

การผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนเพื่อการวิเคราะห์
เรดิโออิมมูโนโนแอสเซ

1. การเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมน
โปรเจสเตอโรนในไก่, กระจ่าง และหนูตะเภา.

พทนาย พงษ์พิชัยจันทร์ ¹ และ พัทธิดา พงษ์พิชัยจันทร์ ¹

ANTIBODY PRODUCTION AGAINST HORMONES FOR
RADIOIMMUNOASSAY

I. COMPARISON AMONG CHICKEN, RABBIT AND
GUINEA PIG IN ANTIBODY PRODUCTION AGAINST
PROGESTERONE.

Petai Pongpiachan ¹ and Puntipa Pongpiachan ¹

ABSTRACT : The current experiment aim to raise antisera against progesterone in chicken, rabbit and Guinea pig by 11 Alpha-Hydroxyprogesterone-hemisuccinate-Bovine Serum Albumin to which self-prepared (Conjugate P) and external source (Conjugate S) were also assessed. The experiment were conducted at Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. Nine each of ISA Brown layer, Native x New Zealand White rabbit and Guinea pigs were used. Within each species, 3 animals per group were immunized with Freund's Complete Adjuvant (FCA) only, FCA + 20 microgram Conjugate P, and FCA + 20 microgram Conjugate S by subcutaneous injection at 3 points along the mid-line of the back. Number of immunization were 4 times at 2 weeks interval. The result showed that rabbits were capable of producing the antibody better than chicken and Guinea pig. Rabbit and chicken produced greater amount of antibody when immunized with Conjugate P in comparison with Conjugate S while Guinea pig responded better to Conjugate S. However, there was individual variation within species in the antibody production. The

¹ ภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50002.

¹ Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50002, THAILAND.

achievement of the present experiment are as : (1) availability of antibody to progesterone for further radioimmunoassay (2) conjugation technique between steroid and protein for future active immunization experiment.

บทคัดย่อ : เป้าหมายของการทดลองเป็นการพัฒนาเทคนิคการผลิตแอนติบอดี (Antibody) ต่อต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) จากไก่ไข่, กระต่าย และ หนูตะเภา (Guinea pig) ด้วยแอนติเจน (Antigen) ชนิด 11 Alpha-Hydroxyprogesterone hemisuccinate-Bovine Serum Albumin ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และที่สั่งซื้อจากบริษัท. ทำการทดลองที่ภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. สัตว์ทดลองเป็นไก่ไข่สายพันธุ์ ISA Brown 9 ตัว, กระต่ายลูกผสมพื้นเมือง x นิวซีแลนด์ไวท์ 9 ตัว และ หนูตะเภา (Guinea pig) 9 ตัว. แบ่งสัตว์ทดลองแต่ละชนิดเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 3 ตัว กลุ่มการทดลองประกอบด้วย กลุ่มควบคุม, กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเอง (Conjugate P) และแอนติเจนที่สั่งซื้อจากบริษัท (Conjugate S). การกระตุ้นใช้แอนติเจน 20 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS + Freund's Complete Adjuvant (FCA) (อัตราส่วน 1:2) ต่อครั้ง จำนวน 4 ครั้ง ระยะเวลาห่างกัน 2 สัปดาห์. ผลปรากฏว่า กระต่ายมีการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่าไก่ไข่และหนูตะเภา. กระต่ายและไก่ไข่ตอบสนองต่อ Conjugate P ได้ดีกว่า Conjugate S แต่หนูตะเภาตอบสนองต่อ Conjugate S ได้ดีกว่า Conjugate P. อย่างไรก็ตาม โดยภาพรวมสัตว์แต่ละชนิดมีความเหมือนกันที่บางตัวตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดี ในขณะที่บางตัวตอบสนองน้อยมาก.

คำนำ

โปรเจสเตอโรน (Progesterone) เป็นฮอร์โมนที่จัดอยู่ในกลุ่มสเตอรอยด์ (Steroid hormone) มีแหล่งผลิตจากรังไข่ (Ovary), รก (Placenta), อัณฑะ (Testis) และต่อมหมวกไตส่วนนอก (Adrenal cortex) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammal) (Zarrow, Yochim, McCarthy และ Sanborn, 1964). เป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์กระตุ้นให้มดลูก (Uterus) เตรียมพร้อมสำหรับการตั้งครรภ์ โดยเพิ่มความหนาของมดลูกชั้น Endometrium และชะงักการบีบตัวของชั้น Myometrium (Reeves, 1987) จึงเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมรอบการสืบพันธุ์ (Reproductive cycle) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม. ดังนั้น ถ้าสามารถวัดความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดหรือในน้ำนม จะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์สัตว์ในแง่ช่วยตรวจสอบความแม่นยำในการตรวจการแสดงการเป็นสัด (Oestrus) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, ศึกษาการเป็นสัด (Oestrous cycle), ตรวจการตั้งครรภ์ (อ้างอิงโดย พงษ์เพียจันทร์ และ อภิชิตสร่างกูร, 2533) และ การตรวจการทำงานของรังไข่หลังคลอด. เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในพลาสมา (Plasma) ของโควันที่ 10 และ 16 ของรอบการเป็นสัดมีค่า 5 และ 7 นาโนกรัม/มล. และต่ำกว่า 1 นาโนกรัม/มล. ในช่วงการเป็นสัด (อ้างอิงโดย Henricks และ Mayer, 1977) จะเห็นได้ว่าระดับโปรเจสเตอโรนในร่างกายสัตว์มีค่ามาก. วิธีการหนึ่งที่สามารถวัดระดับฮอร์โมนที่มีในความเข้มข้นต่ำมากคือ เรดิโออิมมูโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA) ที่อาศัยความจำเพาะของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (Antigen) และแอนติบอดี (Antibody) (Antigen-antibody complex) (Dobson, 1983 และ IAEA, 1984). ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพื่อการวิเคราะห์ RIA นั้น โปรเจสเตอโรนโดยตัวมันเองไม่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้เพราะเป็นแฮพเพน (Hapten) จะ

ต้องเชื่อมต่อ (Conjugate) กับสารโมเลกุลใหญ่ เช่น Bovine Serum Albumin (BSA) เสียก่อน จึงจะสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อต้านตัวมันได้ (Erlanger, Borek, Beiser และ Lieberman, 1957 และ 1959; Lindner, Perel, Friedlander และ Zeithlin, 1972; Dobson, 1983).

ดังนั้น การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนระหว่าง ไก่, กระต่าย และหนูตะเภา (Guinea pig) เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาเทคนิคโออิมมูโนโนแอสเซตต่อไป.

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองประกอบด้วย ไก่ไข่สาวสายพันธุ์ ISA Brown อายุ 22 สัปดาห์, กระต่าย ลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมือง กับนิวซีแลนด์ ขาว (New Zealand White) และ หนูตะเภา (Guinea pig) อย่างละ 9 ตัว รวม 27 ตัว ไก่และกระต่ายถูกเลี้ยงในกรงเดี่ยว (Individual cage) ส่วนหนูตะเภาเลี้ยงแบบขังฝูงมีวัสดุรองพื้นคอก (Litter) น้ำและอาหารมีให้กินตลอดเวลา การทดลองเริ่มวันที่ 13 สิงหาคม 2533 เสร็จวันที่ 29 ตุลาคม 2533 สัตว์แต่ละชนิดถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 3 ตัว สุ่มเข้าสู่วิจัยทดลองประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (Control) กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย Adjuvant เพียงอย่างเดียว, กระตุ้นด้วย Adjuvant + 11 Alpha-Hydroxyprogesterone hemisuccinate-Bovine Serum Albumin หรือ Progesterone-11-HS-BSA ที่ Conjugate ระหว่าง 11 Alpha-Hydroxy progesterone hemisuccinate กับ Bovine Serum Albumin ขึ้นเองต่อไป เรียกว่า Conjugate P และกลุ่มสุดท้ายเป็น Adjuvant + Progesterone-11-HS-BSA ที่สั่งซื้อจากบริษัทต่อไปนี้เรียก Conjugate S.

การเตรียมแอนติเจนใช้วิธีของ Erlanger *et al.* (1957 และ 1959); Lindner *et al.* (1972) และ Dobson (1983) กล่าวโดยสรุปดังนี้ : จากแผนผังวิธีการในรูปที่ 1 ละลาย 11-Alpha-Hydroxyprogesterone Hemisuccinate (Sigma) 25 มก. ใน Dimethyl formamide (Sigma) 2.25 มล. จากนั้นเติม 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl-carbodiimide) (Sigma) 25 มก. ในน้ำกลั่น 2.5 มล. เสร็จแล้วปั่นด้วยเครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer, Vortex-Genie; โมเดล K550-GE; LABINCO) นาน 20 นาที ต่อมาเติม Bovine Serum Albumin (BSA) 50 มก. ที่ซึ่งละลายในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) (พวงษ์เพียจันทร์ และอภิชาติสร้างกูร, 2533) 2.5 มล. แล้วแช่หลอดสารละลายในกล่องน้ำแข็ง (Ice-bath) เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker, GFL; Labortechnik M.B.H. & Co.; Germany) เป็นเวลา 3 วัน ทำให้แอนติเจนบริสุทธิ์ด้วยการ Dialyse ใน 0.05 M NaHCO₃ (pH 8) 2 ลิตร 1 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C และในน้ำกลั่น 2 ลิตร, 4 °C อีก 5 วัน โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกวัน จากนั้นทำให้แอนติเจนแห้งที่ความดันบรรยากาศต่ำ (Lyophilization).

