และมีระดับต่ำสุดในวันที่คลอด ซึ่งจะให้ผลดีในการวิเคราะห์หาระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมเพื่อตรวจการตั้งท้องและทำนายวันที่แม่โคจะคลอดได้อย่างถูกต้อง โดยวิธีการวัดระดับโพรเจสเทอโรนนั้นทำได้หลายวิธีเช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) แต่วิธีนี้ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูงจึงไม่เหมาะแก่การใช้ในระดับกลุ่มเกษตรกรทั่วไป อีกวิธีหนึ่งได้แก่การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา โดยการใช้ความสามารถของแอนติบอดีที่จับกับโพรเจสเทอโรนได้อย่างจำเพาะ ซึ่งสามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติเป็นหน่วยงานที่พัฒนานำ Radioimmunoassay มาใช้ในการวิเคราะห์ แต่เนื่องจากมีการใช้สารกัมมันตรังสีจึงต้องทำการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพิเศษเท่านั้น ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาชุดตรวจด้วยหลักการ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ชุดทดสอบนี้ยังไม่มีรายงานการผลิตเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย ดังนั้นจึงต้องนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง ทำให้การตรวจด้วยวิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยม ดังนั้นทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวะกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถจับกับโพรเจสเทอโรนได้อย่างจับเพาะและได้มีโครงการที่จะพัฒนาเป็นชุดทดสอบโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้เองภายในประเทศและจะสามารถลดต้นทุนในการตรวจได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้มีผู้สนใจที่จะใช้ชุดตรวจนี้ในการตรวจระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคเพื่อวางแผนด้านการผสมเทียมและตรวจการตั้งครรภ์มากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนางานวิจัยต่อให้เป็นชุดทดสอบชนิดแถบสำเร็จรูปหรือ Strip test (ลักษณะเดียวกับการแถบทดสอบการตั้งครรภ์ของคน) ต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

6.1 เพื่อพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบ ELISA สำหรับวัดระดับโพรเจสเทอโรน

6.2 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบต้นแบบ ELISA ในการตรวจโพรเจสเทอโรนใน ตัวอย่างน้ำนมโค

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

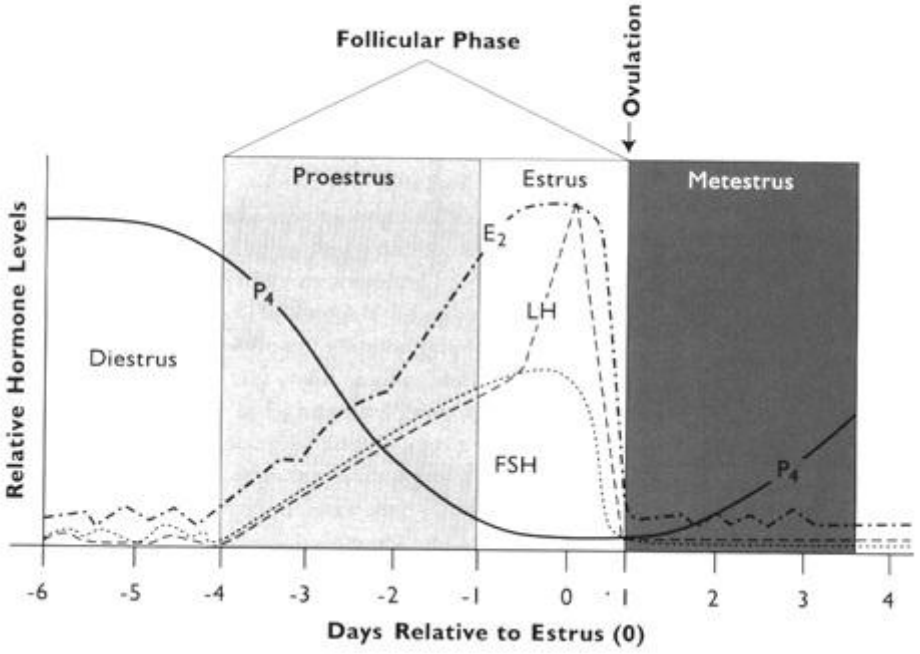
7.1 เตรียม วัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการทำชุดทดสอบโพรเจสเทอโรนแบบ ELISA

7.2หาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมชุดทดสอบแบบ ELISA

7.3ทดสอบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ ELISA ต้นแบบในการตรวจโพรเจสเทอโรนใน ตัวอย่างน้ำนมโค

1.4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

การสืบพันธุ์ และการผลิตน้ำนมของโค จะมีประสิทธิภาพได้โดยการเพิ่มอัตราการผสมติด ซึ่งสามารถทำได้โดยการผสมเทียมในช่วงระยะที่แม่โคเป็นสัดดังนั้นการทราบระยะการเป็นสัดและการตรวจยืนยันการตั้งท้องที่ถูกต้องจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก การที่จะทำให้โคผลิตนมได้จำเป็นต้องทำให้โคนมมีการตั้งท้องจนกระทั่งคลอดลูกออกมา โดยการให้นมจะเริ่มขึ้นตั้งแต่คลอดลูกจนกระทั่งถึงระยะที่ลูกโคไม่ต้องการนมจากแม่อีก โดยหลังคลอด 60 วันเกษตรกรควรทำการตรวจความเป็นสัด และผสมเทียมในระยะที่แม่โคเป็นสัด หลังจากนั้น 21-24 วันให้ตรวจการตั้งท้องเพื่อให้การผลิตน้ำนมเป็นไปอย่างต่อเนื่อง จนกว่าแม่โคจะไม่สามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ การตรวจดังกล่าวสามารถทำได้โดยการวัดระดับฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน (progesterone)ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญต่อการควบคุมทำงานของระบบสืบพันธุ์จัดเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormone)มีชื่อทางเคมี คือ Δ^4-pregnene-3,20-dione (P4) เป็นฮอร์โมนที่ผลิตโดยคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum)ของรังไข่ ในช่วงที่แม่โคเป็นสัด (estrous) โพรเจสเทอโรนในกระแสเลือดและน้ำนมจะมีปริมาณต่ำมากประมาณ 0.2-0.92 ไมโครกรัมต่อลิตร และจะมีปริมาณสูงสุดในช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัดมีค่าประมาณ 0.2-30 ไมโครกรัมต่อลิตร ถ้าโคนมไม่ได้รับการผสมพันธุ์หรือผสมพันธุ์ไม่ติดระดับโพรเจสเทอโรนจะลดลงในช่วง 2-3 วัน ก่อนช่วงเป็นสัดต่อไป หากการผสมพันธุ์ติด คอร์ปัสลูเทียม ยังคงทำงานต่อ ทำให้ระดับโพรเจสเทอโรนมีค่าสูงประมาณ 20-35.7 ไมโครกรัมต่อลิตรตลอดการตั้งท้อง (Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2010) โดยฮอร์โมนในร่างกายโคในระหว่างวงรอบการเป็นสัดของโคแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงฮอร์โมนในร่างกายโคในระหว่างรอบการเป็นสัดของโค
(เอกสารประกอบการอบรมวิชาการฯ จัดโดยสมาคมส่งเสริมการเลี้ยงโคพันธุ์บราห์มัน วันที่ 4-5 มิถุนายน 2554 ณ ห้างฉัตรแรนซ์ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง)

จากรูปที่ 1 พบว่า ฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดคือ P4- โพรเจสเทอโรน(Progesterone) ฮอร์โมนตัวนี้สร้างมาจากคอร์ปัสลูเทียม(corpus luteum) เป็น สเตียรอยด์ฮอร์โมนทำหน้าที่ให้การตั้งท้องดำเนินต่อไป โดยระดับของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนจะค่อยๆเพิ่มขึ้นพร้อมๆกับขนาดของคอร์ปัสลูเทียม และจะอยู่ในระดับสูงไปตลอดการตั้งท้อง แต่ถ้าไม่ตั้งท้อง ภายในวันที่ 15-18 หลังการเป็นสัด ระดับโพรเจสเทอโรนก็จะลดลง อันเนื่องมาจาก โปรสตาแกลนดิน(Prostaglandin-PG) ที่หลั่งออกมาจากมดลูกมาทำให้คอร์ปัสลูเทียมสลายตัวอย่างรวดเร็ว และระดับโพรเจสเทอโรนก็ลดลงอย่างรวดเร็วด้วย ฮอร์โมนที่สำคัญถัดมาก็คือ FSH(Follicle Stimulating Hormone) และ LH(Luteinizing Hormone) ทั้งสองตัวเรียกรวมกันเป็น โกนาโดโทรปิน(Gonadotropin) ซึ่งหลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ด้วยการกระตุ้นของ GnRH(Gonadotropin Releasing Hormone)ที่หลั่งมาจากไฮโปทาลามัส ให้มาทำงานที่รังไข่ โดยมากระตุ้นให้ถุงไข่(follicle) เจริญขึ้นมา ระดับของGnRH จะผกผันกับระดับของ โพรเจสเทอโรน ฮอร์โมนตัวสุดท้ายที่มีในรูปคือ E2-เอสตราไดออล(Estradiol) เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่บ่งบอกลักษณะของเพศเมีย ฮอร์โมนนี้จะสร้างในถุงไข่ ถ้าถุงไข่มีการเจริญขึ้นมากหรือมีจำนวนมากก็จะทำให้ระดับของ E2 สูงขึ้น

ดังนั้น การวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมวัวจึงเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ เพื่อหาระยะเวลาเป็นสัดของโคได้อย่างแม่นยำ ทำให้สามารถกำหนดวันผสมพันธุ์ที่ถูกต้องเป็นการเพิ่มโอกาสการตั้งท้องของแม่โค และสามารถใช้ตรวจสอบการตั้งท้องของโคได้อีกด้วย ซึ่งการวัดระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโดยวิธี ELISA เป็นวิธีที่เหมาะแก่การวัดตัวอย่างจำนวนมากในห้องปฏิบัติการธรรมดาทั่วไปแต่ในปัจจุบันชุดตรวจนี้ต้องนำเข้าจาก

ต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการตรวจสูงจึงยังไม่เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง โดยจะพัฒนาต่อเป็นชุดทดสอบหาระดับฮอร์โมนนี้ในน้ำนมโค และเป็นแนวทางในการพัฒนาแถบทดสอบเพื่อให้เหมาะแก่การใช้งานในระดับเกษตรกรต่อไปได้

1.5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ในปัจจุบันมีการพัฒนาการวิเคราะห์ที่สามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น โดยอาศัยวิธีทางอิมมูโนวิทยา (Immunological method) ได้แก่ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay, RIA) และเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) สำหรับหลักการของ RIA คืออาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน คือ โพรเจสเทอโรนกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน ซึ่งมีการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี แล้วติดตามปริมาณ โพรเจสเทอโรนจากเครื่องนับปริมาณรังสี 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 มีความจำเพาะและความไวสูง สะดวก ใช้งานได้ง่าย ไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม สามารถนำมาตรวจสอบนอกห้องปฏิบัติการได้จึงนำมาใช้ในฟาร์มได้ ให้ความถูกต้องสูงให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกับการตรวจวัดด้วยวิธีทางเคมี แต่ใช้เวลาน้อยและวิเคราะห์ตัวอย่างได้คราวละมากๆ และมีการใช้อย่างแพร่หลาย (Nakao และคณะ 1980)

1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

11.1 ได้ชุดทดสอบต้นแบบ ELISA เพื่อใช้หาระดับโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโค ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนชุดตรวจสอบที่นำเข้าจากต่างประเทศ

11.2 องค์ความรู้ ประสบการณ์และอุปกรณ์ต่างๆ ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบที่มีคุณภาพสูงต่อสารอื่นๆ ต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

2.1. การเตรียมสารเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ BSA

2.1.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับ BSA

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

2.1.2 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

2.1.3 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

2.2. การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

2.2.1 การเลี้ยงเซลล์และการเพิ่มจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์

นำเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนซึ่งผลิตโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 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 จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของเซลล์ที่ตกตะกอนทิ้งไป เก็บส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีแอนติบอดีไว้ เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.2.2 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธี protein A affinity chromatography

เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจะเพาะต่อโพรเจสเทอโรนสูง มีไอโซไทป์เป็น 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 หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วเก็บสารละลายในหลอดที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงมารวมกันนำไปไดแอไลซ์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยน PBS 5 ครั้ง ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

2.2.3 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีหลังการทำให้บริสุทธิ์ต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ

หลังจากทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ได้ทำการทดสอบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ยังมีความสามารถในการจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระอยู่หรือไม่ โดยวิธี indirect competitive ELISA ซึ่งมีวิธีการทดสอบคือ เคลือบพื้นผิวของจาน 96 หลุม ด้วยโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA 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 เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ 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

2.3. การเตรียมชุดตรวจสอบ

ทำการออกแบบชุดตรวจสอบ 2 แบบ คือ

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

โดยชุดตรวจสอบแต่ละแบบมีขั้นตอนการเตรียมที่แตกต่างกัน ทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อให้ได้ชุดชุดตรวจสอบต้นแบบที่มีความไวต่อโพรเจสเทอโรนสูงสุด จึงออกแบบชุดตรวจสอบทั้ง 2 แบบตามขั้นตอนดังนี้

2.3.1 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) นี้ ต้องทำการเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ hoseradish peroxidase (HRP) เพื่อใช้เป็นตัวแข่งขันกับ โพรเจสเทอโรนในรูปอิสระซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1.1 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

2.3.1.2 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured)

การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ โดยทำการแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ นำไปทดสอบกับแอนติบอดีและโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ HRP ในปริมาณที่เหมาะสมที่เลือกมา ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ag captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรน คำนวนหาความไวที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบแบบอื่นต่อไป

2.3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Indirect 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 เติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปพร้อมกับแอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอติน จากข้อ 3.2.1 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

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

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

2.3.2.2 การทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบ ด้วยวิธี Indirect competitive ELISA (Ab captured) ทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ นำอัตราส่วนระหว่างโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เหมาะสม มาทดสอบกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี Direct competitive ELISA (Ab captured) โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรน หาความไวนำไปเปรียบเทียบกับชุดทดสอบแบบอื่น

2.3.3 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

ทำการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบแบบต่างๆทั้ง 2 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

2.4. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

2.4.1 การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มของชุดตรวจสอบต้นแบบ

ในการปฏิบัติงานจริงจะต้องเตรียมชุดตรวจสอบให้สะดวกต่อการใช้งานมากที่สุด จึงทำการแปร อุณภูมิและเวลา ในการบ่มแอนติเจนและแอนติบอดีเพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการทดสอบ

2.4.2 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

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

2.4.2.1 หาค่าความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

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

$$LOD = B_0 - 3SD$$

$$LOQ = B_0 - 10SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

2.4.2.2 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจสอบ

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

2.4.2.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า %Recovery โดยนำตัวอย่างน้ำนมโค ที่มีการเติมโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้จากการสกัดตามขั้นตอน 4.3 มาทำการหาค่า %Recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % Recovery จากสูตรดังนี้

