บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1. การเป็นสัด

2.1.1. รอบการเป็นสัด

การเป็นสัดในแม่แพะแตกต่างกันตามพันธุ์ของสัตว์และสภาพแวดล้อม รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ แสงสว่าง ในแพะนั้นตอบสนองต่อความยาวของแสงในช่วงวันได้เป็นอย่างดี เมื่อความยาวของแสงในช่วงวันลดลงจะมีผลไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าทำให้เกิดการเป็นสัดขึ้นได้

ตารางที่ 2-1 แสดงลักษณะเฉพาะทางระบบสืบพันธุ์ของแพะ วงรอบการเป็นสัดของแพะนับจากช่วงไข่ตก (ovulation) ครั้งหนึ่งจนถึงไข่ตกครั้งต่อไป ใช้เวลาประมาณ 17-21 วัน โดยแบ่งระยะการเป็นสัดได้ 4 ระยะดังนี้

1. ระยะก่อนมีการตกไข่ เรียกว่า โปรเอสทรัส (proestrus) ใช้เวลาประมาณ 3 วัน เป็นช่วงเวลาหลังจากการสลายตัวของคอร์ปัสลูเทียม (Corpus luteum, CL) ในวงรอบการเป็นสัดครั้งก่อน และมีการลดลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (Progesterone, P_4) อย่างรวดเร็ว เป็นระยะที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของฟอลลิเคิลสตีมูเรทติงฮอร์โมน (Follicle stimulating hormone, FSH) โดย FSH จะไปกระตุ้นให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิลและในขณะเดียวกันเซลล์ภายในฟอลลิเคิลก็ผลิตฮอร์โมนเอสโทรเจน (Estrogen, E_2) เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยจะมีเลือดมาเลี้ยง endometrium มากขึ้น ช่องคลอดจะบวมหนามีเลือดมาเลี้ยงที่เยื่อบุช่องคลอดด้านในเพิ่มขึ้นและมีน้ำเมือกเหนียวบริเวณปากช่องคลอด

2. ระยะที่มีการตกไข่ หรือระยะเป็นสัด เรียกว่า เอสทรัส (estrus หรือ ovulation) ใช้เวลาประมาณ 1-2 วัน เป็นระยะที่สัตว์ยอมรับการผสมพันธุ์จากตัวผู้ ในระยะนี้จะเริ่มตั้งแต่ตัวเมียยอมให้ตัวผู้ขึ้นขี่ครั้งแรก จนถึงครั้งสุดท้าย สัตว์เพศเมียจะแสดงอาการกระวนกระวาย ตื่นตกใจง่าย ขึ้นขี่ตัวอื่น กินอาหารลดลง สิ่งที่สังเกตได้คือ อวัยวะเพศจะมีสีแดงเรื่อ มีน้ำเมือกใสไหลออกมา ทางปากช่องคลอด ระยะ estrus นี้อยู่ภายใต้อิทธิพลของ E_2 และลูทีไนท์ซิง ฮอร์โมน (Luteinizing hormone, LH)

3. ระยะที่มีการสร้าง CL เรียกว่า เมทเอสทรัส (metestrus) ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 2 วัน เป็นช่วงหลังจากการตกไข่ ฟอลลิเคิลเปลี่ยนแปลงไปเป็น CL เริ่มมีการผลิต P_4 ทำให้มีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนแปลงที่ผนังมดลูกเพื่อเตรียมรับการฝังตัวของตัวอ่อนในระยะนี้ถ้ามีการปฏิสนธิเกิดขึ้นแม่แพะจะใช้เวลาอุ้มท้องประมาณ 150 วัน (146-151 วัน) ตามด้วยระยะในการให้น้ำนมอีกประมาณ 30-60 วันจึงจะเริ่มเข้าสู่วงรอบของการเป็นสัดอีกครั้ง

4. ระยะไดเอสทรัส (diestrus หรือ luteal phase) เป็นระยะที่มีระดับ P_4 สูง ใช้เวลาประมาณ 11-12 วัน หลังจากนั้นเมื่อไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น CL จะฝ่อหายไป ทำให้ระดับ P_4 ลงอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะโปรเอสทรัสต่อไป (Ensminger, 2002)

ตารางที่ 2-1. แสดงลักษณะเฉพาะทางระบบสืบพันธุ์ของแพะ

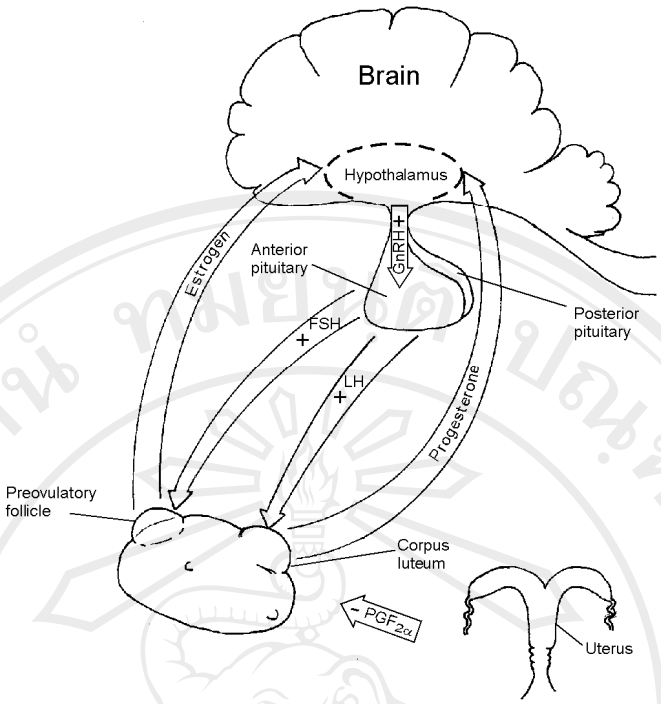
ลักษณะทางระบบสืบพันธุ์	พันธุ์แพะ		อ้างอิง
อายุเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (เดือน)	Anglo-Nubian	5-7	Khanum *et al*. (2006)
รอบการเป็นสัด (วัน)	Saanen	19-22	Menchaca and Rubianes (2002)
ระยะเมทเอสทรัส (วัน)	Shiba	0-5 (หลังตกไข่)	Suganuma *et al*. (2006)
ระยะไดเอสทรัส (วัน)	Serrana	13-15	Kustritz (2001)
ระยะโปรเอสทรัส (วัน)	Serrana	2-3	Kustritz (2001)
ระยะเอสทรัส (ชั่วโมง)	Bore	12-24	Campbell *et al*. (2007)
ระยะเวลาไข่ตก (ชั่วโมง)	Bore	$\pm$ 30	Campbell *et al*. (2007)
ช่วงเวลาการตั้งท้อง (วัน)	Anglo-Nubian	146-151	Khanum *et al*. (2006)

2.1.2. ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัด

วงรอบการเป็นสัดที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทุกชนิด ถูกควบคุมโดยส่วนสำคัญ 3 ส่วนคือ ระบบประสาทส่วนกลาง ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า และฮอร์โมนจากรังไข่

โกนาโดโทรปิน (gonadotrophin) เป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ต่อต่อมเพศซึ่งหลั่งจากต่อมพิทูอิตารี (pituitary) หรือต่อมใต้สมองส่วนหน้าพบว่ามีอยู่ 2 ชนิด คือ LH มีฤทธิ์ไปกระตุ้นให้กระเปาะไข่โตเต็มที่ มีการตกไข่และสร้าง CL ส่วนของกระเปาะไข่และ CL จะสร้าง E_2 และ P_4 ความสัมพันธ์ของระบบประสาทส่วนกลาง ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า และฮอร์โมนจากรังไข่ที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ แสดงในภาพที่ 2-1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

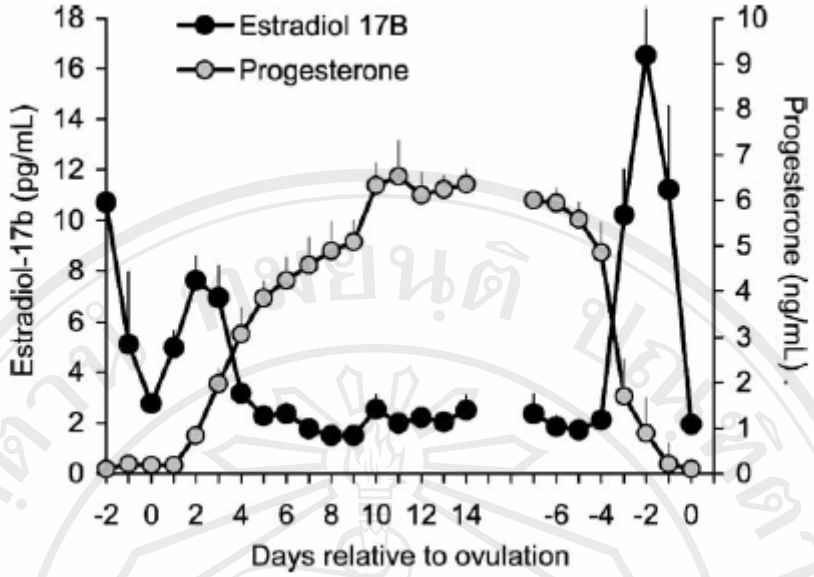


ภาพที่ 2-1. ความสัมพันธ์ของระบบประสาทส่วนกลาง ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า และฮอร์โมนจากรังไข่ ที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ (ที่มา: Gordon, 1997).

E_2 ทำให้กระเปาะไข่เจริญเต็มที่เป็นผลให้ระดับของ LH ขึ้นสูงสุด ทำให้เกิดการตกไข่ภายใน 24 ชั่วโมง และมีผลต่อสมองทำให้สัตว์แสดงพฤติกรรมการเป็นสัด เช่นทำให้แพะเพศเมียยอมให้แพะเพศผู้ปีนขึ้นทับผสมพันธุ์ได้ ระดับ E_2 และ LH จะสูงติดต่อกันไปประมาณ 48-60 ชั่วโมง และลดต่ำลงพร้อมๆ กับระดับ P_4 และโกนาโดโทรปิน (ภาพที่ 2-2) ก่อนที่จะมีการตกไข่ในรอบต่อไป หลังจากแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดประมาณ 30-36 ชั่วโมง (Rubianes and Menchaca, 2003)

หลังจากมีการตกไข่ ระดับ E_2 จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงนี้ CL จะหลั่ง P_4 ไปกดการทำงานของต่อมใต้สมอง จัดอยู่ในระยะ ไดเอสตรัส ถ้าไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้นภายในวันที่ 12 ของวงรอบการเป็นสัด จะมีการปล่อยสารพรอสตราแกลนดิน (prostaglandin) จากมดลูกเข้าสู่เส้นเลือดดำของมดลูก สารนี้จะเหนี่ยวนำให้คอร์ปัสลูเทียมฝ่อสลายไป และเริ่มต้นวงรอบการเป็นสัดครั้งใหม่ (Gordon, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-2. การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสโทรเจนและฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในระหว่างการตกไข่ของแพะ ซาเนน (Saanen) (Rubianes and Menchaca, 2003).

2.1.3. อาการเป็นสัด

แพะแสดงอาการเป็นสัดโดยการเข้าหาตัวผู้ตามสัญชาตญาณ เมื่อแม่แพะอยู่ในอาการเป็นสัด จะมีการร้องเรียกตัวผู้ พยามยามเดินเข้าหาตัวผู้ หรือตามกลิ่นตัวผู้ไป ซึ่งแตกต่างจากตัวที่ไม่เป็นสัดจะพยายามหลีกหนีตัวผู้ ในการเดินเข้าหาตัวผู้นั้นมีการส่งสัญญาณ โดยการร้องเรียก กระดิกหางเป็นจังหวะให้สังเกตได้ (Thiery *et al.,* 2002) เมื่อตรวจดูอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก พบว่ามีการบวมแดงของแคมของช่องคลอดและมักมีเมือกใสไหลออกมาเล็กน้อย เมือกใสนี้ถ้าสังเกตไกล ๆ มักสังเกตไม่พบ เพราะมีปริมาณที่ไหลออกน้อยกว่าในโคมาก และมักไม่ไหลย้อยลงมาให้สังเกตได้ง่าย ๆ เหมือนในโค (Rezac *et al.,* 2001)

2.1.4. การเปลี่ยนแปลงที่รังไข่

รังไข่ของแพะมีขนาดเล็กกว่าโคมากและรูปร่างรังไข่ของแพะมีลักษณะเกือบกลม คือ มีขนาดในระยะแอนเอสทรัสประมาณ 1.3 × 1.2 × 0.8 เซนติเมตร กระเปาะไข่ในระยะแอนเอสทรัสมีขนาด 0.2 - 0.6 เซนติเมตร และอาจมีขนาดถึง 1 เซนติเมตรก็เป็นได้ ผนังของกระเปาะไข่จะบางใส มองเห็นของเหลวภายในกระเปาะซึ่งมีสีม่วงได้ (Orita *et al.,* 2000) เมื่อเกิดการตกไข่แล้วบริเวณที่เป็นกระเปาะไข่ก็เจริญไปเป็น CL การเจริญนี้คล้ายโคคือมีขนาดประมาณ 0.6 เซนติเมตร ในช่วงกลางของไดเอสทรัส (Ireland *et al.,* 2000) ในช่วงไดเอสทรัสนี้มีการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงของเลือดกลายเป็นสีชมพูอ่อน และ CL จะคงขนาดนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงการเป็นสัดครั้งต่อไปซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในช่วงแอนเอสทรัส ก็อาจมีการตกไข่และเกิดการสร้าง CL ขึ้นได้โดยไม่แสดงอาการเป็นสัดออกมาให้เห็น การตกไข่ในช่วงของการเป็นสัดนั้นมีการตกไข่พร้อมกันได้ครั้งละ 1 ฟองถึงหลายฟองแล้วแต่สภาพแวดล้อม พันธุ์ อาหาร ฮอร์โมนและอายุของสัตว์ด้วย ในสัตว์ที่อายุน้อยและอายุมากแล้วจะตกไข่น้อยกว่าสัตว์ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (Evans *et al.,* 2000)

2.2. ฮอร์โมนเอสโทรเจน (Estrogen, E_2)

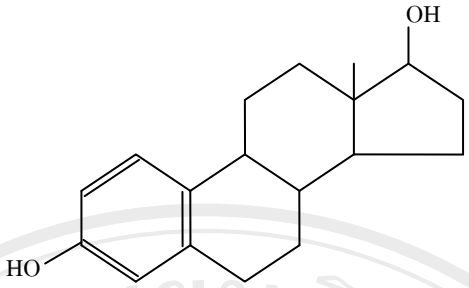
E_2 จัดเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสารประเภทสเตียรอยด์ (steroid hormone) ฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่ม E_2 ได้แก่ เอสโทรน (estrone, E1), เอสทราไดออล-17β (estradiol-17 β, E2- β),เอสทราไดออล-17α (estradiol-17α, E2-α) และเอสทรอล (estriol, E3) E_2 สร้างจากเซลแกรนนูโลซา (granulosa) ของฟอลลิเคิล (follicle) เซลแกรนนูโลซาเป็นเซลที่อยู่ด้านในของฟอลลิเคิล โดยอยู่ล้อมรอบช่องว่าง (antrum) ของฟอลลิเคิล E_2 ปริมาณน้อย ๆ จะช่วยกระตุ้นการสร้างและหลั่งฮอร์โมน FSH นอกจากนี้ ยังเป็นฮอร์โมนที่ทำให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัด ซึ่งทำให้สัตว์เพศเมียมีเมือกใสไหลจากช่องคลอด โดยอาการเป็นสัดจะเด่นชัดขึ้นตามปริมาณของ E_2 ที่เพิ่มขึ้น

ลักษณะประจำโครงสร้างของฮอร์โมนกลุ่มนี้จะมีพันธะคู่ 3 แห่งในวงแหวน A และไม่มี methyl group ที่ตำแหน่ง C-10 แต่จะมี hydroxyl group ที่ตำแหน่ง C-3 (ภาพที่ 2-3)

<u>คุณสมบัติของ E_2</u>

1. ชื่อสามัญ : Estrogen
2. ชื่ออื่นๆ : Estradiol 17β, Dihydrofolliculin, Dihydroxyestrin
3. ชื่อทางเคมี : Estra-1,3,5 (10)-triene-3,17β-diol
4. สูตรโครงสร้าง : $C_{18}H_{24}O_2$
5. มวลโมเลกุล : 272.39
6. จุดหลอมเหลว : 173 องศาเซลเซียส
7. Half life : ~ 13 ชั่วโมง (Schumacher *et al.*, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



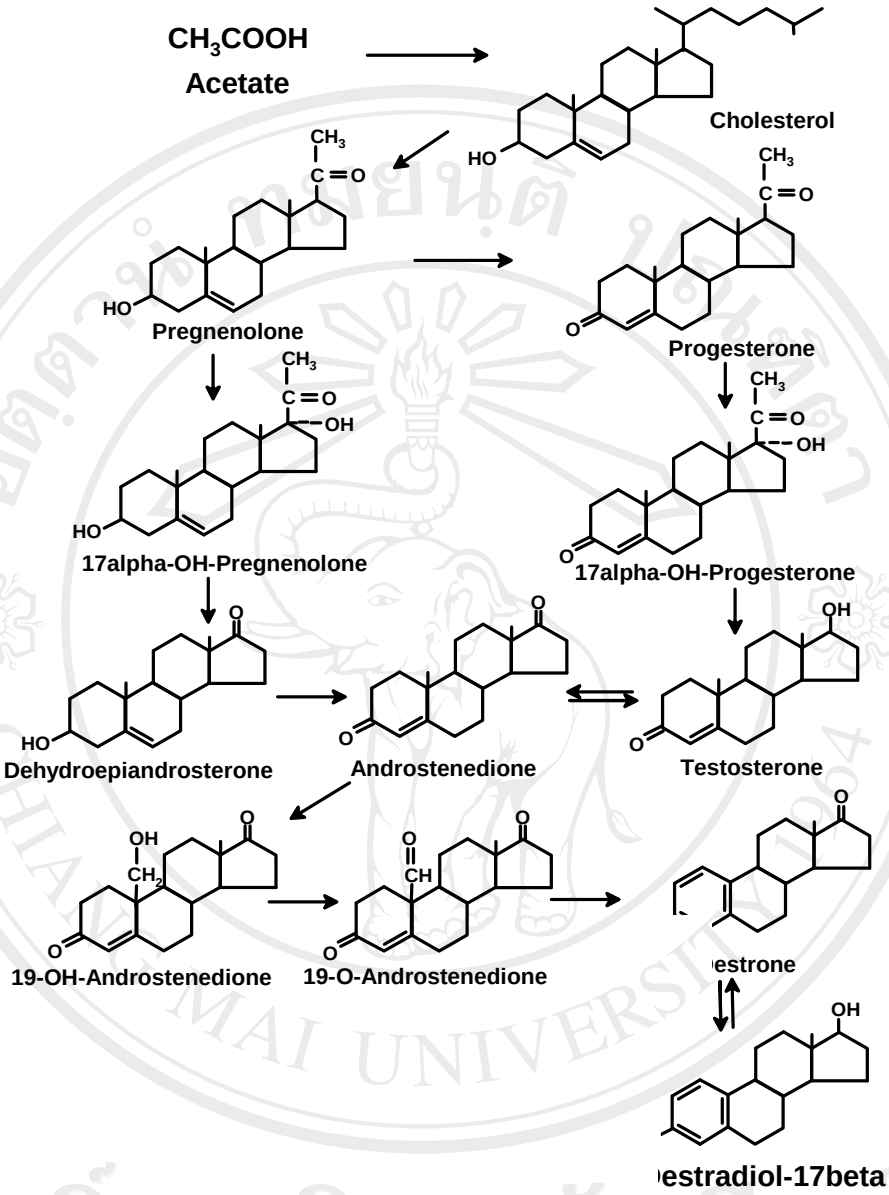
ภาพที่ 2-3. แสดงโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนเอสโทรเจน (http://www.indstate.edu/thcme/mwking/steroid-hormones.html).

รังไข่และรกเป็นแหล่งผลิต E_2 ที่สำคัญที่สุด นอกจากนี้ E_2 ยังถูกสร้างได้จากต่อมหมวกไตอีกด้วย ส่วนของรังไข่ที่ผลิต E_2 ได้แก่ ฟอลลิเคิล โดย LH จะกระตุ้นให้ thecal cell ของฟอลลิเคิลผลิตฮอร์โมนเทสโทสเทอโรน (Testosterone) จะถูกเปลี่ยนเป็น E_2 ใน granulosa cell ภายใต้อิทธิพลของ FSH (ภาพที่ 2-4) (Simpson, 2003)

2.2.1. บทบาทหน้าที่ของฮอร์โมนเอสโทรเจน

E_2 ทำหน้าที่ กระตุ้นให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัดเมื่อถึงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผสมพันธุ์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์เยื่อบุช่องคลอดโดยไปมีผลกระตุ้นให้มีการเจริญของมดลูกในส่วนของ myometrium และ endometruim และทำให้เกิดการบีบตัวของมดลูก และเพิ่มปริมาณการทำงานของ oxytocin และ prostaglandins ในการบีบตัวของมดลูกและท่อนำไข่นอกจากนั้นยังควบคุมการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองโดยขณะที่ปริมาณ E_2 อยู่ในระดับต่ำจะมีผลไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลั่ง FSH เพื่อให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิลขึ้นและเมื่อ E_2 มีปริมาณสูงสุด ก็จะทำให้มีการหลั่ง LH เพื่อกระตุ้นการตกไข่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-4. ขั้นตอนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ (Simpson, 2003).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

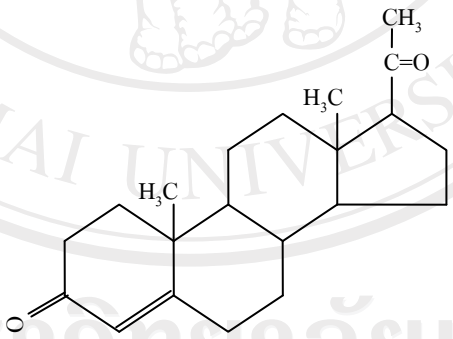
2.3. ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (Progesterone, P_4)

เป็น C-21 สเตียรอยด์ คือฮอร์โมนที่มีฤทธิ์กระตุ้นมดลูก โดยเฉพาะเยื่อบุผนังมดลูกให้เจริญเพื่อเตรียมไว้สำหรับการฝังตัวและการเติบโตของไข่ที่ถูกผสมเชื้อแล้ว ฮอร์โมนนี้ถูกหลั่งจาก CL ของรังไข่โดย granulosa lutein cell เป็นส่วนใหญ่ theca lutein cells เป็นส่วนน้อยและรก P_4 เป็นสารตัวกลางของการสังเคราะห์สเตียรอยด์เพศในรังไข่

ลักษณะประจำโครงสร้างของ P_4 คือ มีแขนคู่เชื่อมระหว่าง C 4-5 มี double C- side chain ที่ C-17 และมีปรมาณูออกซิเจนติดที่ C-3 และที่ C-20 (ภาพที่ 2-5)

<u>คุณสมบัติของ P_4</u>

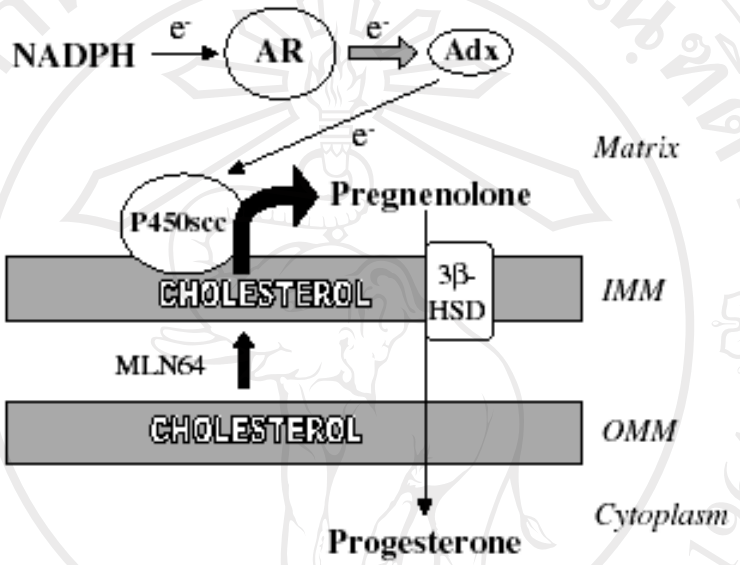
1. ชื่อสามัญ : Progesterone
2. ชื่ออื่นๆ : Progestin; Lutren; Lutein; Flavolutan; Corporin; Luteal hormone
3. ชื่อทางเคมี : 4-Pregnene-3,20-dione
4. สูตรโครงสร้าง : $C_{21}H_{30}O_2$
5. มวลโมเลกุล : 314.46
6. จุดหลอมเหลว : 128-130 องศาเซลเซียส (Schumacher *et al*., 2001)



ภาพที่ 2-5. แสดงโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (http://www.indstate.edu/thcme/mwking/steroid-hormones.html).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเคราะห์ P_4 ทั้งที่รังไข่ รก และต่อมหมวกไตส่วนนอกต่างก็ใช้วิถีเดียวกันคือ มีโคเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารตั้งต้น (ภาพที่ 2-6) การเปลี่ยนเพรกเนนโนโลน (Pregnenolone) ไปเป็น P_4 ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือการเอาอะตอมของไฮโดรเจนออกจากตำแหน่ง 3-เบตา ทำให้เหลือกลุ่มคีโทนและการเปลี่ยนตำแหน่งของ double bond จากตำแหน่งที่ 4 ไปเป็นตำแหน่งที่ 5 ทั้งสองขั้นตอนถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ตัวเดียวกันคือ3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3 βHSD)



ภาพที่ 2-6. แสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในต่อมหมวกไตและต่อมเพศ (Tuckey, 2005).

2.3.1. บทบาทหน้าที่ของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน

P_4 ทำให้กล้ามเนื้อมดลูกอยู่ในระยะสงบ และช่วยควบคุมประมาณเลือดที่ไปเลี้ยงมดลูกและเตรียมเยื่อบุโพรงมดลูกให้พร้อมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน รวมถึงกดระบบภูมิคุ้มกันของแม่ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านตัวอ่อนและรกในขณะเดียวกัน P_4 ยังมีผลในการกระตุ้นให้มีการพัฒนาของส่วน alveolar ของเต้านมเพื่อเตรียมสำหรับสร้างน้ำนมและยังใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับต่อมหมวกไตของตัวอ่อนเพื่อนำไปสร้าง กลูโคคอร์ทิคอยด์ (glucocorticoid) และมิเนรัลโลคอร์ทิคอยด์ (mineralocorticoid) อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4. การเหนี่ยวนำการเป็นสัด (Estrus synchronization)

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดคือการจัดการให้สัตว์หนึ่งตัว หรือหลายตัวเป็นสัดพร้อมกันในเวลาที่กำหนดไว้หรือในเวลาที่ต้องการ โดยทั่วไปใช้ฮอร์โมนที่สกัดจากธรรมชาติหรือสังเคราะห์มาให้สัตว์ โดยเลียนแบบการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ (Ball and Peter, 2004) การควบคุมวงรอบการเป็นสัดขึ้นกับการจัดการฮอร์โมนที่มีการเปลี่ยนแปลงในวงรอบการเป็นสัดปกติเช่นการควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิลที่จะตกในสัตว์ที่มีวงรอบการเป็นสัดโดยมีกระบวนการหลักคือ กระบวนการสลาย CL หรือกระบวนการลดการหลั่ง P_4 ซึ่งในธรรมชาติกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในวันที่ 17 และ 18 ของวงรอบการเป็นสัด ดังนั้นการทำให้ระดับของ P_4 ลดลงสามารถทำได้โดยการจัดการจากภายนอกตัวสัตว์ โดยการเลียนแบบการทำงานของ CL โดยการให้ P_4 ติดต่อกันหลายวันแล้วหยุดให้ (Chenault *et al*., 2003)

2.4.1 การใช้ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในการควบคุมวงรอบการเป็นสัด

การใช้ P_4 ในการควบคุมวงรอบการเป็นสัด คือ การเลียนแบบการทำงานของ CL โดยการให้ P_4 จากภายนอก ซึ่งในธรรมชาติระดับ P_4 ที่สูง จะกดการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองและทำให้ฟอลลิเคิลไม่เจริญจนถึงตกไข่ได้ จนเมื่อหยุดการให้ P_4 จะมีการหลั่ง FSH จากต่อมใต้สมองและการเจริญเต็มที่ของฟอลลิเคิลจึงมีการหลั่งของ LH ในระดับสูงและเกิดการตกไข่ตามมา (Mihm *et al.,* 2002) การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะมีด้วยกันหลายวิธี

2.4.1.1. Melengestrol Acetate (MGA) แบบเสริมในอาหาร

MGA เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ผสมในอาหารและมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ เนื่องจาก MGA สังเคราะห์ P_4 MGA ส่วนใหญ่ใช้กับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในโคเนื้อ แต่ปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับแพะ และแกะแล้ว โดยการนำ MGA ผสมในอาหารวันละ 1 หรือ 2 ครั้งเป็นเวลา 8-14 วัน ในขั้นตอนการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยวิธีนี้มักใช้ร่วมกับ Pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) หรือ Human chorionic gonadotrophin (hCG) (Wildes, 2000) ผลจากการนำ MGA มาเหนี่ยวนำการเป็นสัด ดังตารางที่ 2-2 การตอบสนองต่อการเป็นสัดอยู่ในช่วง 13 ถึง 96 % และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ PMSG หรือ Zeranol ร่วมกับการทดลองด้วย การผสมติดหลังจากใช้ MGA ผสมในอาหารขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ร่วมกับการทดลอง การใช้ Zeranol (5 มิลลิกรัม) หลังจากสิ้นสุดการให้อาหารที่ผสม MGA ทำให้การตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดสูงขึ้น

แต่การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธีการใช้ MGA ผสมในอาหารยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากผลตอบสนองต่อการเป็นสัดไม่ดีนัก อัตราการผสมติด และอัตราการตั้งท้องต่ำมาก อาจเป็นผลจากการกำหนดขนาดยาในอาหารที่ยังไม่แน่นอน ซึ่งทำได้ลำบากและการดูดซึมทางระบบอาหารสู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1.2. Norgestomet แบบฝังใต้ผิวหนังบริเวณใบหู

Norgestomet เป็นผลิตภัณฑ์ของ P_4 ซึ่งมีชื่อทางการค้าคือ SynchroMate-B (SMB) ใช้สำหรับเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยการฝังแท่ง norgestomet ไว้ใต้ผิวหนังบริเวณใบหูเป็นเวลา 9 ถึง 14 วัน และใช้ร่วมกับ PMSG หรือ Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) โดยฉีดสารเหล่านี้ 2 วันก่อนสิ้นสุดการเหนี่ยวนำด้วย norgestomet (Whitley and Jackson, 2004) ผลการตอบสนองต่อการเป็นสัดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย norgestomet อยู่ในช่วง 62-100 % ขึ้นอยู่กับปริมาณของ norgestomet ฤดูกาลและสิ่งทดลองร่วม ในทำนองเดียวกันกับอัตราการผสมติด (27-83 %) ก็ขึ้นอยู่กับความไม่คงที่ของปัจจัยที่กล่าวมาแล้วดังแสดงในตารางที่ 2-3 เมื่อใช้ norgestomet เทียบกับการใช้ CIDR ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ Saanen พบว่า อัตราการเป็นสัดเท่ากันคือ 100 % แต่อัตราการผสมติดของแพะในกลุ่ม CIDR สูงกว่ากลุ่ม norgestomet คือ 100 และ 80 % ตามลำดับ (Oliveira *et al*., 2001) แต่เนื่องจาก norgestomet เวลาใช้ต้องฝังใต้ผิวหนังทำให้สัตว์เกิดความเจ็บและยากต่อการบังคับสัตว์ทดลองเวลาฝังฮอร์โมนวิธีนี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-2 การตอบสนองต่อการเป็นสัดและอัตราการผสมติดเมื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยการเสริม Melengestrol Acetate (MGA) ในอาหาร

ปริมาณ MGA ในแต่ละวัน (มิลลิกรัม)	ระยะเวลาทดลอง (วัน)	สิ่งทดลองร่วม	จำนวนสัตว์ทดลอง	% การเป็นสัด	% การผสมติด	อ้างอิง
0.25	8	1.25 mg Zeranol 30 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้อาหาร	48	70.8	29.2	Powell *et al*. (1996)
		5 mg Zeranol 30 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้อาหาร	50	94.0	12.0	
0.25	14	-	20	80	75.0	Powell *et al*. (1996)
		5 mg Zeranol 30 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้อาหาร	23	95.7	43.5	
0.25	10	7.5 mg $PGF_{2\alpha}$ เมื่อสิ้นสุดการให้อาหาร	25	84	58	Jackson *et al*. (2006)
0.22	12	7.5 mg $PGF_{2\alpha}$	12	80	50	Martinez-Alvarez *et al*. (2007)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-3 การตอบสนองต่อการเป็นสัดและอัตราการผสมติดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย norgestomet แบบฝังใต้ผิวหนังบริเวณใบหู

ปริมาณ norgestomet (มิลลิกรัม)	ระยะเวลาทดลอง (วัน)	สิ่งทดลองร่วม	จำนวนสัตว์ทดลอง	% การเป็นสัด	% การผสมติด	อ้างอิง
3.0	9-13	300 IU PMSG 36 ชั่วโมงก่อนถอดและ 50 ug Cloprostenol เมื่อถอด norgestromet	67	89	70	Rowe and East (1996)
3.0	11	400 IU PMSG และ 50 ug Cloprostenol 48 ชั่วโมงก่อนถอด	56	98	75	Freitas *et al*. (1997b)
1.5	11	400 IU PMSG และ 50 ug Cloprostenol 48 ชั่วโมงก่อนถอด	55	98	45	
3.0	9	-	12	64	58	Kusina *et al*. (2000)
3.0	9	125 ug Cloprostenal 48 ชั่วโมงก่อนถอด norgestomet	12	82	75	
2.0	9	2.5 mg estradiol valerate และ 1.5 mg norgestomet ก่อนฝัง ; 100 IU eCG และ 0.05 mg Cloprostenol เมื่อถอด norgestomet	20	100	80	Oliveira *et al*. (2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1.3. Intravaginal Sponges แบบฟองน้ำสอดช่องคลอด

Intravaginal sponges เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยการสอดเข้าช่องคลอดซึ่งอุปกรณ์นี้มีลักษณะเป็นแบบฟองน้ำ และแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ flurogestone acetate (FGA) มีชื่อทางการค้าคือ Chronogest และอีกแบบหนึ่งคือ medroxyprogesterone acetate (MAP) มีชื่อทางการค้าคือ Veramix การเหนี่ยวนำด้วย Intravaginal sponges นี้ใช้ระยะเวลา 9-19 วันและใช้ร่วมกับ PMSG โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อเมื่อถอดเอาอุปกรณ์ออก หรือฉีดหลังจากเอาอุปกรณ์ออกไปแล้ว 48 ชั่วโมง (Wildeus, 2000) ผลการตอบสนองต่อการเป็นสัดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย Intravaginal sponges ค่อนข้างสูงคือ 75-100 % และอัตราการผสมติดก็สูงด้วยเช่นกันคือ 51-80 % ดังแสดงในตารางที่ 2-4 ซึ่งการเหนี่ยวนำด้วย Intravaginal sponges ค่อนข้างให้ผลดีถ้าหากว่าอุปกรณ์ไม่หลุดจากช่องคลอดในช่วงเวลาที่อยู่ในช่วงโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด

2.4.1.4. Controlled internal drug release (CIDR) device แบบซิลิโคนสอดช่องคลอด

CIDR เป็นอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอด มีลักษณะเป็นรูปตัวที (T-shaped) (ภาพที่ 2-7) ผลิตจากซิลิโคน ประกอบด้วย P_4 0.3 กรัม ซึ่ง P_4 นี้เคลือบอยู่ที่ผิวด้านนอกของซิลิโคน ใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด 10-18 วัน (Fonseca *et al.,* 2005)

การตอบสนองต่อการเป็นสัดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย CIDR แสดงในตารางที่ 2-5 จากรายงานการวิจัยของ Dixon *et al*. (2006) ได้ศึกษาผลของ CIDR-G กับกลุ่มควบคุม โดยสอด CIDR-G เข้าช่องคลอดนาน 12 วัน จากการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดของกลุ่มควบคุมคือ 41.6 % น้อยกว่ากลุ่มที่เหนี่ยวนำด้วย CIDR-G คือ 97.7 % ($P<0.01$) และอัตราการตั้งท้องในกลุ่มควบคุม คือ 79.0 % น้อยกว่ากลุ่มที่เหนี่ยวนำด้วย CIDR-G คือ 90.0 % ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ

จากการศึกษาของ Romano (2004) มีวัตถุประสงค์ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตอบสนองการเป็นสัด การเหนี่ยวนำการเป็นสัด ระยะเวลาการเป็นสัด และอัตราการตั้งท้องระหว่างฟองน้ำสอดช่องคลอด (Intravaginal sponges) FGA, MAP และ CIDR โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มแต่ละกลุ่มใช้แพะจำนวน 20 ตัว กลุ่มที่ 1 ให้ Intravaginal sponges ที่ประกอบด้วย FGA จำนวน 30 mg กลุ่มที่ 2 ให้ MAP จำนวน 60 mg และกลุ่มที่ 3 ให้ CIDR ประกอบด้วย P_4 จำนวน 300 mg ใช้เวลาในการสอดอุปกรณ์นี้นาน 13 วัน หลังจากการถอดอุปกรณ์นี้ออกฉีด prostaglandin $F_{2\alpha}$ 5 mg และทำการผสมเทียม 12 ถึง 24 ชั่วโมงหลังจากพบการเป็นสัด จากการทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของการตอบสนองการเป็นสัดแพะทั้ง 3 กลุ่มสามารถตอบสนองการเป็นสัดได้ทั้งหมด (100 %) แพะในกลุ่ม FGA สามารถเป็นสัดได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CIDR ($P<0.05$) และกลุ่ม MAP ($P<0.001$) ช่วงห่างการเป็นสัดกลุ่ม CIDR มีช่วงการเป็นสัดสั้นกว่ากลุ่ม MAP ($P<0.05$) การเหนี่ยวนำการเป็นสัดของทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ และอัตราการตั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Oliveira *et al.* (2001) ได้ศึกษาผลของ CIDR ร่วมกับการให้ equine chorionic gonadotrophin (eCG) หรือ cloprostenol โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1- CIDR ที่ประกอบด้วย P_4 0.3 g สอดเข้าช่องคลอดเป็นเวลา 9 วัน และก่อนถอด CIDR ฉีด eCG 100 IU และ cloprosterol 0.05 mg เข้ากล้ามเนื้อ กลุ่มที่ 2- CIDR ที่ประกอบด้วย P_4 0.3 g สอดเข้า ช่องคลอดเป็นเวลา 9 วัน และหลังถอด CIDR ฉีด eCG 100 IU และ cloprosterol 0.05 mg และ กลุ่มที่ 3- CIDR ที่ ประกอบด้วย P_4 0.3 g สอดเข้าช่องคลอดเป็นเวลา 9 วัน หลังจากถอด CIDR ออกฉีด cloprestemal 0.05 mg เข้ากล้ามเนื้อ จากการศึกษาพบว่า แพะในกลุ่ม ที่ 1- CIDR และกลุ่มที่ 2- CIDR แสดงอาการเป็นสัดทั้งหมด (100 %) ส่วนในกลุ่มที่ 3- CIDR แสดงการเป็นสัดต่ำกว่ากลุ่มที่ 1- CIDR และกลุ่มที่ 2- CIDR อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากรายงานการทดลองของ Teresa *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลในการเปรียบเทียบผลการตอบสนองของแพะที่เหนี่ยวนำด้วย P_4 สังเคราะห์ (FGA) และ P_4 ธรรมชาติ (CIDR-G) โดยสอดเข้าช่องคลอดนาน 11 วัน จากการทดลองพบว่าแพะทั้งหมดมีปริมาณ LH สูงสุดก่อนการตกไข่ (93.9 %) ที่ 54.7 ชั่วโมงหลังจากถอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำ นอกจากนั้นยังพบว่าแพะที่ให้ CIDR-G มีการตกไข่ 93.3 % และตกลูก 67.5 % ซึ่งสูงกว่าแพะในกลุ่ม FGA เช่นเดียวกับ Leboeuf *et al.* (2003) พบว่าเมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วย CIDR-G พบว่าสัตว์เกิด LH สูงสุดในช่วง 24-36 ชั่วโมงก่อนการตกไข่หลังจากการถอด CIDR-G 12-24 ชั่วโมงในทำนองเดียวกัน Billing and Katz (1999); Menchaca and Rubianes (2001) พบว่าการเหนี่ยวนำด้วย CIDR-G สามารถเหนี่ยวนำเป็นสัดและการตกไข่ได้ผลดีซึ่งการให้ CIDR-G นี้จะทำให้พบประมาณ P_4 คงระดับสูงในกระแสเลือดตลอดระยะเวลาที่ยังคงอยู่ของ CIDR-G (Tanaka *et al.*, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-4 การตอบสนองต่อการเป็นสัดและอัตราการผสมติดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย Intravaginal Sponges แบบฟองน้ำสอดช่องคลอด

ชนิด และปริมาณสาร (มิลลิกรัม)	ระยะเวลาทดลอง (วัน)	สิ่งทดลองร่วม	จำนวนสัตว์ทดลอง	% การเป็นสัด	% การผสมติด	อ้างอิง
MAP - 60	14	300 IU PMSG เมื่อถอดอุปกรณ์	20	75	65	Greyling and Nest (2000)
MAP - 60	16	300 IU PMSG เมื่อถอดอุปกรณ์	30	93.1	51.7	Motlomelo *et al.* (2002)
FGA - 40	16	300 IU PMSG เมื่อถอดอุปกรณ์	30	96.7	60	
FGA - 40	11	50 µg cloprosternol 48 ชั่วโมง ก่อนถอด	31	82	68	Drion *et al.* (2002)
MAP - 60	13	5 mg $PGF_{2\alpha}$ เมื่อถอดอุปกรณ์	20	100	65	Romano (2004)
FAP - 30	13	5 mg $PGF_{2\alpha}$ เมื่อถอดอุปกรณ์	20	100	63	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่อ ตารางที่ 2-4 การตอบสนองต่อการเป็นสัดและอัตราการผสมติดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย Intravaginal Sponges แบบฟองน้ำสอดช่องคลอด

ชนิด และปริมาณสาร (มิลลิกรัม)	ระยะเวลาทดลอง (วัน)	สิ่งทดลองร่วม	จำนวน สัตว์ทดลอง	% การเป็นสัด	% การผสมติด	อ้างอิง
MAP - 60	11	750 IU PMSG และ 125 μg $PGF_{2\alpha}$ หลังถอด 48 ชั่วโมง	19	100	52.6	Dogan *et al.* (2004)
FGA - 40	11	750 IU PMSG และ 125 μg $PGF_{2\alpha}$ หลังถอด 48 ชั่วโมง	24	100	50	
FGA - 45	19	400 IU PMSG เมื่อถอดอุปกรณ์	20	100	80	Amarantidis *et al.* (2004)
FGA - 45	19	-	20	100	80	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-5 การตอบสนองต่อการเป็นสัดและอัตราการผสมติดเมื่อเหนี่ยวนำด้วย Controlled internal drug release (CIDR) device แบบซิลิโคนสอดช่องคลอด

ชนิด	ระยะเวลาทดลอง (วัน)	สิ่งทดลองร่วม	จำนวนสัตว์ทดลอง	% การเป็นสัด	% การผสมติด	อ้างอิง
CIDR	9	100 IU eCG ก่อนถอดอุปกรณ์	30	100	-	Oliveira *et al.* (2001)
CIDR	9	100 IU eCG หลังถอดอุปกรณ์	30	100	-	
CIDR	9	0.05 mg clopresternal หลังถอดอุปกรณ์	30	73	-	
CIDR	16	300 IU PMSG เมื่อถอดอุปกรณ์	30	100	46.7	Motlomelo *et al.* (2002)
CIDR	13	5 mg $PGF_{2\alpha}$ เมื่อถอดอุปกรณ์	20	100	63	Romano (2004)
CIDR	12	-	45	97.7	90.0	Dixon *et al.* (2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่เนื่องจาก CIDR-G ผลิตจากซิลิโคนไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจึงได้ทำการพัฒนารูปแบบของ CIDR-G โดยใช้ผ้าซับในขึ้นรูปอุปกรณ์และใช้ชานอ้อยบดอบแห้งเป็นวัสดุดูดซับฮอร์โมน

ภาพที่ 2-7. อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้า CIDR-G.

2.5. ชานอ้อย (Sugarcane Bagasse)

ลำต้นอ้อยประกอบด้วยเปลือกและเนื้ออ้อย ในส่วนของเนื้ออ้อยประกอบด้วยท่อแคปิลลารี (1) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางท่อ 0.3-0.5 ไมครอน (ขึ้นกับพันธุ์อ้อย) จำนวนมาก เรียงขนานกันตามความยาวของลำต้นอ้อย แต่ละท่อแคปิลลารีประกอบด้วยส่วนที่เป็นข้อ (2) และส่วนที่เป็นปล้อง (3) เรียงสลับกันตลอดความยาวของท่อแคปิลลารี ดังแสดงในภาพที่ 2-8 ท่อแคปิลลารีที่ขนานกันอาจมีข้อไม่อยู่ในแนวเดียวกัน ส่วนปล้องมีความยาว 400-700 ไมครอน ขึ้นกับพันธุ์อ้อย ภายในปล้องของท่อแคปิลลารีแต่ละปล้อง มีน้ำอ้อยบรรจุอยู่ภายใน และข้อจะปิดกั้นการติดต่อของของเหลวที่อยู่ในปล้องที่อยู่ติดกัน

ท่อแคปิลลารีประกอบขึ้นจากสารประเภทเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ นอกนั้นเป็นส่วนประกอบอื่นๆ ในปริมาณเล็กน้อย (โดยที่ส่วนประกอบเฮมิเซลลูโลสมีอยู่ 30-35 % น้ำหนักของส่วนประกอบทั้งหมด) ลักษณะผนังท่อแคปิลลารีมีความยืดหยุ่น ทำให้มีความสามารถในการดูดซับของเหลวเข้าไปอยู่ภายในได้เป็นอย่างดี และสามารถปล่อยออกเมื่อมีแรงกด บีบหรืออัด เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้นำชานอ้อยที่มีท่อแคปิลารีนี้มาใช้เป็นวัสดุดูดซับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในครั้งนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2-8. โครงสร้างของท่อแคปิลลารี (1) ที่ประกอบด้วยข้อ (2) และปล้อง (3) ที่เรียงสลับกันตามความยาวของท่อ.

2.6. เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA)

2.6.1. หลักการของ ELISA

ELISA เป็นปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen, Ag) และแอนติบอดี (antibody, Ab) โดยการติดฉลากแอนติบอดีหรือแอนติเจนด้วยเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น (substrate) ได้หลายโมเลกุล ดังนั้นการใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดสอบนั้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังสามารถเก็บไว้ได้นาน ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้ผลผลิตที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ง่าย และชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

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

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 ซึ่งทำให้เกิดข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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, 2001)

2.7. แอนติบอดี (Antibodies)

พันธะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยปกติเป็นพันธะแบบ noncovalent ระหว่างแอนติเจนและกรดอะมิโนที่บริเวณ binding site แรงที่เกิดขึ้นได้แก่ hydrogen bond, electrostatic และ hydrophobic การที่พันธะมีความแข็งแรงมากที่สุดเกิดขึ้นเนื่องจาก antibody combining site ของแอนติเจนสามารถจับกับ epitope ของแอนติบอดีได้พอดี (best fit)

ความจำเพาะเจาะจงและความสามารถในการจับกันระหว่างบริเวณของแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจน (epitope หรือ antigen binding site) และส่วนของแอนติเจนที่มีพันธะกับแอนติบอดี (paratope หรือ antigen determinant) เรียกว่า affinity ในกรณีที่ paratope และ epitope จับกันได้อย่างสมบูรณ์มีผลทำให้เกิด affinity สูง Ab ที่มี affinity สูงจะสามารถจับกับAg ได้ดี พบว่า Ab ที่มี affinity สูงมักจะเป็น Ab ที่สร้างขึ้นในช่วงท้าย ๆ ของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แอนติบอดีที่เลือกใช้ใน ELISA มี 2 แบบคือโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonalantibody, PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody, MAb)

PAb เป็นแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นสัตว์ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ แล้วนำเอาซีรั่มของสัตว์ที่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้มาใช้ แต่เป็นแอนติบอดีที่มีความหลากหลายและมีความจำเพาะเจาะจงสูง-ต่ำ ปนกันทำให้ความสามารถในการจับกับแอนติเจนต่างกัน ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA มีการเจือจางแอนติบอดีเพื่อหาความเหมาะสม อาจทำให้ปริมาณของแอนติบอดีที่มี affinity สูงเหลือปริมาณน้อยกว่า affinity ต่ำได้

MAb เป็นแอนติบอดีที่ผลิตจากเซลล์ลูกผสม (hybridomal cell) ระหว่างเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงเป็นเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocyte ที่เกิดภายหลังจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อแอนติเจนกับเซลล์ไมอิโลมา ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง โมโนโคลนอล แอนติบอดีเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีผู้ให้ความสนใจในการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA (Crowther, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved