บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1. วงรอบการเป็นสัดของโคนม (Estrus cycle)

วัยเจริญพันธุ์เป็นช่วงเวลาที่ระบบสืบพันธุ์และการแสดงลักษณะทางเพศเริ่มเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และมีการเจริญไปจนถึงวัยสมบูรณ์พันธุ์ กระบวนการเปลี่ยนแปลงนี้เริ่มแสดงออกเมื่อโคอายุ 5 เดือน และสมบูรณ์พร้อมผสมพันธุ์เมื่ออายุ 10 ถึง 12 เดือน ในโคนมที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (โคสาว) และแม่โคท้องว่าง มีวงรอบการเป็นสัดเฉลี่ยทุกๆ 21 วัน พฤติกรรมที่แสดงว่าเป็นสัดคือการยืนนิ่งเมื่อโคตัวอื่นขึ้นขี่ (standing estrus) และอาการอื่นๆ เช่น ปากช่องคลอดบวมแดง มีน้ำเมือกเหนียวใสขับออกมา กระวนกระวายและร้องเสียงดัง การเป็นสัดเกิดขึ้นประมาณ 18 ชั่วโมง และจะเกิดการตกไข่ (ovulation) ในช่วง 10-12 ชั่วโมง หลังจากสิ้นสุดการเป็นสัด ยืนนิ่งยอมรับการผสม (standing estrus) (Bearden and John, 2000; Shearer, 1992)

วงรอบการเป็นสัดมีฮอร์โมนเป็นตัวควบคุมและสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ โปรเอสตรัส (proestrus) เอสตรัส (estrus) เมทเอสตรัส (metestrus) และไดเอสตรัส (diestrus) ระยะโปรเอสตรัสและเอสตรัส อยู่ภายใต้อิทธิพลของอีสโตรเจน และสัมพันธ์กับการเจริญของรังไข่ ส่วนระยะเมทเอสตรัส และไดเอสตรัส มีความสัมพันธ์กับการเจริญของคอร์ปัสลูเทียม และอยู่ภายใต้อิทธิพลของโปรเจสเตอโรน

1.1 ระยะเอสตรัส ระยะนี้โคจะแสดงความต้องการทางเพศออกมา พฤติกรรมที่แสดงออกมาเป็นผลจากการทำงานของ E_2 ต่อระบบประสาทส่วนกลาง โคจะกระวนกระวายมาก ร้องเสียงดัง อยากอาหารน้อยลงและผลผลิตน้ำนมลดลง การไหลเวียนของเลือดในระบบสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นและต่อมต่าง ๆ ถูกกระตุ้นเกิดการหลั่งเมือกเหนียวใสขับออกทางปากช่องคลอด หลังจากนั้นประมาณ 14-18 ชั่วโมง อาการต่างๆของระยะเอสตรัสเริ่มสิ้นสุดลง

1.2 ระยะเมทเอสตรัส เป็นระยะที่ต่อจากระยะเอสตรัส โคจะไม่เกิดการตกไข่จนกระทั่งสิ้นสุดการเป็นสัด ดังนั้น เมทเอสตรัสเป็นระยะที่เกิดการตกไข่ มีการพัฒนาของคอร์ปัสลูเทียม เมทเอสตรัสเกิดขึ้นเพียง 2-3 วัน หลังจากนั้นจะมีรอยเปื้อนเลือดเป็นเมือกในระยะนี้ เป็นผลจากเลือดที่คั่งอยู่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ในช่วงที่เกิดการเป็นสัด เมื่อสังเกตเห็นลักษณะดังกล่าวแสดงว่าโคน่าจะเป็นสัดมาแล้ว 1 หรือ 2 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

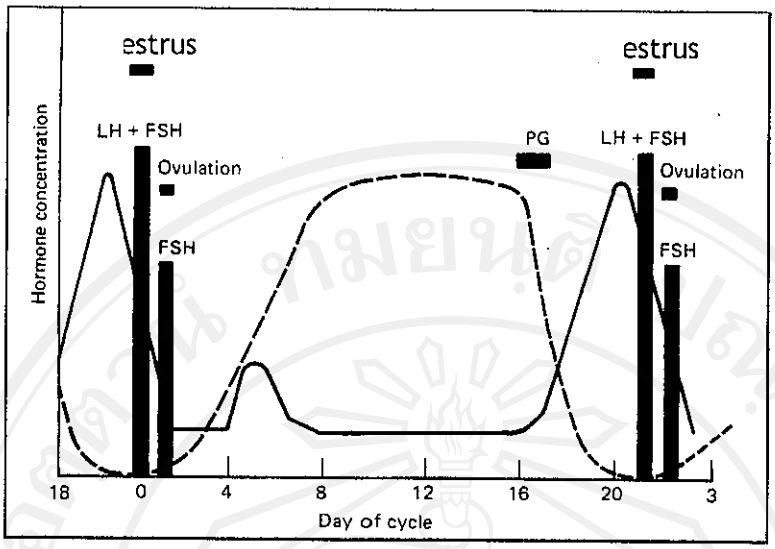
1.3 ระยะไดเอสตรัส ระยะนี้เกิดขึ้นยาวนานที่สุดในวงรอบการเป็นสัด คอร์ปัสลูเทียมมีการพัฒนาเต็มที่และมีบทบาทสำคัญ ในการเพิ่มระดับโปรเจสเตอโรน หากไข่ไม่ได้รับการผสมกับอสุจิ (fertilization) คอร์ปัสลูเทียมจะคงอยู่ถึงประมาณวันที่ 17 หรือ 18 ของวงรอบการเป็นสัด หลังจากนั้นก็จะเริ่มสลาย

1.4 ระยะโปรเอสตรัส เกิดขึ้นประมาณ 2-3 วันก่อนเป็นสัด และในระยะนี้ มีการเจริญของรังไข่และผลิต E_2 ระดับ E_2 สูงขึ้นเนื่องจากการไหลเวียนเลือดในระบบสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น มีผลให้ระบบสืบพันธุ์ภายนอกบวม ต่อมบริเวณคอมดลูกและช่องคลอดถูกกระตุ้นให้เพิ่มการหลั่งเมือกใสออกมา เกิดการเริ่มวงรอบการเป็นสัดใหม่ (Shearer, 1992)