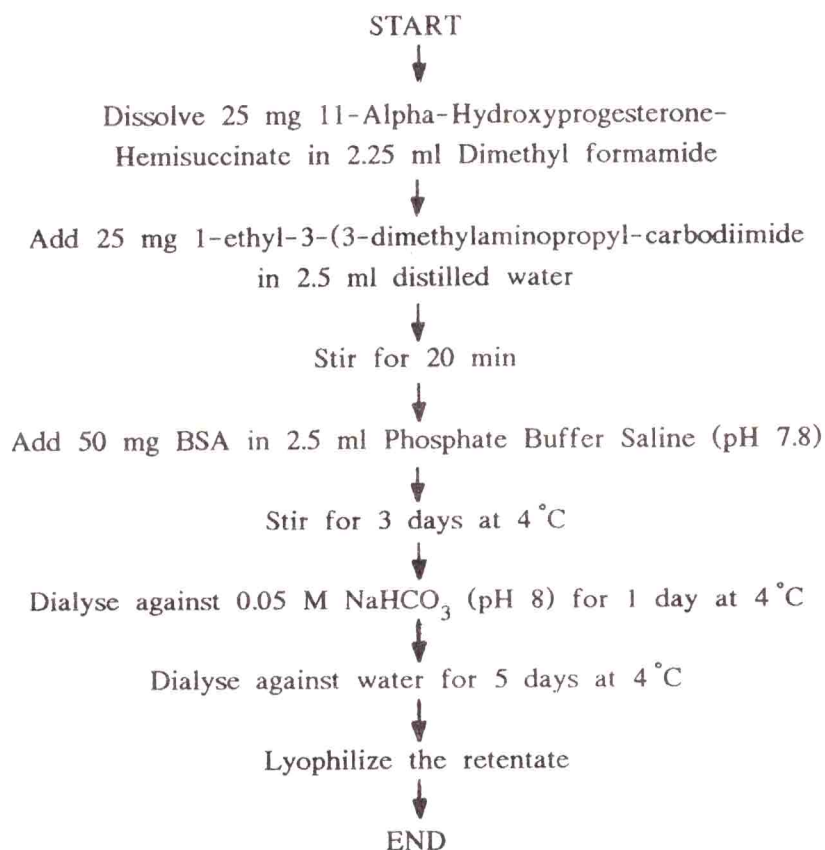


Figure 1. Flow diagram depicted the preparation of Progesterone-11-HS-BSA. (After Lindner *et al.*, 1972).

การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunization) : เตรียมแอนติเจนสำหรับกระตุ้น โดยการผสม (Emulsified) สารละลาย PBS 3.3 มล. กับ Freund's Complete Adjuvant (FCA) 6.6 มล. Progesterone-11-HS-BSA ที่เตรียมขึ้นเอง และที่ซื้อจากบริษัท 200 ไมโครกรัม ใน PBS 3.3 มล. กับ FCA 6.6 มล. สำหรับกลุ่มควบคุม, Conjugate P และ Conjugate S ตามลำดับ. วิธีผสมใช้กระบอกฉีดขนาด 10 มล. ผสมสารละลายแล้วฉีดกลับขึ้นหลอดแก้ว ทำซ้ำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจนกว่าของเหลวจะดูเป็นสีนํ้านมเนื้อเดียวกัน. จากนั้นฉีดให้สัตว์ตามกลุ่มทดลอง ตัวละ 1 มล. สัตว์ในกลุ่ม Conjugate P และ S ได้รับแอนติเจนตัวละ 20 ไมโครกรัม (Vaitukaitis, Robbins, Nieschlag และ Ross, 1971) โดยการแบ่งฉีดตามแนวกลางหลัง 3 จุด คือ หัวไหล่, กลางหลัง และส่วนท้าย. จากนั้นฉีดซ้ำอีก 4 ครั้ง แต่ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ การเตรียมแอนติเจนทำเหมือนครั้งแรก ต่างกันที่ใช้ Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) แทน.

มีการเก็บตัวอย่างเลือดในวันแรกของการทดลอง และทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 12 สัปดาห์ เลือดจากกระต่ายเจาะจากเส้นเลือดที่ใบหู, ส่วนไก่ไข่เจาะจากเส้นเลือดที่ปีก สำหรับหนูตะเภากรีดจากเส้นเลือดที่ใบหู ตัวอย่างเลือดมี Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 2 มก./เลือด 1 มล. เก็บพลาสมา (Plasma) ด้วยเครื่องปั่นแยก (MISTRAL 3000; MSE : ประเทศอังกฤษ) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำพลาสมามาไตเตรท (Titrate) หาอัตราการแข่งขันที่เหมาะสมเมื่อทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ติดฉลากด้วยไตรเทียม [(1, 2, 6, 7-³H)-Progesterone, ³H-P4; Amersham UK] (พงษ์เพ็ญจันทร์ และ อภิชาติสร่างกูร, 2533) ได้อัตราที่เหมาะสมของพลาสมา : PBS เท่ากับ 1 : 2000.

การวัดปฏิกิริยาของแอนติบอดีในพลาสมา กับ ³H-P4 ทำเช่นเดียวกับงานของ พงษ์เพ็ญจันทร์ และอภิชาติสร่างกูร, (2534) โดยยี่ห้อ : ผสม ³H-P4 ที่มี Activity ประมาณ 6,000 cpm, พลาสมาที่เจือจาง 1 : 2000, และ PBS ในปริมาตร 100, 100 และ 300 ไมโครลิตร ตามลำดับ. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แชนเจอร์ใส่หลอดแก้วสำหรับปั่นในเครื่องปั่นไว้ที่อุณหภูมิ -15 °C แชนเจอร์ในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 0 ° ถึง 5 °C เติมน้ำละลายกับมันคาร์บอน (Charcoal suspension) 200 ไมโครลิตร/หลอดทดลอง ทิ้งไว้ 20 นาที บรรจุหลอดแก้วลงในตะกร้านำเข้าเครื่องปั่นแยกที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C ปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นแยกส่วนของเหลวลงในขวดที่ใช้สำหรับการวัดพลังงานของสารรังสี (Vial) เติมน้ำละลายซินติเลเตอร์ (Scintillator) 4 มล. ทิ้งไว้ข้ามคืน นำเข้าเครื่องวัดรังสี 1209 RACKBETA (LKB WALLAC : ประเทศฟินแลนด์) ค่า ซีพีเอ็ม ที่วัดได้นี้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของซีพีเอ็มที่เติม ³H-P4 เพียงอย่างเดียว และเรียกค่านี้ว่า % Binding.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วย Progesterone-11-HS-BSA ในไก่ไข่สายพันธุ์ ISA Brown (รูปที่ 2.) ปรากฏว่า การตอบสนองมีความแปรปรวนขึ้นกับสัตว์แต่ละตัว กล่าวคือ หนึ่งในสามของสัตว์ทดลอง (a, เบอร์ C4 และ C7) ตอบสนองต่อแอนติเจนต่ำสุด ในขณะที่ 2/3 ของสัตว์ทดลองตอบสนองเป็นอย่างดี ไก่ที่ได้รับ Conjugate P มีการผลิตแอนติบอดีในปริมาณสูงสุด 4 สัปดาห์หลังการกระตุ้น (เบอร์ C5 และ C6) ในขณะที่ไก่ที่ถูกกระตุ้นด้วย Conjugate S มีการผลิตแอนติบอดีสูงสุดเมื่อ 10 และ 12 สัปดาห์หลังกระตุ้น ในไก่เบอร์ C9 และ C8 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า Conjugate P มีระยะเวลาระหว่างการเชื่อมต่อโมเลกุล (Conjugate) กับการนำไปใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันสั้นกว่า Conjugate S ก็เป็นไปได้. ส่วนการผลิตแอนติบอดีของกระต่ายมีการตอบสนองต่อ Conjugate P มากกว่า Conjugate S อย่างเด่นชัด (รูปที่ 3.) โดยเฉพาะกระต่ายเบอร์ R5 (a) เริ่มผลิต

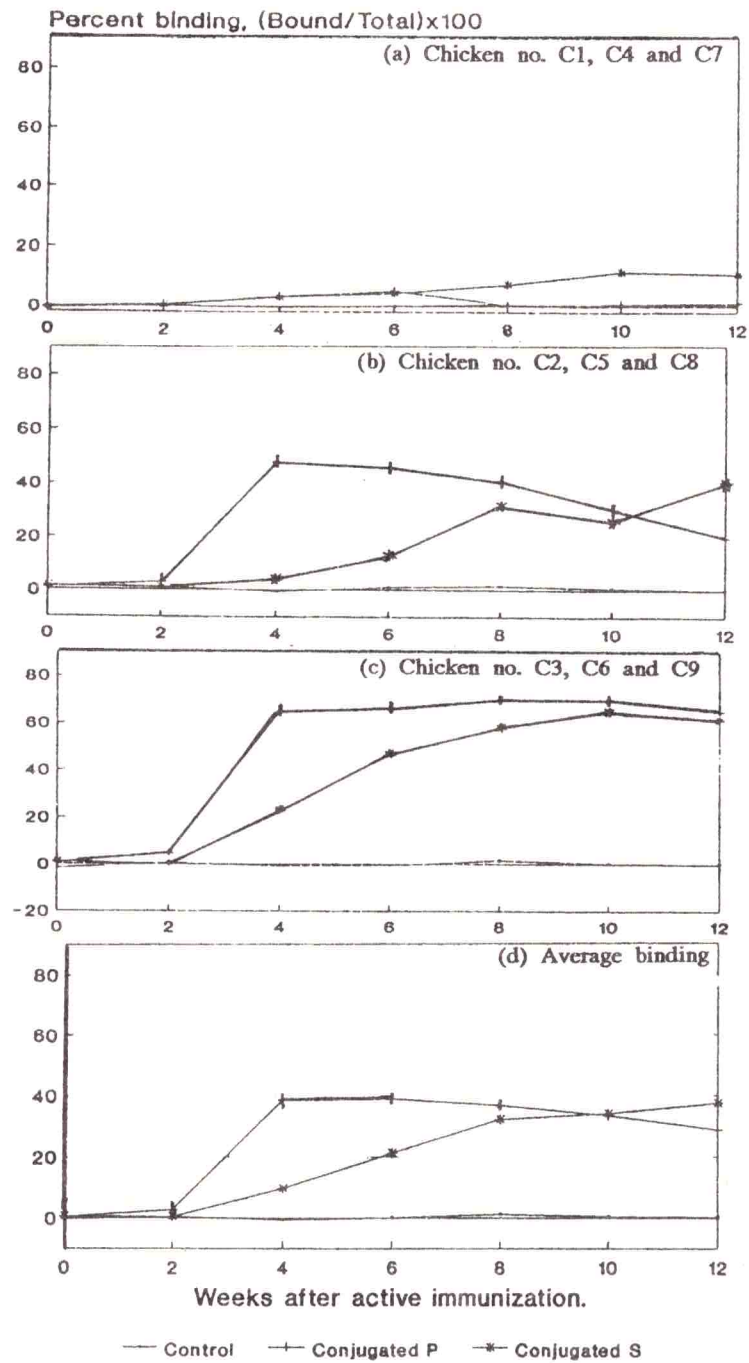


Figure 2. Antigen-antibody complex between ^3H -P4 and antibody from progesterone-11-HS-BSA immunized chicken : Conjugated P = self preparation; Conjugate S = External source; (a) (b) and (c) = individual response; (d) = average response.

แอนติบอดีตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังการกระตุ้น และมีค่าสูงสุดเมื่อ 8 สัปดาห์หลังการกระตุ้น ในขณะที่กระต่ายเบอร์ R8 ที่ได้รับ Conjugate S มีการผลิตแอนติบอดีใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมในกลุ่ม (b) กระต่ายที่ได้รับ Conjugate P (เบอร์ R6) ผลิตแอนติบอดีได้มากกว่า Conjugate S (เบอร์ R9) และมีการผลิตแอนติบอดีสูงที่สุดเมื่อ 6 และ 12 สัปดาห์หลังกระตุ้นในกระต่ายที่ได้รับ Conjugate P และ S ตามลำดับ โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่ากระต่ายตอบสนองต่อแอนติเจนที่เตรียมใหม่ๆ ได้ดีกว่าแอนติเจนที่เตรียมไว้นานแล้ว. สำหรับหนูตะเภา (รูปที่ 4.) การตอบสนองแตกต่างจากไก่ไข่และกระต่ายสองประการ ประการแรก มีการผลิตแอนติบอดีต่อต้านแอนติเจนอย่างรวดเร็วมากเกิดขึ้นเพียง 3 วันหลังการกระตุ้น (กราฟ a และ b) โดยมี Interaction ระหว่างชนิดของ Conjugate และ หนูตะเภาแต่ละตัว หมายความว่า หนูตะเภาตัวหนึ่งตอบสนองต่อ Conjugate ชนิดหนึ่ง อาจจะไม่ตอบสนองต่อ Conjugate อีกชนิดหนึ่งก็ได้ ประการที่สอง หนูตะเภาตอบสนองต่อ Conjugate S ได้ดีกว่า Conjugate P. จากการเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในไก่ไข่, กระต่าย และหนูตะเภา จึงให้เห็นถึงความเหมือนกับตรงจุดที่ว่า สัตว์แต่ละตัวมีความสามารถในการผลิตแอนติบอดีไม่เท่ากัน นอกจากนั้นยังขึ้นกับความใหม่ในการเตรียมแอนติเจนอีกด้วย อีกประการหนึ่ง โดยภาพรวมกระต่ายมีแนวโน้มที่จะผลิตแอนติบอดีได้เร็วและมากกว่าไก่ไข่และหนูตะเภา เมื่อเปรียบเทียบความง่ายในการจะเลือกแล้วน่าจะเลือกใช้กระต่ายเป็นสัตว์ผลิตและแอนติบอดีสำหรับงานเรดิโออิมมูโนโนแอสเซซ.