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

2.5. การสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

วิธีการสกัดที่เหมาะสมจากตัวอย่างน้ำนมโค ทำการทดลองโดยนำน้ำนมโคปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนบนที่เป็นชั้นไขมันมาสกัด โดยนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองแบ่งหลอดละ 10 ไมโครลิตร เติม P4 ที่ละลายอยู่ใน 5% Methanolใน PBST ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 ปริมาตรต่อปริมาตร นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส ละลายกลับด้วย 0.5 ไมโครลิตรของ 5% Methanolใน PBST จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้กับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน

นำน้ำนมโค 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง เติม โพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 – 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำนมดิบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกชั้นไขมันที่ได้ด้านบนใส่หลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองดูดใส่หลอดทดลองใหม่ นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลายกลับด้วย 0.5 มิลลิลิตรลิตรของ 5% เมทานอล ละลายใน PBST เติม แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับไบโอติน 1:6000 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลิตร นำไปตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 8 ซ้ำ จากนั้นนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ เปรียบเทียบความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ได้กับสารละลายมาตรฐานโพรเจสเทอโรน

2.6. การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค

เก็บน้ำนมโคซึ่งอยู่ในระยะต่างๆของวงรอบการเป็นสัด จากฟาร์มโคนมสวนจิตรลดา จากแม่โค 3 ตัว ได้แก่ NF, 193 และ 296 เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 1 เดือน ทำการสกัดน้ำนมตัวอย่างและตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนด้วยชุดตรวจสอบที่เตรียมได้เทียบกับกราฟโพรเจสเทอโรนมาตรฐานและทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้กับชุดตรวจสอบทางการค้า

โดยนำน้ำนมมาละลายที่อุณหภูมิห้อง อุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำน้ำนมโค 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกชั้นไขมันที่ได้ด้านบนใส่หลอดทดลอง (นำ Skim milk ไปตรวจด้วยวิธีตรวจแบบที่ 2 และ3 ต่อไป) นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองดูดใส่หลอดทดลองใหม่ นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลายกลับด้วย 0.5 มิลลิลิตรลิตรของ 5% เมทานอล ละลายใน PBST เติม แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับไบโอติน 1:6000 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลิตร นำไปตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ หลุมละ 100

ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 8 ซ้ำ นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟโพรเจสเทอโรนมาตรฐานและทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้กับชุดตรวจสอบทางการค้า

3. ผลการวิจัย (Results)

3.1 การเตรียมแอนติบอดีและทำให้บริสุทธิ์

นำไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม (FCS) ร้อยละ 10 เลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ (spinner flask) ขนาด 1 ลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้ได้แอนติบอดีในปริมาณที่เข้มข้น จากนั้นทำการปั่นแยกเซลล์ไฮบริโดมาออก เก็บเอาส่วนอาหารเลี้ยงเพื่อนำมาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี affinity chromatography โดยผ่าน คอลัมน์ protein G sepharose หลังจากนั้นชะเอาส่วนแอนติบอดีด้วย 0.1 M glycine buffer pH 2.7 เก็บส่วนแอนติบอดีที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี bicinchoninic acid assay (BCA assay) แล้วนำส่วนที่มีปริมาณโปรตีนสูงรวมกัน นำไป dialysis ด้วย บัฟเฟอร์ PBS pH 7.2 นำไปวัดปริมาณโปรตีนหลังจากรวมแล้วได้ปริมาณรวมเป็น 45 มิลลิกรัม และหาปริมาณแอนติบอดี (IgG) รวมได้เป็น 29.6 มิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์คิดเป็นร้อยละ 66 หลังจากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี indirect ELISA

3.2 การเตรียมชุดตรวจสอบ

การพัฒนาชุดตรวจสอบต้นแบบเพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานที่ครอบคุมช่วงของปริมาณฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนที่ต้องการ โดยศึกษาทั้งหมด 2 แบบ ได้แก่

- แบบที่ 1 Competitive Indirect ELISA (Antibody capture; โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน)
- แบบที่ 2 Competitive direct ELISA (Antigen capture; โพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP)

ชุดตรวจสอบแต่ละแบบมีขั้นตอนการเตรียมที่แตกต่างกัน โดยต้องทำการเตรียมแอนติเจนและแอนติบอดีให้เหมาะสมกับแต่ละวิธี เพื่อนำไปศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแอนติเจนและแอนติบอดี เพื่อให้ได้ชุดชุดตรวจสอบต้นแบบที่มีความไวต่อโพรเจสเทอโรนสูงสุด จึงออกแบบชุดตรวจสอบทั้ง 2 แบบตามขั้นตอนดังนี้

3.2.1 แบบที่1 Competitive Indirect ELISA (Antibody capture; โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน)

3.2.1.1 การเชื่อมติดแอนติเจน P3 (3-(o-carboxymethyl)oxime) กับโปรตีนพาหะ BSA และ OVA

- การเชื่อมต่อ โพรเจสเทอโรนกับ BSA

ได้เป็น P3-BSA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้เตรียมชุดตรวจสอบ ELISA โดยใช้ NHS และ EDC เป็นสารเชื่อมต่อ โดยนำโพรเจสเทอโรน P3 ละลายใน DMSO เติม NHS และ EDC กวนเบาๆเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย BSA ที่ละลายใน 0.5 M carbonate buffer pH 9.6 กวนเบาๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการ BCA สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 1.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

- การเชื่อมต่อ โพรเจสเทอโรนกับ OVA

ได้เป็น P3-OVA เพื่อนำไปเคลือบจานชนิด 96 หลุม (96 wells plate) สำหรับใช้เตรียมชุดตรวจสอบ ELISA นำโพรเจสเทอโรน P3cmo ละลายใน DMSO เติมโปรตีน OVA (10 มิลลิกรัม) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ กวนเบาๆที่อุณหภูมิห้อง เชื่อมติดโพรเจสเทอโรนกับ OVA โดยใช้ glutaraldehyde เติมลงในสารละลายให้ความเข้มข้นสุดท้ายมี glutaraldehyde อยู่ร้อยละ 0.2 กวนเบาๆที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไป dialysis เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

3.2.1.2การเชื่อมต่อระหว่างแอนติบอดีกับไบโอติน (คู่มือการใช้งานสาร Aminohexanoyl-Biotin-N-Hydroxysuccinimide (Zymed))

การเชื่อมต่อแอนติบอดี กับไบโอติน เริ่มจากนำแอนติบอดี 1.5 มิลลิกรัมไปไดแอไลซิสใน 0.1 M carbonate buffer pH 8.4 ข้ามคืน เตรียม stock ไบโอติน ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณไบโอตินที่ใช้คือ 100 ไมโครกรัมต่อแอนติบอดี 1 มิลลิกรัม ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่บริสุทธิ์แล้วมีความเข้มข้นของแอนติบอดีเป็น 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม stock ไบโอติน ปริมาตร 13 ไมโครลิตร ลงในแอนติบอดี 1 มิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO บ่มที่อุณหูมิห้อง กวนเบาๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไป ไดแอไลซิสใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เปลี่ยน PBS 3 ครั้งยืนยันผลการเชื่อมติดด้วย Indirect ELISA โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วยแอนติเจน P3-BSA ที่เตรียมได้จากข้อ 1 หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้แบ่งใส่หลอดเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส

3.2.1.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมและทดสอบความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 1

หาความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมด้วยวิธี direct ELISA โดยทำการเคลือบโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA บนพื้นผิวในของจานชนิด 96 หลุมๆ ที่ความเข้มข้น 0.0625-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลาย 1%BSA ที่ละลายใน PBS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอตินเจือจางที่ความเข้มข้น 1:1000 – 1:128000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST เติม

สารละลาย Streptavidin ที่มี HRP เชื่อมอยู่ 1:2000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ได้ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1:6000 ตามลำดับ ทดสอบหาความไวของชุดตรวจสอบแบบ โดยศึกษาจากความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ นำอัตราส่วนระหว่างโพรเจสเทอโรนที่เชื่อมต่อกับ BSA กับ แอนติบอดีที่เชื่อมต่อกับไบโอตินที่เหมาะสมที่ได้มาทำ Competitive direct ELISA โดยทำตามขั้นตอน direct ELISA เบื้องต้นที่กล่าวมาแล้ว มาทดสอบกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรนที่ความที่ความเข้มข้น 50, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงไปพร้อมกับ แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน 1:6000 พบว่าได้ค่าของปริมาณความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่ตรวจวัดในน้ำนมได้อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 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

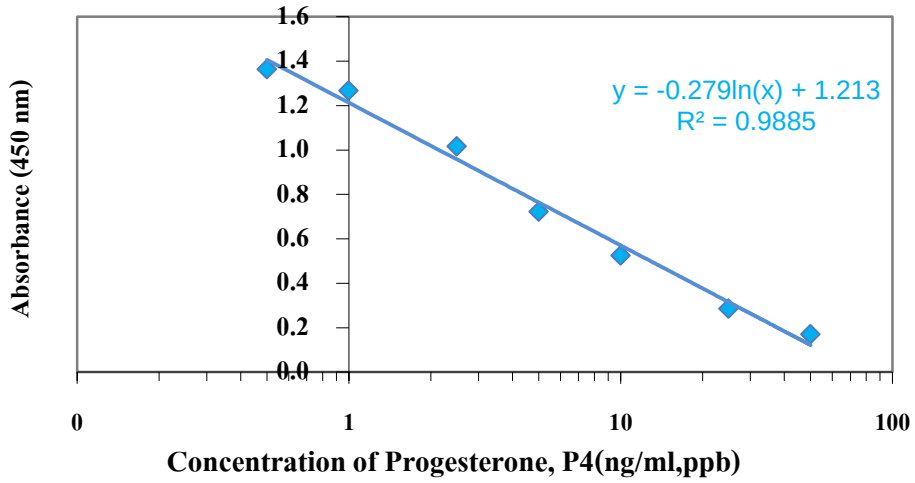
ทำการหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยรายงานเป็นค่า LOD (Limit of detection; LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรไม่มีโพรเจสเทอโรน(B_0) มาลบออกจาก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรนเพื่อแปลงเป็นความเข้มข้นของ โพรเจสเทอโรนซึ่งค่าความเข้มข้นที่ได้นี้คือ ค่าความไวของชุดตรวจสอบ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนและแกน Y เป็นค่า การดูดกลืนแสง หรือ $\%B/B_0$

$$LOD = B_0 - 3SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

จะได้ค่า IC50 และ LOD เป็น 4.85 และ 0.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ(รูปที่2 ตารางที่1 ข้อ 1)



รูปที่ 2.แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนในการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 1)

3.2.2 แบบที่ 2 Competitive direct ELISA (Antigen capture; โพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP)

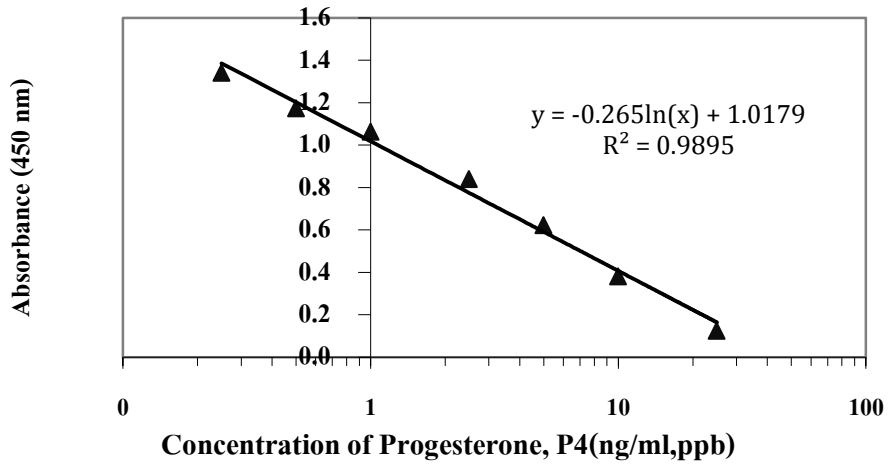
ในการเตรียมชุดตรวจสอบแบบ Competitive direct ELISA (Ag captured) นี้ ต้องทำการเชื่อมต่อระหว่างโพรเจสเทอโรนกับ hoseradish peroxidase (HRP) เพื่อใช้เป็นตัวแข่งขันกับ โพรเจสเทอโรนในรูปอิสระซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.2.2.1 การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนกับเอ็นไซม์ HRP (Progesterone-HRP)

การเชื่อมต่อโพรเจสเทอโรนเข้ากับเอ็นไซม์ HRP 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 6 ครั้ง ทุกๆ 12 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อด้วยวิธี Direct ELISA

การเตรียมชุดตรวจสอบแบบที่2 ต้องหาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมด้วยวิธี direct ELISA โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรนเจือจางที่ความเข้มข้น 0.0625-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย 1%BSA หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรน เชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP ที่ความเข้มข้น 1:1000 ถึง 1:20,000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM

Potassium citrate buffer pH 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสม คือ 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1:14000 ตามลำดับ นำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้มาหาความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ด้วยวิธี Competitive direct ELISA โดยทำตามขั้นตอน direct ELISA เบื้องต้นที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งจะทำการแปรความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ(P4 ; 4-Prognene-3,20-dione) มาตรฐานที่ความเข้มข้น 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงไปพร้อมกับโพรเจสเทอโรนที่มี HRP ที่เจือจาง 1:14,000 โดยมีตัวควบคุมลบ คือ หลุมที่ไม่มีโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ และตัวควบคุมบวก คือ หลุมที่มีโพรเจสเทอโรน คำนวนหาความไวที่ได้คำนวนตามข้อ 2.2.1.3 จะได้ค่า IC50 และ LOD เป็น 3.01 และ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3 ตารางที่ 1 ข้อ 2)



รูปที่ 3.แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนในการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 2)

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.3.1 การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบต้นแบบ

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

3.3.1.1 หาค่าความไว (Sensitivity) ของชุดตรวจสอบ

ทำการหาความไวของชุดตรวจสอบต้นแบบโดยรายงานเป็นค่า LOD (Limit of detection; LOD) หรือปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ ซึ่งค่า LOD หาได้จากการนำค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (n = 9) ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน(B_0) มาลบออกจาก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0 ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรนเพื่อแปลงเป็นความเข้มข้นของ โพรเจสเทอโรนซึ่งค่า

ความเข้มข้นที่ได้นี้คือ ค่าความไวของชุดตรวจสอบ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนและแกน Y เป็นค่า การดูดกลืนแสง หรือ $\%B/B_0$ ผลดังตารางที่ 1

$$LOD = B_0 - 3SD$$

โดยที่ B_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ที่ไม่มีโพรเจสเทอโรน

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ B_0

ตารางที่1 แสดงค่า IC50 และ LOD ในการพัฒนาชุดต้นแบบด้วยวิธี ELISA แบบต่างๆ ต่อฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน

วิธีเตรียมชุดตรวจสอบต้นแบบ	สัดส่วนของแอนติเจนกับแอนติบอดี	Progesterone(P4)	
		IC50 (ng/ml)	LOD(ng/ml)
1. Competitive indirect ELISA (Antibody capture)	Pro-BSA = 0.25 µg/ml MAb.Pro-Biotin = 1:6,000 Range of detection = 50-0.5 ng/ml	4.85	0.50
2. Competitive direct ELISA (Antigen capture)	MAb.Pro.= 0.35 µg/ml Pro.-HRP = 1:14,000 Range of detection = 25-0.25 ng/ml	3.01	0.25

3.3.1.2 การหาค่าความแม่นยำ (Precision) ของชุดตรวจสอบ

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

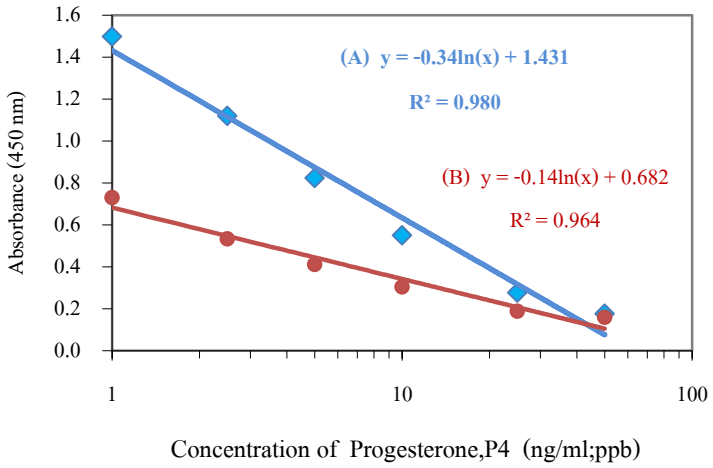
3.3.1.3 การหาค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบ

ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของชุดตรวจสอบสามารถวิเคราะห์ได้จากค่า %Recovery โดยนำตัวอย่างน้ำนมโค ที่มีการเติมโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทำการหาค่า %Recovery โดยทำการตรวจหาความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า % Recovery จากสูตรดังนี้

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

การหาค่าความแม่นยำ(Precision) และค่าความถูกต้อง (accuracy) โดยทำการตรวจหาสารมาตรฐานโพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมโคที่เจือจางด้วยPBS ที่ 1:5 และ 1:10 ความปริมาณความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนต่างๆกัน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 2.5, 5, 10, 25 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ)แล้วนำไปตรวจหาโพรเจสเทอโรนจากตัวอย่างน้ำนมโค โดยนำมาตรวจสอบด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่1 Competitive direct ELISA Antibody capture; แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับ Biotin) ที่

เตรียมได้ ซึ่งในการตรวจหาโพรเจสเทอโรนจากตัวอย่างนั้นต้องทำกราฟมาตราฐาน (รูปที่ 4) ด้วยทุกครั้ง โดยได้กราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรน อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ไปแทนค่าในสมการที่ได้จากกราฟมาตราฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค (ตารางที่ 2)



รูปที่ 4 กราฟมาตารฐานแสดงปริมาณความเข้มข้นฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการเตรียมชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 1)

A) กราฟมาตรฐานแสดงปริมาณความเข้มข้นต่างๆของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนที่ละลายในบัฟเฟอร์

B) กราฟมาตรฐานแสดงปริมาณความเข้มข้นต่างๆของฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนที่ละลายในน้ำนมเจือจาง 1:10

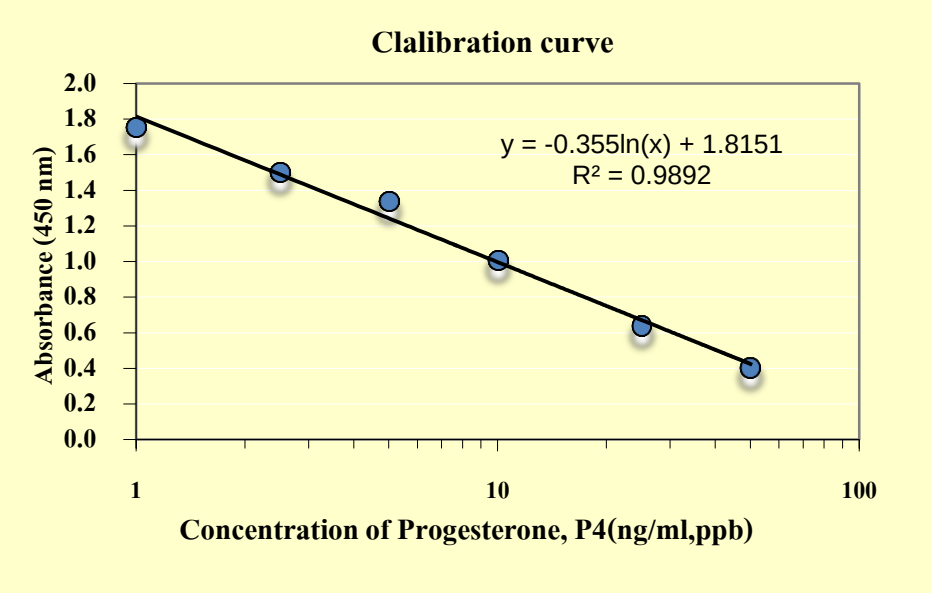
ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1

Fortified Conc. (ng/ml)	Sample	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
50	1:5	32.87±0.01	0.01	65.74
	1:10	39.41±0.02	0.04	78.82
25	1:5	24.23±0.01	0.04	96.90
	1:10	29.08±0.02	0.08	116.31
10	1:5	9.93±0.03	0.31	99.27
	1:10	13.84±0.01	0.09	138.38
5	1:5	5.68±0.03	0.47	113.64
	1:10	8.74±0.02	0.17	174.74
2.5	1:5	2.90±0.02	0.55	116.01
	1:10	3.72±0.03	0.81	148.89
1	1:5	0.61±0.02	3.12	61.09
	1:10	0.90±0.06	6.14	89.52

จากผลการทดสอบความแม่นยำพบว่าชุดตรวจสอบปริมาณโพรเจสเทอโรนต้นแบบโดยใช้หลักการ ELISA แบบที่ 1 คือ antibody captured direct competitive ELISA (Streptavidin-HRP) สามารถตรวจหาระดับปริมาณฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนได้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและเมื่อทำกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบระหว่างกราฟมาตรฐานที่ใช้ตัวทำละลายฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน เป็นบัฟเฟอร์(PBS) กับน้ำนมเจือจาง 1:10 พบว่าสารประกอบในน้ำนม(Milk Matrix) มีผลต่อค่าดูดกลืนแสง ดังรูปที่ 3 และเมื่อเติมปริมาณโพรเจสเทอโรนที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50, 25, 10, 5, 2.5 และ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำนมโดยนำมาวัดปริมาณโพรเจสเทอโรนด้วยชุดตรวจต้นแบบที่ 1 พบว่าเมื่อเจือจางน้ำนม เป็น 1:5 จะให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01-

3.12 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 61.09-116.01 และ 1:10 จะให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.04-6.14 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 78.82-174.74 ดังตารางที่ 2

ดูความแม่นยำของชุดตรวจ ELISA เพื่อตรวจหาสารมาตรฐานโพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมโคที่เจือจางด้วยPBS ที่ 1:0, 1:2, 1:5 และ 1:10 ความปริมาณความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนต่างๆกัน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 2.5, 5, 10 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ)แล้วนำไปตรวจหาโพรเจสเทอโรนจากตัวอย่างน้ำนมโค โดยนำมาตรวจสอบด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่2 Competitive direct ELISA Antigen capture; โพรเจสเทอโรนที่มี HRP) ที่เตรียมได้ ซึ่งในการตรวจหาโพรเจสเทอโรนจากตัวอย่างนั้นต้องทำกราฟมาตราฐาน (รูปที่ 5) ด้วยทุกครั้ง โดยได้กราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรน อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ไปแทนค่าในสมการที่ได้จากกราฟมาตราฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณของโพรเจสเทอโรนในตัวอย่าง (ตารางที่ 3 และ 4)



รูปที่ 5.แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรนสำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณของโพรเจสเทอโรนที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมเพื่อทดสอบประสิทธภาพของชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ(แบบที่ 2)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี antigen captured direct competitive ELISA (Progesterone-HRP; แบบที่ 2)

Fortified Conc. (ng/ml)	Sample	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
50	1:5	61.90±0.01	0.02	123.80
	1:10	63.39±0.11	0.18	126.79
20	1:5	18.67±0.25	1.35	93.23
	1:10	34.22±0.01	0.04	171.11
10	1:5	10.39±0.19	1.86	103.93
	1:10	17.57±0.02	0.13	175.65
5	1:5	3.89±0.24	6.07	77.84
	1:10	3.88±0.26	6.81	77.60
2	1:5	4.24±0.21	4.87	211.74
	1:10	2.48±0.03	1.08	124.09

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธี antigen captured direct competitive ELISA (Progesterone-HRP; แบบที่ 2)

Fortified Conc. (ng/ml)	Sample	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
25.0	1:0	14.25±0.02	0.17	56.98
	1:2	22.43±0.03	0.01	89.71
	1:5	27.07±0.01	0.04	108.26
	1:10	23.03±0.05	0.22	92.12
10	1:0	6.77±0.09	1.36	67.66
	1:2	10.56±0.06	0.52	105.62
	1:5	14.23±0.05	0.36	142.33
	1:10	12.98±0.07	0.56	129.78
5	1:0	5.00±0.05	1.03	99.99
	1:2	6.24±0.01	0.17	124.77
	1:5	10.80±0.01	0.11	215.99
	1:10	7.50±0.07	0.87	149.94
2.5	1:0	6.42±0.05	0.74	256.91
	1:2	4.59±0.01	0.10	183.77
	1:5	6.47±0.01	0.11	258.89
	1:10	6.12±0.05	0.88	244.69

จากผลในตารางที่ 3 และ 4 ทำสอบความแม่นยำของชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่2 Competitive direct ELISA Antigen capture; โพรเจสเทอโรนที่มี HRP) ผลในตารางที่ 3 พบว่าเมื่อเติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางน้ำนมที่ 1:5 และ 1:10 จะให้ผลการวัดที่ได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.02-6.81 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 77.60-211.74

ผลในตารางที่ 4 พบว่าเมื่อเติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเจือจางน้ำนมที่ 1:2 จะให้ผลการวัดที่ได้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01-0.52 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 89.71-183.77

3.4 การปรับระบบที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

เนื่องจากในการตรวจหาโพรเจสเทอโรนที่เติมลงในน้ำนม ด้วยวิธี แบบที่1 (Competitive direct ELISA Antibody capture; แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับ Biotin) และ แบบที่2 (Competitive direct ELISA Antigen capture; โพรเจสเทอโรนที่มี HRP) นั้นสารประกอบในน้ำนม (Milk Matrix) มีผลต่อการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่เติมลงไปในน้ำนม และต้องทำการเจือจางน้ำนมก่อนตรวจทำให้ปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมที่มีอยู่จริงในภาคสนามชุดตรวจต้นแบบจะต้องตรวจได้ไวในน้ำนมดิบต้องไม่เกิน 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดลองพบว่าชุดตรวจต้นแบบที่ 1 (Competitive direct ELISA ; Antibody capture) นั้นให้ค่าที่ความแม่นยำของการตรวจดีกว่าชุดตรวจแบบที่ 2 (Competitive direct ELISA ; Antigen capture) โดยจะให้ค่า % Recovery ที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (80-120%) จึงเลือกชุดตรวจต้นแบบที่ 1 มาใช้ในการพัฒนาต่อเพื่อให้ชุดตรวจสอบต้นแบบใช้งานได้จริงในภาคสนาม จึงต้องทำการปรับปรุงวิธีการทดสอบเพื่อลดผลของ Matrix ด้วยการปรับปรุงขั้นตอนการทำ ELISA, ปรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้าง, เลือกโปรตีนที่นำมาใช้บล็อกเพลท และเลือกโพรเจสเทอโรน มาตรฐานที่เหมาะสม เพื่อให้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

3.4.1 การปรับปรุงวิธีการทดสอบเพื่อลดผลของ Matrix ในน้ำนม ทำได้ดังนี้

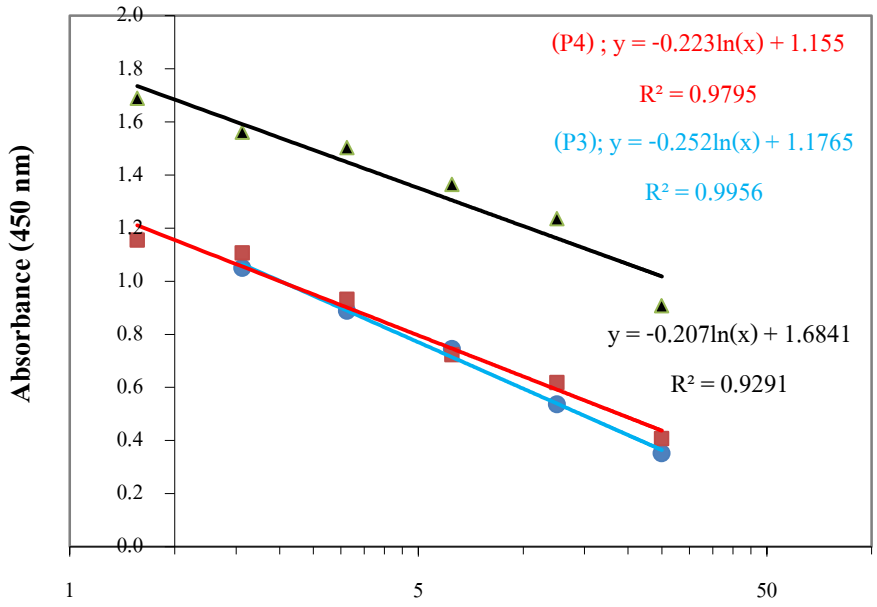
3.4.1.1 ปรับบัฟเฟอร์เป็น Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal (PBSCTT)

เนื่องจากโปรตีนในน้ำนมมีผลต่อระบบการจับของ biotin กับ streptavidin ที่ เชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP จึงจำเป็นต้องปรับ บัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจาง แอนติบอดีที่ติดกับ biotin และใช้ล้างจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมหลังบ่มตัวอย่างน้ำนมดิบทำให้ไม่ต้องเจือจางตัวอย่างน้ำนมดิบก่อนทดสอบ จากการศึกษาข้อมูลพบว่าบัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal (PBSCTT) สามารถลดปัญหาโปรตีนในน้ำนมที่มีผลต่อการตรวจวัดหาปริมาณโพรเจสเทอโรนเพื่อให้การทดสอบลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจ ทำให้สามารถตรวจตัวอย่างน้ำนมดิบได้โดยไม่ต้องทำการเจือจางหรือสกัดก่อนตรวจ เพื่อความสะดวกในการใช้งานจริงในภาคสนาม

Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal (PBSCTT) เตรียมได้โดยละลาย 0.5 % เคซีน (Hammersten grade casein ; C-3400) ใน 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตร นำไปต้มที่ 60 องศาเซลเซียส จนเป็นสารละลายใส เมื่อเย็นแล้วเติม PBS บัฟเฟอร์ที่มี 0.05% Tween20 และ 0.02% Thimerosal นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 – 1.2 ไมโครโมล เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ภายใน 1 อาทิตย์

ทดสอบผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคดิบโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 2 ใช้ PBSCTT โดยหาความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมด้วยวิธี direct ELISA โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโพรเจสเทอโรน เจือจางที่ความเข้มข้น 0.2 - 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย 1%BSA หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมโพรเจสเทอโรน เชื่อมติด