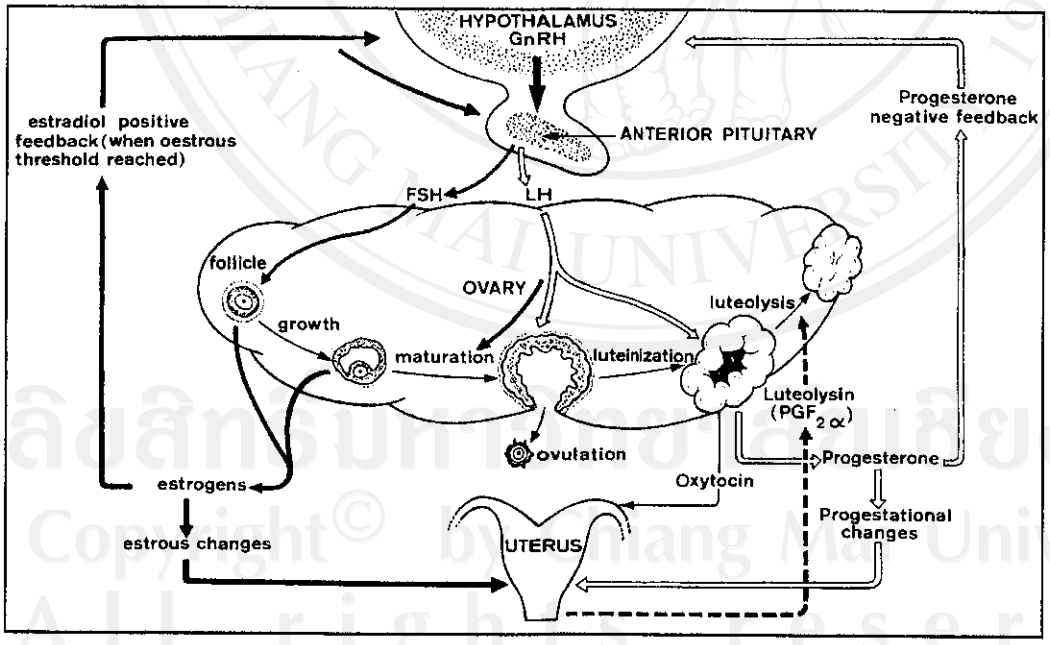
2.2. ฮอร์โมนควบคุมการเป็นสัดของโคนม

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในระบบสืบพันธุ์ช่วงวงรอบการเป็นสัดนั้น ควบคุมโดยฮอร์โมนต่างๆ (ภาพที่ 2-1) ซึ่งเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของ ไฮโปธาลามัส (hypothalamus) ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary) และรังไข่ (ovary) (ภาพที่ 2-2) สามารถวัดการทำงานได้จากระดับฮอร์โมนที่หลั่งออกมาในระบบไหลเวียนเลือด โดยไฮโปธาลามัส จะหลั่งโกนาโดโทรฟิน รีลีสซิงฮอร์โมน (gonadotrophin releasing hormone, GnRH) ไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า เกิดการหลั่งโกนาโดโทรฟินฮอร์โมน (gonadotrophin hormone) ได้แก่ ลูทีไนท์ซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone, LH) และ ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (Follicle stimulating hormone, FSH) ไปมีผลต่อรังไข่ ซึ่งจะทำให้ไข่ (follicle) เจริญ มีการสร้างและหลั่ง E_2 (ภาพที่ 2-3) ประมาณวันที่ 18 ของรอบการเป็นสัด เริ่มเข้าสู่ระยะฟอลลิคูล่า (follicular phase) คอร์ปัสลูเทียมเริ่มสลาย ทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนลดลง ระดับฮอร์โมนอีสโตรเจนจะเริ่มสูงขึ้น และจะมีผลย้อนกลับไปกระตุ้นไฮโปธาลามัส ให้หลั่ง GnRH และเพิ่มการตอบสนองของต่อมใต้สมองส่วนหน้าต่อ GnRH ให้หลั่ง FSH ซึ่งจะเพิ่มขนาดของฟองไข่ Dominant ovarian follicle และระดับของ E_2 ก็จะเพิ่มสูงขึ้น การเป็นสัดของโคนมในรอบหนึ่ง ๆ อาจมีคลื่นฟอลลิเคิล 2 คลื่น, 3 คลื่น หรือ 4 คลื่น คือมีฟอลลิเคิลหลาย ๆ ใบเจริญขึ้นมาและฝ่อสลายไปเป็นชุดของฟอลลิเคิลซึ่งสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนที่ควบคุมรอบการเป็นสัด หากมี 2 คลื่น ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดซึ่งเรียกว่า dominant follicle ในคลื่นแรกจะไม่มีการตกไข่แล้วฝ่อสลายไป แต่จะมีการตกไข่ในคลื่นที่ 2 หากมี 3 คลื่น ฟอลลิเคิลส่วนใหญ่จะฝ่อสลายไป แต่ dominant follicle ของคลื่นที่ 3 จะเพิ่มขนาดใหญ่ ซึ่งจะมีผลทำให้โคแสดงอาการเป็นสัดในระหว่างวันที่ 18-21 ของรอบการเป็นสัด หลังจากนั้นระดับ LH ในกระแสเลือดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว กระตุ้นแกลนูโลซา (glanulosa cell) และทีคาเซลล์ (theca cell) ของฟองไข่ ทำให้เกิดการตกไข่ (Donald *et al.*, 1978; Peters and Ball, 1986; Sakaguchi *et al.*, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

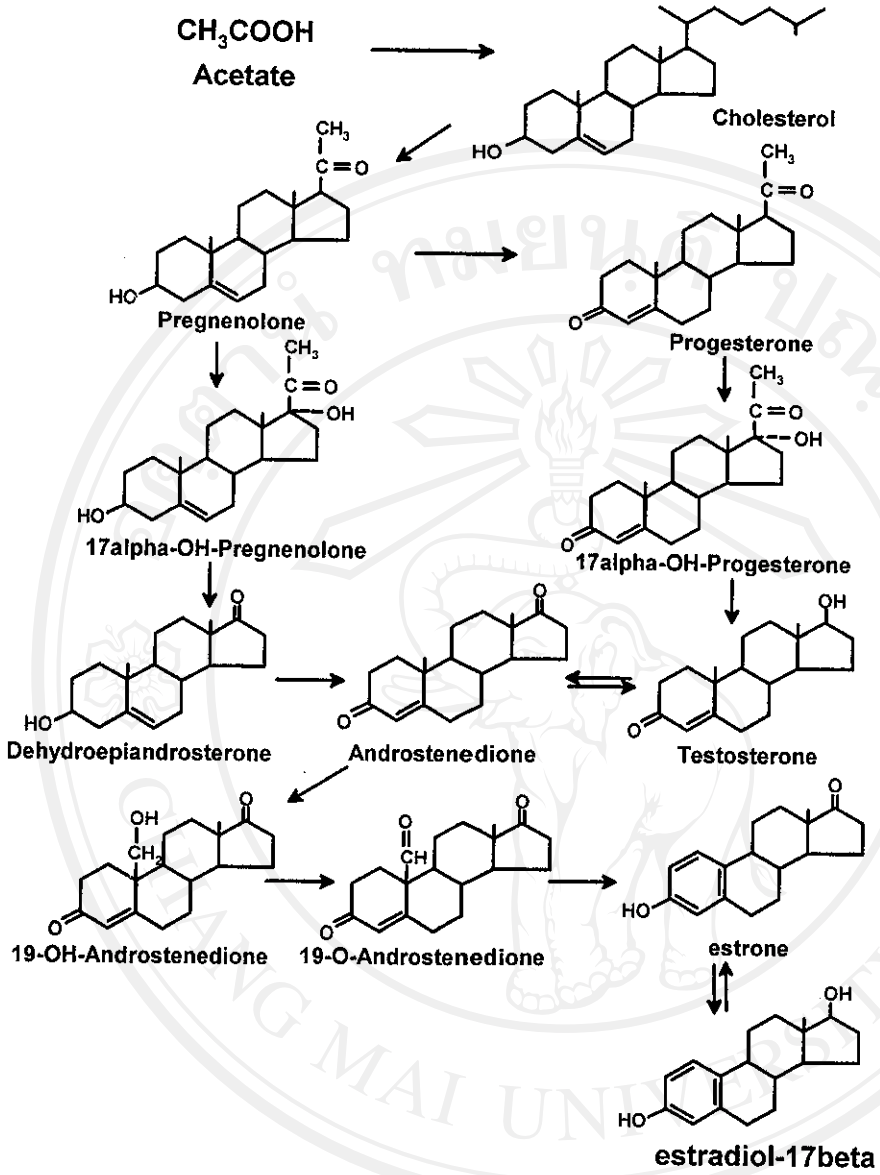


ภาพที่ 2-1. Changes in blood plasma hormone concentrations during the bovine oestrous cycle: ———, estradiol; - - - - - -, progesterone (Peters and Ball, 1986).



ภาพที่ 2-2. A summary of the hormonal control of the ovarian cycle (Peters and Ball, 1986).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-3. Synthetic pathway of some Steroid hormone (Austin and Short, 1984).

2.3. ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดในโคนม

2.3.1 สภาพภูมิอากาศ

การเลี้ยงโคนมในสภาพภูมิอากาศร้อนอย่างเช่นประเทศไทย ปัญหาที่พบคือ โคเกิดความเครียดจากสภาพอากาศร้อน (heat stress) นับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลต่อวงรอบการเป็นสัดของโคนม ระยะของวงรอบ และการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด ซึ่งพบว่าในแต่ละฤดูของประเทศไทย คือ ฤดูหนาว ฤดูร้อน และฤดูฝน อัตราการแสดงการเป็นสัดและอัตราการผสมเทียมติดมากที่สุดในฤดูหนาวทั้งโคนมฟรีเชียนลูกผสม (crossbred Friesian) และพันธุ์แท้ (purebred Friesian) (Pongpiachan *et al.* 2003) นอกจากนี้พฤติกรรมการเป็นสัดของโคที่เลี้ยงในสภาพอากาศเย็นยัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เด่นชัดมากกว่าโคสาวบางตัวที่เครียดจากความร้อน ไม่แสดงพฤติกรรมขึ้นทับ หรือไม่ยอมให้ตัวอื่นขึ้นทับในระยะเป็นสัด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rodtian *et al.* (1996) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของฤดูหนาวและฤดูร้อนระหว่าง 2 ปี ต่อพฤติกรรมการเป็นสัดในโคนมโฮสไตน์ฟรีเชียน พบว่า การตรวจพบพฤติกรรมการเป็นสัดในฤดูหนาวมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าฤดูร้อนทั้ง 2 ปีแสดงใน ตารางที่ 2-1 และในฤดูหนาวการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดก็ชัดเจนและระยะเวลาที่แสดงออกยาวนานกว่าในฤดูร้อนมากดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-1. Number of cows with regular ovarian cycles, ovulation and proportions detected in estrus during various periods of continuous observation in cooler and hotter seasons (Rodtian *et al.*, 1996)

	Year 1		Year 2	
	Cooler season	Hotter season	Cooler season	Hotter season
Ovulations	70	60	60	66
detected estrus	63	44	55	49
% detected[1]	90	73	92	74

[1]Ovulation/detected estrus X 100.

2.3.2 พื้นโรงเรือน

ชนิดของพื้นโรงเรือนมีผลต่อการตรวจการเป็นสัดโดยการสังเกตการเป็นสัดเปรียบเทียบระหว่างพื้นดินและคอนกรีต (ตารางที่ 2-3) ในโคสาวพบว่าการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดบนพื้นดินระยะเวลายาวนานกว่าและมีกิจกรรมมากกว่าบนพื้นคอนกรีต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-2. Intensity and duration of estrus behavior demonstrated by Holstein cows during cooler and hotter seasons (Rodtian *et al.*, 1996)

	Cooler season	Hotter season
Times standing when mounted by other cows	8.9 ±1.5 [a]	2.8 ±1.6 [b]
Total mounting-mounted Interactions	29.7 ±3.5 [a]	11.4 ±3.8 [b]
Total time standing when mounted (h)	5.8 ±1.0 [a]	1.3 ±1.1 [b]
Total duration of oestrus (h) (mounting-mounted interaction)	11.3 ±1.3 [a]	7.1 ±1.4 [b]

[a,b] Row with common superscripts are different ($P < 0.05$).

ตารางที่ 2-3. Estrus activity on dirt versus concrete surfaces (Britt *et al.*, 1986)

Activity	Dirt	Concrete
Duration of estrus (hours)	13.8	9.4
Mounts per hour	7.0	3.2
Stands per hour	6.3	2.9

2.3.3 ปริมาณผลผลิตน้ำนม

โคนมในช่วงเริ่มให้น้ำนมอย่างน้อย 80 เปอร์เซ็นต์ จะเสียสมดุลพลังงาน (negative energy balance) เนื่องจากต้องการพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการดำรงชีวิตและผลิตน้ำนม ทำให้มีผลต่อการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย รวมทั้งระบบฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์โดยผ่านการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ดังนั้นในช่วง negative energy balance จึงรบกวนการทำงานของรังไข่ส่งผลกระทบต่อการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดของโค (Villa-godoy *et al.*, 1990) แต่จากการทดลองของ Sangsritavong *et al.* (2002) พบว่าถ้าโคที่ให้ผลผลิตสูงได้รับปริมาณอาหารที่มากพอ ก็จะส่งผลให้มีการไหลเวียนของเลือดเข้าสู่ตับในระดับสูง ทำให้มีฮอร์โมนอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรนเข้าสู่ตับมากขึ้นเช่นกัน จึงมีฮอร์โมนอีสตราไดออลและโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดในระดับต่ำ กระทบต่อวงรอบการเป็นสัดและการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชัดเจน ในการทดลองของ Lopez *et al.* (2004) รายงานว่าโคที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงและจะมีความเข้มข้นของ อีสตราไดออลต่ำกว่าโคที่ให้ผลผลิตน้ำนมต่ำ ($P = 0.01$) ช่วงเวลาการเป็นสัดก็สั้นกว่า ดังแสดงใน ตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4. Follicular size, estradiol concentration, characteristics of estrus for low and high producing low (Lopez *et al.* 2004)

Day of estrus	Low producers (n=40)	Hight producers (n=31)	*P* - value
Average milk production (kg/d)	32.3 ±0.6	46.8 ±1.0	-
Follicular size (mm)	17.4 ±0.2	18.6 ±0.3	0.004
Estradiol (pg/ml)	8.6 ±0.5	6.8 ±0.5	0.01
Dulation of estrus (h)	11.9 ±1.4	7.0 ±1.1	0.01
Total standing events (n)	9.8 ±1.0	6.5 ±0.9	0.01
Total standing time (s)	28.4 ±2.7	20.0 ±2.8	0.03

2.4. การตรวจสัดและการผสมติด

การตรวจการเป็นสัดถือเป็นหัวใจในการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมติดของโคนม ซึ่งได้มีการศึกษาระยะเวลาการเป็นสัด เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมโคนม โดยได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการผสมเทียมในช่วงอาการที่แสดงออกต่าง ๆ ในช่วงรอบการเป็นสัด คือช่วงก่อนเป็นสัด วันเป็นสัด และหลังการเป็นสัดเพื่อหาอัตราการผสมติดพบว่า อัตราการผสมติดระหว่างโคนมที่ยืนนิ่งเมื่อตัวอื่นขึ้นขี่ และโคนมที่แสดงอาการอื่นๆแต่ไม่ใช่การยืนนิ่ง เท่ากับ 51.3 % และ 45.7 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2-5) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ (George Heersche, 1994)

การตรวจการเป็นสัดในโคนมมีหลายวิธีที่ช่วยเพิ่มความแม่นยำ เช่น การทาสีที่โคนหาง การใช้ Radiotelemetry หรือ HeatWatch (HW) ทำให้สามารถสังเกตได้ 24 ชั่วโมงต่อวัน (Xu *et al.*, 1998) และพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตรวจสัดสูงที่สุด 89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (Marcinkowski, 2004) และ At-Taras *et al.* (2001) เปรียบเทียบการตรวจการเป็นสัดโดยใช้ Electronic heatmount detector (HMD) หรือ HW และการใช้ Electronic activity tag หรือ Pedometer และการสังเกตเอง พบว่า ประสิทธิภาพในการตรวจสัดของ HMD และ Electronic activity tag ใกล้เคียงกันและมีเปอร์เซ็นต์การตรวจสัดสูงกว่าการสังเกตเอง สอดคล้องกับการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ Peralta *et al.* (2005) ซึ่งพบว่าอัตราการผสมติดของโคที่ตรวจสัดโดยระบบ HW (24.2 %) สูงกว่าการสังเกตเอง (18.5 %) ($P < 0.05$) และอัตราการผสมติดที่ตรวจสัดโดยระบบ Electronic activity (22.2 %) ไม่แตกต่างกับทั้งสองระบบ เมื่อดูจากเปอร์เซ็นต์ของอัตราการผสมติดจะพบว่าการตรวจสัดโดยการสังเกตเองมีค่าต่ำที่สุด ดังนั้นการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ช่วยในการตรวจพฤติกรรมการเป็นสัดจะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจพบการเป็นสัดมากกว่าสังเกตเองด้วยตาเปล่าอย่างเดียว การสังเกตพฤติกรรมการเป็นสัดควรทำอย่างสม่ำเสมอ หากไม่มีอุปกรณ์ช่วยควรทำการสังเกตถี่ขึ้นและใช้เวลาสังเกตแต่ละครั้งประมาณ 3 ชั่วโมง จากที่กล่าวมาจะเป็นการตรวจการเป็นสัดของโคนมจากพฤติกรรมที่แสดงออกทั้งสิ้น หากโคนมเกิดความเครียดจากปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพอากาศร้อนจะมีผลต่อการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด ระยะเวลาการเป็นสัดลดลง และการเป็นสัดเงียบ ลักษณะเหล่านี้ทำให้ลดโอกาสการสังเกตเห็นการเป็นสัด (At-Taras and Spahr, 2001) และเวลาที่ทำการผสมเทียมผิดพลาด ส่งผลให้อัตราการผสมติดต่ำ

ตารางที่ 2-5. Relationship between sign of estrus at insemination and conception rate based on calving or known open status (Heersche, 1994)

Sign of estrus	Conception rate (%)
Standing	51.3[a]
Not standing	
Bawling	50.0[b]
Unusually active	49.6[b]
No milk letdown	49.3[b]
Riding other cows	49.2[b]
Rough tail head	48.8[b]
Mucus	44.2[b]
Fully triggered Kamar device	43.2[b]
Blood on vulva	33.0[b]
Partly triggered Kamar device	30.2[b]

[a,b] conception rate for cows standing to be mounted (n=2696) *versus* all other sign, but not standing (n=1174), was different (51.3% vs. 45.7% ; $P<.05$)

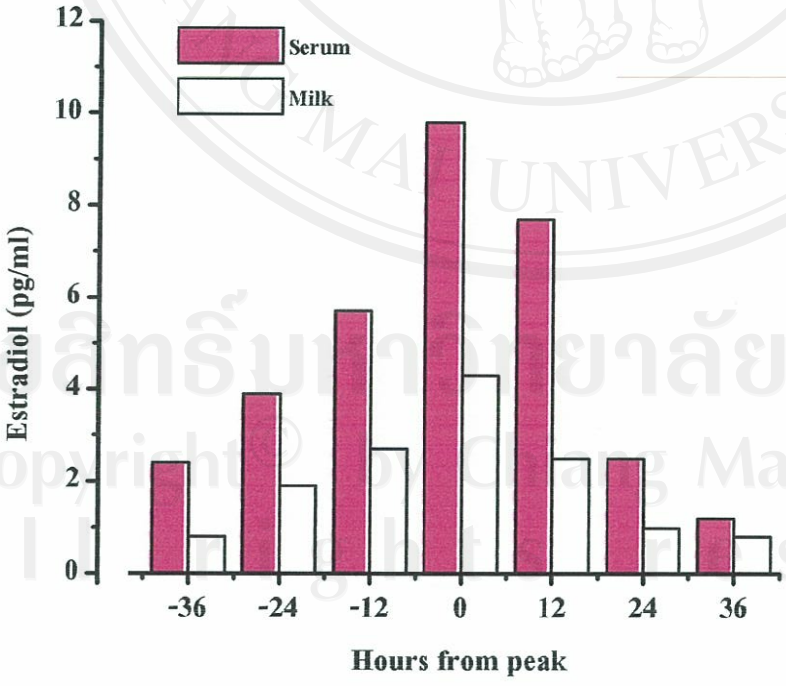
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5. การวัดระดับ E_2

นอกจากการสังเกตพฤติกรรมการเป็นสัดที่แสดงออกแล้ว การวัดระดับฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัด หรือฮอร์โมนที่ควบคุมการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด เช่น E_2 ก็สามารถชี้วัดถึงการเป็นสัดของโคนมและเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมได้ โดยมีการศึกษาพบว่า เมื่อระดับ E_2 ที่สูงสุดที่ระดับ 7.76 pg/ml นั้น ในเวลาเดียวกันคะแนนการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดก็สูงสุดเช่นกัน (Lyimo *et al.*, 2000) ดังนั้นการตรวจสัดด้วยการสังเกตร่วมกับการวัดระดับ E_2 ในน้ำนม ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความถูกต้อง แม่นยำในการตรวจสัดได้

มีการศึกษาวัดระดับ E_2 ในน้ำนมโคโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอซเซ (Radioimmunoassay, RIA) โดยใช้ specific anti-estradiol-17β serum พบว่า ในช่วงเริ่มแรกของ ovulation cycle หรือ follicular phase ซึ่งเป็นช่วงก่อนเข้าสู่ luteal phase นั้น E_2 จะมีระดับสูง วัดได้ระดับ E_2 สูงสุด 40 pg/ml ที่ระยะ estrus และ 17 pg/ml ในระยะ luteal phase (Gyawu and Pope, 1983)

Meisterling and Dailey (1987) รายงานว่าระดับความเข้มข้นของ E_2 ในน้ำนมและซีรั่มของโคที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันมีความสัมพันธ์กัน ($r = 0.88$, $P<0.01$) สำหรับในน้ำนมมี E_2 ต่ำกว่าในซีรั่ม แสดงใน ภาพที่ 2-4 โดยการเพิ่มของ E_2 สูงสุดนับเป็นที่ชั่วโมงที่ 0 มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 4.2 pg/ml และจะลดต่ำลงหลังจากชั่วโมงที่ 0



ภาพที่ 2-4. Concentration of estradiol-17β in whole milk and serum in cow synchronized for estrus (Meisterling and Dailey, 1987).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

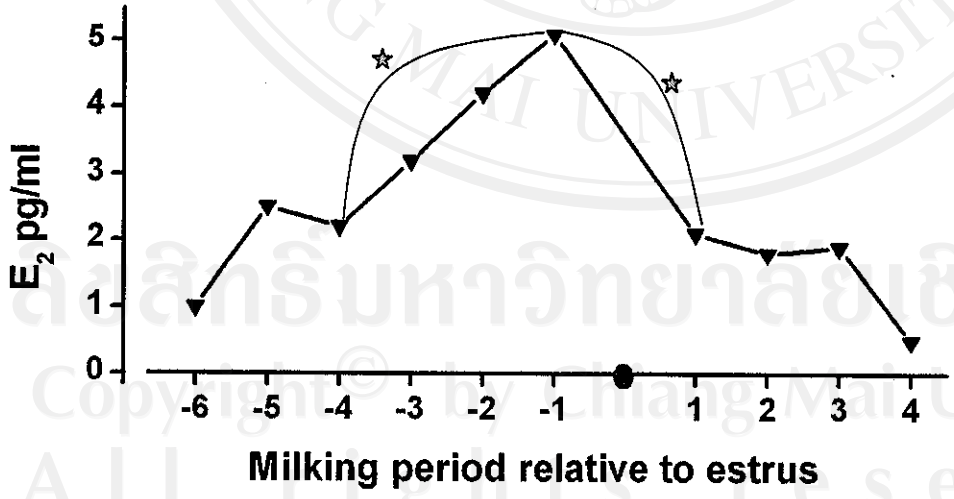
Lopez *et al.* (2002) ศึกษาเปรียบเทียบระดับ E_2 ใน whole milk และ defatted milk พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วน E_2 ในวันที่ 5 ของรอบการเป็นสัด จะน้อยกว่าในวันที่ 18 อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2-6) และได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมทุก 12 ชั่วโมง จากวันที่ 18 ของ estrous cycle จนกระทั่งถึงวันที่ 4 หลังจากระยะ estrus เพื่อนำมาวัดระดับ E_2 โดยวิธี RIA พบว่า ความเข้มข้นของ E_2 ในน้ำนมมีปริมาณเพิ่มขึ้น ($P<0.01$) ในการเก็บน้ำนมครั้งที่ 4 ช่วงก่อน estrus และเพิ่มถึงสูงที่สุดก่อนเริ่มพฤติกรรมยืนนิ่งยอมให้ผสม ในช่วงหลังการเป็นสัดระดับ E_2 จะเริ่มลดลง (ภาพที่ 2-5)

ตารางที่ 2-6. Mean estradiol-17β concentration (pg/ml) in milk samples[1] (Lopez *et al.*, 2002)

	Day 5[2]	Day 18[2]
Composite whole milk	0.8 ±0.3 a	5.4 ±1.9 b
Composite defatted milk	0.6 ±0.2 a	5.3 ±1.8 b

[1] (n = 8) per each category per day

[2] Means with different letters are different ($P < 0.001$)



ภาพที่ 2-5. Milk estradiol-17β concentration at each milking period in relation to the onset of estrus; ☆ significant ($P < 0.01$) (Lopez *et al.*, 2002).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Lyimo *et al.* (2000) ได้แนะนำการตรวจการเป็นสัดจากการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างการสังเกตอาการเป็นสัด การใช้ Pedometer และการวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธี RIA ไว้ว่า การใช้ Pedometer ช่วยในการตรวจสัดได้แต่ต้องอ่านค่าหลายครั้งต่อวัน สำหรับการสังเกตอาการเป็นสัดมีค่าสัมพันธ์กับการวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล เป็นการตรวจสัดที่เชื่อถือได้และมีประสิทธิภาพนำไปสู่การกำหนดเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผสมเทียม

Silvan *et al.* (1993) ได้ใช้วิธี ELISA ในการตรวจหาระดับ E_2 ใน follicula fluid จากลักษณะขนาดของ follicle ที่แตกต่างกัน เล็ก, กลาง และใหญ่ ผลที่ได้คือ มี E_2 เท่ากับ 77 ±5.2 (n = 490), 111±19 (n = 65) และ 496 ±146 (n = 45) ng/ml ตามลำดับ และค่าที่ได้จากการวัดด้วยวิธี ELISA มีความสัมพันธ์กับวิธี RIA สูง correlation coefficient เป็น 0.99 ($P<0.005$) เพื่อให้ผลที่เชื่อถือได้และแม่นยำ สำหรับกำหนดความเข้มข้นของ E_2 ใน follicular fluid และสามารถใช้เป็นวิธีบอกปริมาณความเข้มข้น E_2 ใน antral follicles ที่มีขนาดต่างกันของโคสาวในระยะ follicular phase ของ estrous cycle ได้และสามารถนำวิธี ELISA มาใช้ในการหาปริมาณ estradiol-17β ในซีรั่มและน้ำนมได้เช่นกัน

ซึ่งได้มีการศึกษาการวัดระดับ estradiol-17β ในน้ำนมโดยวิธี ELISA ที่เตรียมจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยกนกวรรณ (2542) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีร์ต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล เพื่อใช้ตรวจการเป็นสัดในโคนมโดยวิธี ELISA พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคนม ที่เป็นสัดและไม่เป็นสัดได้

2.6. เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) (Crowther, 2001)

2.6.1 องค์ประกอบต่างๆ ในระบบของ ELISA

Solid phase เป็นพลาสติก microplate ที่เตรียมมาสำหรับการทำ ELISA ปกติจะมีทั้งหมด 8 x 12 หลุม ออกแบบมาให้ใช้งานได้เหมาะสมกับ multichannel pipets

Adsorption เป็นขั้นตอนการเติมแอนติเจน (antigen, Ag) หรือแอนติบอดี (antibody, Ab) ที่ละลายอยู่ใน buffer ลงไปใน solid phase เพื่อให้เกิดการเกาะติดที่ solid phase

Washing คือ การล้างเอา Ag หรือ Ab ที่ไม่ทำปฏิกิริยากันออกจากระบบ เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อผลการวัดที่จะออกมา

Antigen เป็นโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตที่ใช้กระตุ้นให้เกิด Ab ในสัตว์

Antibody เป็นโปรตีนที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อจับกับ Ag ได้อย่างจำเพาะเจาะจง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Antispecies antibodies เป็น Ab ที่สร้างขึ้นมาสำหรับจับกับ Ab เพื่อใช้ในการวัดผลของการทำ ELISA โดยการนำ Ab ของสัตว์ชนิดหนึ่งไปกระตุ้นสัตว์อีกชนิดหนึ่งให้สร้าง Ab ขึ้นมา

เอนไซม์ (Enzyme) เป็นการนำเอนไซม์เชื่อมเข้ากับ Ab เพื่อใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยากับ substrate เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีในระบบขึ้นมา

Substrate เป็นสารที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยา

Stopping เป็นสารเคมีที่ใช้หยุดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate ทำให้หยุดการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อต้องการอ่านผล

Reading การอ่านผลโดยใช้ spectrophotometer เมื่อต้องการวัดออกมาเป็นค่าของตัวเลข หรืออ่านโดยใช้ตาเปล่าเมื่อต้องการดูผลว่ามีหรือไม่มี Ag หรือ Ab ที่ต้องการหา

2.6.2 ระบบในการทำ ELISA แบ่งเป็น 3 ระบบ ดังนี้:

2.6.2.1 Direct ELISA

เป็นการทำ ELISA ที่ง่ายที่สุดแบบตรงไปตรงมา โดยละลายตัวอย่างที่มี Ag ที่ต้องการหาใน buffer แล้วเติมลงใน solid phase หลังจากบ่มไว้ให้ Ag จับกับ solid phase แล้วจึงล้างเอาส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer เพื่อปิดพื้นที่ว่างของ solid phase เพื่อไม่ให้ protein ชนิดอื่น ๆ มาจับ solid phase ได้ จากนั้นจึงบ่ม แล้วล้างออก เติมแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ (Ab-Enz) ที่จำเพาะเจาะจงกับ Ag ที่ต้องการหา บ่มไว้ จากนั้นล้าง Ab-Enz ส่วนเกินที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาออก เติม substrate และบ่มไว้ เติม Stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้จะใช้ได้เมื่อ Ag ที่ต้องการหาสามารถยึดเกาะกับ solid phase ได้ และมี Ab-Enz ที่จำเพาะเจาะจงกับ Ag

2.6.2.2 Indirect ELISA

เป็นการทำ ELISA อีกแบบหนึ่งที่ใช้กันมากสำหรับวัดปริมาณ Ab โดยละลาย Ag ใน buffer แล้วเติมลงใน solid phase หลังจากบ่มไว้ให้ Ag จับกับ solid phase แล้วจึงล้างเอาส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer บ่มไว้ แล้วล้างออก เติมตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่เป็น serum ที่มี Ab ที่ต้องการวัด บ่มไว้ ล้างเอา Ab ส่วนเกิน รวมทั้งสารชนิดอื่นๆ ออก เติม Anti-Ab-Enz ที่จับได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับ Ab ที่ต้องการวัด บ่มไว้ ล้างเอา Anti-Ab-Enz ส่วนเกินออก เติม substrate และบ่มไว้ เติม stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้นิยมใช้กันมากเนื่องจากสามารถวัด Ab ใน serum ได้ ซึ่งใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้อย่างแม่นยำ และมีการผลิต AntiAb-Enz ออกมาขายมากมาย ทำให้สะดวกในการเลือกใช้ รวมทั้งสามารถเลือกวัด Ab ชนิดต่างๆ ได้ เช่น Anti-IgM, Anti-IgG1, Anti-IgG2 เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6.2.3 Sandwich ELISA

เป็นการทำ ELISA ที่ใช้สำหรับวัด Ag ที่ไม่สามารถยึดเกาะกับ solid phase ได้ โดยแบ่งย่อยออกได้อีก 2 ชนิด ดังต่อไปนี้

2.6.2.3.1 Direct sandwich ELISA

เติม Ab ตัวที่ 1 ที่ละลายใน buffer ลงใน solid phase บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารตัวอย่างที่มี Ag ที่ต้องการวัด บ่มไว้แล้วล้างออก เติม Ab-Enz ลงไป บ่มไว้ แล้วล้างเอาส่วนเกินออก เติม substrate บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติม stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้ ใช้ Ab 2 ตัวในระบบ ซึ่งทำให้เกิดข้อจำกัดบางประการได้แก่ Ag หรือตัวอย่างที่ต้องการวัดจำเป็นต้องมีบริเวณที่ Ab เข้าจับ หรือที่เรียกว่า antigenic site มากกว่า 2 บริเวณ เพื่อให้ Ab เข้าจับได้ หรืออีกกรณีหนึ่งคือ Ab ทั้ง 2 ตัวที่ใช้มีบริเวณจับ หรือ epitope site บน Ag นั้นแตกต่างกัน รวมทั้ง Ag ต้องมีขนาดใหญ่พอสมควรเพื่อให้ Ab 2 ตัวเข้าจับได้

2.6.2.3.2 Indirect sandwich ELISA

เป็นการทำ ELISA ที่มีขั้นตอนคล้ายกับ direct sandwich ELISA แต่ต่างกันที่ Ab ตัวที่ 2 ไม่ได้ จับกับ Enz ทำให้ระบบต้องมี Anti-Ab ตัวที่ 2 – Enz เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ตัว โดยเติม Ab ตัวที่ 1 ที่ละลายใน buffer ลงใน solid phase บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารละลาย blocking buffer บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติมสารตัวอย่างที่มี Ag ที่ต้องการวัด บ่มไว้แล้วล้างออก เติม Ab ตัวที่ 2 ลงไป บ่มไว้ แล้วล้างเอาส่วนเกินออก เติม Anti-Ab ตัวที่ 2 – Enz ลงไป บ่มไว้ แล้วล้างออก เติม substrate บ่มไว้ แล้วล้างส่วนเกินออก เติม stopping และอ่านผล การทำ ELISA วิธีนี้นอกจากข้อจำกัดที่คล้ายกับ direct sandwich ELISA แล้ว ยังมีข้อจำกัดอีกประการคือ Anti-Ab-Enz ต้องไม่จับกับ Ab ตัวที่ 1 ที่ใช้ในระบบ ดังนั้น ส่วนใหญ่แล้ว Ab ตัวที่ 1 และ Ab ตัวที่ 2 ต้องมาจากสัตว์ต่าง species กัน

2.6.2.4 Competition ELISA

เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ Ab หรือ Ag 2 ตัวแย่งกันจับกับ Ag หรือ Ab โดยวิธีนี้รวมถึงการวิเคราะห์ ELISA แบบ inhibition หรือ blocking assay ต่างกันเล็กน้อยตรงที่ competition ELISA จะเติม Ab หรือ Ag พร้อมกัน 2 ตัว แล้วจึงบ่มให้แย่งกันจับ แต่ inhibition หรือ blocking assay จะเติม Ab หรือ Ag ทีละตัวเป็นลำดับ (Crowther, 1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7. แอนติบอดี (Antibodies)

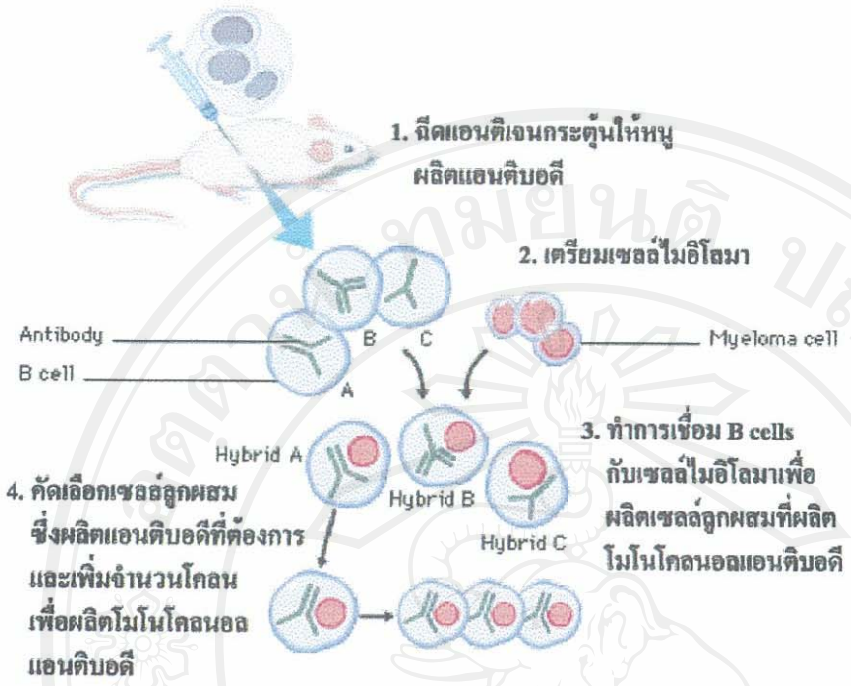
2.7.1 โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody, PAb)

PAb หรือ Polyclonal antisera เป็นแอนติบอดีที่ผลิตได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ด้วย Ag ที่ต้องการให้สัตว์สร้าง Ab ซึ่งสัตว์ที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ กระต่าย, แกะ หรือแพะ แล้วนำซีรั่มของสัตว์ที่ตรวจพบว่าสร้าง Ab ต่อสารที่ต้องการมาใช้ แต่ PAb มีการตอบสนองต่อ epitopes ที่หลากหลาย ซึ่งอาจจะแข่งขันกันใน epitope เดียวกัน และมีความจำเพาะหลากหลาย ทำให้มีความสามารถในการจับกับ Ag แตกต่างกันด้วย (Catty, 1989)

2.7.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal anyibody, MAb)

MAb ผลิตได้จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง หนูขาวตัวเล็กหรือหนูขาวด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดี แล้วเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocyte ทำการเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมา ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ผลจากการเชื่อมเซลล์ทำให้ได้เซลล์ลูกผสม (Hybridoma) หลังจากนั้นทำการแยกเซลล์ลูกผสม ออกจาก เซลล์ไมอิโลมาที่ไม่ได้ถูกเชื่อม (ภาพที่ 2-6) โดยอาศัยคุณสมบัติของเซลล์ไมอิโลมา ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน selective media เพราะขาดยีนที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอ โดย selective media ทั่วไปคือสารละลาย HAT (hypoxanthine-aminopterine-thymidine medium) ประกอบไปด้วย hypoxanthine, aminopterine และ thymidine ซึ่ง aminopterine จะขัดขวางการสร้าง purine nucleotide ตามวิธีปกติ (Denovo pathway) ทำให้เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ต้องเปลี่ยนมาสร้างนิวคลีโอไทด์ทางอ้อม (Salvage pathway) ด้วยการใช้ hypoxanthine ในการสร้างโดยอาศัยเอนไซม์ hypoxanthine-quanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และสร้าง thymidinekinase (TK) แต่เนื่องจากเซลล์ไมอิโลมาที่ใช้นั้นขาดเอนไซม์ HGPRT และ/หรือ TK ทำให้ไม่สามารถสร้างนิวคลีโอไทด์จาก Salvage pathway ได้ จึงตายใน HAT media ในขณะที่ Hybridoma นั้นอาศัยเอนไซม์ HGPRT จากเซลล์ B lymphocyte ทำให้สามารถสร้างดีเอ็นเอและเจริญเติบโตสร้างแอนติบอดีได้ (Harlow and Lane, 1988) แล้วทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อแยกเอาแอนติบอดี ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง และเซลล์สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-6. แสดงกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(http://images.encarta.msn.com/xrefmedia/aencmed/targets/illus/ilt/T059309A.gif).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved