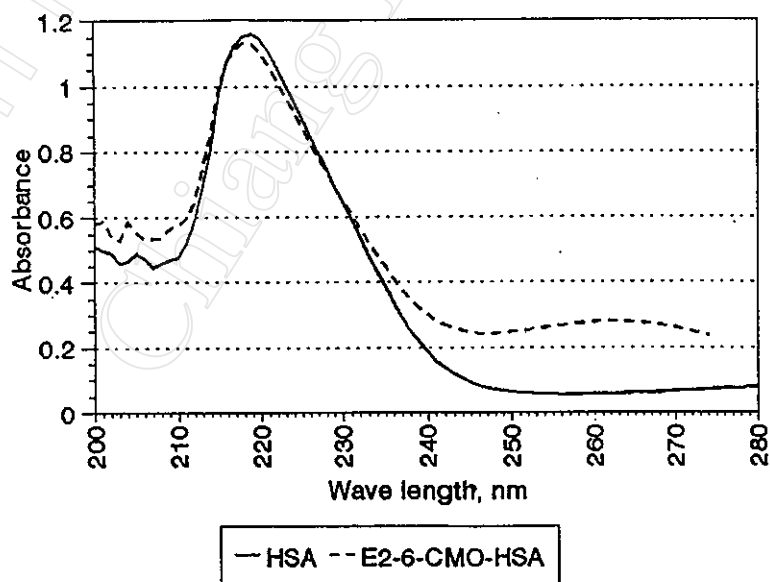


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. คุณสมบัติของแอนติเจน 17 β -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA ที่เตรียมได้

การทดลองครั้งนี้ 17 β -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA เตรียมจาก 17 β -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime ดูดกลืนแสง UV ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร และ HSA ดูดกลืนแสง UV ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร เมื่อนำแอนติเจนที่เกิดขึ้นไปทดสอบด้วยคุณสมบัติการดูดแสงของสารโดยเครื่อง spectrophotometer (ภาพที่ 9) และคำนวณอัตราส่วนการเชื่อมติระหว่าง 17 β -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime กับ HSA มีค่าเท่ากับ 11.4 :1 (ตารางที่ 4) คำนวณตามวิธีการของ Erlanger และคณะ (1957) จากสมการ $O.D. = ECI$ (Bree's law) เมื่อ $O.D.$ = ค่าการดูดกลืนแสง, E = สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (ต่อ โมล-ซม.) (molar extinction coefficient, $M^{-1} cm^{-1}$), C = ความเข้มข้นของสารละลาย (โมล) (concentration, g/l ; M), I = ระยะทางที่แสงส่องผ่านสารละลาย (ซม.) (length of light path, cm)



ภาพที่ 9. แสดงการดูดกลืนแสง UV ของ 17 β -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime และ HSA

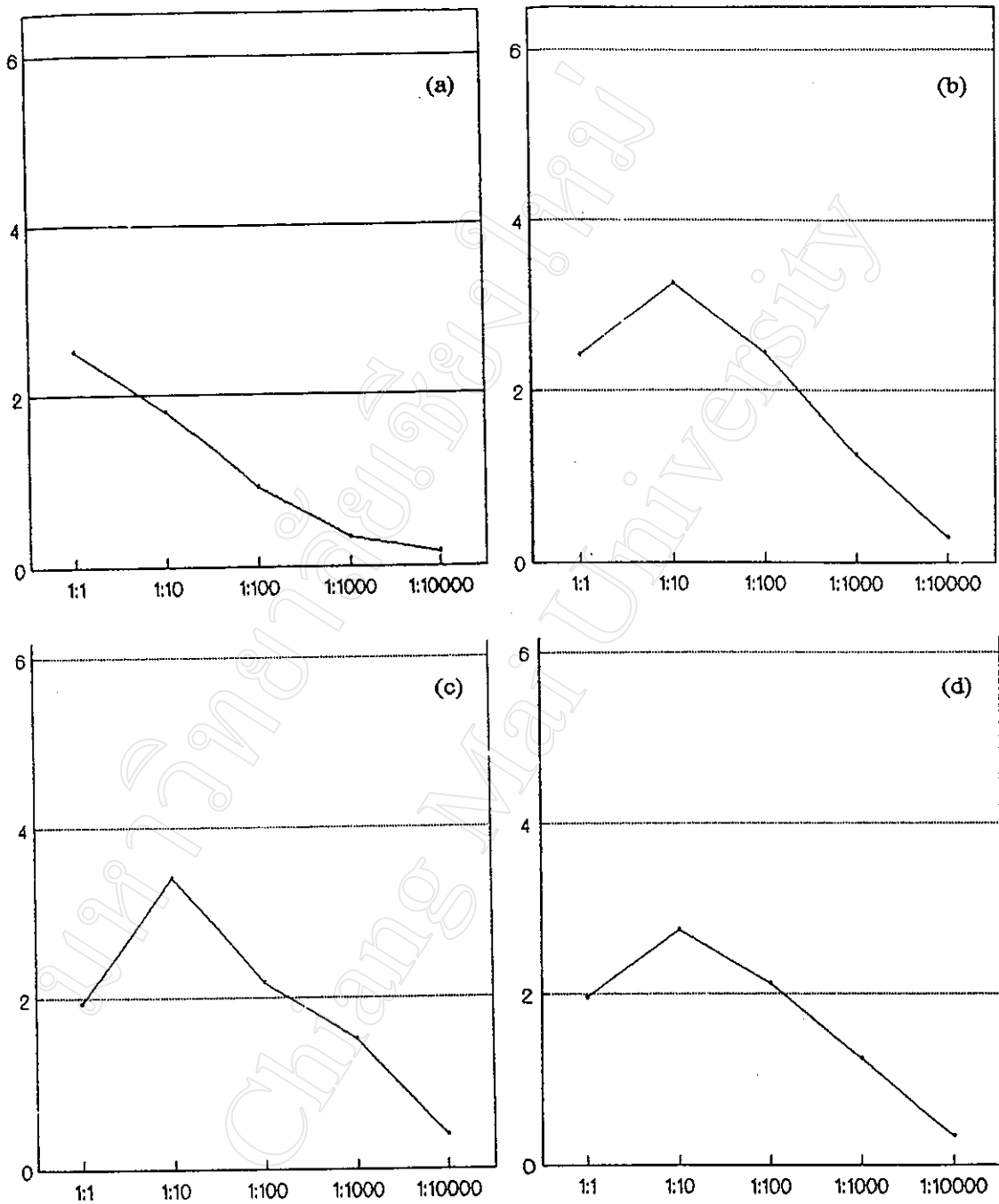
ตารางที่ 4. แสดงผลการคำนวณการเกาะติดระหว่าง 17β -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime กับ HSA

ค่าการดูดกลืนแสง uv ของ E2-6-CMO-HSA, O.D.	0.2805
ค่าการดูดกลืนแสง uv ของ HSA, O.D.	0.0573
ผลต่าง, O.D.	0.2232
ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (E) ของ E2-6-CMO-HSA	9,300
มวลโมเลกุลของ E2-6-CMO	359.4
มวลโมเลกุลของ HSA	70,000
ความเข้มข้นของ Steroid-HSA, โมล	0.000024
ความเข้มข้นของ Steroid-HSA, กรัม/ลิตร	0.0086256
ความเข้มข้นของ Steroid-HSA, มก./ลิตร	8.6256
ความเข้มข้นของ HSA, มก./ลิตร	156
ความเข้มข้นของ HSA ที่เหลือ, โมล	2.10535×10^{-6}
อัตราส่วน E2-6-CMO:HSA (ได้จากการคำนวณ)	11.4:1
ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด	262