กับเอ็นไซม์ HRP ที่ความเข้มข้น 1:2000 ถึง 1:28000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBSCTT เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ละลายใน 205 mM Potassium citrate buffer pH 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติม 1 M H_2SO_4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง ELISA microplate reader ได้ความเข้มข้นของแอนติบอดีและแอนติเจนที่เหมาะสมคือ 0.425 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1:8000 ตามลำดับ นำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้มาหาความไวของแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ด้วยวิธี Competitive direct ELISA เพื่อทดสอบผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคดิบ โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุมด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรน0.425 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง เติมสารละลาย 1%BSA หลุมละ 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง นำตัวอย่างน้ำนมดิบของแม่โครหัส SJ 247 ที่เก็บมาจากสวนจิตรลดา และ PBST มาเติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระแบบต่างๆ ได้แก่ P3, P4 และ 17α (4-Pregnen-17 α-ol-3,20-dione) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.3906 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงไปพร้อมกับโพรเจสเทอโรนที่มี HRP ที่เจือจาง 1:8000 โดยพบว่าชุดตรวจแบบที่ 2 สามารถตรวจวัดโพรเจสเทอโรนได้ในรูปของ P3 และ P4 ได้ที่ช่วงความเข้มข้นที่ต้องการ แต่ในรูปของ 17α จะสามารถตรวจได้ในช่วงความเข้มข้นสูงกว่าที่ต้องการ จึงทำให้ได้กราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ดังรูปที่ 6 สามารถตรวจหาระดับปริมาณฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนได้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 1.5625 – 25 และ 0.7813 - 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าในน้ำนมดิบที่ไม่ได้ผ่านการเจือจางแล้วเติม P3 ให้ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.3906 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเส้นกราฟเลื่อนขึ้นเป็นแนวขนานเนื่องจากค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นในแต่ละความเข้มข้นคิดเป็นค่าเฉลี่ยคือ 0.612 และพบว่าในน้ำนมดิบเมื่อเติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P4 และ17α ที่ความเข้มข้นดังกล่าวชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 2 ไม่สามารถตรวจวัดได้ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงไม่ลดลงเมื่อเทียบกับน้ำนมดิบที่ไม่เติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ ดังผลในตารางที่ 5

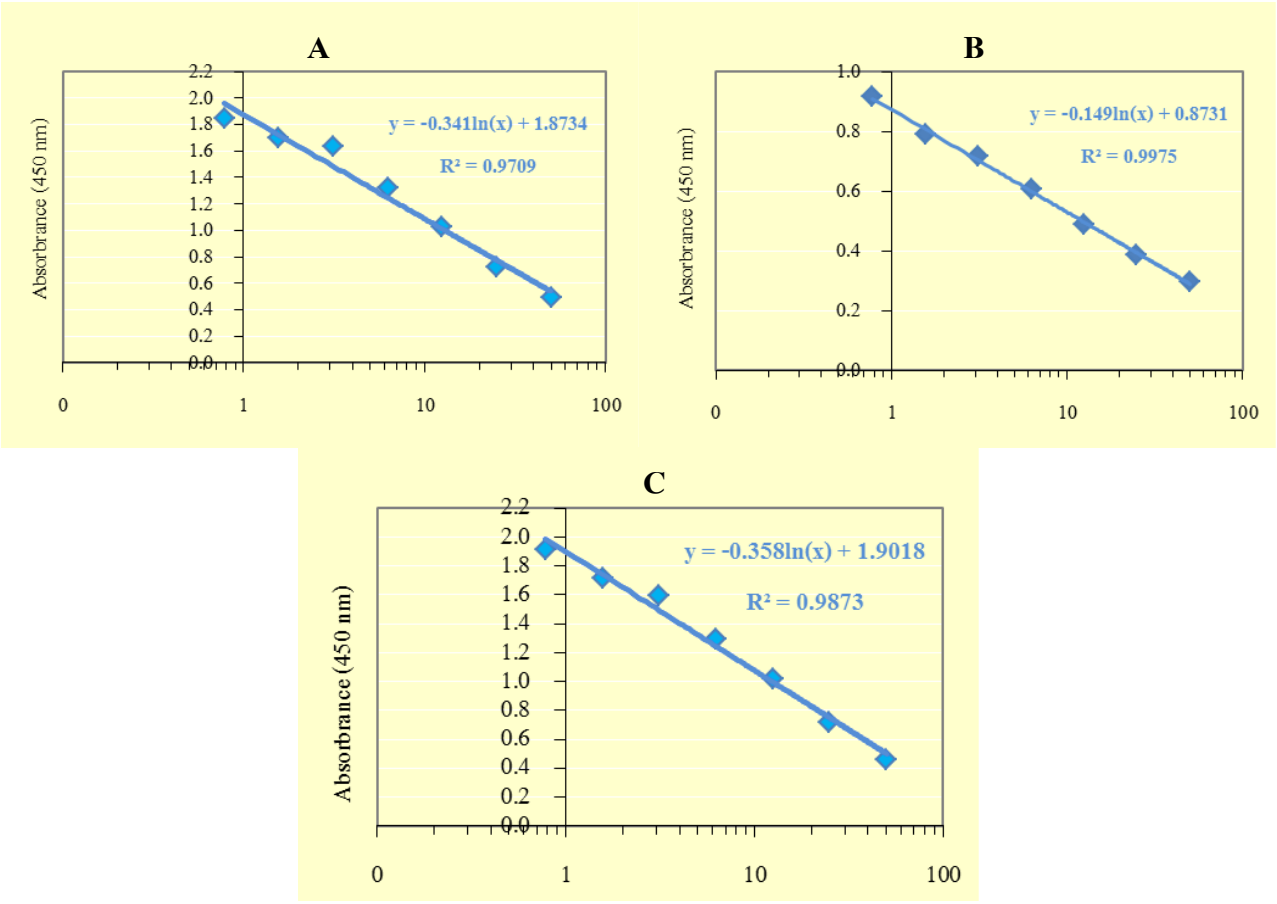


รูปที่ 6 แสดงกราฟมาตราฐานของโพรเจสเทอโรน P4 และ P3 สำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณของโพรเจสเทอโรน▲ P3 ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา ด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่ 2) โดยใช้บัฟเฟอร์ PBSCTT

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรน P3,P4 และ 17α ที่ละลายใน PBST และตัวอย่างน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา ด้วยชุดตรวจ ELISA ต้นแบบ (แบบที่ 2)โดยใช้บัฟเฟอร์ PBSCTT

ความเข้มข้น โพรเจสเทอโรน มาตรฐาน(นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)	ละลายใน PBST			ละลายใน น้ำนมสวนจิตรลดา SJ247		
	P3	P4	17α	P3	P4	17α
25	0.351	0.408	1.133	0.908	1.663	1.710
12.5	0.536	0.619	1.193	1.236	1.675	1.672
6.25	0.745	0.723	1.221	1.365	1.668	1.664
3.125	0.889	0.932	1.178	1.504	1.647	1.679
1.5625	1.050	1.107	1.267	1.561	1.699	1.712
0.78125	1.025	1.155	1.168	1.689	1.746	1.750
0.390625	1.012	1.136	1.217	1.655	1.704	1.649
0	1.110	1.114	1.219	1.694	1.609	1.605

ทดสอบผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคดิบโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 1 ใช้ PBSCTT พร้อมทั้งปรับ แอนติเจนที่ใช้ เคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม เป็น P3-OVA ที่ความเข้มข้น 1:1000- 1:6000 บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลาย 1%BSA ที่ละลายใน PBS แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติม โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอตินเจือจางที่ความเข้มข้น 1:5000 – 1:40000 ใน PBSCTT บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBSCTT 3 ครั้ง เติมสารละลาย Streptavidin ที่มี HRP เชื่อมอยู่ 1:4000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1:4000 และ 1:10000 ตามลำดับ นำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้มาทำ Competitive direct ELISA โดยทำตามขั้นตอน direct ELISA เบื่องต้นที่กล่าวมาแล้ว แต่จะเติมสารอิสระโพรเจสเทอโรนมาตรฐาน P3 และ P4 ที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เติมผสมกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน 1:4000 โดยได้กราฟมาตรฐานของโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ที่ตรวจวัดได้อยู่ในช่วง 0.781 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตรวจโพรเจสเทอโรน P3 รูปอิสระที่เติมลงในน้ำนมดิบ SJ247ได้อยู่ในช่วง 0.781 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังผลในรูปที่ 7 (A) ละลายใน PBST (B) ละลายในน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 (C) โพรเจสเทอโรน P4 ละลายใน PBST และเมื่อนำไปทำการทดลองซ้ำโดยทำการทดลองซ้ำในครั้งเดียวกัน (Intra-variation assay) และการทำการทดลองซ้ำระหว่างครั้งการทดลอง (Inter-variation assay) จะพบว่าชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 1 สามารถตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P3 ที่เติมลงในน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 ได้โดยไม่ต้องผ่านการสกัดและเจือจาง ซึ่งสามารถตรวจได้ในช่วงความเข้มข้น 0.781 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 6 จากผลที่ได้สามารถบอกได้ว่าชุดตรวจต้นแบบที่ 1 สามารถตรวจน้ำนมดิบที่เติม P3 ลงไป ได้อย่างถูกต้องแม่นยำที่ยอมรับได้คือต้องมีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 80 – 120 % และ %CV ≤ 20 จึงทำให้ตรวจได้ในช่วง 6.25 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี %Recovery เป็น 85.19 – 102.55 % และ %CV เป็น 0.01-0.18 % โดยพบว่าโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P4 ที่เติมลงในน้ำนมดิบจะสามารถตรวจวัดได้ในระดับความเข้มข้นมากกว่า 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงต้องนำชุดต้นแบบนี้ไปพัฒนาต่อในข้อต่อไปเพื่อให้ชุดตราจสอบต้นแบบสามารถตรวจโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P4 ได้ในน้ำนมดิบเพื่อให้ใช้ได้จริงในภาคสนาม



รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานโพรเจสเทอโรน P3 (A) ละลายใน PBST (B) ละลายในน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 (C) โพรเจสเทอโรน P4 ละลายใน PBST

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณโพรเจสเทอโรน P3 ในตัวอย่างน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 ด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1 โดยใช้บัฟเฟอร์ PBSCTT

Fortified Conc. (ng/ml)	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
Intra-variation assay			
50	49.07 ± 0.02	0.04	98.14
25	30.78 ± 0.02	0.07	123.13
12.5	13.31 ± 0.05	0.41	106.47
6.25	4.18 ± 0.04	1.00	66.89
3.125	1.59 ± 0.02	1.42	50.84
1.563	0.76 ± 0.04	5.26	48.82
0.781	0.54 ± 0.05	8.74	68.88
Inter-variation assay			
50	47.51 ± 0.01	0.01	95.01
25	25.53 ± 0.05	0.18	102.10
12.5	12.82 ± 0.01	0.05	102.55
6.25	5.33 ± 0.01	0.14	85.19
3.125	2.30 ± 0.03	1.40	73.66
1.563	1.18 ± 0.04	3.48	75.19

3.4.1.2 ปรับโปรตีนที่นำมาใช้บล็อกเพลท

ทดสอบผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคดิบโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่ 1 โดยใช้ PBSCTT พร้อมทั้งปรับ แอนติเจนที่ใช้ เคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม เป็น P3-OVA กับ P3-BSA และ ปรับโปรตีนที่นำมาใช้บล็อกเพลท เคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย P3-OVA และ P3-BSA ที่ความเข้มข้น 1:4000 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายที่ใช้บล็อก เป็น Skim milk ร้อยละ 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 ที่ละลายใน PBS แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ละลายสารอิสระโพรเจสเทอโรนมาตรฐาน P3 ที่ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.3906 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ P4 ที่ความเข้มข้น 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812, 3.906 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน PBS และน้ำนมดิบ

จากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247 ผสมกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน 1:4000 ละลายใน PBSCTT บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง ล้างด้วย PBSCTT 3 ครั้ง เติมสารละลาย Streptavidin ที่มี HRP เชื่อมอยู่ 1:4000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร ดังผลในตารางที่ 7 (A) เติมโพรเจสเทอโรน P3 (B) เติมโพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ผลที่ได้พบว่าเมื่อเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม P3-BSA จะให้ค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตรที่สูงกว่า P3-OVA โดยเปรียบเทียบควบคู่ไปกับ ร้อยละของ Skim milk ที่ใช้บล็อก และโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระที่เติมลงใน PBS และน้ำนมดิบจึง เลือกสภาวะที่ได้คือ เคลือบเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย P3-BSA ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บล็อกด้วย 1% Skim milk

ชุดตรวจต้นแบบที่เลือกได้ เป็นชุดตรวจสอบต้นแบบ Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1 โดยใช้สภาวะดังนี้

1. เคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย P3-BSA ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. บล็อกจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย 1% Skim milk

3. เจือจางแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน 1:4000 และ ล้างจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม หลังจากบ่มตัวอย่าง ด้วย PBSCTT

โดยนำสภาวะที่เลือกได้มาทดสอบตรวจหาโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระโดยละลายสารอิสระโพรเจสเทอโรนมาตรฐาน P3 และ P4 ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.3906, 0.1977 และ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ใน PBS, Skim milk 0.5-5% และน้ำนมโคดิบจากสวนจิตรลดา (SJ247) ผลที่ได้ดังตารางที่ 8 โดยแสดงให้เห็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อเติมโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ลงใน PBS, Skim milk ที่ความเข้มข้น 0.5-50 % และน้ำนมดิบจากแม่โค SJ247 ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1 เพื่อเลือกระบบที่มีสภาวะใกล้เคียงกับน้ำนมแล้วยังสามารถตรวจติดตามโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P3 และ P4 ได้ใกล้เคียงกับกราฟมาตรฐานเพื่อลดผลของ สารประกอบในน้ำนม (Milk Matrix) ที่มีผลต่อการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนน้ำนมที่มีอยู่จริงในภาคสนาม และเมื่อนำค่าบางส่วนจากตารางที่ 8 มาสร้างกราฟดังรูปที่ 7 จะพบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบโปรตีนที่นำมาบล็อกโดยใช้ Skim milk ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 % เพื่อตรวจหาโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P3 ที่ความเข้มข้น 0-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA โดยเคลือบหลุมด้วย P3-OVA และ P3-BSA พบว่าเมื่อบล็อกด้วย Skim milk ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % ให้ผลค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นจะได้ค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร มีแนวโน้มลงต่ำลง แต่จากการเปรียบเทียบการเคลือบหลุมด้วย P3-OVA และ P3-BSA โดยทำการบล็อกด้วย 0.5% Skim milk พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับ P3-BSA ได้ดีกว่า P3-OVA ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อ

ไม่เติมโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ เป็น 1.521 และ1.049 ตามลำดับ ดังตารางที่ 7 (A) และยังสามารถจับกับโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P3 และ P4 ได้ดีกว่า ผลในตารางที่ 7(A) และ 7(B) ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกแอนติเจนที่เคลือบจาน 96 หลุม เป็น P3-BSA โดยจะพบว่าโพรเจสเทอโรนที่ละลายอยู่ใน PBS จะสามารถจับกับแอนติบอดีได้ดีกว่าละลายอยู่ในน้ำนมดิบ ซึ่งที่ความเข้มข้นโพรเจสเทอโรนเป็น 0 ค่าดูดกลืนแสงที่ได้ในน้ำนมดิบจะต่ำกว่าใน PBS แสดงให้เห็นว่าสารประกอบในน้ำนมยังมีผลต่อการทำปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ดังนั้นในการตรวจหาโพรเจสเทอโรนในน้ำนมจึงควรเทียบกับกราฟมาตรฐานที่อยู่ในน้ำนม แต่เนื่องจากในน้ำนมอาจมีโพรเจสเทอโรนปนเปื้อน จึงได้ทำการเปรียบเทียบการทำปฏิกริยาของแอนติบอดีกับโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ในรูปอิสระที่ละลายอยู่ใน PBS, Skim milk ที่ความเข้มข้น 0.5-5 % และน้ำนมดิบ ด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA พบว่า Skim milk ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลการทำปฏิกริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกับ PBS และค่าจะลดต่ำลงเมื่อความเข้มข้นของ Skim milk สูงขึ้น เมื่อตรวจในน้ำนมดิบพบว่าค่าดูดกลืนแสงที่ได้ลดต่ำลง 2-3 เท่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบในน้ำนม หรือตัวอย่างน้ำนมดิบที่ใช่อาจมีโพรเจสเทอโรนตกค้างอยู่ ดังตารางที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับ โพรเจสเทอโรนอิสระทั้งในรูป P3 และ P4 อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.19 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นกันดังรูปที่ 8

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อใช้แอนติเจน P3-OVA และ P3-BSA เคลือบจาน 96 หลุม และ บล็อกด้วย Skim milk ที่ร้อยละ 0.5-5 โดย (A) เติม โพรเจสเทอโรน P3 (B) เติม โพรเจสเทอโรน P4

(A)

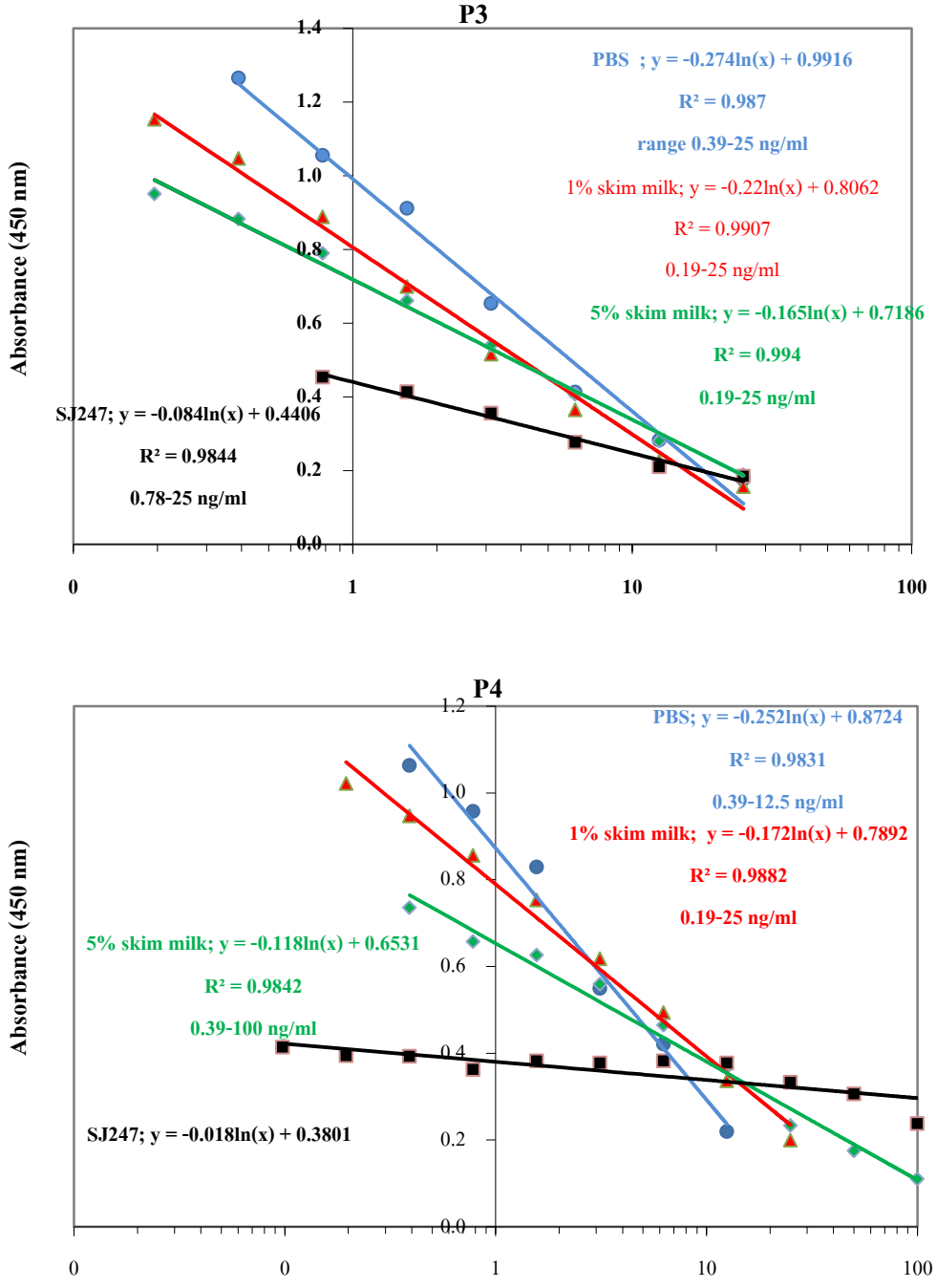
P3	Coat plat : P3-OVA (1:4,000)												Coat plat : P3-BSA (0.25 ug/ml)											
	Skim milk 0.5%		Skim milk 1%		Skim milk 2%		Skim milk 3%		Skim milk 4%		Skim milk 5%		Skim milk 0.5%		Skim milk 1%		Skim milk 2%		Skim milk 3%		Skim milk 4%		Skim milk 5%	
ng/ml	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk
25	0.317	0.402	0.400	0.411	0.360	0.367	0.343	0.331	0.359	0.339	0.389	0.348	0.173	0.182	0.222	0.187	0.227	0.199	0.209	0.191	0.220	0.182	0.216	0.184
12.5	0.485	0.509	0.562	0.507	0.540	0.504	0.508	0.473	0.547	0.442	0.568	0.467	0.282	0.268	0.375	0.288	0.404	0.278	0.368	0.270	0.380	0.266	0.413	0.265
6.25	0.641	0.612	0.699	0.601	0.723	0.613	0.638	0.559	0.714	0.590	0.751	0.613	0.425	0.344	0.569	0.372	0.622	0.372	0.566	0.337	0.569	0.367	0.639	0.369
3.125	0.790	0.675	0.947	0.685	0.887	0.653	0.776	0.580	0.835	0.651	0.884	0.591	0.588	0.391	0.831	0.396	0.849	0.399	0.792	0.381	0.782	0.373	0.837	0.344
1.563	0.843	0.639	1.045	0.702	0.990	0.779	0.925	0.655	0.993	0.654	0.997	0.744	1.014	0.539	1.310	0.568	1.356	0.549	1.250	0.537	1.211	0.524	1.323	0.529
0.781	0.954	0.678	1.118	0.753	1.101	0.719	1.022	0.642	1.064	0.677	1.111	0.677	1.172	0.538	1.542	0.560	1.518	0.512	1.273	0.518	1.452	0.520	1.475	0.502
0.391	0.972	0.641	1.184	0.814	1.128	0.743	1.027	0.673	1.084	0.702	1.120	0.561	1.394	0.556	1.791	0.660	1.731	0.577	1.631	0.569	1.757	0.582	1.812	0.533
0	1.049	1.074	1.118	0.796	1.035	0.760	1.039	0.546	1.000	0.696	1.029	0.636	1.521	0.520	1.939	0.559	1.666	0.493	1.743	0.463	1.773	0.462	1.739	0.439

(B)

P4	Coat plat : P3-OVA (1:4,000)												Coat plat : P3-BSA (0.25 ug/ml)											
	Skim milk 0.5%		Skim milk 1%		Skim milk 2%		Skim milk 3%		Skim milk 4%		Skim milk 5%		Skim milk 0.5%		Skim milk 1%		Skim milk 2%		Skim milk 3%		Skim milk 4%		Skim milk 5%	
ng/ml	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk	PBS	Milk
250	0.084	0.472	0.093	0.500	0.090	0.442	0.090	0.333	0.086	0.331	0.083	0.311	0.130	0.212	0.113	0.212	0.111	0.193	0.092	0.167	0.126	0.137	0.094	0.148
125	0.162	0.596	0.190	0.669	0.191	0.584	0.171	0.540	0.177	0.532	0.155	0.521	0.114	0.276	0.123	0.286	0.122	0.278	0.104	0.229	0.101	0.208	0.105	0.190
62.5	0.325	0.725	0.427	0.724	0.394	0.669	0.344	0.613	0.345	0.607	0.338	0.565	0.155	0.331	0.187	0.363	0.190	0.352	0.153	0.278	0.140	0.257	0.140	0.219
31.25	0.482	0.725	0.579	0.653	0.502	0.585	0.420	0.599	0.478	0.505	0.463	0.492	0.241	0.425	0.311	0.386	0.294	0.395	0.235	0.333	0.202	0.276	0.201	0.242
15.63	0.706	0.799	0.898	0.820	0.840	0.727	0.724	0.749	0.765	0.673	0.748	0.619	0.521	0.495	0.679	0.516	0.738	0.522	0.488	0.402	0.410	0.348	0.396	0.289
7.813	0.831	0.786	1.031	0.773	1.000	0.741	0.743	0.682	0.803	0.674	0.847	0.647	0.782	0.489	1.026	0.523	1.110	0.474	0.619	0.399	0.694	0.367	0.636	0.298
3.906	0.887	0.770	1.104	0.798	1.060	0.770	0.831	0.673	0.879	0.704	0.849	0.707	1.029	0.512	1.338	0.550	1.296	0.522	0.875	0.394	0.810	0.363	0.815	0.314
0	1.001	0.718	1.122	0.693	1.086	0.679	0.854	0.592	0.899	0.618	0.845	0.588	1.335	0.442	1.581	0.528	1.583	0.444	1.194	0.360	1.084	0.308	1.007	0.266

ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เมื่อเติมโพรเจสเทอโรน P3 และ P4 ลงใน PBS, Skim milk ที่ความเข้มข้นต่างๆ และน้ำนมดิบจากแม่โค SJ247 ด้วยชุดตรวจสอบต้นแบบ Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) แบบที่ 1

Conc. (ng/ml)	P3								P4							
	PBS	Skim milk						SJ247	PBS	Skim milk						SJ247
		0.5%	1%	2%	3%	4%	5%			0.5%	1%	2%	3%	4%	5%	
100	0.099	0.090	0.129	0.122	0.099	0.112	0.115	0.117	0.103	0.089	0.118	0.118	0.107	**0.104**	**0.110**	0.238
50	0.139	0.179	0.178	0.162	0.131	0.157	0.145	0.122	0.127	0.095	0.132	0.144	0.140	**0.166**	**0.175**	0.306
25	**0.176**	**0.149**	**0.157**	**0.177**	0.171	0.216	0.189	**0.185**	0.178	0.149	**0.199**	**0.226**	**0.192**	**0.231**	**0.233**	0.332
12.5	**0.283**	**0.222**	**0.227**	**0.280**	**0.248**	**0.266**	**0.281**	**0.211**	**0.219**	**0.220**	**0.336**	**0.366**	**0.304**	**0.320**	**0.367**	0.377
6.25	**0.413**	**0.329**	**0.365**	**0.386**	**0.394**	**0.372**	**0.407**	**0.277**	**0.421**	**0.345**	**0.493**	**0.481**	**0.371**	**0.418**	**0.464**	0.382
3.125	**0.654**	**0.451**	**0.516**	**0.543**	**0.529**	**0.505**	**0.540**	**0.356**	**0.549**	**0.500**	**0.617**	**0.667**	**0.479**	**0.492**	**0.559**	0.377
1.563	**0.912**	**0.613**	**0.699**	**0.714**	**0.689**	**0.666**	**0.662**	**0.414**	**0.829**	**0.660**	**0.753**	**0.788**	**0.557**	**0.569**	**0.626**	0.382
0.781	**1.056**	**0.796**	**0.889**	**0.856**	**0.840**	**0.807**	**0.790**	**0.454**	**0.957**	**0.747**	**0.856**	**0.856**	**0.633**	**0.579**	**0.657**	0.362
0.391	**1.266**	**0.980**	**1.047**	**0.989**	**0.874**	**0.906**	**0.883**	0.706	**1.063**	**0.870**	**0.947**	**0.903**	**0.686**	**0.642**	**0.735**	0.393
0.195	1.335	0.998	**1.153**	1.004	0.938	**0.981**	**0.951**	0.557	1.079	0.888	**1.022**	0.910	0.716	0.737	0.737	0.394
0.098	1.263	1.124	1.143	1.105	0.919	0.997	0.949	0.495	1.078	0.918	1.038	0.964	0.716	0.790	0.751	0.414
0	1.281	1.078	1.176	1.029	0.926	0.966	1.052	0.490	1.098	0.872	0.973	0.937	0.698	0.717	0.739	0.397



รูปที่ 8 แสดงกราฟเปรียบเทียบการวัดปริมาณโพรเจสเทอโรน (A) P3 (B) P4 ละลายใน PBS 1%Skim milk 5%Skim milk น้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา แม่โครหัส SJ247

3.5 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมโค

ทำการเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคเพื่อนำมาทดสอบในชุดตรวจสอบต้นแบบโดยการเก็บน้ำนมโคซึ่งอยู่ในระยะต่างๆของวงรอบการเป็นสัด จากฟาร์มโคนม ทำการสกัดน้ำนมตัวอย่างและตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนด้วยชุดตรวจสอบที่เตรียมได้เทียบกับกราฟโพรเจสเทอโรนมาตรฐานและทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้กับชุดตรวจสอบทางการค้า

3.5.1 การสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

3.5.1.1 ทดสอบผลขององค์ประกอบของสารสกัด ต่อชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ (Matrix Effect)

โดยนำน้ำนมโคปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนบนที่เป็นชั้นไขมันมาสกัด โดยนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองแบ่งหลอดละ 10 ไมโครลิตร เติม P4 ที่ละลายอยู่ใน 5% Methanolใน PBST ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 ปริมาตรต่อปริมาตร นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส ละลายกลับด้วย 0.5 ไมโครลิตรของ 5% Methanolใน PBST

ตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคดิบโดยใช้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่เตรียมได้ โดยเคลือบจานทดสอบ ELISA ชนิด 96 หลุม ด้วย 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของ P3-BSA 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 12-16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลายที่ใช้บล็อก เป็น 1% Casein และ 1% Gelatin ที่ละลายใน PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย PBST 3 ครั้ง นำสารสกัดที่เตรียมได้มาผสมกับแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน 1:6000 ละลายใน PBST บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง เติมสารละลาย Streptavidin ที่มี HRP เชื่อมอยู่ 1:4000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ล้างด้วย PBST เติมสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 450 นาโนเมตร พบว่าเมื่อนำไขมันในน้ำนมที่แยกได้มาเติม P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบด้วยวิธี ELISA เพื่อทดสอบความถูกต้อง แม่นยำ และศึกษาผลขององค์ประกอบของไขมันที่ผ่านการสกัดว่ามีผลต่อชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ พร้อมทั้งศึกษาผลของสารที่นำมาบล็อกจาน 96 หลุมเพื่อให้ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่เหมาะสมกับสารสกัดโพรเจสเทอโรน จากไขมันน้ำนมที่แยกได้ โดยทำการบล็อกด้วย 1% Gelatin และ 1% Casein นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันดังตารางที่ 9 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อบล็อก ด้วย 1%Gelatin จะให้ค่าการตรวจหา P4 ที่เติมลงในไขมันนมได้ถูกต้องกว่า บล็อก ด้วย 1%Casein โดยตรวจ P4 ที่เติมลงในไขมันน้ำนมแล้วนำมาสกัด ได้ในช่วง 1.25 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ %Recovery ตั้งแต่ 79.16 – 168.68

ตารางที่ 9 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ในตัวอย่างไขมันจากน้ำนมดิบ ด้วยวิธี Competitive Indirect ELISA (Antibody capture) เมื่อบล็อกด้วย 1% Gelatin และ 1% Casein

Fortified Conc. (ng/ml)	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
Block : 1% Gelatin, N=3			
50	**50.52 ± 0.01**	**0.01**	**101.03**
25	**29.13 ± 0.02**	**0.05**	**116.51**
10	**7.92 ± 0.06**	**0.80**	**79.16**
5	**8.43 ± 0.04**	**0.45**	168.68
1.25	**1.36 ± 0.05**	**3.96**	109.14
Block : 1% Casein, N=3			
50	**59.61 ± 0.01**	**1.55**	**119.22**
25	**39.40 ± 0.01**	**1.71**	**157.60**
10	**30.54 ± 0.01**	**2.66**	**305.38**
5	**15.00 ± 0.01**	**2.90**	**300.04**

เมื่อเติม โพรเจสเทอโรน P4 และ P3 ที่ความเข้มข้นต่างๆให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในไขมันที่สกัดจากน้ำนมดิบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปสกัดตามข้อ 2.5.1.1 แล้วนำมาตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบ พบว่าชุดตรวจสามารถตรวจ โพรเจสเทอโรนได้ทั้งในรูปที่เป็น P4 และ P3 แต่สามารถตรวจในรูป P4 ได้ %Recovery อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานมากกว่าผลตรวจในรูป P3 โดยให้ค่า %Recovery เป็น 98.33 – 138.52 และ 59.13 – 176.06 ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 และ P3 ในตัวอย่างไขมันจากน้ำนมดิบ ด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้

Fortified Conc. (ng/ml)	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
P4, N=3			
50	61.57 ± 0.01	0.01	123.13
25	31.34 ± 0.02	0.05	125.37
10	12.33 ± 0.02	0.13	123.27
2.5	2.46 ± 0.04	1.59	98.33
1.25	1.73 ± 0.01	0.69	138.52
P3, N=3			
50	58.53 ± 0.01	0.01	117.06
25	21.49 ± 0.01	0.06	85.97
10	17.61 ± 0.02	0.12	176.06
2.5	1.48 ± 0.05	3.37	59.13
1.25	0.79 ± 0.03	4.14	62.85

เมื่อเติม โพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำนมดิบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปสกัดแยกไขมันกับส่วนใสออกตามข้อ 2.5.1.1 นำส่วนไขมันไปสกัดต่อตามข้อ 2.5.1.1 แล้วนำมาตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบ โดยแยกเป็น 3 ส่วน คือ 1. ส่วนใส 2. ส่วนใสนำไปเจือจางกับ 5% Methanolใน PBST อัตราส่วน 1:10 3. ไขมันที่แยกได้ไปสกัดตามข้อ 2.5.1.1 พบว่าชุดตรวจสามารถตรวจ โพรเจสเทอโรน P4ได้ทั้งในรูปที่เป็น Skim milk, Skim milk ที่เจือจาง และ ส่วนที่สกัดจากไขมัน โดยพบว่าส่วนใส ตรวจได้ช่วง 5-15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %Recovery เป็น 60.61 – 121.15 ส่วนใสนำไปเจือจาง 1:10 ตรวจได้ช่วง 1.56-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %Recovery เป็น 48.12 – 85.12 ส่วนที่สกัดจากไขมัน ตรวจได้ช่วง 2.5-15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร %Recovery เป็น 87.23– 109.05 ผลดังตารางที่ 11

จากผลที่ได้ทำให้สรุปได้ว่าความสามารถในการตรวจหาโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าเมื่อตรวจในไขมันที่สกัด จะให้ %Recovery สูงกว่าเมื่อตรวจในน้ำนมใสที่แยกได้ เนื่องจาก โพรเจสเทอโรนจัดเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมน สามารถละลายได้ดีในชั้นไขมันทำให้ปริมาณโพรเจสเทอโรนส่วนใหญ่พบที่ไขมันนม จึงทำให้สามารถตรวจหา โพรเจสเทอโรนในไขมันนมได้ %Recovery ที่สูงกว่าในรูปของส่วนใส (Skim milk) ซึ่งมี โพรเจสเทอโรน ละลายอยู่น้อยกว่า

ตารางที่ 11 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ที่เติมลงในตัวอย่างน้ำนมดิบ

Fortified Conc. (ng/ml)	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
Whey (Whole milk ;De-fat) , N=3			
15	9.09 ± 0.01	0.15	60.61
10	7.39 ± 0.04	0.50	73.95
5	6.06 ± 0.09	1.43	121.15
Whey (Whole milk ;De-fat) , dilute 1:10 , N=3			
25	12.03 ± 0.01	0.04	48.12
12.5	6.15 ± 0.04	0.63	49.17
6.25	4.15 ± 0.06	1.42	66.45
3.125	1.98 ± 0.02	1.17	63.30
1.5625	1.33 ± 0.12	9.20	85.12
Fat (Extracted) , N=3			
15	13.08 ± 0.07	0.50	87.23
10	10.47 ± 0.05	0.43	104.67
5	4.87 ± 0.04	0.90	97.33
2.5	2.73 ± 0.09	3.29	109.05

นำน้ำนมโค 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง เติม โพรเจสเทอโรน P4 ที่ความเข้มข้นต่างๆให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 – 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำนมดิบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกชั้นไขมันที่ได้ด้านบนใส่หลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองดูดใส่หลอดทดลองใหม่ นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลายกลับด้วย 0.5 มิลลิลิตร ลิตรของ 5% เมทานอล ละลายใน PBST เติม แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับไบโอติน 1:6000 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลิตร นำไปตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 8 ซ้ำ ผลที่ได้ดังตารางที่ 12 พบว่าเมื่อต้องการตรวจ โพรเจสเทอโรนที่ระดับต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้นำตัวอย่างที่สกัดและละเหยแห้งแล้วมาละลายกลับด้วย 0.5 มิลลิลิตรลิตรของ 5% เมทานอล ละลายใน PBST เติม

แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับไบโอติน 1:6000 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลิตร นำไปตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้เลย หากต้องการตรวจในระดับ 10 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต้องนำตัวอย่างที่ละลายกลับแล้วมาเจือจางด้วย 5% เมทานอล ละลายใน PBST อัตราส่วน 1:1 ก่อนนำมาเติมแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับไบโอติน 1:6000 โดยจะสามารถตรวจได้ช่วง 1 – 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า %Recovery และ %CV อยู่ในช่วง 80.09-117.66 และ 0.03-3.33 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้และมีค่าแม่นยำในการตรวจ

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรน P4 ในไขมันน้ำนมด้วยชุดตรวจต้นแบบ

Fortified Conc. (ng/ml)	Mean±SD (ng/ml)	CV (%)	Recovery (%)
100	84.14 ± 0.04	0.04	84.14
50	50.15 ± 0.01	0.03	100.03
10	8.01 ± 0.19	2.35	80.09
5	5.88 ± 0.06	0.97	117.66
1	0.88 ± 0.03	3.33	88.50

3.5.2 การวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในตัวอย่างน้ำนมดิบกับชุดตรวจสอบต้นแบบ

ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำนมดิบจากสวนจิตรลดา จากแม่โคนม 3 ตัว ได้แก่ NF, 193 และ 296 เก็บน้ำนมทุกๆ 2 วัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2555 ถึง 4 กันยายน 2555 ได้ทั้งหมด 18 ตัวอย่างต่อแม่โค 1 ตัว เก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 1 ตรวจโพรเจสเทอโรนจากการสกัด Core fat ด้วยชุดตรวจต้นแบบ

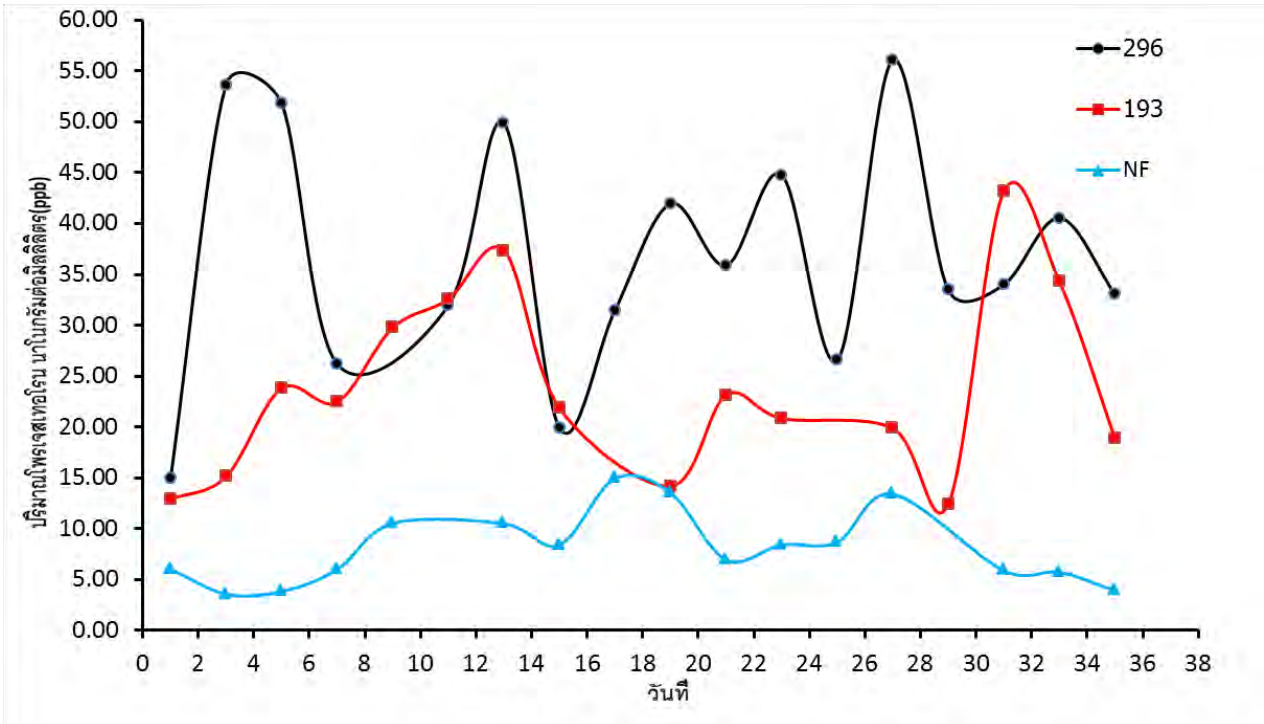
นำมาตรวจหาโพรเจสเทอโรนโดยนำน้ำนมมาละลายที่อุณหภูมิห้อง อุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำน้ำนมโค 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกชั้นไขมันที่ได้ด้านบนใส่หลอดทดลอง (นำ Skim milk ไปตรวจด้วยวิธีตรวจแบบที่ 2 และ3 ต่อไป) นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะได้ของเหลวสีเหลืองดูดใส่หลอดทดลองใหม่ นำไปสกัดด้วย Petroleum ether : Methanol : Water อัตราส่วน 0.5: 0.75 : 0.125 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง นำส่วน Methanol มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส จนแห้ง ละลายกลับด้วย 0.5 มิลลิลิตรลิตรของ 5% เมทานอล ละลายใน PBST เติม แอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนที่ติดกับไบโอติน 1:6000 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลิตร นำไปตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 8 ซ้ำ

วิธีที่ 2 ตรวจโพรเจสเทอโรนจาก Skim milk ด้วยชุดตรวจต้นแบบ

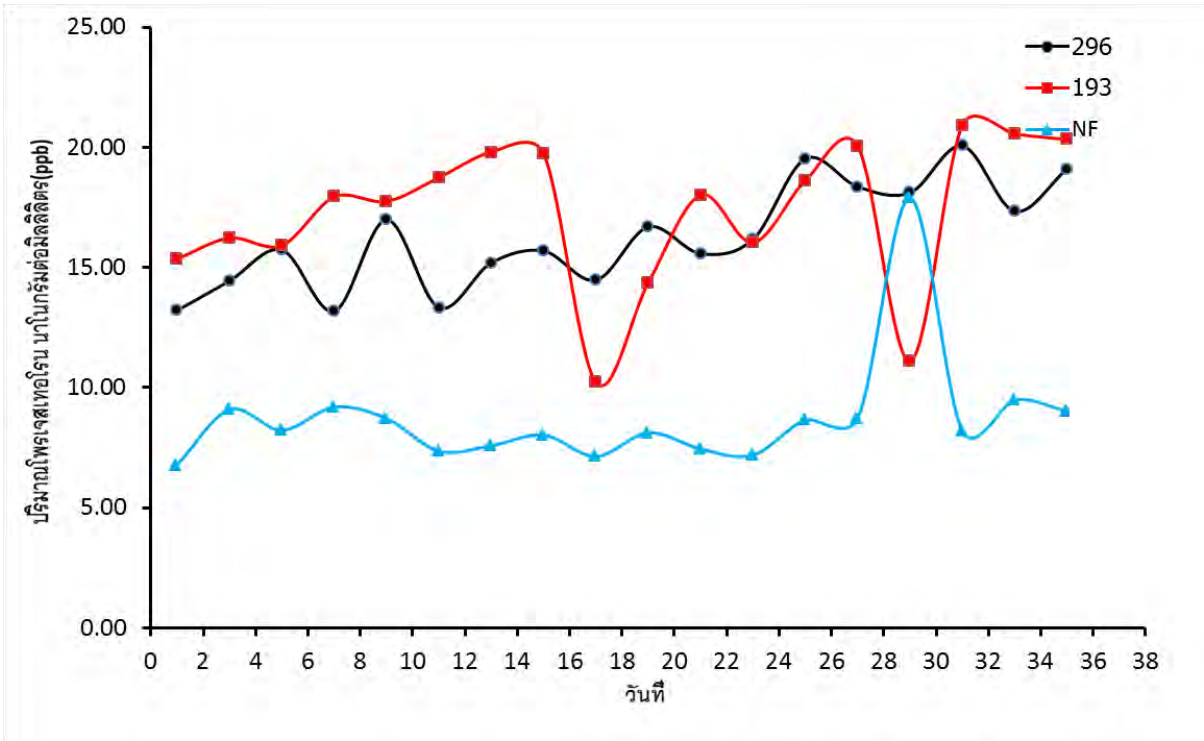
นำส่วน Skim milk ที่ได้จากวิธีที่ 1 มาตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 8 ซ้ำ