งานทดลองครั้งนี้ นอกจากเป็นการพัฒนาการเตรียมแอนติบอดีเพื่อการวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เพื่องานปรับปรุงประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงแล้ว ยังเป็นพื้นฐานสำหรับการประยุกต์เทคนิคการเชื่อมต่อสเตอรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormones) กับโปรตีนขนาดใหญ่ ในทำนองเดียวกันกับงานทดลองครั้งนี้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยง ดังผลงานของ Cox และ Wilson (1976) ที่ลดผลเสียอันเกิดกับแกะ เนื่องจากการกินเอสโตรเจนที่มีอยู่ในพืชอาหารสัตว์ (Phyto-oestrogen) ด้วยการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่มี Phyto-oestrogen Haptens; Cox *et al.* (1982) ใช้แอนติเจนชนิด Oestrone-6-Carboxymethyloximino : human serum albumin, Oestrone-3-carboxymethylether : HSA และ Testosterone-3-carboxymethylo-ximino : HSA ในการเพิ่มอัตราการเกิดลูกแฝดในแกะ, Kamonpatana *et al.* (1985) ใช้ Testosterone-3-CMO-HSA เป็นแอนติเจนในการปรับปรุงความสมบูรณ์พันธุ์ของกระบือปลักเพศเมีย กลุ่มที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ (Subfertile buffalo) ให้ดีขึ้น และ Quirke *et al.* (1986) ที่ใช้ Androstenedione-7-human serum albumin เป็นแอนติเจนกระตุ้นให้แกะมีการตกไข่เพิ่มขึ้น.

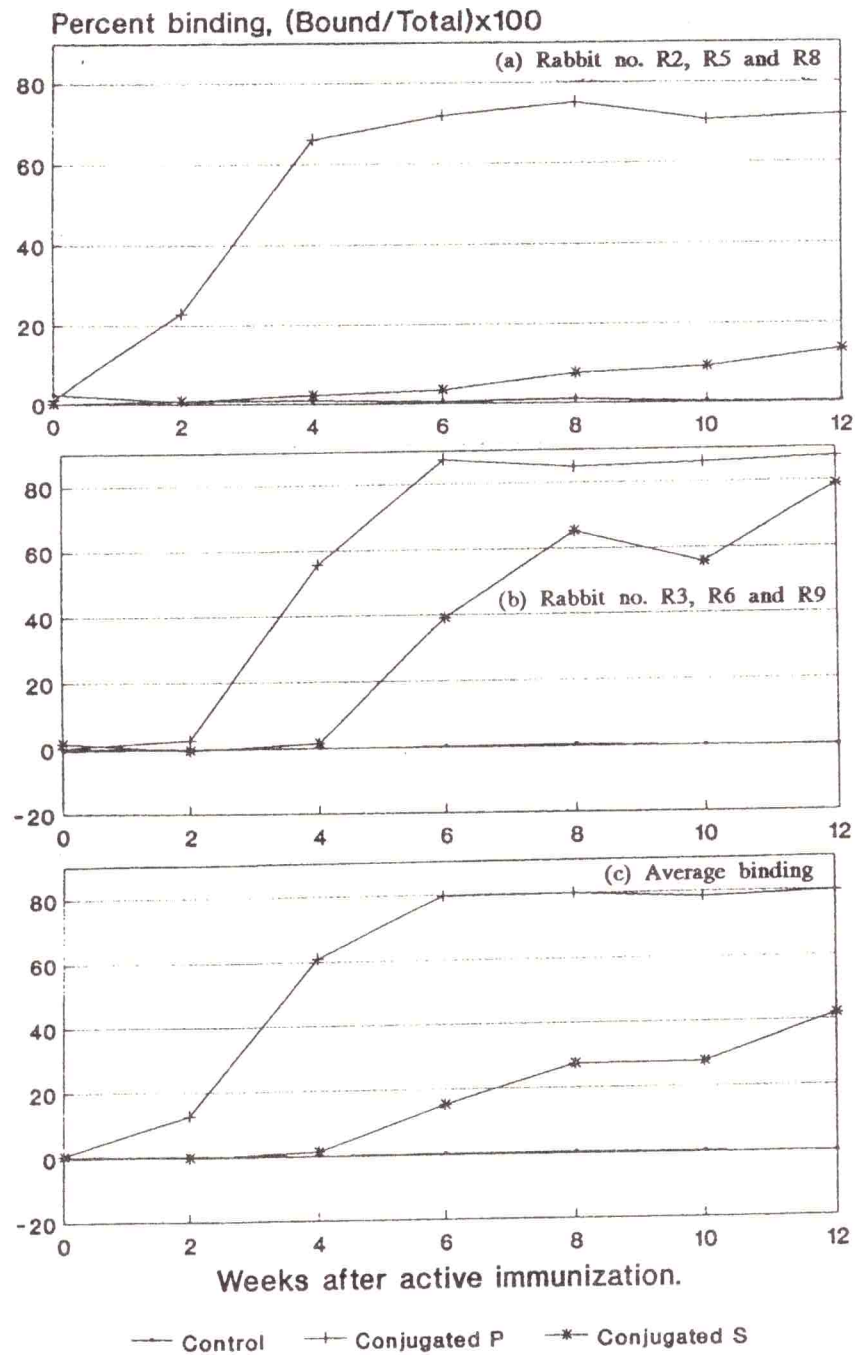


Figure 3. Antigen-antibody complex between ^3H -P4 and antibody from progesterone-11-HS-BSA immunized rabbit : Conjugated P = self preparation; Conjugate S = External source; (a), (b) and (c) = individual response; (d) = average response.

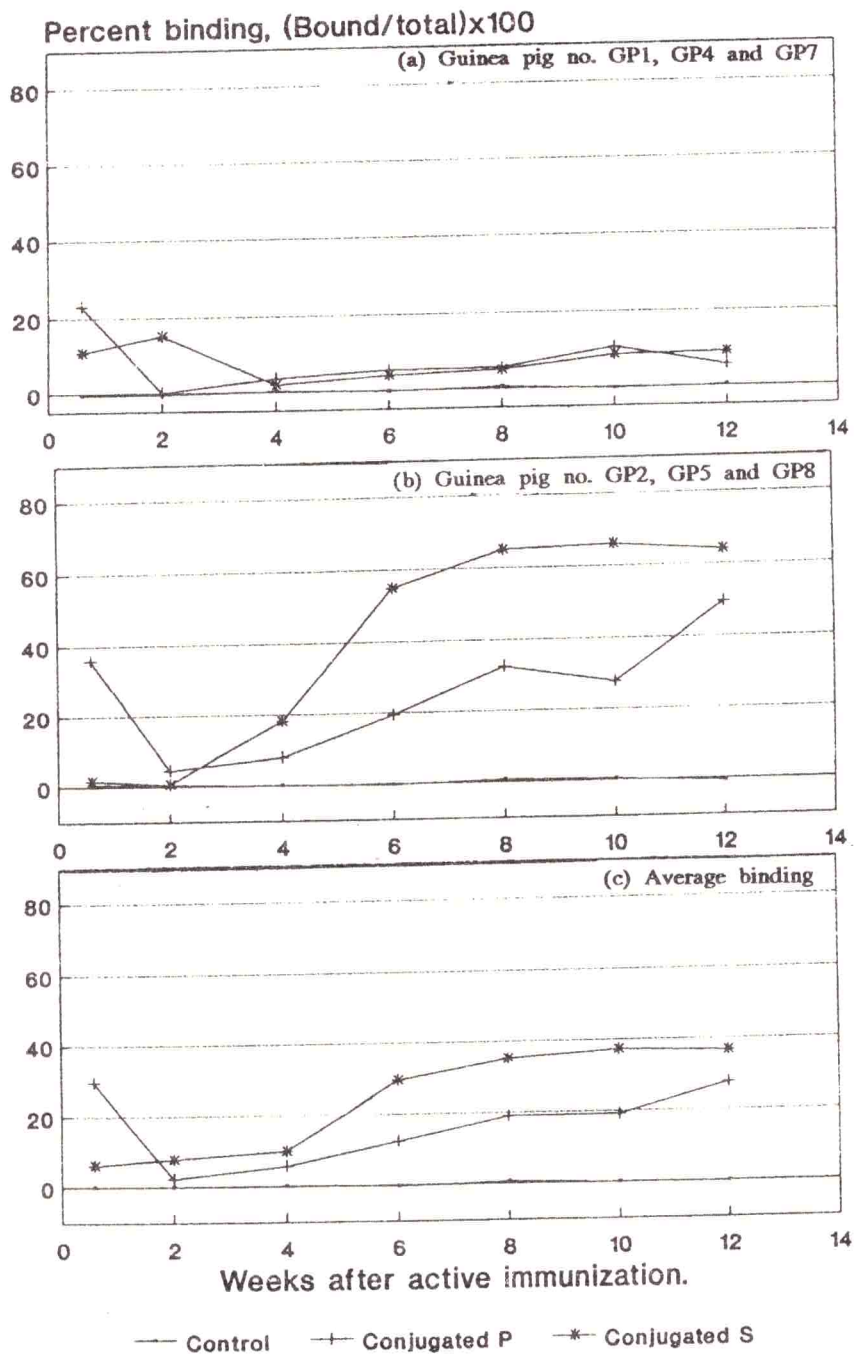


Figure 4. Antigen-antibody complex between ^3H -P4 and antibody from progesterone-11-HS-BSA immunized Guinea pig : Conjugated P = self preparation; Conjugate S = External source; (a), (b) and (c) = individual response; (d) = average response.

สรุปผลการทดลอง

จากการใช้แอนติเจน Progesterone-11-HS เชื่อมกับ BSA ในห้องปฏิบัติการของภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และแอนติเจนชนิดเดียวกันที่ส่งจากบริษัทกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ปรากฏว่า มีการผลิตแอนติบอดีได้ดีในกระจ่าง, ไก่ไข่ และหนูตะเภา ตามลำดับ โดยที่กระจ่างและไก่ตอบสนองต่อแอนติเจนที่เตรียมขึ้นเองได้ดีกว่าชนิดที่ส่งเข้ามา ส่วนหนูตะเภา นั้นกลับตอบสนองต่อแอนติเจนจากบริษัทได้ดีกว่าที่เตรียมขึ้นเอง. โดยภาพรวมการทดลองครั้งนี้สามารถผลิตแอนติบอดีได้เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยวิธี RIA.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย, ประจำปี 2533, จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่. โดยการสนับสนุนของภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มีสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ และคุณอดุง ศิลป์ประเสริฐ อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์. คุณชาติ ทองอินทร์ ผู้ช่วยงานวิจัยตลอดการทดลอง คุณอัญชลี นากา ผู้ช่วยงานพิมพ์ต้นฉบับ จึงขอขอบคุณสถาบันและบุคคลที่ได้เอื้อถึงมา ณ ที่นี้.

เอกสารอ้างอิง

- พงษ์เพ็ญจันทร์, เพทาย และ อภิชาติสว่างกูร, พศนัย. (2533). การประเมินประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมโดยวิธีเรดิโออิมมูโนโนแอสเซ. วารสารเกษตร 6(1):21-40.
- Cox, R.I. and Wilson, P.A. (1976). Effects of immunizing sheep to steroid oestrogens and phyto-oestrogens. J. Reprod. Fert. 46:524.
- Cox, R.I. and Wilson, P.A., Scaramuzzi, R.J., Hoskinson, R.M., George, J.M. and Bindon, B.M. (1982). The active immunization of sheep against oestrone, androstenedione or testosterone to increase twinning. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 14:511-514.
- Dobson, H. (1983). A Radioimmunoassay Laboratory Handbook. Liverpool University Press, Liverpool.
- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. and Lieberman, S. (1957). Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J. Biol. Chem. 228:713-727.
- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. and Lieberman, S. (1959). Steroid-protein conjugates. II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone, and estrone. J. Biol. Chem. 234:1090-1094.

- Henricks, D.M. and Mayer D.T. (1977). Gonadal hormones and uterine factors. In : *Reproduction in Domestic Animals*. Cole, H.H. and Cupps, P.T. (eds.). Academic Press, New York. p. 79-117.
- International Atomic Energy Agency. (1984). *Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction*. Technical Reports Series No. 233. IAEA, Vienna.
- Kamonpatana, M., Timsard, V., Pansin, C. and Cox, R.I. (1985). Steroid immunization in the swamp buffalo : Potential for subfertile recovery. *Buffalo J.* 1:53-60.
- Lindner, H.R., Perel, E., Friedlander, A. and Zeitlin, A. (1972). Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier. *Steroids* 19:357-375.
- Quirke, J.F., Hanrahan, J.P., Tait, A.J. and Kilpatrick, M.J. (1986). Effects of active immunization against androstenedione on ovulation rate and fecundity in Galway and Finish Landrace sheep. *Livest. Prod. Sci.* 15:27-37.
- Reeves, J.J. (1987). Endocrinology of reproduction. In : *Reproduction in Farm Animals*. Hafez, E.S.E. (ed.). Lea and Febiger, Philadelphia. p. 85-129.
- Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. and Ross, G.T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocr.* 33:988-991.
- Zarrow, M.X., Yochim, J.M., Mc Carthy, J.L. and Sanborn, R.C. (1964). *Experimental Endocrinology : A Sourcebook of Basic Techniques*. Academic Press, New York. p. 65-108.
-