4.2.ผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย

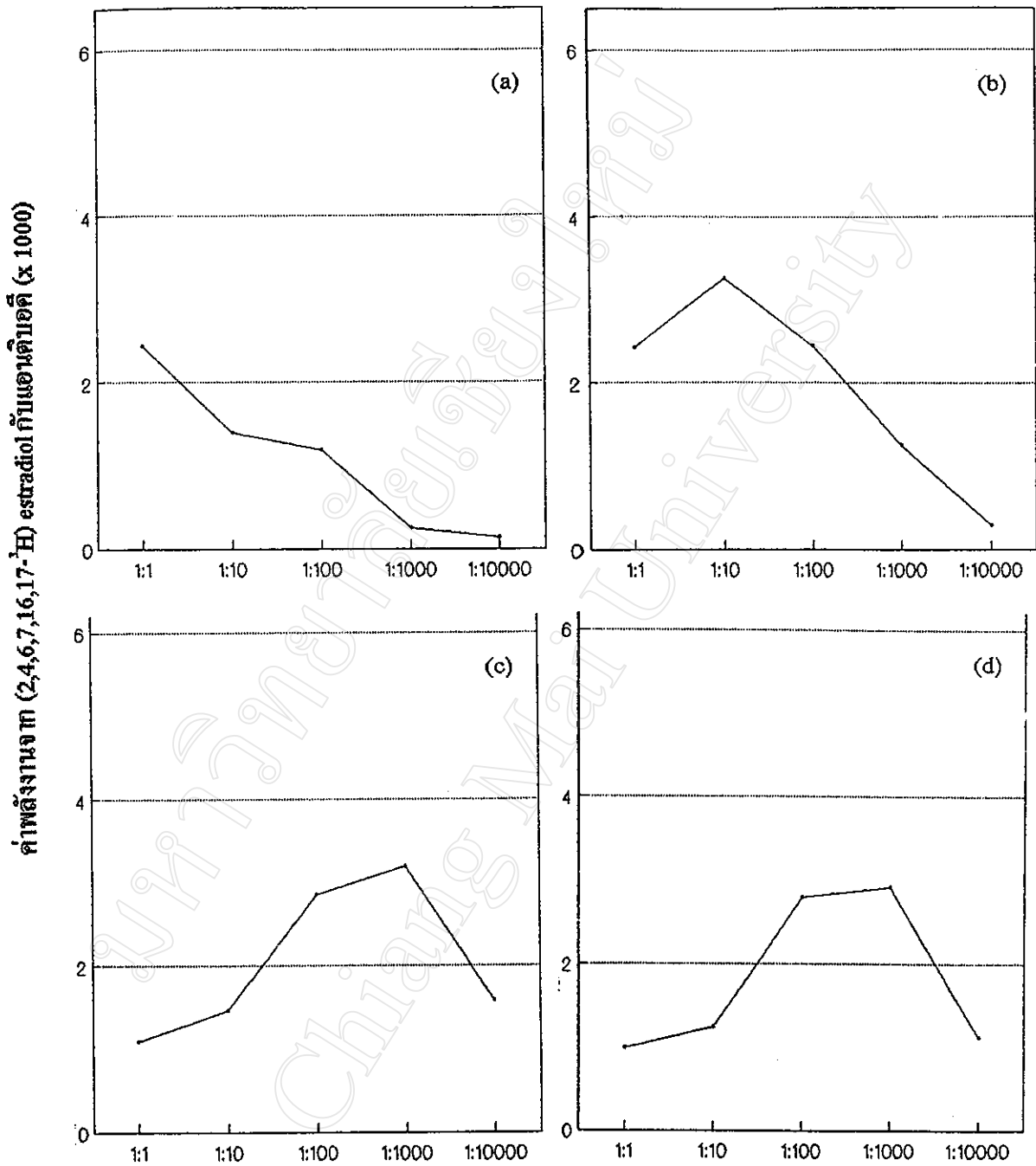
หลังจากที่กระต่ายเบอร์ 4 และ 5 ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย E2-6-CMO-HSA เป็นเวลานาน เมื่อนำเอาพลาสมาในวันที่ 60, 68, 74 และ 81 ที่อัตราการเจือจางของพลาสมาความเข้มข้นต่างๆ ตรวจวัดได้โดยวิธี RIA พบว่าความสามารถในการจับกันระหว่างแอนติบอดีของกระต่ายแต่ละตัวกับ ^3H -estradiol เป็นไปตามความเข้มข้นของแอนติบอดี ดังภาพที่ 10 และ 11 จะเห็นได้ว่าในพลาสมาของกระต่ายเบอร์ 4 และ 5 ที่ได้รับแอนติเจน มีแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล ฉะนั้นจากการทดลองนี้จึงนำเซลล์เม็ดเลือดขาวจากกระต่ายหมายเลข 4 และ 5 ไปใช้ในการเชื่อมเซลล์ต่อไป

ค่าพลังงานจาก (2,4,6,7,16,17-³H) estradiol กับแอนติบอดี (x 1000)



อัตราการเจือจางระหว่างแอนติบอดีกับ PBS

ภาพที่ 10. แสดงการจับ (affinity) ระหว่าง (2,4,6,7,16,17-³H) estradiol กับแอนติบอดีจาก กระจ่ายหมายเลข 4 ใน อัตราเจือจางระดับต่างๆ ค่า activity ของตรีเทียมวัดเป็น ครั้งต่อนาที (cpm). (a), (b), (c) และ (d) เป็นตัวอย่างพลศาสตร์หลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 60, 68, 74, และ 81 วันตามลำดับ



อัตราการเจือจางระหว่างแอนติบอดีกับ PBS

ภาพที่ 11. แสดงการจับ (affinity) ระหว่าง (2,4,6,7,16,17-³H) estradiol กับแอนติบอดีจากกระต่ายหมายเลข 5 ใน อัตราเจือจางระดับต่างๆ ค่า activity ของตรีเทียมวัดเป็น ครั้งต่อนาที (cpm). (a), (b), (c) และ (d) เป็นตัวอย่างพลัสมาหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 60, 68, 74, และ 81 วันตามลำดับ.

4.3. ผลการผลิตเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์

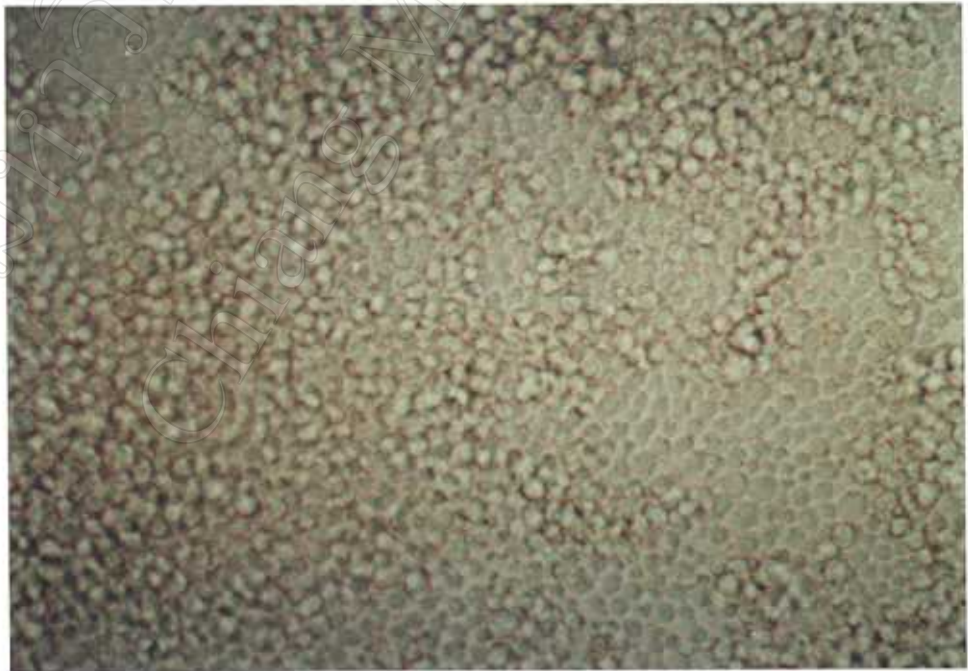
การทดลองนี้เป็นการเชื่อมเซลล์ข้ามสปีชีส์ระหว่างเม็ดเลือดขาวของกระต่าย (ภาพที่ 12) กับเซลล์ไมอีโกลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 (ภาพที่ 13) ปรากฏเซลล์ heterohybridomas ในหลุมประมาณ 1-12 โคลน ในวันที่ 14-21 วันหลังจากเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT ทำการเลี้ยงเซลล์ มีหลุมที่พบ heterohybridomas ทั้งหมด 21 หลุม (จากทั้งหมด 384 หลุม) คิดเป็น 5.47 % ของทั้งหมด เมื่อทำการตรวจหาเซลล์ heterohybridoma ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีตราไดออกพบว่ามี 12 หลุม (จาก 21 หลุม) คิดเป็น 57.14 % ของเซลล์ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 5) คิดเป็นโอกาสที่ได้เซลล์ลูกผสมที่ผลิตแอนติบอดีเท่ากับ 3.125% หลังจากนั้น heterohybridoma หลุม 3F5 ทำการแยกโคลนเดี่ยวปรากฏโคลนเดี่ยวที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีตราไดออกได้ทั้งหมด 18 โคลน ได้แก่ 5F7, 5F4, 5E8, 5B9, 5E7, 5D6, 5D2, 6B5, 6B7, 6D8, 6E6, 6G4, 6G8, 6E5, 6D4, 6D10, 6D11 ใช้ระยะเวลาในการแยกโคลนเดี่ยวประมาณ 10-15 วัน จึงได้โคลนเดี่ยว (ตารางที่ 6, ภาพที่ 14 และ 15)

ตารางที่ 5. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของเซลล์ที่แสดงการสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านฮอร์โมนอีตราไดออก

หลุม	ค่า O.D. หลุมที่เคลือบด้วย E2-6CMO-HSA	ค่า O.D. หลุมที่เคลือบด้วย BSA	ค่าความแตกต่าง
3B3	0.441	0.062	0.379
3F5	0.651	0.184	0.467
3F8	0.513	0.22	0.293
3D3	0.667	0.454	0.213
3H5	0.424	0.191	0.233
3D5	0.562	0.156	0.406
3D8	0.535	0.139	0.396
3D9	0.573	0.12	0.453
3E3	0.456	0.214	0.242
3E8	0.61	0.262	0.351
3F9	0.535	0.192	0.343
3H7	0.737	0.189	0.548



ภาพที่ 12. แสดงเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ 2 วัน (X400 เท่า).



ภาพที่ 13. แสดงเซลล์ไมอีโกลาสายพันธุ์ X63Ag8.653 (X100 เท่า).



ภาพที่ 14. แสดง heterohybridomas หลังการทำ limiting dilution ได้ 10 วัน ของโคลน 3F5-5E8 (X 40 เท่า).



ภาพที่ 15. แสดง heterohybridoma หลังการทำ limiting dilution ได้ 10 วัน ของโคลน 3F5-6B7 (X 40 เท่า).

ตารางที่ 6. แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ E2-6CMO-HSA ของมีเดียที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายหลังจากการทำ limiting dilution

Heterohybridoma	ค่า O.D. จากหลุมที่เคลือบด้วย E2-6CMO-HSA	ค่า O.D. จากหลุมที่เคลือบด้วย BSA	ค่าความแตกต่างของ O.D.
3F5-5F7	1.052	0.520	0.523
3F5-5F4	0.881	0.464	0.417
3F5-5E8	1.058	0.502	0.556
3F5-5B9	0.769	0.414	0.355
3F5-5E7	0.924	0.514	0.410
3F5-5D6	0.936	0.534	0.402
3F5-5D2	0.894	0.524	0.370
3F5-6B5	1.066	0.570	0.496
3F5-6B7	0.985	0.631	0.354
3F5-6C6	0.884	0.584	0.300
3F5-6D8	0.949	0.626	0.323
3F5-6E6	0.943	0.545	0.398
3F5-6G6	0.890	0.475	0.415
3F5-6G8	0.942	0.475	0.467
3F5-6E5	0.964	0.473	0.491
3F5-6D4	0.873	0.494	0.379
3F5-6D10	1.096	0.503	0.593
3F5-6D11	1.083	0.602	0.481

4.3.1. ผลการจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้จาก heterohybridomas มาจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน พบว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลิน ชนิด จี ของกระต่ายทั้งหมด ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร จากการตรวจชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการทำปฏิกิริยากับgoat anti-rabbit IgG และ goat anti-rabbit IgA.

Heterohybridoma	ค่า O.D. ที่ทำปฏิกิริยากับ goat anti-rabbit IgA	ค่า O.D. ที่ทำปฏิกิริยา กับ goat anti-rabbit IgG	ชนิด Immunoglobulin
3F5-5B5	0.96	2.59	IgG
3F5-5B9	0.91	2.80	IgG
3F5-5E5	0.94	2.98	IgG
3F5-5E8	0.77	2.65	IgG
3F5-6B5	1.14	2.89	IgG
3F5-6C6	1.48	2.72	IgG
3F5-6D8	0.77	2.59	IgG
3F5-6G4	0.44	0.61	IgG
3F5-6G8	1.15	2.69	IgG

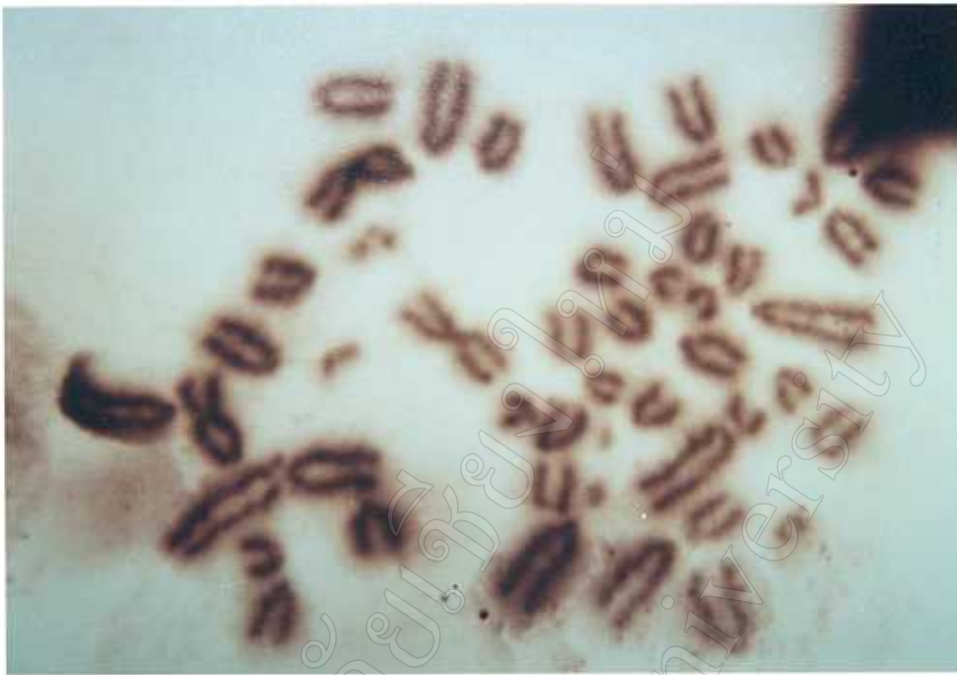
4.3.2. การตรวจคาริโอไทป์ (Karyotype) ของเซลล์ heterohybridomas

จากการทดลอง กนกวรรณ (2542) ได้ทำการตรวจคาริโอไทป์ของเซลล์ heterohybridomas ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ไมโอโมา (X63Ag8.653) กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนอีตราโคออล พบว่ากระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนีย

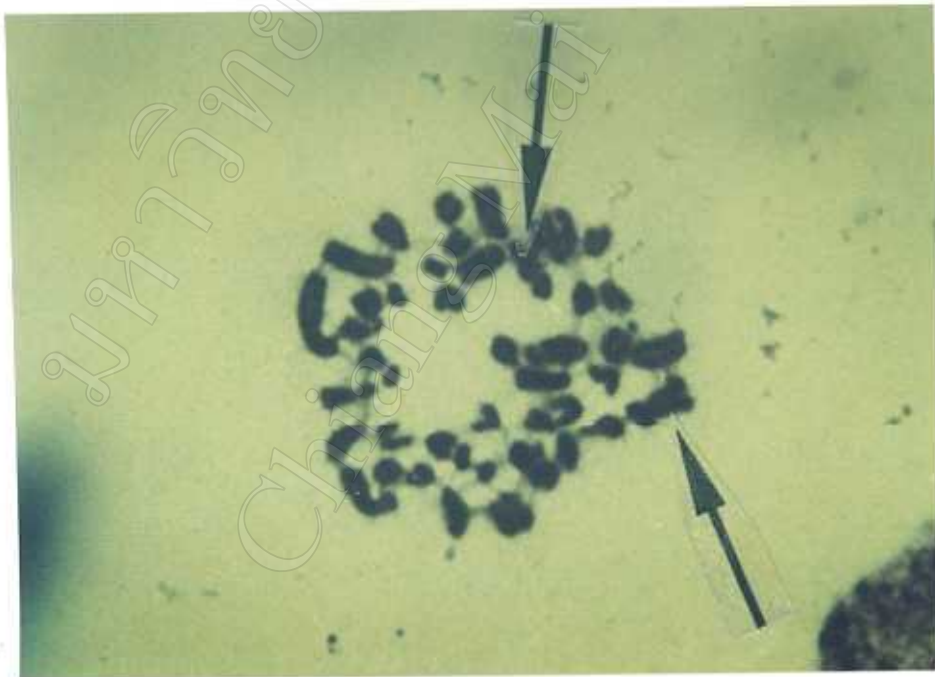
(*Oryctolagus cuniculus*) มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 44 ชิ้น หรือ 22 คู่ ดังภาพที่ 16 ซึ่งมีโครโมโซมชนิด เมตาเซนตริก (metacentric) จำนวน 11 คู่ ซับเมตาเซนตริก (submetacentric) จำนวน 6 คู่ อะโครเซนตริก (acrocentric) และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) 1 คู่ ส่วนโครโมโซมของเซลล์ไมโอโมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 มีความแปรปรวนในแต่ละเซลล์ ตั้งแต่ 50 - 58 ชิ้น โครโมโซมเป็นชนิดอะโครเซนตริกทั้งหมด ดังภาพที่ 17 และเมื่อทำการนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ heterohybridomas ที่ได้รับการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายกับเซลล์ไมโอโมา (X63Ag8.653) ปรากฏว่ามีจำนวนโครโมโซมมีความแปรปรวนอย่างมากในแต่ละเซลล์ 52 -72 ชิ้น โครโมโซมส่วนใหญ่จะเป็นชนิดอะโครเซนตริกของเซลล์ไมโอโมาส่วนในเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีตราไดคอลได้ จะปรากฏโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก และซับเมตาเซนตริก ซึ่งเป็นของกระต่ายอยู่ประมาณ 1-3 คู่ ดังภาพที่ 18 ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงเซลล์ heterohybridomas ได้จากการเชื่อมเซลล์ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันเป็นผลสำเร็จ



ภาพที่ 16. แสดงจำนวนและชนิดโครโมโซมของกระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนียเพศผู้มี 22 คู่.



ภาพที่ 17. แสดงจำนวนและชนิดโครโมโซมของเซลล์ไมอีโกลมา สายพันธุ์ X63Ag8.653.



ภาพที่ 18. แสดงจำนวนและชนิดโครโมโซมของเซลล์ heterohybridomas ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ไมอีโกลมากับเซลล์เม็ดเลือดขาวกระด้างที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่ออีสตราไดออล ทูมอร์โครโมโซมชนิดเมตาเซนตริกกับซันเมตราเซนตริกที่ได้มาจากเซลล์เม็ดเลือดของกระด้าง.

4.4. ผลของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

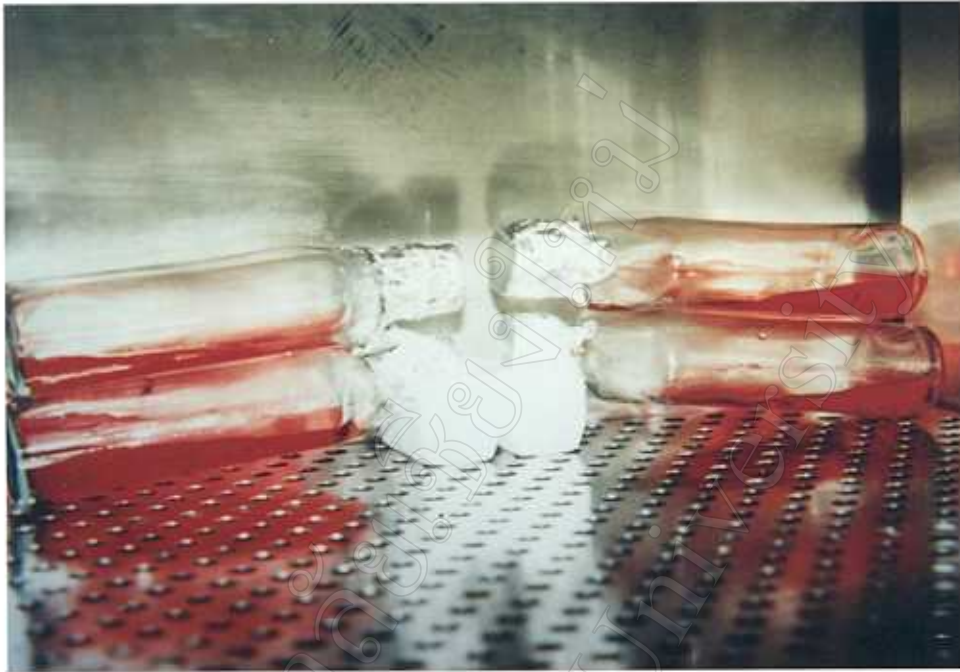
การทดลองนี้มีวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 2 วิธี ได้แก่

4.4.1. วิธี *in vivo* โดยผลิต Acitic fluid ในหนู Balb/c เมื่อทำการแยกให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ พบว่าหนู Balb/c 1 ตัว สามารถผลิตแอนติบอดีได้ประมาณ 5-10 มก. (ตารางที่ 8)

4.4.2. วิธี *in vitro* โดยการเลี้ยงเซลล์ด้วย UltraDOMA-PF (ภาพที่ 16) เมื่อทำการแยกให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์จาก UltraDOMA-PF 50 มล. ได้แอนติบอดีประมาณ 1-6 มก. (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8. แสดงความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ heterohybridomas โคลนต่างๆ ทั้งการผลิตวิธี *in vivo* และ *in vitro*.

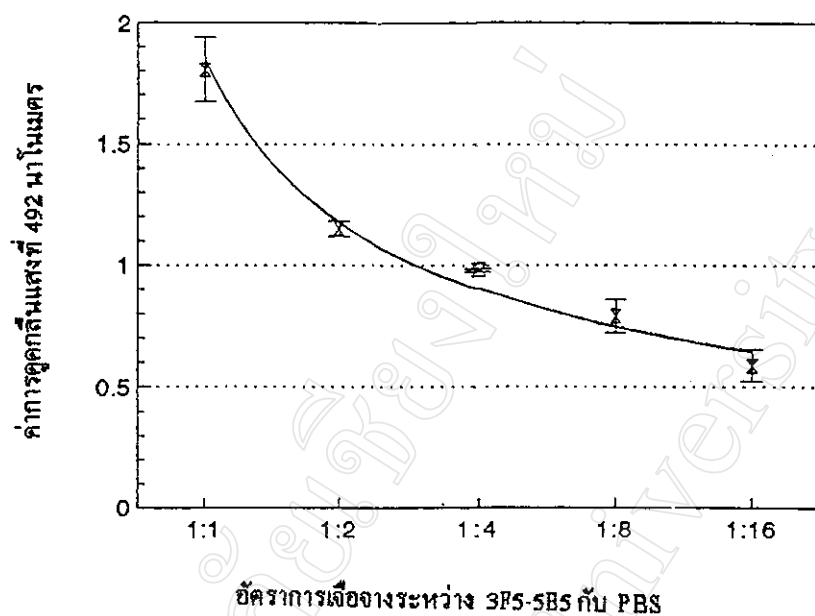
Heterohybridomas	ปริมาณแอนติบอดีจากวิธี <i>in vivo</i> (มก./หนู1 ตัว)	ปริมาณแอนติบอดีจาก UltraDOMA-PF (มก./50 มล.)
3F5-5E5	8.12	5.84
3F5-5E8	5.36	1.73
3F5-6B5	9.00	5.46
3F5-6C6	9.45	3.77
3F5-6D8	7.96	2.65



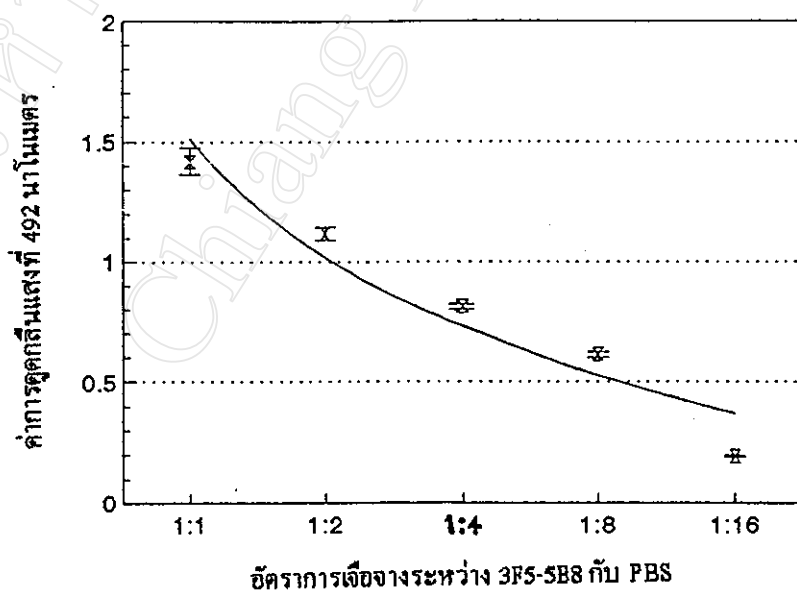
ภาพที่ 19. แสดงการเลี้ยงเซลล์ heterohybridomas ใน UltraDOMA-PF เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ภายในตู้เลี้ยงเซลล์.

4.5. ผลของการวัดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับแอนติเจน

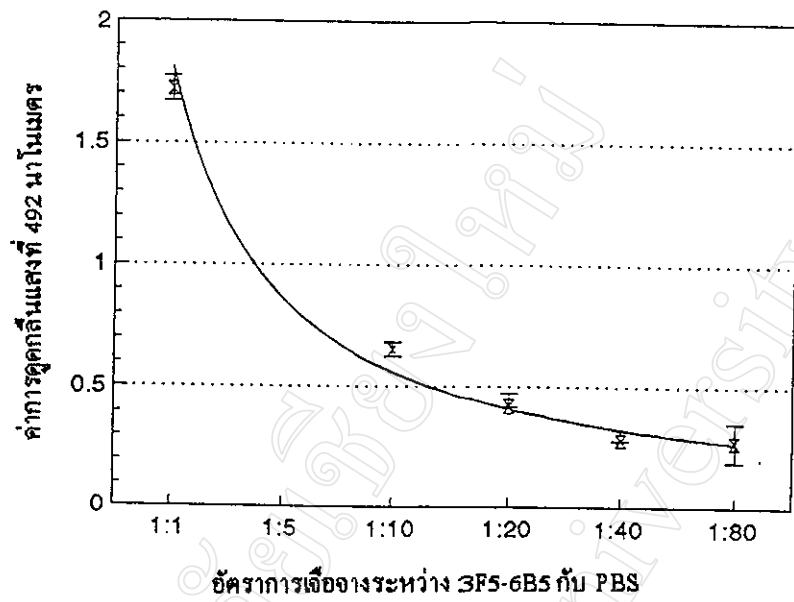
จากการทดลองใช้วิธี ELISA (ดังที่กล่าวในข้อ 3.3.3) เป็นวิธีในการวิเคราะห์หลังจากผลิตแอนติบอดีได้เป็นจำนวนมากพอ นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 3F5-5E5, 3F5-5E8, 3F5-6B5, 3F5-6C6, 3F5-6D8 มาทำปฏิกิริยากับแอนติเจน โดยเจือจางแอนติบอดีกับสารละลายฟิบีเอสในอัตรา 1:1 จนถึง 1:36 พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกตัวมีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้เป็นอย่างดีและในแต่ละโคลนของเซลล์ถูกผสมข้ามสปีชีส์จะมีความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้แตกต่างกันไป ผลดังในภาพที่ 19, 20, 21 และ 22 ตามลำดับ



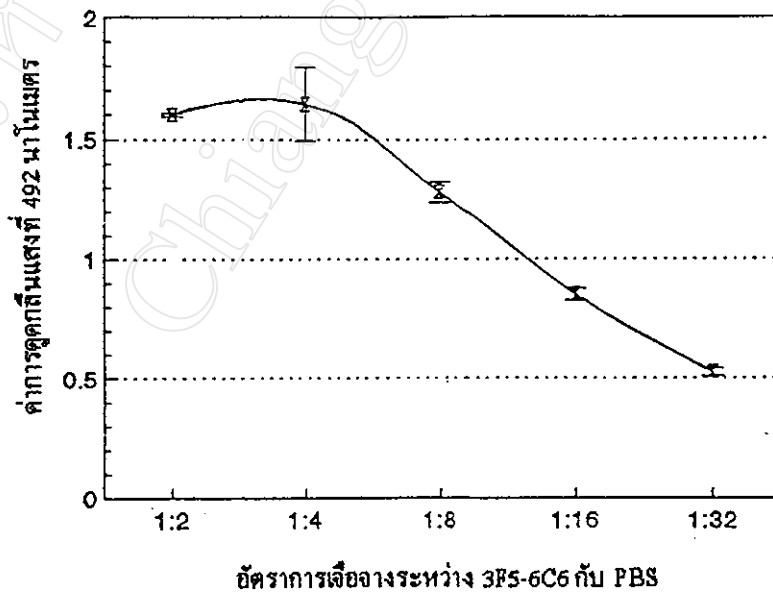
ภาพที่ 20. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-5E5 กับ E2-6CMO-HSA.



ภาพที่ 21. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-5B8 กับ E2-6CMO-HSA.



ภาพที่ 22. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-6B5 กับ E2-6CMO-HSA.



ภาพที่ 23. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-6C6 กับ E2-6CMO-HSA.

4.6. ผลของปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยว (Cross reaction) ของแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล

เมื่อนำโมนโคลอนอลแอนติบอดีที่ได้จากโคลน 3F5-6C6 และ 3F5-6D8 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาวัด % cross reaction กับสเตียรอยด์ชนิดอื่นๆ (ตามวิธี 3.3.9) ผลดังตารางที่ 9 ซึ่งปรากฏว่าโมนโคลอนอลแอนติบอดีทั้งสองโคลนมี % cross reaction กับฮอร์โมนชนิดอื่นต่ำ และเมื่อพิจารณาที่ N 23 ซึ่งเป็นโพลีโคลนอนแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมของกระต่ายเบอร์ N23 จะมี % cross reaction กับฮอร์โมนอีสโตรนเท่ากับ 1.502 % มากกว่าโมนโคลอนอลแอนติบอดีของโคลน 3F5-6C6 และ 3F5-6D8 เท่ากับ 0.53 และ 0.024 ตามลำดับ

ตารางที่ 9. แสดงผลของปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลกับ สเตียรอยด์ชนิดต่างๆ.

ชนิดสเตียรอยด์	3F5-6C6	3F5-6D8	N23
C18			
Estradiol-17 β (1,3,5[10]-estriene-3,17 β -diol)	100	100	100
Estrone (1,3,5[10]-estratrien-3-ol-17-one)	0.53	0.024	1.502
C19			
Testosterone (4-Androstene-17 β -ol-3-one)	0.016	0.0024	0.005
Androsteneione (4-Androstene-3,17-dione)	0.00035	<0.012	0.002
C21			
Pregnenolone (5-Pregnen-3 β -ol-20-one)	*	<0.012	0.005
Progesterone (4-Preg-4-ene-3,20-dione)	*	<0.012	0.005
Hydrocortisol	*	<0.012	<0.002
11 α -Hydroxyprogesterone (4-Pregnen-11- α -ol-3,20 dione)	*	<0.012	0.005
C23			
17 α -Acetoxypregesterone (4-Pregnen-17 α -ol-3,20 dione acetate)	*	<0.012	0.005

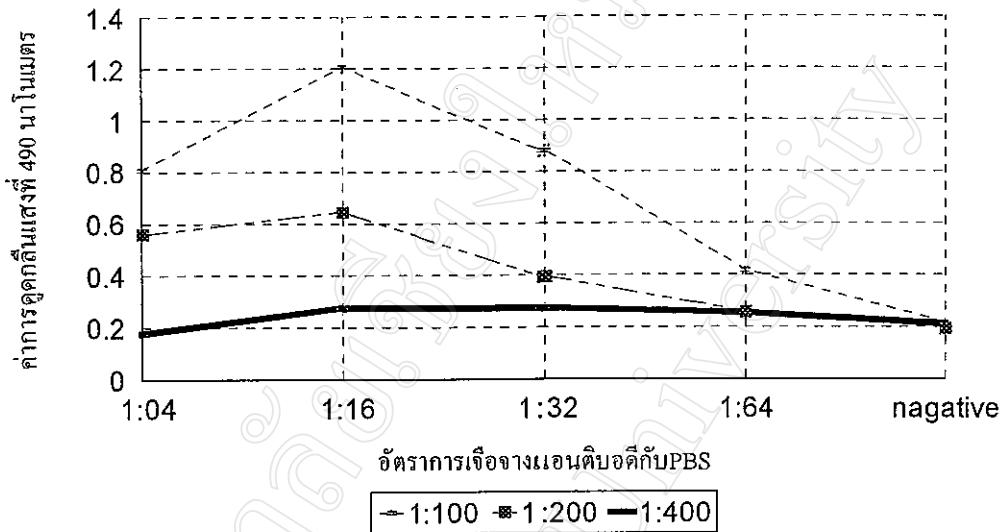
* ไม่ได้ทำการทดลอง

4.7. ผลของการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล โดยวิธี ELISA

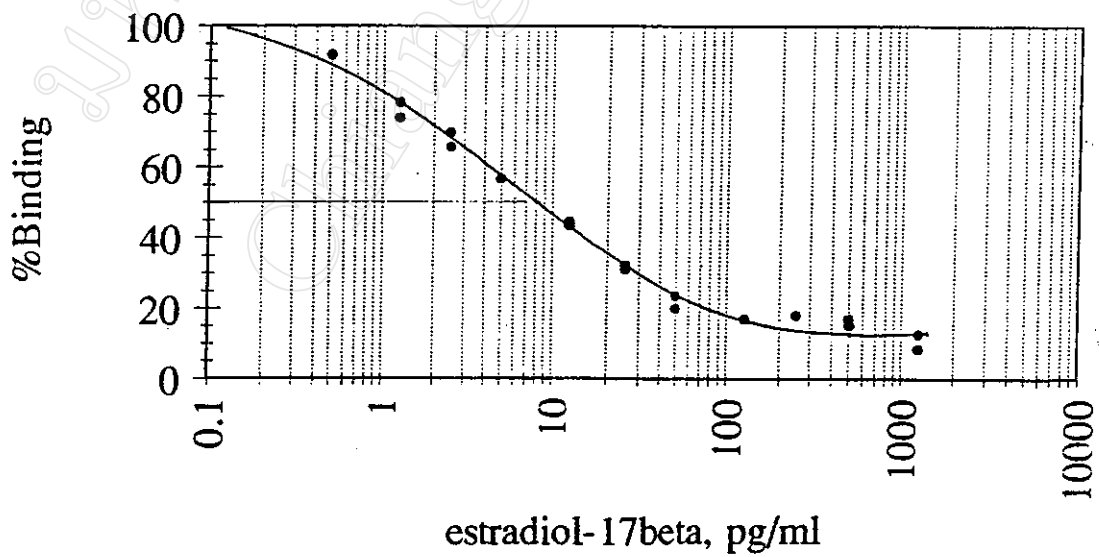
4.7.1. โมนาโคลนอลแอนติบอดีในการวัดปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออล โดยใช้ไมโครเพลท เป็น solid-phase

จากการทดลองเมื่อได้เลือก MAb จากโคลนที่เหมาะสมแล้ว ในการทดลองนี้ ได้แก่ MAb จากโคลน 3F5-6D8 จึงนำมาไตเตรท (titrate) หาอัตราการเจือจางของ MAb ที่เหมาะสมกับอัตราการเจือจางของเอนไซม์ estradiol-peroxidase-labeled ที่เหมาะสมกับ solid-phase ที่ใช้ไมโครเพลท ซึ่งเป็นพื้นผิวทำมาจากโพลีสไตรีน มีคุณสมบัติในการเกาะติดโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ดี ผลของการไตเตรทโดยเลือกจากอัตราการเจือจางของทั้งสองสัมพันธ์กัน และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ประมาณ 1.0 ดังภาพที่ 24 อัตราเจือจางของ MAb ที่เหมาะสมคือ 1:16 และ estradiol-peroxidase-labeled อัตราการเจือจางที่เหมาะสมคือ 1:100 เมื่อได้จุดที่มีความเหมาะสมแล้วจึงนำสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตามข้อที่ 3.5.2.) ได้ผล ดังภาพที่ 25 จากกราฟพบว่า 50 % binding ได้ที่ 8 พิโคกรัมต่อมล. (pg/ml) ซึ่งมีความไวในการวัดฮอร์โมนอีสตราไดออล สามารถบ่งบอกได้ในระดับที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนปริมาณน้อยๆ ได้ ในการทดลองนี้บอกได้ในเชิงปริมาณ ดังตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าสามารถวัดระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลในปริมาณน้อยกว่า 2.5 pg/ml ได้ ซึ่งวิธี RIA วัดไม่ได้ ส่วนในปริมาณที่ระดับอีสตราไดออลสูงค่าออกมาสูงกว่าวิธี RIA ซึ่ง % recovery ของการสกัดตัวอย่างจากน้ำนมครั้งนี้เท่ากับ 79 %

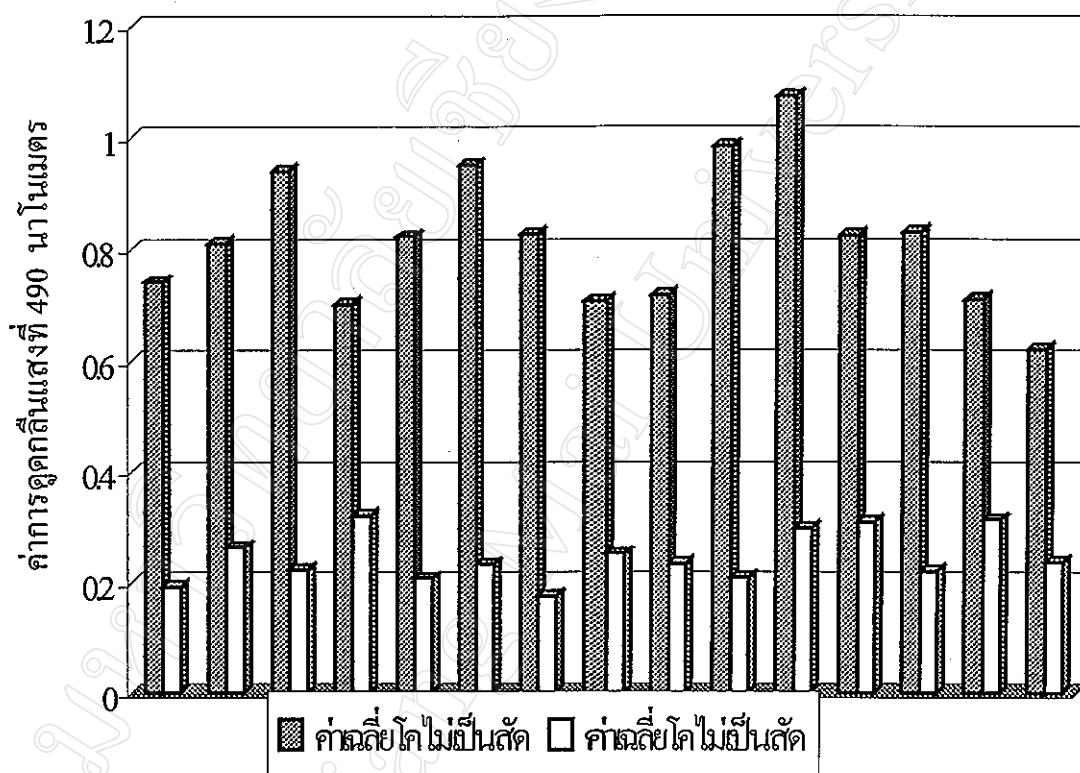
เมื่อใช้ไมโครเพลทตรวจการเป็นสกัดพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ระหว่างโคนมที่เป็นสกัดและตัวที่ไม่เป็นสกัดได้ชัดเจน ซึ่งตัวอย่างได้จากน้ำนมโคสกัดที่มี % recovery ของการสกัดน้ำนมเท่ากับ 79 % ได้ค่าจากการวัดค่าโดยวิธี RIA แล้ว ปรากฏผลดังภาพที่ 26 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ของตัวอย่างที่ได้จากโคที่ไม่เป็นสกัดอยู่ระหว่าง 1.102-0.610 ส่วนโคที่เป็นสกัดอยู่ระหว่าง 0.172-0.326 ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงมีค่าแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด จากการทดลองนี้การแยกความแตกต่างระหว่างโคนมที่เป็นสกัดและไม่เป็นสกัดได้ในเชิงคุณภาพ แต่ยังไม่สามารถหาค่าในเชิงปริมาณได้อย่างชัดเจน ต้องอาศัยการทดลองและระยะเวลาในการทำการทดลองในการปรับปรุงและพัฒนาการวัดปริมาณเชิงปริมาณครั้งต่อไป



ภาพที่ 24. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรในการไตเตรทหาอัตราเจือจางของ MAb (3F5-6D8) กับ estradiol-peroxidase-labeled ที่เหมาะสม สำหรับไมโครเพลท



ภาพที่ 25. แสดงกราฟมาตรฐานเมื่อใช้ไมโนโคลนอลแอนติบอดี จากโคลน 3F5-6D8 โดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase.



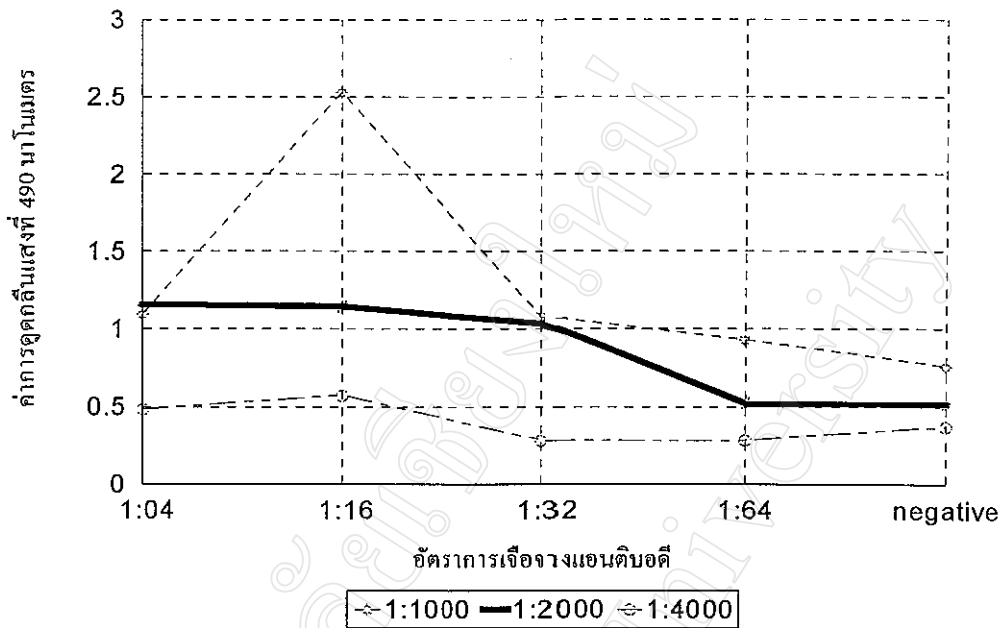
ภาพที่ 26. แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร จากตัวอย่างสกัดของโคที่เป็น สัดและไม่เป็นสัด โดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase ในการเกาะกับโมโนโคลนอล แอนติบอดีโคลน 3F5-6D8 โดยวิธี ELISA

ตารางที่ 10. แสดงปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออกไซด์ของแม่โคนมจาก ตัวอย่างสกัดจากน้ำนม วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase.

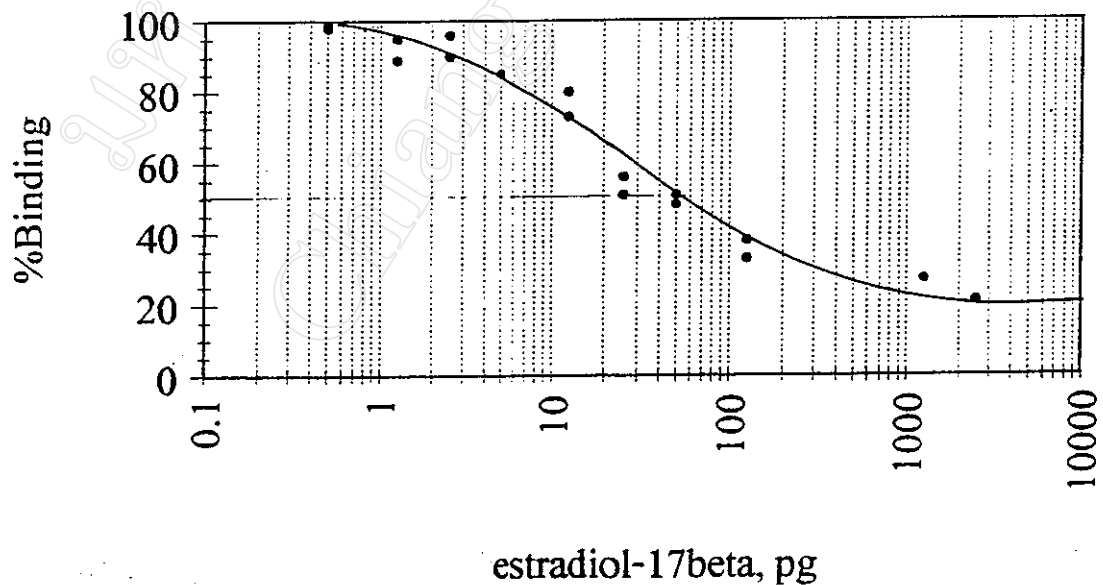
ตัวอย่างที่ไม่เป็นสัตว์	ระดับอีสตราไดออกไซด์ (pg/ml)	ตัวอย่างที่เป็นสัตว์	ระดับอีสตราไดออกไซด์ (pg/ml)
A-1	1.23	B-1	>13.70
A-2	0.88	B-2	13.70
A-3	0.41	B-3	>13.70
A-4	1.37	B-4	13.70
A-5	0.55	B-5	>13.70
A-6	0.41	B-6	>13.70
A-7	0.74	B-7	>13.70
A-8	1.37	B-8	13.70
A-9	1.40	B-9	>13.70
A-10	0.28	B-10	>13.70
A-11	0.25	B-11	13.70
A-12	0.82	B-12	13.70
A-13	0.55	B-13	>13.70
A-14	1.37	B-14	13.70
A-15	2.19	B-15	>13.70

4.7.2. การวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลจากตัวอย่างสกัดโดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส

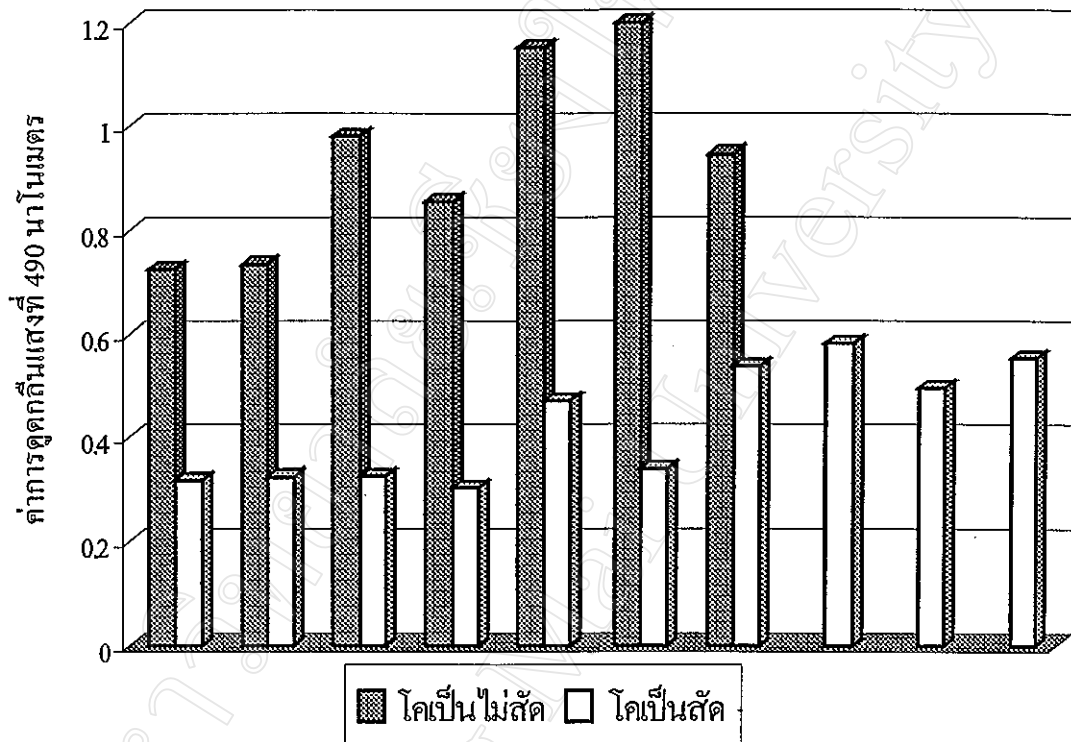
การวิเคราะห์โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น solid-phase โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. พบว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีโคลน 3F5-6D8 อยู่ที่ 1:16 และของ estradiol-peroxidase-labeled อยู่ที่ 1:2000 (ดังภาพที่ 27) เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานกับอีสตราไดออล ดังภาพที่ 28 ปรากฏว่า 50% binding ของการวัดอยู่ที่ 50 pg/ml นำตัวอย่างน้ำนมโคที่สกัดมาวิเคราะห์ พบว่ามี % recovery ของการสกัดน้ำนมโคเท่ากับ 68 % มีตัวอย่างโคนมเป็นสัตว์ 14 ตัว และไม่เป็นสัตว์ 12 ตัว นำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค ELISA สามารถเห็นความแตกต่างกันได้ระหว่างกลุ่มที่เป็นสัตว์ (ภาพที่ 29) จากการทดลองที่วัดด้วยแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะสามารถแยกความแตกต่างกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งในตัวอย่างสกัดจากโคที่ไม่เป็นสัตว์มีระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลต่ำจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรสูง (0.716-1.288) ส่วนตัวอย่างสกัดจากโคที่เป็นสัตว์ ซึ่งมีระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลสูงจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรต่ำ (0.215-0.831) และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของอีสตราไดออลพบว่าสามารถวัดความเข้มข้นอีสตราไดออลที่ต่ำได้ และในขณะที่ค่าสูงมีค่าแปรปรวนมาก อาจเกิดเนื่องจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสสามารถจับแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ได้ด้วย นั้นอาจหมายถึงการปนเปื้อนแอนติบอดีชนิดอื่นมากับแอนติบอดีของอีสตราไดออลด้วย ทำให้ค่าของอีสตราไดออลสูงมาก การวัดโดย ELISA ที่ใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase และวิธี RIA



ภาพที่ 27. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ในการไตเตรทหาอัตราเจือจางของ MAb (3F5-6D8) กับ estradiol-peroxidase-labeled ที่เหมาะสม สำหรับแผ่นไนโตรเซลลูโลส



ภาพที่ 28. แสดงกราฟมาตรฐานเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี จากโคลน 3F5-6D8 โดยใช้ solid-phase เป็นแผ่นไนโตรเซลลูโลส.



ภาพที่ 28. แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรจากตัวอย่างสกัดของโคที่เป็น สั้ดและไม่เป็นสั้ด โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น solid-phase ในการเกาะกับโมโน-โคลนอลแอนติบอดีโคลน 3F5-6D8 โดยวิธี ELISA

ตารางที่ 11. แสดงปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออกเจนของแม่โคนมจาก ตัวอย่างสกัดจากน้ำนม วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น solid-phase.

ตัวอย่างที่ไม่เป็นสกัด	ระดับอีสตราไดออกเจน (pg/ml)	ตัวอย่างที่เป็นสกัด	ระดับอีสตราไดออกเจน (pg/ml)
A-1	3.038	B-1	48.10
A-2	3.028	B-2	37.97
A-3	0.253	B-3	37.97
A-4	1.317	B-4	48.10
A-5	0.253	B-5	18.99
A-6	0.253	B-6	40.51
A-7	0.506	B-7	11.39
A-8	<0.270	B-8	8.10
A-9	<0.270	B-9	12.66
A-10	<0.270	B-10	8.10
A-11	<0.270	B-11	5.33
A-12	<0.270	B-12	5.33
		B-13	6.67
		B-14	13.33

4.8. การวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธี RIA

เทคนิค RIA ในการวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล ในน้ำนมสกัด ใช้แอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลจากกระต่าย เบอร์ N 23 ที่มีระดับไตเตอร์ (Titer) 1:1,000 ที่สามารถจับกับ ^3H -estradiol ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ นำไปวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออล เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานกับสารมาตรฐานอีสตราไดออล พบว่ามีค่า 50% binding อยู่ที่ 247 พิโคกรัม/มล. ที่ 85 % binding อยู่ 42 พิโคกรัม/มล. แสดงได้ชัดเจนว่าเทคนิค RIA มีความไวต่ำมาก เมื่อนำไปวัดตัวอย่างสกัดพบว่าเนื่องจากความไวต่ำมากจึงไม่สามารถวัดปริมาณฮอร์โมนอย่างละเอียดได้ และปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลในตัวอย่างสกัดมีปริมาณน้อยกว่า ปริมาณที่ RIA มี sensitivity ที่ 50% binding ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12. แสดงปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลเฉลี่ย (พคก./มล. \pm SE.) ของแม่โคนมจากตัวอย่างสกัดจากน้ำนม วิเคราะห์ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ.

ตัวอย่างที่ไม่เป็นสัด	ระดับอีสตราไดออล (pg/ml)	ตัวอย่างที่เป็นสัด	ระดับอีสตราไดออล (pg/ml)
A-1	<2.5	B-1	9.68 \pm 0.61
A-2	<2.5	B-2	5.92 \pm 0.18
A-3	<2.5	B-3	7.89 \pm 0.39
A-4	<2.5	B-4	8.61 \pm 0.81
A-5	<2.5	B-5	6.78 \pm 0.28
A-6	<2.5	B-6	8.56 \pm 0.56
A-7	<2.5	B-7	9.78 \pm 0.25
A-8	<2.5	B-8	7.50 \pm 0.10
A-9	<2.5	B-9	6.60 \pm 0.40
A-10	<2.5	B-10	8.65 \pm 0.05
A-11	<2.5	B-11	6.23 \pm 0.77
A-12	<2.5	B-12	8.50 \pm 0.50
A-13	<2.5	B-13	7.68 \pm 0.68
A-14	<2.5	B-14	8.15 \pm 0.25
A-15	<2.5	B-15	6.89 \pm 0.49