บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี

สารเคมี	Lot number	บริษัท
Ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$	101217	Merk
Citric acid	C2270	Sigma
Dihydrogen phosphate, KH_2PO_4	4873	Merk
Dimethyl sulfoxide, DMSO	802912	GIBCO
Disodium phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$	30414	Riedel-de Haen
17β-Estradiol	21K1267	Sigma
Ethanal	65434	Scharlau
Gelatin	K4988770	Merk
Glycine	2022722	Fisher
Hydrochloric acid	1789	Scharlau
O-phynylene-diamine-HCl, OPD	80972	Zymed lab
Polyethylene sorbitan monolaurate, Tween 80	H0306	Sigma
Potassium chloride, KCl	31248	Riedel-de Haen
Progesterone	61K0286	Sigma
Sodium chloride, NaCl	K29287204	Merk
Sodium hydrogen carbonate, $NaHCO_3$	612	Merk
Sodium hydroxide	K19742898	Merk
Sulfuric acid, H_2SO_4	-	J.T.Baker

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
Immunowash	1575	BIO-RAD	ฝรั่งเศส
Micropipet (20, 100, 200, 1000 µl)	Pipetman	Gilson	ฝรั่งเศส
Microplate 96 wells	Nunc-immuno®	Nalge Nunc International	เดนมาร์ก
Microplate reader	2010	Anthos	ออสเตรีย
pH meter	678	EP/K	สวิสเซอร์แลนด์
Refrigerated centrifuge	6930	Kubota	ญี่ปุ่น
Spectrophotometer UV-visible	DU	Beckman	อเมริกา
Vortex mixer	K-500 GE	Labinco	อเมริกา
Hi Trap® Protein G HP	17-0404-01	GE-Healthcar	สวีเดน
Hotplate Stirrer	LMS-1003	Lab Tech	เกาหลี
เข็มเย็บผ้า	10	Milwards	ไทย
กรรไกรตัดผ้า	04	Barbarian Head	ไทย
ด้ายเย็บผ้า	-	-	ไทย
ผ้า organza	-	ทรงชัย	ไทย

3.1.3. สัตว์ทดลอง

แพะลูกผสม ซาเนน × แองโกลนูเบียน (Cross-breed Saanen × Anglo Nubian Goats) เพศเมีย อายุ 8-24 เดือน จำนวน 13 ตัว จากภาควิชาสัตว์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2. แผนการดำเนินงาน

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) และการทดลองที่ 2 ในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3. การวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (Progesterone, P_4)

3.3.1. การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ (purification)

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ P_4 (โคลน 4B2) ที่ผลิตโดย นางสาว มัลลิกา กำภูศิริ ที่ตกตะกอนได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย column Hi Trap® Protein G (ภาพที่ 3-1) ใช้ syringe เติมสารละลาย binding buffer ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดันของเหลวผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราหยด 1 มิลลิลิตรต่อ 5 นาที แล้วนำสารผสมระหว่าง แอนติบอดี 10 มิลลิลิตร และสารละลาย binding buffer 10 มิลลิลิตร เติมผ่านลงในคอลัมน์จนหมด แล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย binding buffer อีกครั้งหนึ่ง และเติมสารละลาย elution buffer 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใน vial ที่เติมสาร neutralization buffer 70 ไมโครลิตร เก็บสารละลายนี้ประมาณ 20 vials vials ละประมาณ 500 ไมโครลิตร เติม 20 เปอร์เซ็นต์ ethanol 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างคอลัมน์แล้วเก็บคอลัมน์ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ใหม่ นำสารละลายเก็บไว้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยวิธี ELISA แล้วรวมสารละลายที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ ≤ 3 นาโนเมตร เข้าด้วยกัน จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm.}}{1.4} \text{ mg/ml}$$

ภาพที่ 3-1. แสดงวิธีการใช้คอลัมน์ Hi Trap® Protein G ในขั้นตอนการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2. การหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน ($MAbP_4$) และ ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนติดเอนไซม์ horseradish peroxidase (P_4-HRP) โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

เคลือบเพลทด้วย $MAbP_4$ เจือจาง 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350 และ 1:400 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowash โปรแกรม TSE3 เติม เจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติม P_4-HRP เจือจาง 1:450,000, 1:475,000, 1:500,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (ภาพที่ 3-2)

3.3.3. การหากราฟมาตรฐาน

เคลือบเพลทด้วย $MAbP_4$ เจือจาง 1:250 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowash โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายมาตรฐาน P_4 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 พิโคกรัมต่อ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เติม P_4-HRP เจือจาง 1:475,000 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (ภาพที่ 3-3)

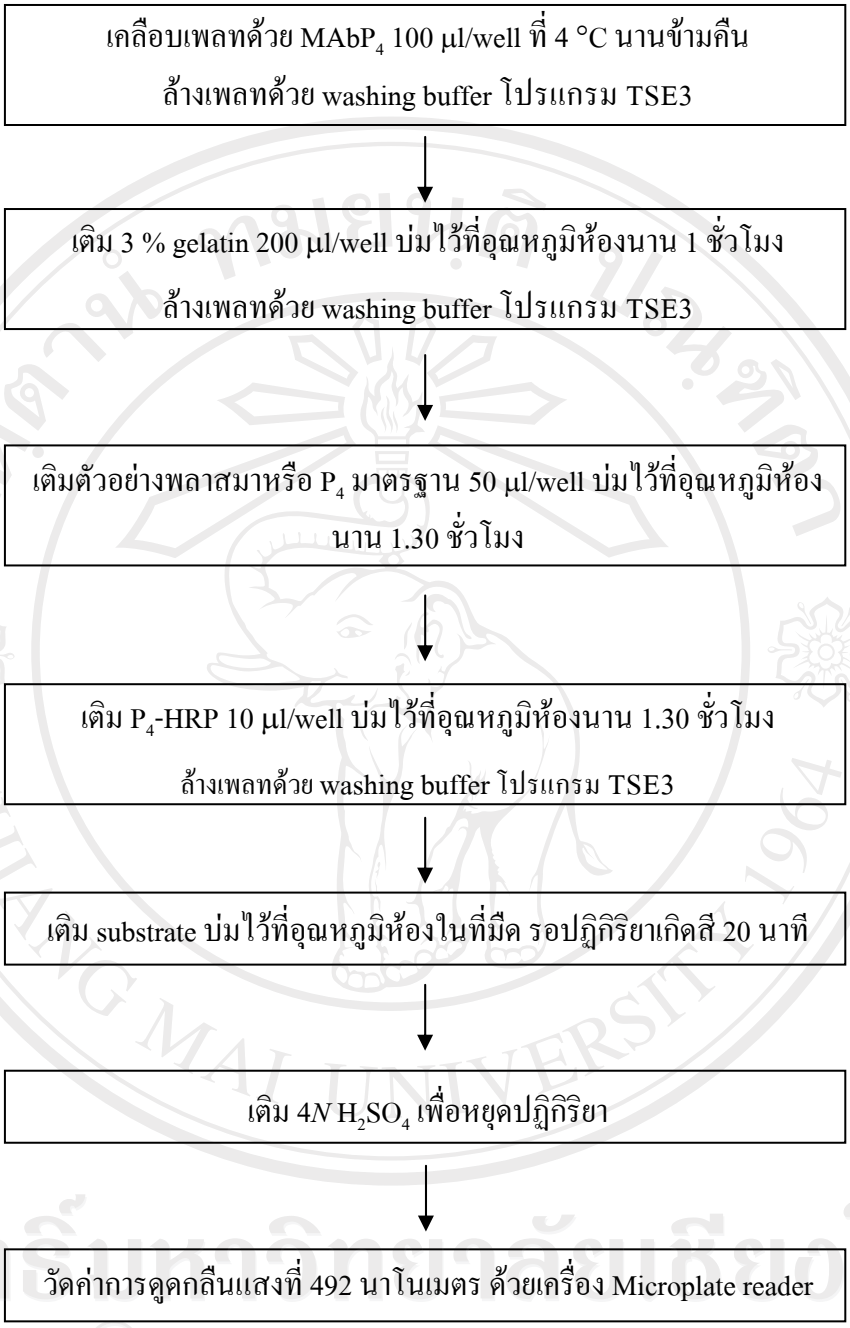
3.3.4. การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในพลาสมาโดยวิธี competitive ELISA

เคลือบเพลทด้วย $MAbP_4$ เจือจาง 1:250 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowash โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3-2. แสดงการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ $MAbP_4$ และ P_4- HRP ด้วยวิธี ELISA.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-3. แสดงการหากราฟมาตรฐานและการวัดปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในพลาสมาโดยวิธี competitive ELISA.

