ภาคผนวก

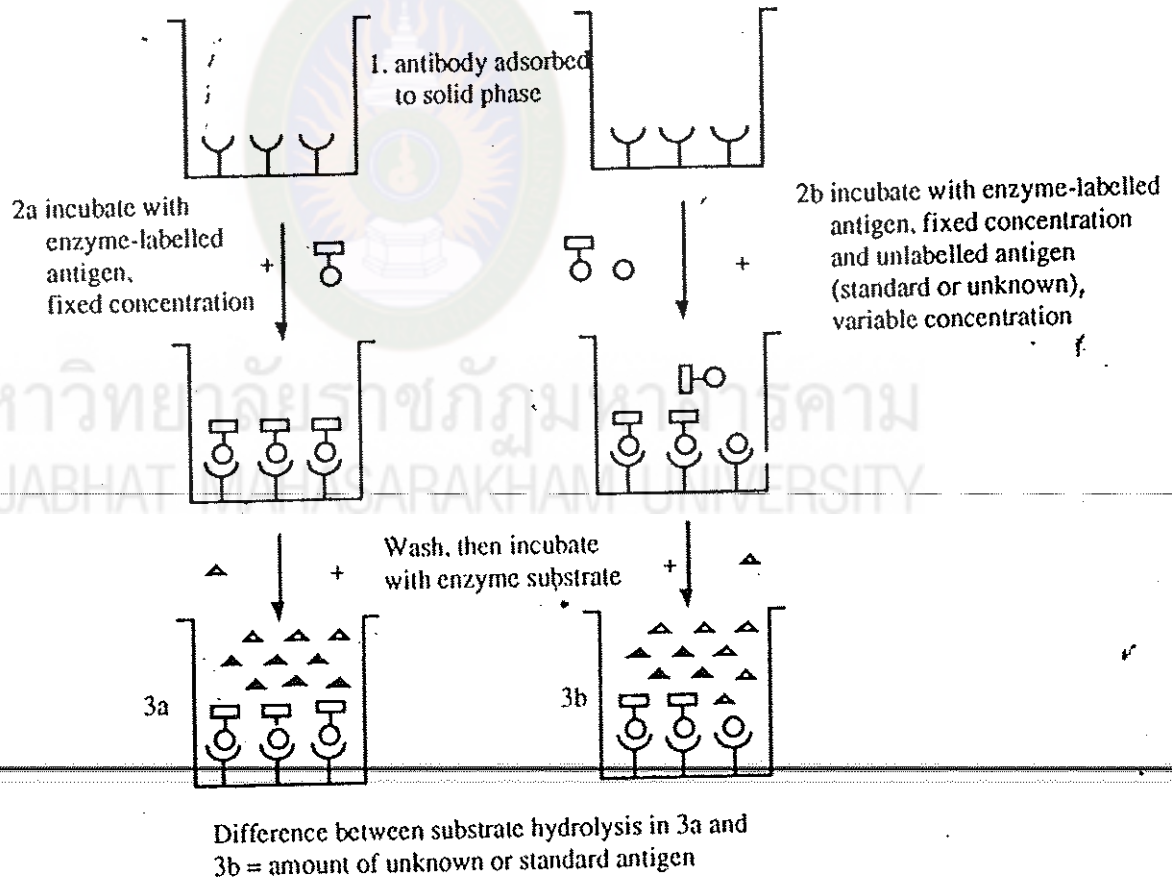
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การวิเคราะห์ฮอร์โมน P4 ด้วยวิธี Competitive ELISA ตามวิธีการของ Crane, et al. (2006)

หลักการของ competitive ELISA

เป็นวิธีการทดสอบซึ่งมีหลักการเหมือน competitive RIA แบบที่เป็น solid phase assay ในการทดสอบอาจใช้แอยติเจนติดฉลากด้วยเอ็นไซม์หรือใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ก็ได้

ในกรณีที่ใช้แอนติเจนติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ วิธีการทดสอบมีหลักการคือ ทำให้แอนติบอดีติดกับพื้นผิวของวัสดุแข็ง ให้แอนติเจนที่ต้องการทดสอบแย่งกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าว ถ้าแอนติเจนที่ทดสอบมีมากก็จะแย่งจับกับแอนติบอดีได้มาก ทำให้มีแอนติเจนติดฉลากจับอยู่กับแอนติบอดีบนพื้นผิวของวัสดุน้อย (ดังรูปที่ 1)



มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
RAJABHAT NAKHONPATHOM UNIVERSITY

รูปที่ 1. หลักการของ Competitive enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อการหาแอนติเจนโดยใช้ enzyme – linked antigen

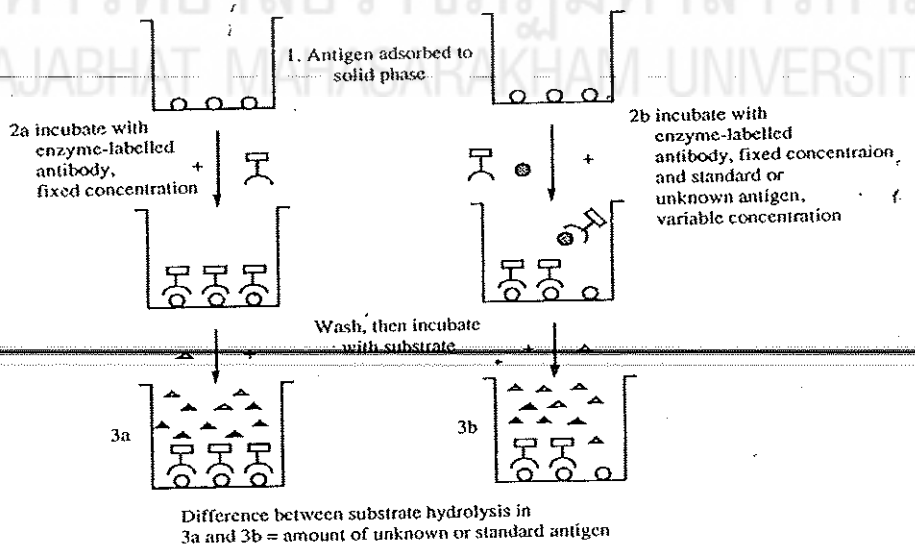
ที่มา : อารินี, (2546)

ในการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่ติดฉลากนี้ไม่มีผลทำให้หน้าที่ของเอ็นไซม์ที่ใช้ในวิธีการทดสอบนี้เปลี่ยนแปลงไป หลังจากล้างเอาแอนติเจนติดฉลากที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีบนพื้นผิววัสดุแข็งนั้นออกไปแล้ว เติม substrate การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนที่ต้องการทดสอบนั้น

ในการทดสอบเพื่อหาปริมาณของแอนติเจนด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องสร้างเส้นโค้งมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของ substrate กับแอนติเจนมาตรฐานปริมาณต่างๆ เพื่อใช้ในการอ่านค่าของปริมาณแอนติเจนที่ต้องการทราบด้วย ทำนองเดียวกับ competitive RIA

ในกรณีที่ใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ หลักการของการทดสอบคือ ทำให้แอนติเจนติดกับพื้นผิวของวัสดุแข็ง และให้แอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณแย่งกับแอนติเจนที่ติดกับพื้นผิวนี้ในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ซึ่งเติมลงไปให้ทำปฏิกิริยา ถ้าแอนติเจนที่นำมาทดสอบมีปริมาณมากจะยับยั้งการจับของแอนติบอดีติดฉลากกับแอนติเจนบนพื้นผิววัสดุได้มาก ทำให้แอนบอดีติดฉลากจับกับแอนติเจนบนพื้นผิวได้น้อยลง ดังนั้นจึงมีเอ็นไซม์คงติดอยู่กับพื้นผิววัสดุได้น้อย และมีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงของ substrate ที่เติมลงไปหลังจากแยกเอาแอนติบอดีติดฉลากที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนบนพื้นผิวออกแล้วนั้นเกิดได้น้อยด้วย ในการทดสอบนี้การเปลี่ยนแปลงของ substrate จึงเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของแอนติเจนที่นำมาทดสอบเช่นกัน (ดังรูปที่ 2)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



รูปที่ 2. หลักการของ Competitive enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อการหาแอนติเจนโดยใช้ enzyme – labelled antibody

ที่มา : อารินี, (2546)

รูปที่ 3 เครื่อง shaker

4. เตรียมตัวอย่างสกัดแล้วที่แห้งจนสนิท มาเติม 0.1% gelatin ขนาด 0.5 ml

บ่ม 37 C นาน 10 นาที

↓

เขย่าด้วยเครื่อง vertexer

↓

บ่ม 37 C นาน 10 นาที

↓

เขย่าด้วยเขย่า

5. เตรียม standard curve P4 ตาม concentrate (ng/ml) ที่เตรียมไว้ 10, 5, 2.5, 1.25, 0.61, 0.32, 0.16, 0.078, 0.038 โดยการทำทุกครั้งจะต้องทำ standard curve ทุกครั้ง
6. เติมตัวอย่างและ standard curve ในจาน 96 หลุม(plates 96 wells) ขนาด 100 µl/well
7. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1.30 ชั่วโมง
8. เติม P3-P4-HRP (Horsr Radish Peroxidase) ขนาด 50 µl/well นำไปเขย่าที่ด้วยเครื่อง shaker นาน 1.30 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างอีก 4 ครั้ง
9. เติม substrate ขนาด 125 µl/เติม substrate ขนาด 125 µl/well
10. เติม stop solution ขนาด 50 µl/well
11. อ่านผลด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Microplate-reader) โดยmode 4 ที่ความยาวคลื่นแสง (OD 450 and 600 nm)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รูปที่ 4 เครื่อง Microplate-reader

วิธีการสกัดตัวอย่างซีรั่ม

1. ดูดตัวอย่างซีรั่ม ขนาด 200 µl เติมลงไปในหลอดขนาด 1.5 ml.
2. เติม petroleum ether ขนาด 3 ml/หลอด
3. เขย่าด้วยเครื่อง Multi-tube vortex นาน 3 นาที
4. นำไปแช่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งแห้งกับ Methanol จนกว่าตัวอย่างซีรั่มจะตกตะกอน แล้วเทส่วนใสด้านบนเก็บไว้ในหลอดขนาด 5 ml. (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
5. นำส่วนใสที่ได้ตั้งทิ้งไว้ในตู้ปลอดเชื้อจนกว่าจะแห้ง ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมน P4

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตัวอย่างจานหลุม 96 หลุม

B0	**$P_4$10**	**$P_4$5**	**$P_4$2.5**	**$P_4$1.25**	**$P_4$0.63**	**$P_4$0.31**	**$P_4$0.16**	**QCL**	**QCH**	**B0**	**NSB**
B0	**$P_4$10**	**$P_4$5**	**$P_4$2.5**	**$P_4$1.24**	**$P_4$0.63**	**$P_4$0.31**	**$P_4$0.16**	**QCL**	**QCH**	**B0**	**NSB**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
13	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**
13	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**
QCL	**QCH**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**NSB**
QCL	**QCH**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**NSB**