วิธีที่ 3 ตรวจโพรเจสเทอโรนจาก Skim milk ด้วยชุดตรวจ Euro

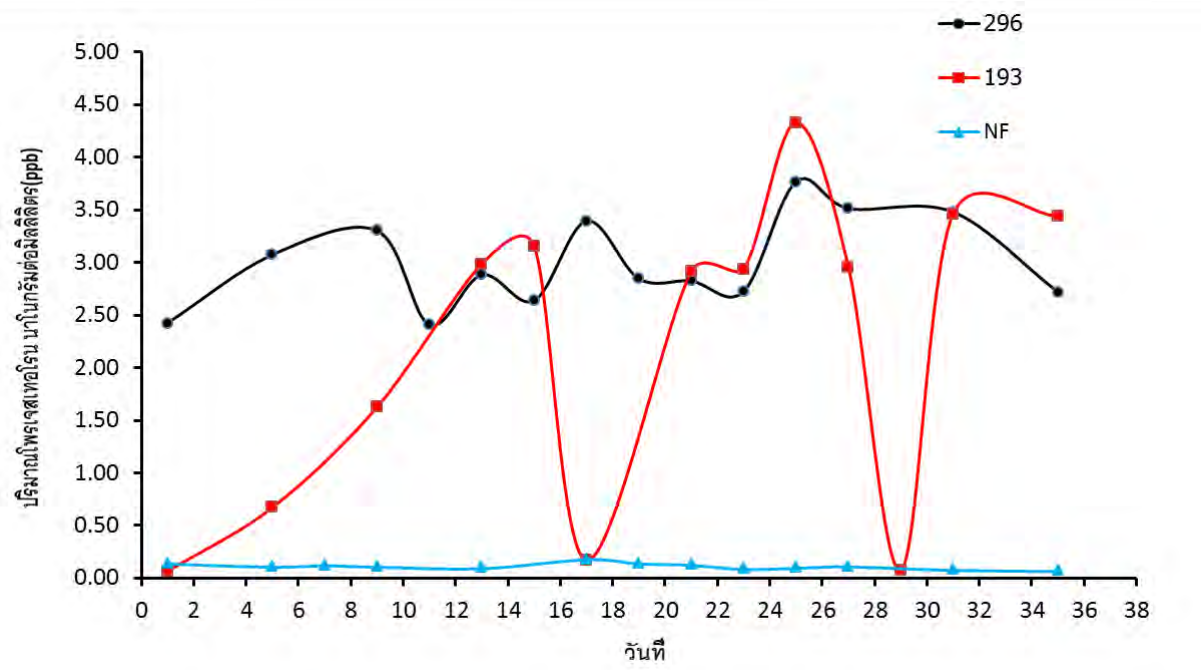
นำส่วน Skim milk ที่ได้จากวิธีที่ 1 มาตรวจด้วยชุดตรวจของ Progesterone ELISA ของ Euro Proxima (5081PROG) สามารถตรวจได้ในช่วง 0.2-12.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยระยะก่อนเป็นสัด (ระยะต้น Follicular ; ระยะที่ฟอลลิเคิลเจริญทำงานมากเป็นช่วงที่รวมระยะก่อนเป็นสัดกับระยะเป็นสัด) จะตรวจได้ต่ำกว่า 0.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะต้นหรือสิ้นสุด Luteal ตรวจได้ช่วง 0.4-1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ Luteal phase เป็นระยะที่มีคอร์ปัสลูเทียมทำงานรวมระยะหลังการเป็นสัดและระยะไม่เป็นสัดในวงรอบ ตรวจได้มากกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม Progesterone-HRPO 25 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม สารละลายแอนติบอดี 25 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่า 1 นาที นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง เติมสารละลายสับสเตรตของเอนไซม์ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยาปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร



รูปที่ 9 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยตรวจโพรเจสเทอโรนจากการสกัด Core fat ด้วยชุดตรวจต้นแบบ



รูปที่ 10 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยตรวจโพรเจสเทอโรนจาก Skim milk ด้วยชุดตรวจต้นแบบ



รูปที่ 11 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยตรวจโพรเจสเทอโรนจาก Skim milk ด้วยชุดตรวจ Euro

ผลที่ได้พบว่าเมื่อตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมด้วยการสกัดจากไขมันน้ำนม (Core fat) จะให้ค่าปริมาณโพรเจสเทอโรนได้ถูกต้องแม่นยำและให้ค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการตรวจจาก Skim milk และเมื่อนำไปตรวจด้วยชุดตรวจของ Euro จะตรวจได้ปริมาณต่ำที่สุดเนื่องจากช่วงในการตรวจของชุดตรวจ Euro ตรวจได้ในช่วง 0.1 – 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเหมาะสำหรับหรับตรวจใน Skim milk ซึ่งมีปริมาณโพรเจสเทอโรนละลายอยู่ปริมาณน้อย สำหรับชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้สามารถตรวจได้ในช่วง 0.2 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อปริมาณสูงกว่าช่วงของกราฟมาตรฐานให้ทำการเจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณต่ำลงให้อยู่ในช่วงกราฟแล้วจึงคูณกลับโดยจะสามารถตรวจได้ทั้งในรูปที่เป็นสารสกัดจากไขมัน (Core fat) และส่วนที่เป็น Skim milk ซึ่งพบว่าจะให้ค่าที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 วิธี โดยวิธีตรวจใน core fat จะสามารถตรวจหาโพรเจสเทอโรนปริมาณต่ำได้ถูกต้องแม่นยำ และเมื่อเทียบผลการตรวจตัวอย่างน้ำนมพบว่าปริมาณโพรเจสเทอโรนที่ตรวจจากชุดตรวจต้นแบบ เมื่อตรวจใน Core fat ในจะมีปริมาณมากกว่าใน Skim milk เป็น 1-2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบผลตรวจจากชุดตรวจต้นแบบกับชุดตรวจจาก Euro พบว่าชุดตรวจต้นแบบจะตรวจให้ค่าปริมาณโพรเจสเทอโรนทั้งในรูป Core fat และ Skim milk ได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro เป็นดังนี้ 1. ที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro 80 เท่า 2. ที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนมากกว่า 10 แต่ไม่เกิน 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro 30 เท่า 3. ที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนมากกว่า 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro 5-10 เท่า ผลดังรูปที่ 9-11 และตารางที่ 13

เมื่อนำผลการตรวจปริมาณโพรเจสเทอโรนด้วยชุดตรวจต้นแบบไปเปรียบเทียบกับชุดตรวจทางการค้าของ Euro ดังตารางที่ 14 พบว่าค่าที่ได้มีความสอดคล้องกันสามารถประมาณค่าได้ว่าถ้าตรวจน้ำนมโคทั้งในรูปของ Core fat และ Skim milk ด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ที่ค่าน้อยกว่า 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอยู่ในช่วง ระยะที่ฟอลิเคิลเจริญอย่างรวดเร็ว คอร์ปัสลูเทียมสลาย คือระยะก่อนการเป็นสัด (Early follicular phase) ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 10-15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอยู่ในช่วง ก่อนหรือหลัง ที่รังไข่มีการสร้าง คอร์ปัสลูเทียม (Early or ending luteal phase) และถ้ามากกว่า 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอยู่ในช่วง ระยะไม่เป็นสัดในวงรอบคือมีคอร์ปัสลูเทียมเจริญเต็มที่มดลูกพร้อมรับการตั้งท้อง (Luteal activity)

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากแม่โครหัส 296, 193 และ NF ที่เก็บตัวอย่างจากสวนจิตรลดา ในวงรอบ 1 เดือน โดยวิธีตรวจที่ 1-3

รหัสแม่โค	วิธีตรวจ	วัน-เดือน-ปี ที่เก็บตัวอย่าง																	
		สิงหาคม 2555																กันยายน 2555	
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	2	4
NF	1	6.03	3.58	3.82	5.99	10.53	-	10.50	8.41	14.94	13.53	6.94	8.41	8.67	13.4	-	5.88	5.74	3.91
	2	6.79	9.09	8.22	9.19	8.72	7.36	7.59	8.03	7.14	8.13	7.45	7.20	8.66	8.73	17.90	8.21	9.49	9.02
	3	0.13	-	0.10	0.12	0.10	-	0.09	-	0.18	0.14	0.12	0.08	0.09	0.11	-	0.07	-	0.06
193	1	12.90	15.13	23.82	22.45	29.75	32.57	37.37	21.88	-	14.18	23.14	20.84	-	19.87	12.44	43.17	34.29	18.88
	2	15.36	16.23	15.92	17.94	17.75	18.74	19.80	19.73	10.22	14.36	18.02	16.04	18.61	20.04	11.10	20.93	20.55	20.33
	3	0.07	-	0.67	-	1.63	-	2.99	3.16	0.17	-	2.92	2.94	4.33	2.96	0.08	3.46	-	3.44
296	1	14.94	53.64	51.83	26.20	-	31.95	49.86	19.91	31.48	41.96	35.88	44.78	26.56	56.07	33.47	34.01	40.56	33.07
	2	13.21	14.44	15.73	13.19	16.99	13.33	15.19	15.69	14.47	16.69	15.58	16.17	19.52	18.36	18.11	20.06	17.34	19.10
	3	2.43	-	3.07	-	3.30	2.41	2.88	2.64	3.40	2.85	2.83	2.73	3.77	3.51	-	3.48	-	2.72

วิธีที่ 1 ตรวจหาจากการสกัดจากไขมันนม Core fat

วิธีที่ 2 ตรวจหาจาก whey ด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้

วิธีที่ 3 ตรวจหาจาก whey ด้วยชุดตรวจของ Euro

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบค่าของปริมาณโพรเจสเทอโรนของชุดตรวจต้นแบบกับชุดตรวจของ Euro ที่ระยะต่างๆในวงรอบการเป็นสัดของแม่โค

ระยะในวงรอบการเป็นสัด	ปริมาณโพรเจสเทอโรน (ng/ml)		
	ชุดตรวจจาก Euro	ชุดตรวจต้นแบบ	
	Skim milk	Core fat	Skim milk
Early follicular phase	< 0.4	< 10	< 10
Early or ending luteal phase	0.4 - 1	10 – 20	10 - 15
Luteal activity	> 1	> 20	> 15

4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

เมื่อทดลองเตรียมชุดตรวจต้นแบบสำหรับตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรน 2 แบบ ได้แก่ Indirect Competitive ELISA (Antibody capture; โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับไบโอติน) และ Direct Competitive ELISA (Antigen capture; โพรเจสเทอโรนเชื่อมติดกับเอ็นไซม์ HRP) สำหรับตรวจโพรเจสเทอโรนในรูป P4 พบว่าให้ค่า IC50 เป็น 4.85 และ 3.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ค่า LOD เป็น 0.5 และ 0.25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำชุดตรวจแบบ Indirect Competitive ELISA (Antibody capture) ไปตรวจสอบใน Skim milk ที่เติมโพรเจสเทอโรนปริมาณต่างๆลงไปพบว่าสารประกอบในน้ำนม (Milk Matrix) มีผลต่อค่าดูดกลืนแสง จึงต้องทำการเจือจาง Skim milk เป็น 1:5 ซึ่งจะให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01-3.12 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 61.09-116.01 และ 1:10 จะให้ค่า %CV อยู่ในช่วง 0.04-6.14 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 78.82-174.74 เมื่อตรวจด้วยชุดตรวจแบบ Direct Competitive ELISA (Antigen capture) โดยเจือจางน้ำนมที่ 1:2 จะให้ผลการตรวจวัดจะมีค่า %CV อยู่ในช่วง 0.01-0.52 ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 89.71-183.77 แต่ค่าดูดกลืนแสงที่ได้จะให้ค่าไม่นิ่งเท่ากับชุดตรวจแบบ Indirect Competitive ELISA (Antibody capture) จึงเลือกชุดตรวจต้นแบบดังกล่าวมาพัฒนาต่อเพื่อให้สามารถตรวจโพรเจสเทอโรนในน้ำนมดิบได้จริง โดยปรับที่บัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างในขั้นตอนบ่มตัวอย่างเป็น PBSCTT (Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal) เมื่อนำไปใช้ตรวจกับน้ำนมดิบของแม่โครหัส SJ 247 จากสวนจิตรลดา พบว่าเมื่อเติม P3 ลงไปในน้ำนมดิบ ชุดตรวจสามารถตรวจได้ในช่วง 6.25 ถึง 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี %Recovery เป็น 85.19 – 102.55 % และ %CV เป็น 0.01-0.18 % โดยพบว่าโพรเจสเทอโรนในรูปอิสระ P4 ที่เติมลงในน้ำนมดิบจะสามารถตรวจวัดได้ในระดับความเข้มข้นมากกว่า 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เนื่องจากโพรเจสเทอโรนที่พบได้ในน้ำนมดิบของโคจะอยู่ในรูปของ P4 จึงต้องปรับชุดตรวจให้สามารถตรวจในรูปของ P4 โดยให้อยู่ในช่วงที่ต้องการคือต่ำกว่า 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปรับที่ตัวบล็อกและวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยทำการแยกไขมันออกจากน้ำนมและสกัดเอาโพรเจสเทอโรนออกจากไขมันพบว่าเมื่อบล็อกชุดตรวจด้วย 1%Gelatin จะให้ค่าการตรวจหา P4 ที่เติมลงในไขมันนมได้ถูกต้องกว่า บล็อก ด้วย 1%Casein โดยตรวจ P4 ที่เติมลงในไขมันน้ำนมแล้วนำมาสกัด ได้ในช่วง 1.25 – 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ %Recovery เป็น 79.16 – 168.68 และสามารถตรวจ โพรเจสเทอโรนได้ทั้งในรูปที่เป็น P4 และ P3 แต่สามารถตรวจในรูป P4 ได้ %Recovery อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานมากกว่าผลตรวจในรูป P3 โดยให้ค่า %Recovery ต่อ P4 และ P3 เป็น 98.33 – 138.52 และ 59.13 – 176.06 ตามลำดับ เมื่อเติม P4 ลงในน้ำนมดิบแล้วนำไปปั่นแยกไขมันแล้วนำไปสกัดสามารถตรวจได้ช่วง 1 – 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่า %Recovery และ %CV อยู่ในช่วง 80.09-117.66 และ 0.03-3.33 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้และมีค่าแม่นยำในการตรวจ จึงได้นำชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ไปทดสอบจริงในการตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคจากสวนจิตรลดาได้แก่แม่โครหัส NF, 193 และ 296 โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งได้ตรวจหาปริมาณโพรเจสเทอโรนจากการสกัดไขมันน้ำนม (Core fat) สามารถให้ค่าปริมาณโพรเจสเทอโรนสูงเมื่อเทียบกับการตรวจจาก Skim milk และเมื่อนำ Skim milkไปตรวจด้วยชุดตรวจ

ของ Euro จะตรวจได้ปริมาณต่ำเนื่องจากช่วงในการตรวจของชุดตรวจ Euro ตรวจได้ในช่วง 0.1 – 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเหมาะสำหรับหรับตรวจใน Skim milk ซึ่งมีปริมาณโพรเจสเทอโรน ละลายอยู่ปริมาณน้อยหรือถ้ามีปริมาณอยู่สูงจะต้องทำการเจือจางตัวอย่างก่อนตรวจ สำหรับชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้สามารถตรวจได้ในช่วง 0.5 – 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อปริมาณสูงกว่าช่วงของกราฟมาตรฐานให้ทำการเจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณต่ำลงให้อยู่ในช่วงกราฟแล้วจึงคูณกลับโดยจะสามารถตรวจได้ทั้งในรูปที่เป็นสารสกัดจากไขมันและส่วนที่เป็น Skim milk ซึ่งพบว่าจะให้ค่าที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 วิธี และเมื่อเทียบผลการตรวจตัวอย่างน้ำนมพบว่าปริมาณโพรเจสเทอโรน ที่ตรวจจากชุดตรวจต้นแบบ เมื่อตรวจใน Core fat จะมีปริมาณมากกว่าใน Skim milk เป็น 1-2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบผลตรวจจากชุดตรวจต้นแบบกับชุดตรวจจาก Euro พบว่าชุดตรวจต้นแบบจะตรวจให้ค่าปริมาณโพรเจสเทอโรนทั้งในรูป Core fat และ Skim milk ได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro เป็นดังนี้ 1. ที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro โดยประมาณ 50-80 เท่า 2. ที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนมากกว่า 10 แต่ไม่เกิน 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro โดยประมาณ 10-30 เท่า 3. ที่ความเข้มข้นของโพรเจสเทอโรนมากกว่าโดยประมาณ 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ชุดตรวจต้นแบบจะตรวจได้สูงกว่าชุดตรวจของ Euro โดยประมาณ 5-10 เท่า ซึ่งจะสามารถประมาณค่าได้ว่าถ้าตรวจน้ำนมโคทั้งในรูปของ Core fat และ Skim milk ด้วยชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้ที่ค่าน้อยกว่า 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอยู่ในช่วง ระยะที่ฟอลิเคิลเจริญอย่างรวดเร็ว คอร์ปัสลูเทียมสลาย คือระยะก่อนการเป็นสัด (Early follicular phase) ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 10-15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอยู่ในช่วง ก่อนหรือหลัง ที่รังไข่มีการสร้าง คอร์ปัสลูเทียม (Early or ending luteal phase) และถ้ามากกว่า 15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอยู่ในช่วง ระยะไม่เป็นสัดในวงรอบคือมีคอร์ปัสลูเทียมเจริญเต็มที่มดลูกพร้อมรับการตั้งท้อง (Luteal activity) จึงสรุปได้ว่าชุดตรวจต้นแบบที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพสามารถตรวจสอบปริมาณโพรเจสเทอโรนได้ทั้งในรูปที่เป็น Core fat และ Skim milk โดยให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกับชุดตรวจที่มีขายในท้องตลาดและใช้เวลาในการตรวจเพียง 1 ชั่วโมง 30 นาที ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนชุดตรวจจากต่างประเทศที่มีราคาค่อนข้างสูงได้ต่อไป

บรรณานุกรม (Bioliography)

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.

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

เอกสารประกอบการอบรมวิชาการฯ จัดโดยสมาคมส่งเสริมการเลี้ยงโคพันธุ์บราห์มัน วันที่ 4-5 มิถุนายน 2554 ณ ห้างฉัตร แรนซ์ อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง

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.

D. Romagnolo and R.L. Nebel. 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. Theriognology, 39, 1121-1128

Els H. Gillis, James P. Gosling, Joseph M. Sreenan, Marian Kane. 2002. Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk. Journal of Immunological Methods, 267, 131-138

Geertruida A. Posthuma-Trumpie, Jakob Korf, Aart van Amerongen. 2008. Development of a competitive lateral flow immunoassay for progesterone: influence of coating conjugates and buffer components. Anal Bioanal Chem, 392, 1215-1223

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.

J. W. Schwalm and H. Allen Tucker. 1978. Glucocorticoids in mammary secretions and blood serum during reproduction and lactation and distributions of glucocorticoids, progesterone, and estrogens in fractions of milk. J. Dairy Sci., 61, 550-560

K. I. Arnstadt and W. F. Cleere. 1981. Enzyme-Immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. J. Reprod. Fert, 62, 173-180

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

Mika P. A. Laitinen and Matti Vuento. 1996. Immunochromatographic Assay for Quantitation of Milk Progesterone, 50, 141-145

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.

R. Simersky, J. Swaczynova, D.A. Morris, M. Franek, M. Strnad. 2007. Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk. Veterinarni Medicina, 52, 19-28

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.

Tulsidas G. Shrivastav, Shail K. Chaube, Charu, Kiran Rangari, Kiran P. Kariya, Rita Singh, Anjali Nagendra. 2010. Enzyme linked Immunosorbent assay for milk progesterone. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 31:4, 301-313

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

Yinqiu Wu, John Mitchell, Christian Cook, Lyndsay Main. 2002. Evaluation of progesterone-ovalbumin conjugates with different length linkers in enzyme-linked immunosorbant assay and surface plasmon resonance-based immunoassay. Steroids, 67, 565-572

ภาคผนวก

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. PBSCTT (Phosphate buffer saline with casein , Tween and Thimerosal)

Casein (Hammersten grade casein ; C-3400)	5	กรัม
0.1 N NaOH	100	มิลลิลิตร

   นำไปต้มที่ 60 องศาเซลเซียส จนเป็นสารละลายใส เมื่อเย็นแล้วเติม PBS บัฟเฟอร์ที่มี 0.05% Tween20 และ 0.02% Thimerosal ปรับ pH เป็น 7 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 – 1.2 ไมโครโมล เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ภายใน 1 อาทิตย์

5. 205 mM Potassium Citrate buffer, pH 4.0 (สำหรับเตรียมสารละลาย Substrate)

- Potassium citrate tribasic monohydrate	66.5	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
- Citric acid monohydrate	39.4	กรัม
ละลายด้วยน้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

   นำสารละลาย Potassium Citrate ปรับ pH เป็น 4 ด้วย สารละลาย Citric acidนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 – 1.2 ไมโครโมล เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

6. Substrate TMB

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	2.5	มิลลิกรัม (ละลายใน DMA 0.25 ml)
205 mM Potassium Citrate buffer, pH 4.0	10	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	0.035	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

7. 2.5 M H_2SO_4 (Stopping reagent)

H_2SO_4 (96%)	256	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	744	มิลลิลิตร

ค่อยๆ เทกรดลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ควรนำขวดไปแช่ในน้ำประปาจนกว่าจะหายร้อน (เนื่องจากจะเกิดความร้อนเมื่อกรดผสมกับน้ำ)

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

1.1 ชื่อ-สกุล นางทรงจันทร์ ภู่ทอง

Mrs.Songchan Puthong

1.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 2001 01339 43 0

1.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย ระดับ ชำนาญการพิเศษ

1.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail songchan.p@chula.ac.th

1.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	2539
มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2529

1.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

การเตรียมและผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

การทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยังยั้งเซลล์มะเร็ง

1.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

1.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ทดสอบฤทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทำลายเซลล์มะเร็งตับโดยการตรวจด้วยวิธี MTT Colorimetric Assay

1.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Roengsumran, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Nilaivan, T., Ngamrojnavanich, N., Chaichantipyuth, C. and **Puthong, S**. (2001) Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Phytochemistry 56: 103 – 107.

2. Chaichantipyuth, C., Tiyaworanon, S., Mekaroonreung, S., Ngamrojnavanich, N., Roengsumran, S., **Puthong, S.**, Petsom, A. and Ishikawa, T. (2001) Oxidized heptenes from flowers of *Melodorum fruticosum*. Phytochemistry 58: 1311 – 1315.

3. Roengsumran, S., Musikul, K., Petsom, A., Vilaivan, T., Sangvanich, P., Pornpakakul, S., **Puthong**, **S.**, Chaichantipyuth, C., Jaiboon, N., Chaichit, N. (2002) Croblonhifolin, a new anticancer Clerodane from *Croton oblongifolius*. Planta Medica 68: 274 – 277.

4. Ngamrojnavanich, N., Tonsiengsom, S., Lertpratchya, P., Roengsumran, S., **Puthong**, **S.**, and Petsom, A. (2003) Diterpenoids from the Stem Barks of *Croton robustus*. Archives of Pharmacal Research 26(11): 898 – 901.

5. Roengsumran, S., Pornpakakul, S., Muangsin, N., Sangvanich, P., Nhujak, T., Singtothong, P., Chaichit, N., **Puthong**, **S.**, Petsom, A. (2004) New Halimane Diterpenoids from *Croton oblongifolius*. Planta Med 70:1 - 3.

6. Chaichantipyuth , C., Taweechotipatr, P., Petsom, A., **Puthong, S.**, Roengsumran,S., Watanabe, T. and Ishikawa, T. Chemical constituents of *Croton Oblongifolis*. เอกสาร Proceeding ของ JSPS-NRCT.

7. Tungpradabkul, S., Sandee, D., **Puthong, S.** and Laohathai, K. (2005) Construction of scFv derived from a tumor-associated monoclonal antibody having tumorical activity on human hepatocellular carcinoma. Molecular Immunology 42: 713 – 719.

8. Chaichatipyuth, C., Petsom, A., Taweechotipatr, P., Muangsin, N., Chaichit, N. **Puthong, S.**, Roengsumran, S., Kawahata, M., Watanabe, T. and Ishikawa, T.(2005) New labdane-type diterpenoids from *Croton oblongifolius* and their cytotoxic activity. HETEROCYCLES 65(4): 809 – 822.

9. Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2006) Cytotoxic Activity of Four Xanthones from *Emericella variecolor* an Endophytic Fungus Isolated from *Croton oblongifolius*. Archives of Pharmacal Research 29(2): 140 – 144.

10. Mattanavee, W., Suwantong, O., **Puthong, S.**, Bunaprasert, T., Hoven, P.V. and Supaphol, P. (2009) Immobilization of Biomolecules on the Surface of Electrospun Polycaprolactone Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. ACS APPLIED Materials & Interfaces 1(5): 1076 – 1085.

11. Pimpitak, U., **Puthong, S.**, Komolpis, K., Petsom, A. and Palaga, T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzymed-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp. Food Chemistry 116: 785 – 791.

12. **Puthong, S.**, Rojpibulstit, P. and Buakeaw, A. (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. Thammasat Int. J. Sc. Tech. 14(1): 95 – 104.

13. Umthong, S., **Puthong, S.** and Chanchao, C. (2009) *Trigona laeviceps* Propolis from Thailand : Antimicrobial, Antiproliferative and Cytotoxic Activities. The American Journal of Chinese Medicine. 37(5): 855 – 865.

14. Roengsumran, S., Pata, P., Ruengraweewat, N., Tummatorn, J., Pornpakakul, S.,Sangvanich, P., **Puthong, S.** and Petsom, A. (2009) New Cleistanthane Diterpenoids and 3,4-seco-Cleistanthane Diterpenoids from *Croton cblongifolius*. Chemistry of Natural Compounds. 45(5): 641 – 646.

15. Komolpis, K., Udomchokmongkol, C., **Puthong, S.** and Palaga, T. (2010) Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 16: 567 – 571.

1.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

2. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

3. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

2. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1

2.1 ชื่อ-สกุล นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

Ms. Umaporn Pimpitak

2.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1020 02537 911

2.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

2.4 หน่วยงานสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 โทรสาร 02-253-3543

E-mail umaporn.p@chula.ac.th

2.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2549
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล	ปริญญาตรี	เทคโนโลยีชีวภาพ	2542

2.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

2.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

2.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

2.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

2.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Pimpitak U., Puthong, S., Komolpis, K., Petsom, A., Palaga T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

2.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

3. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

3.1 ชื่อ-สกุล นายกิตตินันท์ โกมลภิส

Mr. Kittinan Komolpis

3.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0

3.3 ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์

3.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail kittinan.k@chula.ac.th

3.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาเอก	Chemical Engineering	2545
University of Michigan สหรัฐอเมริกา	ปริญญาโท	Chemical Engineering	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2532

3.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

3.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

3.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

3.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ตรึงควบคู่กับการแยกผลิตภัณฑ์ด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ได้รับการสนับสนุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2549)

การสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของเจละตินจากเศษหนังสัตว์ใหญ่ที่ยังไม่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอส (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2548 และ 2549)

การพัฒนาชุดตรวจสอบสารเคลนบูเทอรอล ซัลบิวตามอล นอร์ฟลอกซาซิน และเอนโรฟลอกซาซินด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) และ Immunochromatographic Assay (ได้รับทุดอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2549-2551)

การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: 3-อะมิโน-2-ออกซาโซลิดิโนน และ 3-อะมิโน-5-มอร์ฟอลิโนเมทิล-2-ออกซาโซลิดิโนน (ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ปีพ.ศ. 2550-2552)

3.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. **Komolpis, K.**, Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 16: 567-571

2.Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K**., Petsom, A., Palaga T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

3.Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K**. and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 14: 202-206

4.**Komolpis K.,** Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. Biotechnology Progress, 18:641-646.

5.Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*). Biotechnology Progress; 17:421-430.

6.Wu E., **Komolpis K.**, Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. Biotechnology Techniques, 13:567-569.

7.**Komolpis K.**, Kaufman P.B., Wang H.Y. 1998. Chemical permeabilization and *in situ* removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds. Biotec. Techniques, 12:697-700.

3.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1.การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

2.การพัฒนาชุดตรวจสารแคลบูทารอลด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์

4. ผู้ร่วมโครงการคนที่ 3

4.1 ชื่อ-สกุล นายอณุมาศ บัวเขียว

Mr. Anumart Buakeaw

4.2 เลขที่ประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3

4.3 ตำแหน่งทางวิชาการ นักวิจัย

4.4 หน่วยงาน สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8076 **โทรสาร** 02-253-3543

E-mail anumart.b@chula.ac.th

4.5 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาโท	เทคโนโลยีชีวภาพ	2545

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	ชีวเคมี	2541

4.6 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การเตรียมชุดตรวจ ELISA และการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจ

4.7 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

4.7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี

4.7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี

4.7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

1. Puthong, S., Rojpibulstit, P. and **Buakeaw, A.** (2009) Cytotoxic Effect of Hep88 mAb: A Novel Monoclonal Antibody Against Hepatocellular Carcinoma. Thammasat Int. J. Sc. Tech. 14(1): 95 – 104.

2. Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from Salacia verrucosa. Fitoterapia. 82 : 1047 -1051.

4.7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน

2. การพัฒนาชุดตรวจด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ของอนุพันธ์ของสารไนโตรฟูแรน: อะมิโนไฮแดนโทอิน

3. การพัฒนาแถบทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจสารกลุ่มฟลูออโรคิวโนโลนในผลิตภัณฑ์อาหาร

4. การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์โพรเจสเทอโรนในน้ำนมโคด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมิวโนซอร์เบนต์แอสเสย์