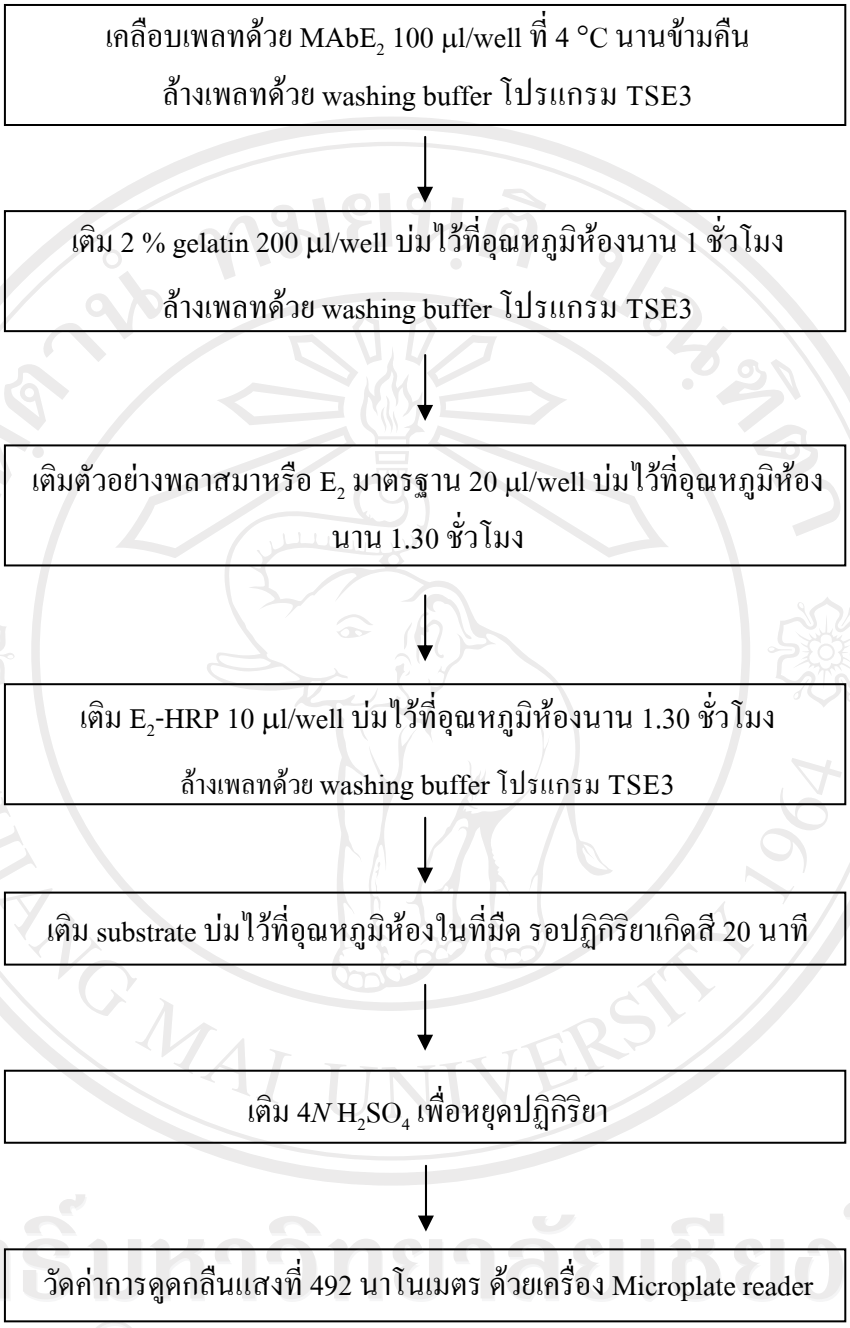
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4. การวิเคราะห์ฮอร์โมนเอสโทรเจน (Estrogen, E_2)

3.4.1. การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเอสโทรเจนในพลาสมาโดยวิธี competitive ELISA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอสโทรเจน ($MAbE_2$) (โคลน 4B9 1E4) ที่ผลิตโดยนางสาว รัชนีวรรณ เขจรวงศ์ ซึ่งทราบอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ $MAbE_2$ และ E_2-HRP แล้ว คืออัตราเจือจางของ $MAbE_2$ คือ 1:64 และ E_2-HRP คือ 1:800 โดยเคลือบเพลทด้วย $MAbE_2$ เจือจาง 1:64 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้าง Immunowash โปรแกรม TSE3 เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมตัวอย่างพลาสมาหรือ E_2 มาตรฐาน ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง เติม E_2-HRP เจือจาง 1:800 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ล้างเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4*N* H_2SO_4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (ภาพที่ 3-4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3-4. แสดงการวัดปริมาณฮอร์โมนเอสโทรเจนในพลาสมาโดยวิธี competitive ELISA.

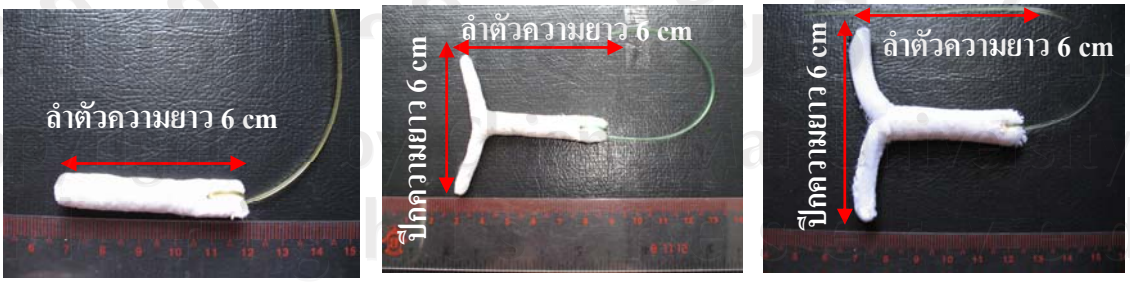
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5. การทดลองที่ 1 ในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*)

3.51. การออกแบบและการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด

กรรมวิธีผลิตอุปกรณ์สอดช่องคลอดเพื่อควบคุมการเป็นสัดพร้อมกันในแพะ มีลักษณะพิเศษที่การขึ้นรูปอุปกรณ์ด้วยผ้าซับใน (organza) (ภาพที่ 3-5) และใช้ชานอ้อยเป็นวัสดุดูดซับ P_4 ใช้เอ็นตกปลาเป็นส่วนหางและส่วนปีกทำจากซิลิโคนเพื่อให้ปีกมีความแข็งแรงขึ้นและไม่ทำให้อุปกรณ์หลุดออกมาก่อนเวลาสิ้นสุดการทดลอง การศึกษาครั้งนี้ได้ออกแบบอุปกรณ์เป็น 3 แบบ คือแบบที่ 1 เป็นรูปทรงกระบอกที่บรรจุชานอ้อยไว้ภายใน แบบที่ 2 เป็นรูปตัววายโดยส่วนของปีกและลำตัวบรรจุด้วยชานอ้อย และแบบที่ 3 เป็นรูปตัววายโดยส่วนปีกทำจากซิลิโคนและส่วนลำตัวบรรจุด้วยชานอ้อย (ภาพที่ 3-6)

ภาพที่ 3-5. อุปกรณ์ในการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดในแพะ.



A B C

ภาพที่ 3-6. อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบที่ 1 เป็นทรงกระบอกบรรจุชานอ้อยไว้ภายใน (A) แบบที่ 2 เป็นรูปตัววายโดยส่วนของปีกและลำตัวบรรจุด้วยชานอ้อย (B) และแบบที่ 3 เป็นรูปตัววายโดยส่วนปีกทำจากซิลิโคนและส่วนลำตัวบรรจุด้วยชานอ้อย (C).

ในขั้นตอนการออกแบบและการขึ้นรูปอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยการออกแบบอุปกรณ์ให้มีลักษณะเหมือนตัววาย (Y) ส่วนปีกมีความยาว 6 เซนติเมตร โดยวัดความยาวจากปีกซ้ายมาหาปีกขวา (ตารางที่ 3-1 และภาพที่ 3-7) และลำตัวมีความยาว 6 เซนติเมตร (วัดความยาวจากปีกด้านบนมาถึงลำตัวด้านล่าง) วาดแบบตัววายลงบนกระดาษแข็งแล้วร่างแบบที่ได้ลงบนเนื้อผ้าซับใน (organza) ซึ่งเป็นผ้าที่มีผิวสัมผัสลื่นและเจาะส่วนปลายของตัววายโดยวัดให้มีความยาวจากจากส่วนท้ายขึ้นมา 1 เซนติเมตรเพื่อไว้สำหรับประกอบส่วนหางและเย็บตามแบบที่ร่างไว้ในการเย็บตามแบบนี้จะเย็บเฉพาะส่วนของลำตัวและปีกด้านล่างทั้งซ้ายและขวาแต่ส่วนด้านบนของปีกไม่ต้องเย็บเพื่อความสะดวกในการประกอบปีกด้วยซิลิโคน ส่วนท้ายสุดของลำตัวก็ไม่ต้องเย็บเพื่อที่จะบรรจุชานอ้อยเข้าไปด้านในของลำตัว หลังจากเย็บเสร็จแล้วให้กลับรอยเย็บเข้าด้านใน

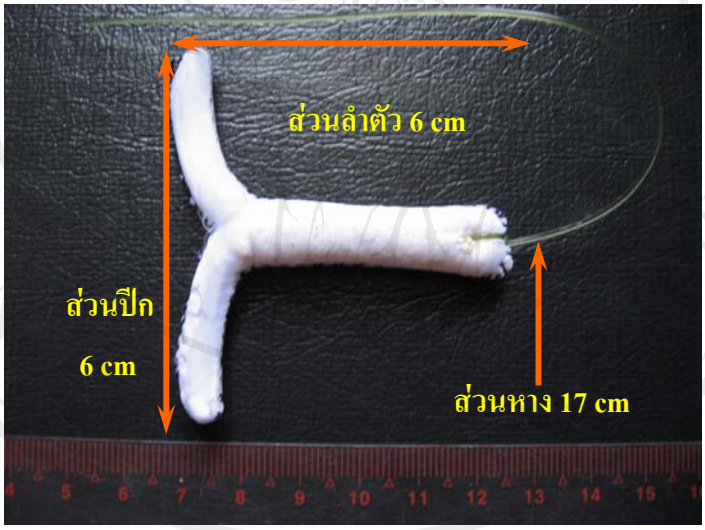
สำหรับการออกแบบปีกโดยการปั้นซิลิโคนให้มีความหนา 1 เซนติเมตร และยาว 6 เซนติเมตรแบ่งส่วนโคนไว้ประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วแบ่งกลางของแท่งซิลิโคนตามยาวให้แยกออกจากกันและจัดให้เป็นรูปตัววาย แล้วนำส่วนปีกที่ได้ไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อีก 24 ชั่วโมง การอบอีกครั้งจะทำให้ได้แท่งซิลิโคนที่มีความแข็งแรงมากขึ้น

เมื่อได้ส่วนปีกแล้วจึงนำมาเย็บประกอบเข้ากับส่วนของลำตัวและนำชานอ้อยมาบรรจุใส่ด้านในของส่วนลำตัวโดยอัดชานอ้อยให้แน่นจนเต็มใช้ชานอ้อยปริมาณ 0.7 กรัม ชานอ้อยที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ผ่านการล่อนด้วยตระแกรงเบอร์ 16 ทำให้ได้ชานอ้อยที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 3-8) เมื่อบรรจุชานอ้อยเต็มแล้วให้เย็บปิดแล้วนำเอ็นตกปลาที่มีความยาว 17 เซนติเมตรมาประกอบเข้ากับส่วนท้ายของลำตัวโดยการสอดเส้นเอ็นเข้าไปบริเวณที่เจาะรูไว้และเย็บเส้นเอ็นให้ติดอยู่กับตัวอุปกรณ์ แล้วนำตัวอุปกรณ์ที่เสร็จสมบูรณ์แล้วไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ขั้นตอนการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแสดงในภาพที่ 3-9

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3-1. แสดงลักษณะทางกายภาพของอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเอง

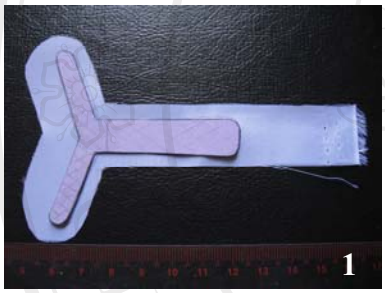
คุณลักษณะ	ปริมาตร
น้ำหนักชานอ้อย (กรัม)	0.7
น้ำหนักฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน (มิลลิกรัม)	300
น้ำหนักซิลิโคน (กรัม)	2.4
ความยาวปีก (เซนติเมตร)	6
ความยาวลำตัว (เซนติเมตร)	6
ความยาวหาง (เซนติเมตร)	17
น้ำหนักรวมทั้งหมดของอุปกรณ์ (กรัม)(เฉลี่ย $\pm$ SE (n))	3.59 $\pm$ 0.03 (n=20)

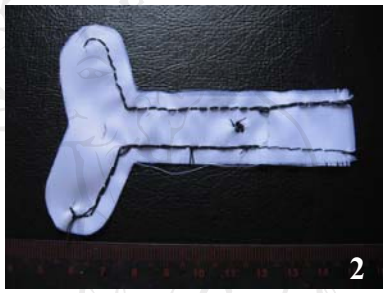


ภาพที่ 3-7. อุปกรณ์สอดช่องคลอดเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเอง.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

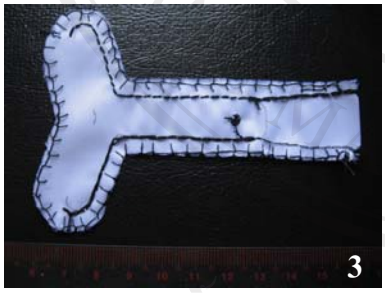
ภาพที่ 3-8. การล่อนชานอ้อยผ่านตะแกรงเบอร์ 16.





1. วาดแบบลงบนผ้า

2. เย็บตามแบบที่วาด เว้นบริเวณปีกด้านบนและด้านล่างลำตัวยังไม่ต้องเย็บและเจาะรูไว้ใส่หาง



3. เย็บเก็บชายผ้าให้เรียบร้อย

4. กลับรอยเย็บเข้าด้านในเพื่อเตรียมประกอบส่วนซิลิโคนและบรรจุชานอ้อย

5. นำซิลิโคนที่ปั้นเรียบร้อยแล้วมาเย็บประกอบเข้าด้านบนและบรรจุชานอ้อยทางด้านล่าง

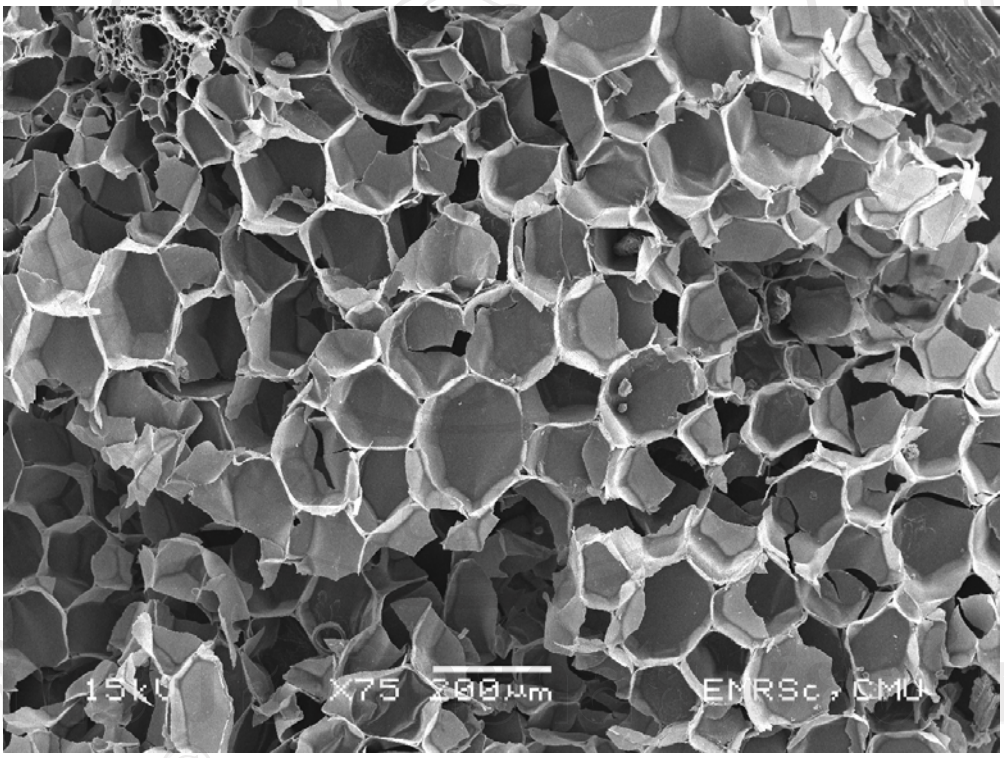
6. ประกอบส่วนหางด้วยเอ็นตกปลาได้อุปกรณ์ที่สมบูรณ์

ภาพที่ 3-9. ขั้นตอนในการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบสอดช่องคลอดในแพะ.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2. คุณลักษณะของชานอ้อย

เมื่อนำชานอ้อยมาส่องด้วยกล้องจุลทรรรศน์อิเล็กตรอนพบภาพตัดตามขวางของท่อแคปิลลารีมีลักษณะเป็นรูปหกเหลี่ยม (ภาพที่ 3-10) ซึ่งประกอบด้วยท่อแคปิลลารีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางท่อ 0.3-0.5 ไมครอน จำนวนมากเรียงขนานกันตามความยาวของลำต้นอ้อย ท่อแคปิลลารีประกอบขึ้นจากสารประเภทเซลลูโลส ลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนใหญ่ นอกนั้นเป็นส่วนประกอบอื่นๆ ในปริมาณเล็กน้อย (โดยที่ส่วนประกอบเฮมิเซลลูโลสมีอยู่ 30-35 % น้ำหนักของส่วนประกอบทั้งหมด) ลักษณะผนังท่อแคปิลลารีมีความยืดหยุ่น ทำให้มีความสามารถในการดูดซับของเหลวเข้าไปอยู่ภายในได้เป็นอย่างดี และสามารถปล่อยออกเมื่อมีแรงกด บีบหรืออัด เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้นำชานอ้อยที่มีท่อแคปิลารีนี้มาใช้เป็นวัสดุดูดซับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการประดิษฐ์อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดในครั้งนี้



ภาพที่ 3-10. ภาพตัดตามขวางของท่อแคปิลลารีที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3. การบรรจุฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด

ชั่ง P_4 300 มิลลิกรัม ละลายในเอธานอล 5 มิลลิลิตรและใช้กระบอกฉีดยาอินซูลิน ขนาด 1 มิลลิลิตร ดึงสารละลาย P_4 และแทงเข็มลงบนตัวอุปกรณ์ตรงบริเวณท้ายของลำตัว (ภาพที่ 3-11) ค่อย ๆ ปล่อยสารละลาย P_4 ลงในชานอ้อยโดยสารละลาย P_4 จะค่อย ๆ ซึมจากทางด้านท้ายไปหาทางด้านปีกของอุปกรณ์ การบรรจุ P_4 หนึ่งครั้งใช้สารละลาย P_4 ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ชานอ้อยภายในจะอิ่มตัวพอดี หลังจากชานอ้อยอิ่มตัวแล้วให้นำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วนำอุปกรณ์มาซับสารละลาย P_4 จนครบปริมาณ 5 มิลลิลิตร เมื่อซับสารละลาย P_4 ครบ 5 มิลลิลิตร แล้วอบอุปกรณ์ที่ 70 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำอุปกรณ์มาใช้งาน

ภาพที่ 3-11. วิธีการบรรจุสารละลายฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนลงในอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4. การวัดปริมาณการปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในห้องปฏิบัติการ

นำอุปกรณ์ที่บรรจุ P_4 แล้วมาแช่ในสารละลายน้ำเกลือ 0.912 % NaCl 1000 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และปั่นสารละลายให้เข้ากันก่อนเก็บตัวอย่างด้วยเครื่อง Stirrer ที่ความเร็ว 100 rpm เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 3-12) เก็บสารละลาย P_4 วันละ 5 ครั้งๆละ 1 มิลลิลิตร แบ่งเวลาในการเก็บสารละลาย P_4 เป็นชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 9 และชั่งโมงที่ 24 ของการแช่อุปกรณ์ของทุกวันเป็นเวลา 10 วัน ปรับปริมาตรสารละลาย P_4 ตามการปัสสาวะจริงของแพะ โดยแพะน้ำหนักตัว 20 กิโลกรัมปัสสาวะวันละ 384 มิลลิลิตร/วัน การปรับปริมาตรทำโดยดูดสารละลายออกแล้วแทนที่สารละลายด้วยน้ำเกลือ ชั่วโมงที่ 1 เปลี่ยนสารละลาย P_4 เท่ากับ 16 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 3 เปลี่ยนสารละลาย P_4 เท่ากับ 32 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 6 เปลี่ยนสารละลาย P_4 เท่ากับ 48 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 9 เปลี่ยนสารละลาย P_4 เท่ากับ 48 มิลลิลิตร และชั่วโมงที่ 24 เปลี่ยนสารละลาย P_4 เท่ากับ 240 มิลลิลิตร

ภาพที่ 3-12. การแช่อุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์เอง (ซ้าย) และอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้า (CIDR-G®) (ขวา) ในสารละลายน้ำเกลือเพื่อวัดปริมาณการปล่อยฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนในห้องปฏิบัติการ.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6. การทดลองที่ 2 ในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)

3.6.1.แผนการทดลอง

ใช้แพะพันธุ์ลูกผสม ซาแนน-แองโกลนูเบียน จำนวน 13 ตัว แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1. กลุ่มควบคุมไม่สอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด (2 ตัว)

กลุ่มที่ 2. กลุ่มที่สอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดทางการค้า (CIDR-G ®) (5 ตัว)

กลุ่มที่ 3. กลุ่มที่สอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ประดิษฐ์ขึ้นเอง (6 ตัว)

โดยแพะทั้ง 13 ตัวนี้ถูกสุ่มให้อยู่ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ตัว กลุ่มที่ 2 จำนวน 5 ตัว และกลุ่มที่ 3 จำนวน 6 ตัว และวิเคราะห์ความแตกต่างของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนและฮอร์โมนเอสโทรเจนด้วยวิธี T-Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS for Windows version 12

3.6.2.วิธีการทดลอง

1. ทำการสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดเข้าไปในช่องคลอดของแพะทดลองในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เป็นเวลานาน 10 วัน ขั้นตอนในการสอดอุปกรณ์ต้องทำความสะอาดกระบอกส่งอุปกรณ์ทุกครั้งหลังจากที่สอดให้แพะในแต่ละตัวโดยแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ ทำความสะอาดปากช่องคลอดก่อนสอดอุปกรณ์ทุกครั้ง นำตัวอุปกรณ์สอดเข้าไปในกระบอกส่ง (ภาพที่ 3-13) ทาเจลหล่อลื่นที่กระบอกส่งและปากช่องคลอด ต่อจากนั้นก็สอดกระบอกส่งเข้าไปในช่องคลอดและค่อย ๆ ดันตัวอุปกรณ์เข้าไปในช่องคลอดแล้วดึงกระบอกส่งอุปกรณ์ออกมาจากช่องคลอด สังเกตการคงอยู่ของอุปกรณ์ได้จากสายที่ห้อยออกมาทางปากช่องคลอดและนอกจากนั้นสายที่ห้อยมานี้ยังเป็นที่สำหรับดึงอุปกรณ์ออกจากช่องคลอดเวลาที่สิ้นสุดการทดลองด้วย

2. เก็บตัวอย่างเลือดของแพะทุกตัว โดยทำการเก็บเลือดจากตำแหน่งเส้นเลือดดำที่คอ (ภาพที่ 3-14) จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่เติมสารป้องกันเลือดแข็งตัว EDTA 0.5 โมล 200 ไมโครลิตร นำเลือดที่ได้มาปั่นแยกพลาสมา (plasma) ด้วยเครื่องปั่นแยกที่ความเร็ว 1,500 g นาน 20 นาที แยกเอาพลาสมาที่อยู่ส่วนบนใส่หลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ระดับ P_4 และ E_2 ในครั้งแรกเก็บเลือดก่อนทำการสอดอุปกรณ์ควบคุมการเป็นสัด และเก็บเลือดทุกๆวันตลอดที่ทำการสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดและสังเกตอาการเป็นสัดรวม 15 วัน โดยทำการเก็บเลือดในช่วงเวลาเดียวกัน

3. วัดปริมาณ P_4 และ E_2 ในพลาสมาด้วยเทคนิค ELISA

4. การตรวจการเป็นสัดและการผสมพันธุ์ หลังจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแพะทั้งหมด และจะทำการเฝ้าสังเกตการเป็นสัดของแพะช่วง 5 วันหลังจากถอดอุปกรณ์ โดยทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจการเป็นสัดวันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ชั่วโมง คือช่วงเวลา 07:00-09:00 น. และ 15:00-17:00 น. ทำการผสมพันธุ์เมื่อพบว่าแพะแสดงการเป็นสัด สามารถสรุปวิธีการทดลองได้ตาม ภาพที่ 3-15

1. นำ Intravaginal Deviceใส่ลงในกระบอกส่ง

2. สอดกระบอกส่งเข้าไปในช่องคลอดของแพะ และดัน Intravaginal Device ออกจากกระบอกส่ง

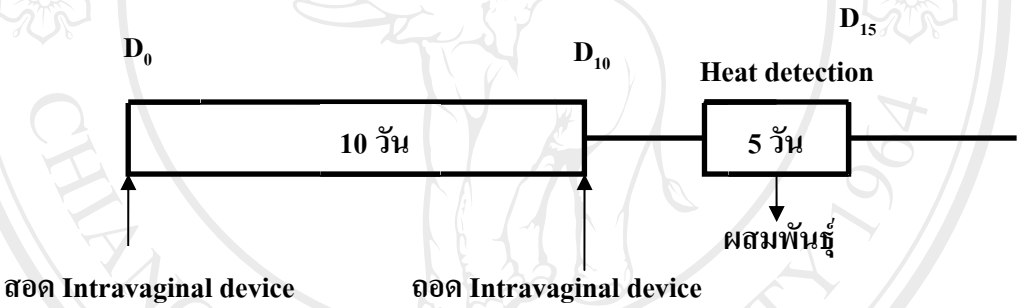
ส่วนหางของ Intravaginal Device

3. หลังจากดึงกระบอกส่งออก Intravaginal Device คงอยู่ในช่องคลอดสังเกตจากส่วนหางของ Intravaginal Device

ภาพที่ 3-13. ขั้นตอนในการสอด Intravaginal Device เข้าช่องคลอดแพะทดลอง.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3-14. การเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (Jugular vein) ของแพะ.



ภาพที่ 3-15. ขั้นตอนการทดลองการจัดการผสมพันธุ์แพะภายหลังจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด.

ภาพสรุปขั้นตอนการเหนี่ยวนำการเป็นสัด โดยทำการสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำเป็นสัดเข้าช่องคลอดของแพะทดลองเป็นเวลา 10 วัน เก็บเลือดครั้งแรกก่อนทำการสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัด โดยวันแรกที่สอดคือวันที่ 0 (D_0) และทำการเก็บเลือดตลอดระยะเวลาที่มีการสอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดไว้ในช่องคลอด และถอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำเป็นสัดในวันที่ 10 (D_{10}) หลังจากถอดอุปกรณ์เหนี่ยวนำการเป็นสัดออกไปแล้ว 24 ชั่วโมง เฝ้าสังเกตการเป็นสัดในช่วง 5 วัน โดยทำการตรวจการเป็นสัดวันละ 2 ครั้งๆละ 2 ชั่วโมง และผสมพันธุ์ เมื่อพบว่าแพะแสดงอาการเป็นสัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved