บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 สารเคมีสำหรับการตรวจฮอร์โมนสเตียรอยด์ด้วยวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเซ (Enzyme Immunoassays; EIA) หรือ เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme Linked Immunosorbent assay; ELISA)

สารเคมี	รหัสสินค้า	บริษัท	ประเทศ
Na_2CO_3	S-2127	Sigma	อเมริกา
$NaHCO_3$	S-8875	Sigma	อเมริกา
NaH_2PO_4	S-9638	Sigma	อเมริกา
Na_2HPO_4	S-0876	Sigma	อเมริกา
NaCl	N/A	Sigma	อเมริกา
BSA	A-7906	Sigma	อเมริกา
Tween 20	P-1379	Sigma	อเมริกา
Citric acid	C-0759	Sigma	อเมริกา
ABTS	A-1888	Sigma	อเมริกา
H_2O_2	N/A	Merck	เยอรมันนี
NaOH pellets	S-5881	Sigma	อเมริกา
Ethyl Alcohol	N/A	Merck	เยอรมันนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท	ประเทศ
Pipette (Brinkman Eppendorf 100, 200, 1000)	Fisher Scientific	อเมริกา
200 µl tips	Perfector Scientific	อเมริกา

1000 µl tips	Perfector Scientific	อเมริกา
Repeater (Brinkman Eppendorf)	Fisher Scientific	อเมริกา
Repeater Fisher Brand Dispenser Tips	Fisher Scientific	อเมริกา
(2.5 ml, 5 ml, 12.5 ml, 25 ml, 50 ml)		
Vortex model KMC – 1300 V	N/A	เกาหลี
pH meter model consort C830 S/N 7762D1	N/A	เบลเยียม
Sonicator	N/A	N/A
Magnetic Stirrer Model MGS-1001 S/N 60104042	N/A	เกาหลี
Glass Bottles	N/A	N/A
Plate Shaker	N/A	N/A
Multi Pulse Vortexer	Glas-Col, Terre Haute	อเมริกา
Microplate Washer model Fluido 2 S/N 501023	N/A	อังกฤษ
Centrifuge	N/A	N/A
Scale	N/A	N/A
Sunrise Microplate reader S/N 605000112	N/A	ออสเตรีย
Printer	Hewlett Packcard	ญี่ปุ่น
Nunc mircotitre 96 flat well plates Maxisorp	N/A	เยอรมันนี
Mircotitre plate sealer	Dynex Laboratories	อเมริกา
12 x 75 mm glass culture tubes	Fisher Scientific	อเมริกา
Rack - 72 holes, holds 10-13 mm	VWR	อเมริกา
16 x 125 mm glass culture tubes	Fisher Scientific	อเมริกา
16 x 100 mm glass culture tubes	Fisher Scientific	อเมริกา
Rack - 72 holes, holds 16 mm tubes	N/A	อเมริกา
Clear 12 x 75 mm plastic tubes	Sarstedt Inc.	N/A
Purple 12 mm stopper caps	Sarstedt Inc.	N/A
Ziplock bags with white write-on labels	Perfector Scientific	อเมริกา
O-ring vials	Sarstedt Inc.	N/A
Daigger cardboard storage boxes	Daigger	อเมริกา
and lids, 3"		
Daigger cardboard	Daigger	อเมริกา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Storage box grids (100 cell)	N/A	อเมริกา
Plastic wash bottles 500 ml	N/A	N/A
Timer	N/A	N/A
Sharpie Markers	N/A	N/A
Kimwipes	N/A	N/A
Parafilm	N/A	N/A
Calculator	N/A	N/A
Glass Scintillation vials	N/A	อเมริกา
Clipboards	N/A	N/A
Protocols and Assay sheets	N/A	N/A
Colored Tape	N/A	อเมริกา

3.2 สัตว์ทดลอง การเก็บตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างอุจจาระ

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ศึกษาในหมาในเพศเมียจำนวน 3 ตัว ณ เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี หมาในเพศเมียตัวที่ 1 และหมาในเพศเมียตัวที่ 2 อายุ 4 ปี เลี้ยงรวมกับหมาในเพศผู้ 2 ตัวในกรงเลี้ยง หมาในเพศเมียทั้ง 2 ตัว นำมาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ของทวีปยุโรปประมาณ 3 เดือนก่อนทำการศึกษา ส่วนหมาในเพศเมียตัวที่ 3 อายุ 7 ปี เลี้ยงรวมกับหมาในเพศผู้ 1 ตัวในกรงเลี้ยงและส่วนแสดง เป็นหมาในที่เกิดในประเทศไทย ก่อนการเก็บตัวอย่างอุจจาระ 1 วัน หมาในเพศเมียทั้ง 3 ตัว จะได้รับเนื้อไก่สดผสมกับสีผสมอาหาร Icing colors royal blue concentration paste (Wilton Industries, Inc. Woodridge, IL) วันละ 1 ครั้ง เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้เป็นของหมาในตัวใด (ตาราง3.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3.1 แสดงอายุ สถานที่เกิด แหล่งที่มา ลักษณะการเลี้ยง และลักษณะอาหารของหมาในเพศเมียแต่ละตัว

หมาในเพศเมีย	ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3
อายุ	4 ปี	4 ปี	8 ปี
สถานที่เกิด (ประเทศ)	*	*	ไทย
แหล่งที่มา (ประเทศ)	เนเธอร์แลนด์	เนเธอร์แลนด์	ไทย
ลักษณะการเลี้ยง	เลี้ยงรวมกับตัวผู้	เลี้ยงรวมกับตัวผู้	เลี้ยงรวมกับตัวผู้
ลักษณะอาหาร	เนื้อไก่สด	เนื้อไก่สด	เนื้อไก่สด

หมายเหตุ เครื่องหมาย * แสดงไม่มีข้อมูล

3.2.2 การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

เก็บตัวอย่างอุจจาระหมาในเพศเมียทุกตัวที่ถ่ายออกมาใหม่ๆ จากพื้นจำนวน 5-7 ครั้ง (ตัวอย่าง) ต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 1 ปี และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 ^{0}C จนกว่าจะสกัดตัวอย่างอุจจาระเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

3.2.3 การสกัดตัวอย่างอุจจาระโดยใช้ตัวอย่างอุจจาระเปียก (Wet weight shaking extraction)

นำตัวอย่างอุจจาระออกจากตู้แช่แข็งและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้อุจจาระที่แข็งนั้นมีความนิ่มลง จากนั้นเอาสิ่งแปลกปลอมซึ่งปนอยู่ในตัวอย่างอุจจาระออกให้เหลือเฉพาะตัวเนื้ออุจจาระ ชั่งตัวอย่างอุจจาระประมาณ 0.48-0.52 g ใส่ในหลอดแก้วขนาด 16X100 mm ตัวอย่างละ 1 หลอด เติมน้ำกลั่น 0.5 ml และเติมเอทานอล 4.5 ml ลงในตัวอย่างอุจจาระทุกหลอด ปิดด้วยจุกยาง ผสมตัวอย่างอุจจาระให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex mixer) เป็นเวลา 10 วินาที นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร Multi Pulse Vortexer (Glas-Col, Terre Haute, IN) เขย่าด้วยความเร็วประมาณ 60-70 รอบต่อนาที และอัตรา 1 จังหวะต่อวินาที เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างอุจจาระไปเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 RPM เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวใส (supernatant) ของตัวอย่างแยกใส่หลอดพลาสติกขนาด 12X75 mm นำมาเจือจางด้วย dilution

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

buffer ที่ความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเก็บตัวอย่างทั้งหมดลงในกล่องและเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 20 ^{0}C

3.2.4 การวัดระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี EIA

แอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนำมาจาก Coralie Munro (University of California, Davis, CA, USA) โดย pregnane CL 425 เกิด cross react กับ progesterone metabolites ดังนี้ 4-pregnen-3,20-dione (100%), 4-pregnen-3α-ol-20-one (188%), 4-pregnen-3β-ol-20-one (172%), 4-pregnen-11α-ol-3,20-dione (147%), 5α-pregnan-3β-ol-20-one (94%), 5α-pregnan-3β,20-dione (64%), 5α-pregnan-3,20-dione (55%), 5β-pregnan-3β-ol-20-one (12.5%), 5-pregnan-3,20-dione (8%), 4-pregnen-11β-ol-3,20-dione (2.7%), and 5β-pregnan-3α-ol-20-one (2.5%) (30)

3.2.4.1 การเคลือบเพลท (plate coating) เติม antibody stock monoclonal pregnane CL 425 (1:50) ปริมาตร 25 µl ลงใน coating buffer ปริมาตร 5 ml (working dilution 1:10,000) ใส่ antibody ที่เจือจางแล้วปริมาตร 50 µl ลงไปในแต่ละหลุมยกเว้นแถวที่ 1 ให้เริ่มที่แถว A 2 และหยดลงไปในแต่ละแถว (ดูตาม plate map) เมื่อเคลือบเพลทครบทุกหลุมให้เคาะเพลทเบา ๆ เพื่อให้ antibody เคลือบติดทั่วหลุม ปิดด้วย acetate plate sealer และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 ^{o}C นานข้ามคืนหรืออย่างน้อย 12 ชั่วโมง เตรียม standard ที่ความเข้มข้นดังนี้ 200 100 50 25 12.5 6.25 3.12 1.56 และ 0.78 pg/well เจือจาง standard working stock (4 ng/ml หรือ 200 pg/well) แบบ 2 fold ใช้ standard stock ปริมาตร 200 µl ผสมกับ EIA buffer ปริมาตร200 µl เตรียมตัวอย่างอุจจาระที่ความเข้มข้น 1: 500 ด้วย dilution buffer และเตรียมความเข้มข้นสูงสุดของ control (high control) ที่ความเข้มข้น 1:4 และความเข้มข้นต่ำสุดของ control (low control) ที่ความเข้มข้น 1:20 เตรียม HRP ที่ความเข้มข้น 1:45,045 เติม HRP stock (1:200) ปริมาตร 22.2 µl ลงใน EIA buffer ปริมาตร 5 ml (HRP ที่เตรียมเสร็จแล้วควรเก็บไว้ในตู้เย็น) เมื่อเตรียม standard ตัวอย่าง control และ HRP เสร็จแล้วล้างเพลท (plate washing) ด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้างเพลทอัตโนมัติ Microplate Washer model Fluido 2 S/N 501023 เคาะเพลทเพื่อขจัดส่วนเกินของสารละลายสำหรับการล้างออกไป ระวังอย่าให้เพลทแห้ง

3.2.4.2 การโหลดเพลท (plate loading) เติม standard control และตัวอย่าง ปริมาตร 50 µl ลงไปในแต่ละหลุมอย่างรวดเร็วและถูกต้องตาม plate map เติม HRP ปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุมที่มี standard control และตัวอย่าง ระวังการกระเด็นของสารละลายภายในหลุมในระหว่างที่โหลด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพลท ขั้นตอนตั้งแต่ใส่ standard control ตัวอย่าง และ HRP ไม่เกิน 10 นาที ปิดเพลทด้วย acetate plate sealer และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลทและเคาะเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (substrate) เตรียม ABTS substrate ทันทีที่จะใช้โดยผสม 0.5 M H_2O_2 ปริมาตร 40 µl และ 40 mM ABTS ปริมาตร 125 µl ลงใน substrate buffer 12.5 ml เติมสารละลาย ABTS substrate ปริมาตร 100 µl ลงในเพลทจนครบทุกหลุม ปิดด้วย acetate plate sealer และบ่มที่อุณหภูมิห้องหรือรอจนกว่าจะเกิดการเปลี่ยนสีประมาณ 30-45 นาที

3.2.4.3 การอ่านเพลท (plate reading) เมื่อค่าการดูดกลืนแสง (optical density , OD) ของหลุม 0 ได้ค่า OD ประมาณ 0.9-1 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ด้วยเครื่อง Sunrise Microplate reader S/N 605000112 โปรแกรม Megellan S/N 126-1YN-9E6-ULGGG

3.2.5 การวัดระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี EIA

แอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนนำมาจาก Coralie Munro (University of California, Davis, CA, USA) โดยที่ EC R522-2 เกิด cross react กับ estrogen metabolites ดังนี้ estrone-3-glycoronide (100%), estrone-3 sulfate (66.6%), estrone (238%), estradiol-17-β (7.8%), estradiol-3-glucoronide (3.8%), estradiol-3-sulfate (3.3%), estradiol-17-surfate (0.1%), estradiol-3-disulfate (0.1%) (31)

3.2.5.1 การเคลือบเพลท (plate coating) เติม antibody stock EC R522-2 (1:100) ปริมาตร 25 µl ลงใน coating buffer 5 ml (working dilution 1:20,000) ใส่ antibody ที่เจือจางแล้วปริมาตร 50 µl ลงไปในแต่ละหลุมยกเว้นแถวที่ 1 ให้เริ่มที่แถว A 2 และหยดลงไปในแต่ละแถว (ดูตาม plate map) เมื่อเคลือบเพลทครบทุกหลุมให้ทำการเคาะเพลทเบาๆ เพื่อให้ antibody เคลือบติดทั่วหลุม ปิดด้วย acetate plate sealer และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C นานข้ามคืนหรืออย่างน้อย 12 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้างเพลทอัตโนมัติ Microplate Washer model Fluido 2 S/N 501023 เคาะเพลท ระวังอย่าให้เพลทแห้ง เติม EIA assay buffer ปริมาตร 50 µl ลงไปในแต่ละหลุมจนครบทุกหลุม ปิดเพลทด้วย acetate plate sealer และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง เตรียม standard ใช้ standard ที่ความเข้มข้นดังนี้ 200 100 50 25 12.5 6.25 3.12 1.56 และ 0.78 pg/well เจือจาง standard working stock (4 ng/ml หรือ 200 pg/well) แบบ 2 fold ใช้ standard stock ปริมาตร 200 µl ผสมกับ EIA buffer ปริมาตร 200 µl เจือจางตัวอย่างอุจจาระที่ความเข้มข้น 1: 10 ด้วย dilution buffer เตรียมความเข้มข้นสูงสุดของ control (high control) ที่ความเข้มข้น 1:9 และความเข้มข้นต่ำสุดของ control (low control) ที่ความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1:22 เตรียม HPR working ที่ความเข้มข้น 1: 80,000 เติม HRP stock (1:200) ปริมาตร 75 µl ลงใน EIA buffer ปริมาตร 6 ml (HRP ที่เตรียมควรเก็บไว้ในที่เย็น)

3.2.5.2 การโหลดเพลท (plate loading) เติม standard control และตัวอย่างปริมาตร 20 µl ลงไปในแต่ละหลุมอย่างรวดเร็วและถูกต้องตาม plate map เติม HRP ปริมาตร 50 µl ลงในทุกหลุมที่มี standard control และตัวอย่าง โดยระวังการกระเด็นของสารละลายภายในหลุมในระหว่างที่โหลดเพลท ขั้นตอนตั้งแต่ใส่ standard control ตัวอย่าง และ HRP ไม่เกิน 10 นาที ปิดเพลทด้วย acetate plate sealer และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยสารละลายสำหรับการล้างโดยใช้เครื่องล้างเพลทอัตโนมัติ เคาะเพลท เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (substrate) เตรียม ABTS substrate ทันทีที่จะใช้โดยผสม 0.5 M H_2O_2 ปริมาตร 40 µl และ 40 mM ABTS ปริมาตร 125 µl ลงใน substrate buffer 12.5 ml เติมสารละลาย ABTS substrate ปริมาตร 100 µl ลงในเพลทจนครบทุกหลุม ปิดด้วย acetate plate sealer และบ่มที่อุณหภูมิห้องหรือรอจนกว่าจะเปลี่ยนสีประมาณ 40 -50 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง

3.2.5.3 การอ่านเพลท (plate reading) เมื่อค่าการดูดกลืนแสงของหลุม 0 ได้ค่า OD ประมาณ 0.9-1 นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ด้วยเครื่อง Sunrise Microplate reader S/N 605000112 โปรแกรม Megellan S/N 126-1YN-9E6-ULGGG

3.2.6 การตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนในตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี HPLC

จำนวนและความสัมพันธ์ของสัดส่วนของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนใช้ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Microsorb C-18 Column, Rainen Inc., Woburn, Mass) สำหรับการตรวจตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมีย 3 ตัว โดยการรวมตัวอย่างอุจจาระที่สกัดได้ของหมาในเพศเมีย 3 ตัวเข้าด้วยกัน (pool) ทำให้แห้งด้วยอากาศ (air dried) เติมเมทานอล 1 ml แล้วทำให้แห้งด้วยอากาศ และเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C ก่อนการตรวจด้วยเครื่อง HPLC เติม phosphate buffer saline ปริมาตร 0.5 ml กรองตัวอย่างอุจจาระที่ pool รวมกันผ่าน C-18 spice cartridge (VWR, West Chester, PA) และ elute ด้วยเมทานอลปริมาตร 5 ml ทำให้แห้งด้วยอากาศ ใส่สารกัมมันตรังสี (radiolabelled steroid ^{3}H-estradiol-17β, ^{3}H-estrone, ^{3}H-estrone-sulphate, ^{3}H-progesterone) ประมาณ 2500 dpm ลงไปในตัวอย่าง ทำให้แห้งด้วยอากาศ เติมเมทานอลปริมาตร 300 µl เมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนถูกแยกโดย Acetonitrile (ACN) gradients 20 เปอร์เซ็นต์ 30 เปอร์เซ็นต์ 50 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 15 นาที 45 นาที 60 นาที และ 120 นาที ตามลำดับ เมตาบอไลต์ของฮอร์โมน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอสโตรเจนถูกแยกโดยใช้ Acetonitrile (ACN) gradient 20-80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 80 นาที จากนั้นหารูปแบบของ co-elution ของสารกัมมันตรังสีที่ใส่ลงไปในแต่ละ HPLC fraction โดยเติมแต่ละ HPLC fraction ปริมาตร 100 µl ลงใน scintillation fluid (Ultima Gold; Packard, Meriden, CT) ปริมาตร 3 ml นำเข้าเครื่อง dual-label channel beta scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA) เพื่อคำนวณปริมาณสารกัมมันตรังสี และแต่ละ HPLC fraction นำไประเหยจนแห้งจากนั้นเติม assay buffer ปริมาตร 1 ml วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี EIA สำหรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสโตรเจน

3.2.7 การหาค่าประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency)

ใส่สารกัมมันตรังสี carbon; ^{14}C ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดแก้วที่มีตัวอย่างอุจจาระที่ต้องการสกัด ก่อนการเติมน้ำกลั่นและเอทานอล สกัดตัวอย่างอุจจาระตามขั้นตอนที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น เตรียมและติดฉลากหลอดพลาสติกสำหรับใส่ตัวอย่างที่สกัดได้จำนวน 20 หลอด หลอด blank 2 หลอด และหลอดสารกัมมันตภาพรังสี (tracer) 2 หลอด เติม scintillation fluid ปริมาตร 3 ml ในหลอดทุกหลอด ดูดสารกัมมันตภาพรังสี carbon; ^{14}C ปริมาตร 100 µl ใส่ในหลอด tracer จำนวน 2 หลอด ดูดตัวอย่างอุจจาระที่สกัดได้ปริมาตร 100 µl ใส่ลงในหลอดที่มี scintillation fluid 3 ml นำเข้าเครื่อง dual-label channel beta scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA) คำนวณเปอร์เซ็นต์ Extraction efficiency จากสูตรดังนี้

% Extraction efficiency = (Amount Observed/Amount Expected)*100

เมื่อ: Amount Expected = expected minus background

Amount Observed =observed minus background

จากวิธีการสกัดตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมียได้ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency) เท่ากับ 77.90 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่า Coefficients of variation (CV) เท่ากับ 30.84 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.8 การหา Parallelism

นำของเหลวที่สกัดได้จากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดของหมาในเพศเมียแต่ละตัว จำนวน 1 ml ใส่รวมกันในหลอดแก้ว (neat) นำมาทำ serial dilution ด้วย dilution buffer (neat, 1:2, 1:4, 1:8,

1:16, 1:32, 1:64, ถึง 1: 8,192) โดยเติม dilution buffer ลงในหลอดแก้วที่ติดฉลาก 1:2 ถึง 1:8,192 หลอดละ 200 µl ดูดตัวอย่างอุจจาระที่ผสมรวมกัน(neat) ปริมาตร 200 µl ใส่ในหลอดแก้วที่ติดฉลาก 1:2 เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 10 วินาที ดูดตัวอย่างปริมาตร 200 µl จากหลอดแก้วที่ติดฉลาก 1:2 ไปใส่ในหลอดแก้ว 1:4 และทำเช่นเดียวกับหลอดที่ติดฉลาก 1: 2 นี้เรื่อยไปจนครบทุกหลอด โดยในแต่ละหลอดจะได้ปริมาตร 200 µl ยกเว้นหลอดสุดท้ายที่จะได้ปริมาตร 400 µl นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปตรวจตามวิธีการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน เขียนกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การจับกัน (binding) กับความเข้มข้นของกราฟ standard cure และกราฟตัวอย่าง ถ้ากราฟตัวอย่างที่ตรวจเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับกราฟของ standard cure แสดงว่า แอนติบอดีของฮอร์โมนนั้นสามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนได้ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะนำมาตรวจด้วยวิธี EIA คือ เปอร์เซ็นต์การจับกันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

จากการหา Parallelism พบว่ากราฟของตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมียเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับกราฟของ standard cure แสดงว่าสามารถใช้แอนติบอดี (CL 425) สำหรับตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และสามารถใช้แอนติบอดี (EC R 522-2) ต่อการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนในตัวอย่างอุจจาระของหมาในเพศเมียได้

จากวิธีการตรวจเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยวิธี EIA ได้ค่า Inter-assay น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intra-assay น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และค่า Assay sensitivity ของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 0.0156 ng/ml และเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนเท่ากับ 0.039 ng/ml

3.3 การศึกษาพฤติกรรมของหมาใน

สังเกตพฤติกรรมของหมาในเพศเมียทั้ง 3 ตัว เป็นเวลา 30 นาทีต่อครั้ง ในช่วงเช้าและ/หรือเย็นของทุกวัน โดยสังเกตลักษณะพฤติกรรมการอยู่เดี่ยวๆ (solitary) การอยู่รวมกันเป็นสังคม (social) และพฤติกรรมทางเพศ (sexual behavior) สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกของหมาในเพศเมียและพฤติกรรมทางเพศ ดังนี้ อวัยวะเพศบวมขยายใหญ่ (swollen vulva) มีสิ่งคัดหลั่งจากช่องคลอด (vaginal discharge) เป็นสีแดงหรือสีแดงจางหรือเป็นเมือก หมาในเพศเมียเป็นที่ดึงดูดและเป็นที่สนใจหมาในเพศผู้ (solicitation) การขึ้นขี่ (mounting) การยอมรับหรือปฏิเสธการผสมจากหมาในเพศผู้ มีการปัสสาวะบ่อยขึ้นโดยการใช้ท่า squat-raise (ท่านั่งยองๆ และยกขาหลังขึ้น) ระยะเวลาการผสมพันธุ์โดยการติดกัน (copulatory lock) และหันหลังชนกัน (back to back posture) รายละเอียดดังตาราง 2-2 โดยนำผลการศึกษาพฤติกรรมทางเพศ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของหมาในเพศเมียมาศึกษาความสัมพันธ์กับรูปแบบของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ตรวจวัดได้

3.4 การวิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนในตัวอย่างอุจจาระกับพฤติกรรมของหมาใน

ระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนของหมาในเพศเมีย 3 ตัว นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับพฤติกรรมทางเพศ โดยรวมข้อมูลของระดับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนของหมาในเพศเมียแต่ละตัวจากตัวอย่างอุจจาระที่เก็บในระยะเวลา 1 ปี ไว้ในกราฟเดียวกัน และหาค่าระดับฮอร์โมนต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (low detecting limit) หรือค่า basal line โดยใช้ค่า Mean ± 2 S.D. สำหรับเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเมตาบอไลต์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่วิเคราะห์ได้ในช่วงที่รังไข่ไม่มีการทำงาน (ovarian inactivity) คือ ระยะ anestrus ซึ่งเป็นระยะที่ต่อมาจากระยะ diestrus ระยะนี้เป็นระยะที่ไม่มีกิจกรรมทางเพศและเป็นระยะที่ไม่มีการทำงานของรังไข่ (ovarian inactivity) (18) หมาในเพศเมียตัวที่ 1 คิดค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 6 เมษายน 2551 ถึงวันที่ 30 ธันวาคม 2551 หมาในเพศเมียตัวที่ 2 คิดค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 23 มีนาคม 2551 ถึงวันที่ 5 มกราคม 2552 และหมาในเพศเมียตัวที่ 3 คิดค่า basal line ตั้งแต่วันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2551 ถึงวันที่ 13 เมษายน 2551 วันที่ 3 กรกฎาคม 2551 ถึงวันที่ 31 สิงหาคม 2551 และวันที่ 10 มกราคม 2552 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2552

3.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

3.5.1 เชียงใหม่ไนท์ซาฟารี จังหวัดเชียงใหม่

3.5.2 Conservation and Research Center Smithsonian's Institution National Zoological Park ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.5.3 ห้องปฏิบัติการฮอร์โมน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยใช้ระยะเวลา 2 ปี ดังนี้

3.6.1 เก็บตัวอย่างอุจจาระเป็นระยะเวลา 1 ปี

3.6.2 สกัดตัวอย่างอุจจาระและวิเคราะห์ปริมาณของเมตาบอไลต์ของฮอร์โมน สรุปผลการศึกษาวิจัย และนำเสนอผลงานวิจัยเป็นระยะเวลา 1 ปี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved