บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 สารเคมี:

- โบวาย ซีรั่ม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA, Sigma A2153)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรท (sodium hydrogen phosphate-12-hydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$, Riedel-de Haen 30414)
- โพแทสเซี่ยมคลอไรด์ (potassium chloride, KCl, Riedel-de Haen 31248)
- ไดไฮโรเจนฟอสเฟต (dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, Merck Art. 4873)
- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl, Fuka biochemival)
- โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)
- โซเดียมเอไซด์ (sodium azide, NaN_3, Fuka biochemival)
- ซาโปนิน (saponin, Sigma S4521)
- โอ-ฟลีนิลลีล-ไดอามีน-เฮสซีแอล (O-phenylene-diamine-HCl, OPD, Zymed Laboratoriees, Inc. USA);
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminiopropyl)-carbodiimide (Sigma, C7625)
- โซเดียม ไฮโดรเจน คาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, $NaHCO_3$, Riedel-de Haen 31437)
- เจลลาติน (gelatin, Merck Art. 4070)
- ไดโซเดียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต โมโนไฮเดรท (disodium phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.H_2O$, Merck Art. 6345)
- ซิตริค แอซิค (citric acid, Sigma C2270)
- มิเนอรอล ออย (mineral oil, Sigma M3516)
- โพลีเอทิลลีล ซาร์บิแทน ไมโอโนลอเรต (polyethylene sarbitan mionolaurate
- ทวีน 80 (Tween 80, Sigma P-1754)
- ซัลฟูริค แอซิค (sulfuric acid, H_2SO_4, J.T. Baker)
- โซมาโตสะแตติน (somatostatin, SRIF, Sigma 66H05841)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

- ซิลเวอร์ ไนเตรท (silver nitrat, Merck K23413312)
- ฮอสแรดิท เปอร์ออกสิเดส (horseradish peroxidase, HRP, Sigma, P-6782)
- ไดเมธิลฟอร์มาไมด์ (N,N-Dimethyl-formide)
- แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$)
- วัคซีนหลอดลมอักเสบ และนิวคาสเซิล (Fort Dodge Animal Health, 11-19)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ:

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrometer, BECKMAN DU750 Spectrophotometer)
- เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-500 GE บริษัท Labinco
- เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) โมเดล Mistral 3000 บริาท MSE Co. ประเทศอังกฤษ
- เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 4 ตำแหน่ง) โมเดล 2842 บริษัท Sartorius GmBH ประเทศเยอรมัน
- เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL Type 3015 บริษัท Gesellschaff fur Labortechnik m.b. H&Co. ประเทศเยอรมัน
- ไมโครปิเปต (micropipet) ขนาด 5,000, 1,000, 200, 100 และ 50 ไมโครลิตร บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
- Dialysing tube (ไม่ให้สารที่มีโมเลกุลตั้งแต่ 12,000 ขึ้นไปผ่าน) บริษัท Viskase ประเทศสหรัฐอเมริกา
- หลอดทดลองขนาด 10x75 มม.
- เครื่องไมโครเพต รีดเดอร์ (micro reader, multiscan, MCC/340P vertion 2.33, Titertek multiscan) บริษัท ICN ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3-way stopcock บริษัท Nipro Medical Industry Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
- ไมโครเพรท 96 หลุม (microplate) แบบ Nunc-Immuno™ Plate บริษัท Nalge Nunc International. ประเทศเดนมาร์ก
- เข็มเบอร์ 23 (23G x 11/2") Nipro®
- หลอดฉีดยา ขนาด 12.5 มล; dryer National® ประเทศไทย
- combitips ขนาด 12.5 มล. บริษัท Eppendorf ประเทศเยอรมัน
- ตู้อบ (incubator, Model 3194, serial No. 35305-398, Forma Scientific)
- เวอร์เนียร์ คาลิเปอร์ (Vernier caliper, Kern Germany)

3.2 สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

ใช้ไก่พันธุ์พื้นเมืองซื้อมาจากหมู่บ้านในอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ อายุประมาณ 2 เดือน จำนวน 20 ตัว มีน้ำหนักเริ่มต้น เฉลี่ย ± SE (range, n) เป็น 592.0 ± 30.6 (340-770, 20) กรัม แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control) เพศผู้หนัก 688.0 ± 32.3 (570.0-750.0, n=5) กรัม กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มควบคุมเพศเมียหนัก 458.0 ± 52.1 (340.0-630.0, n=5) กรัม ส่วนกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มทดลอง (treatment) เพศผู้หนัก 663.3 ± 51.0 (490.0-770.0, n=6) กรัม และกลุ่มที่สี่เป็นกลุ่มทดลอง เพศเมียหนัก 532.0 ± 43.7 (410-600, n=4) กรัม. ขังเดี่ยวในกรงตับ ยกพื้น ขนาด 15x45x30 ซม. (กว้างxยาวxสูง) (ภาพที่ 3) ก่อนการทดลองสองสัปดาห์ทำวัคซีนหลอดลมอักเสบและนิวคาส-เซิล 1 ครั้งโดยวิธีหยอดจมูก มีน้ำให้กินตลอดเวลา อาหารให้ตามสูตรแสดงในตารางที่ 3 ประกอบด้วย: โปรตีน 16.0 %, ไขมัน 4.9 %, เยื่อใย 4.7 % และพลังงานในรูป Metabolizable energy (ME) 2786 กิโลแคลอรี่/กก. โดยไก่แต่ละตัวได้รับอาหารประมาณ 120 กรัม/ตัว/วัน ไก่ทดลองได้รับแสงสว่างตามธรรมชาติในช่วงการทดลองระหว่าง เดือนมิถุนายน ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2543 เลี้ยงที่ ตำบลแม่เหี้ยะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ โดยออกแบบการทดลองและวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD)

หนูขาว (Wistar Stain) อายุประมาณ 1 เดือน จำนวน 20 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆละ 5 ตัว เลี้ยงในกรงขังเดี่ยว กลุ่มที่หนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control) เพศผู้หนัก 129.0 ± 1.9 (n=5) กรัม กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มควบคุมเพศเมียหนัก 121.0 ± 1.9 (n=5) กรัม ส่วนกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มทดลอง (treatment) เพศผู้หนัก 117.0 ± 2.0 (n=5) กรัม และกลุ่มที่สี่เป็นกลุ่มทดลอง เพศเมียหนัก 120.0 ± 1.6 กรัม (n=5) มีน้ำให้กินตลอดเวลา หนูได้รับอาหารวันละ 2 ครั้งๆ ละ ประมาณ 60 กรัม หนูทดลองได้รับแสงสว่างตามธรรมชาติ 12 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง ในช่วงการทดลองระหว่างเดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2545 เลี้ยงที่ห้องสัตว์ทดลอง ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่เชียงใหม่ โดยออกแบบการทดลองและวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

ภาพที่ 3. แสดงกรงตับขังเดี่ยวแถวคู่ ขนาดกรง 15x45x30 ซม. (กว้างxยาวxสูง) ต่อไก่ทดลองหนึ่งตัว.

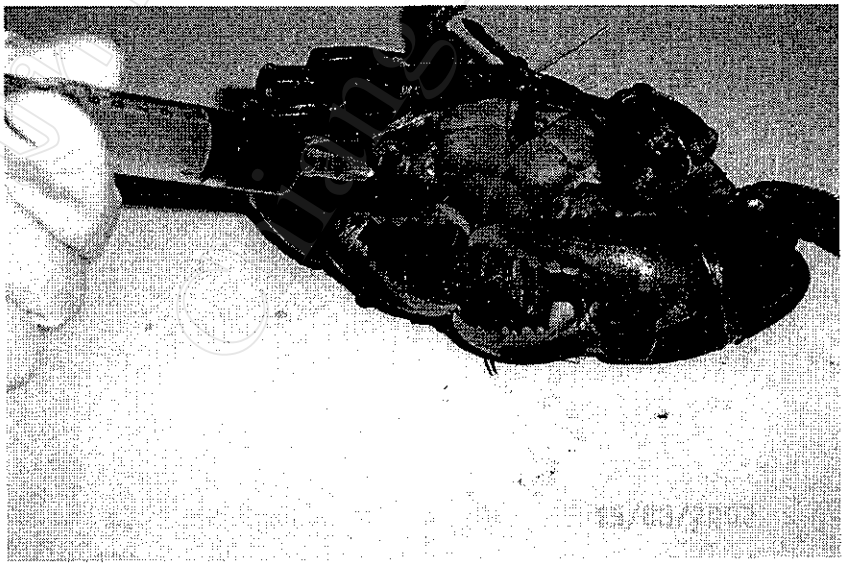
ตารางที่ 3. แสดงสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงไก่ทดลอง

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กก.)
ข้าวโพด	51.0
รำละเอียด	18.0
กากถั่วเหลือง	18.5
ปลาป่น (60 เปอร์เซ็นต์)	3.0
เปลือกหอย	8.0
ไดแคลเซี่ยมฟอสเฟต	1.0
เกลือ	0.1
ดีแอล-เมทไทโอนีน	0.1
น้ำมันถั่วเหลือง	0.2
พรีมิกซ์	0.25
รวม	100

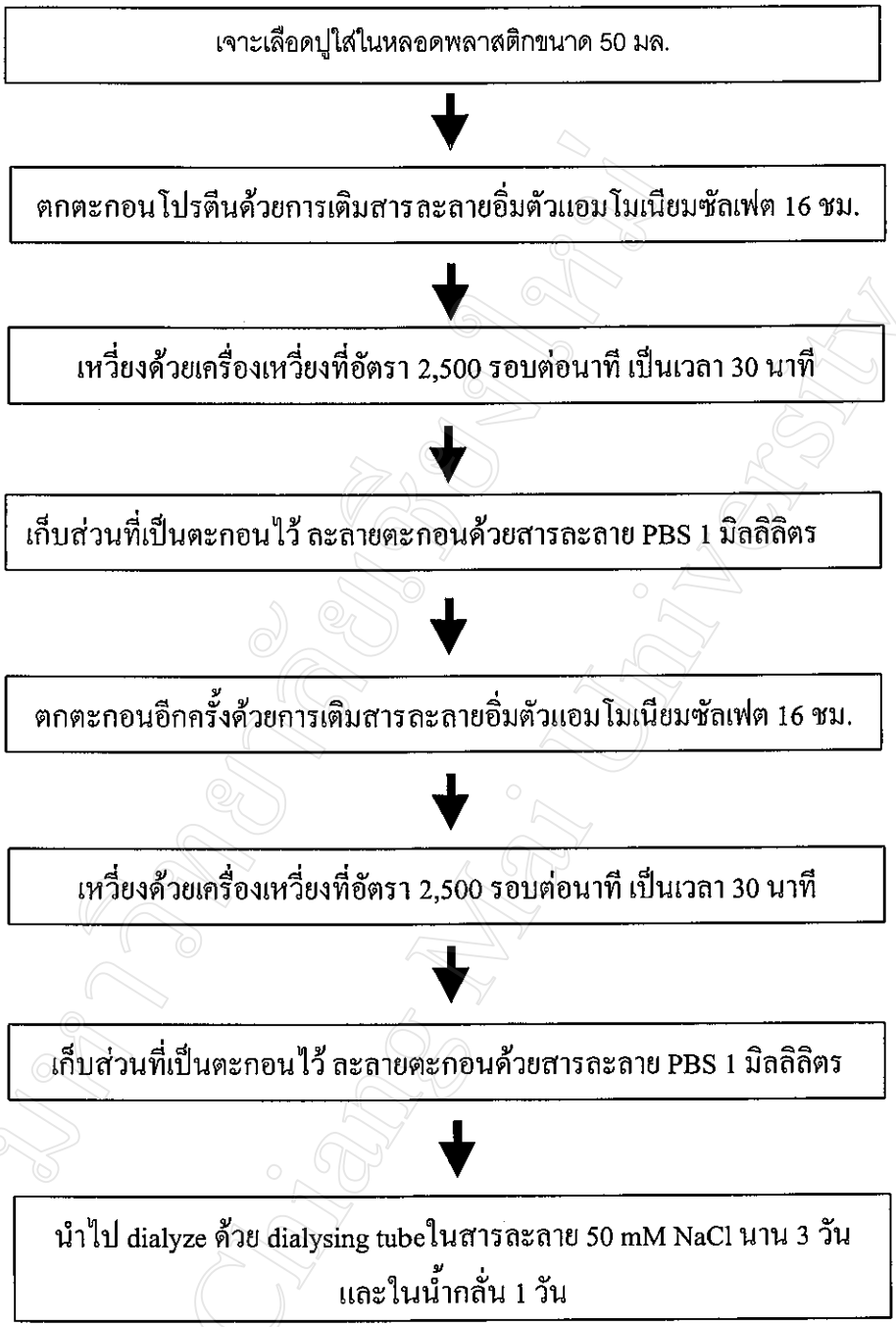
3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียม partial purified hemocyanin (pHMCN)

ปูทะเลมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Scylla serrata* Rathun (Suvatti, 1967) เลือดปูมีฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ทำหน้าที่ขนส่งกาซออกซิเจน มีโครงสร้างประกอบด้วยฮีม (heme) และโกลบิน (globin) มีโปรตีนเท่ากับ 0.188 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (นครินทร์, 2543) เจาะเลือดจากปู ดังภาพที่ 4 ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการแยกส่วนประกอบของฮีโมไซยานินทำได้โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต (saturated ammonium sulphate) จนเต็มหลอดพลาสติก เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Harlow and Lane, 1988) แล้วเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตรา 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ ละลายตะกอนด้วยสารละลายพีบีเอส (phosphate buffer saline, PBS) 1 มิลลิลิตรและตกตะกอนอีกครั้งด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตรา 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS 1 มิลลิลิตร กำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตและสารอื่นที่มีโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12,000-14,000 ดาลตัน โดยนำไป dialyze ด้วย dialyzing tubeในสารละลาย 50 mM NaCl นาน 3 วัน และในน้ำกลั่น 1 วัน นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งเป็นค่าดูดกลืนแสงของโปรตีน (ภาพที่ 5)



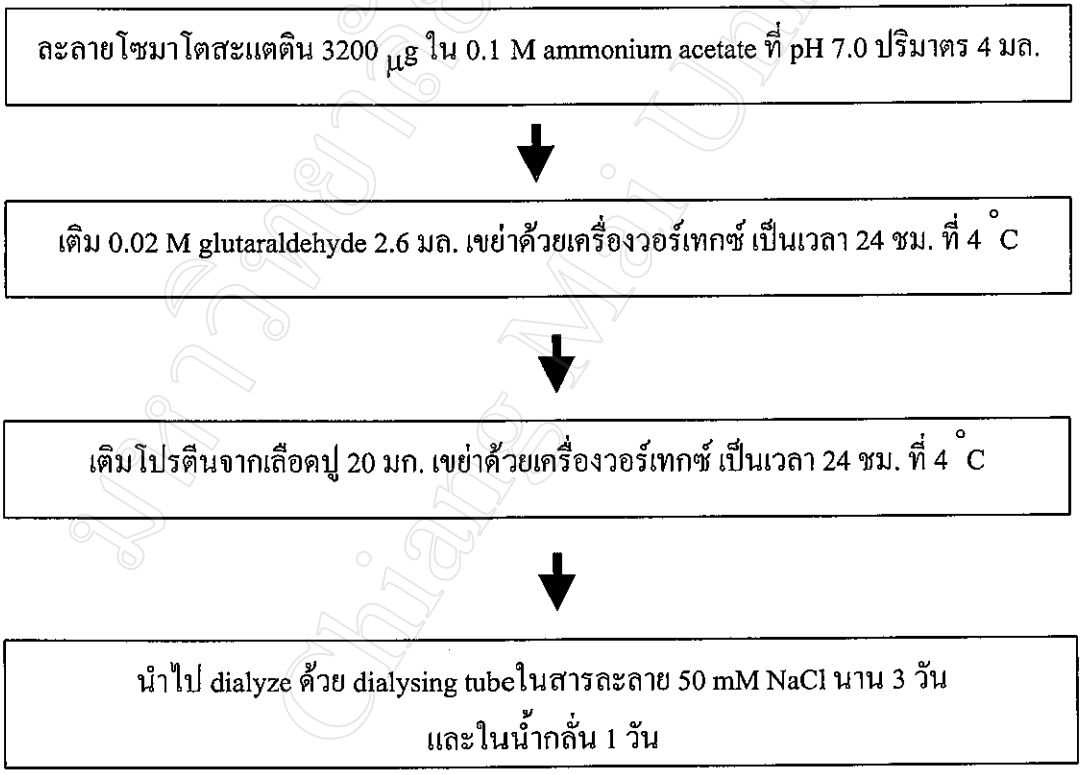
ภาพที่ 4. แสดงการเจาะเลือดปูทะเล



ภาพที่ 5. แสดงแผนภาพวิธีการเตรียม partial purified hemocyanin.

3.3.2 การเชื่อม (conjugate) ฮอร์โมนโซมาโตสะแตตินกับโปรตีนจากเลือดปู

ละลายโซมาโตสะแตติน 3200 ไมโครกรัม ใน 0.1 M ammonium acetate ที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 ปริมาตร 4 มล. เติม 0.02 M glutaraldehyde 2.6 มล. (Engvall and Perlmann, 1972) เขย่าด้วยเครื่องวอร์เทกซ์ (Vortex) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 อาศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมโปรตีนจากเลือดปู (partial purified hemocyanin, pHMCN) 20 มก. เขย่าด้วยเครื่องวอร์เทกซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ต่อมาแยกสารที่ไม่ต้องการออกจากแอนติเจนด้วยวิธี dialysis โดยการบรรจุสารละลายแอนติเจนลงในถุง dialyzing bag (Cellu Sep, T3) ที่ยอมให้สารที่มีโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 12,000-14,000 ดาลตัน ผ่าน ในสารละลาย 50 mM NaCl นาน 3 วัน และในน้ำกลั่น 1 วัน (Mills, 1994) เพื่อขจัดสาร glutaraldehyde ออกไปสารละลายที่เหลือในถุงเป็นแอนติเจนเรียกว่า SRIF- partial purified hemocyanin (SRIF-pHMCN) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6. แผนภาพการเชื่อมฮอร์โมนโซมาโตสะแตตินกับโปรตีนจากเลือดปู.

การตรวจสอบการเชื่อมกันระหว่าง SRIF กับ pHMCN ทำได้โดยนำสารละลาย 50 mM NaCl ที่ได้ผ่านการ dialyze แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ 214

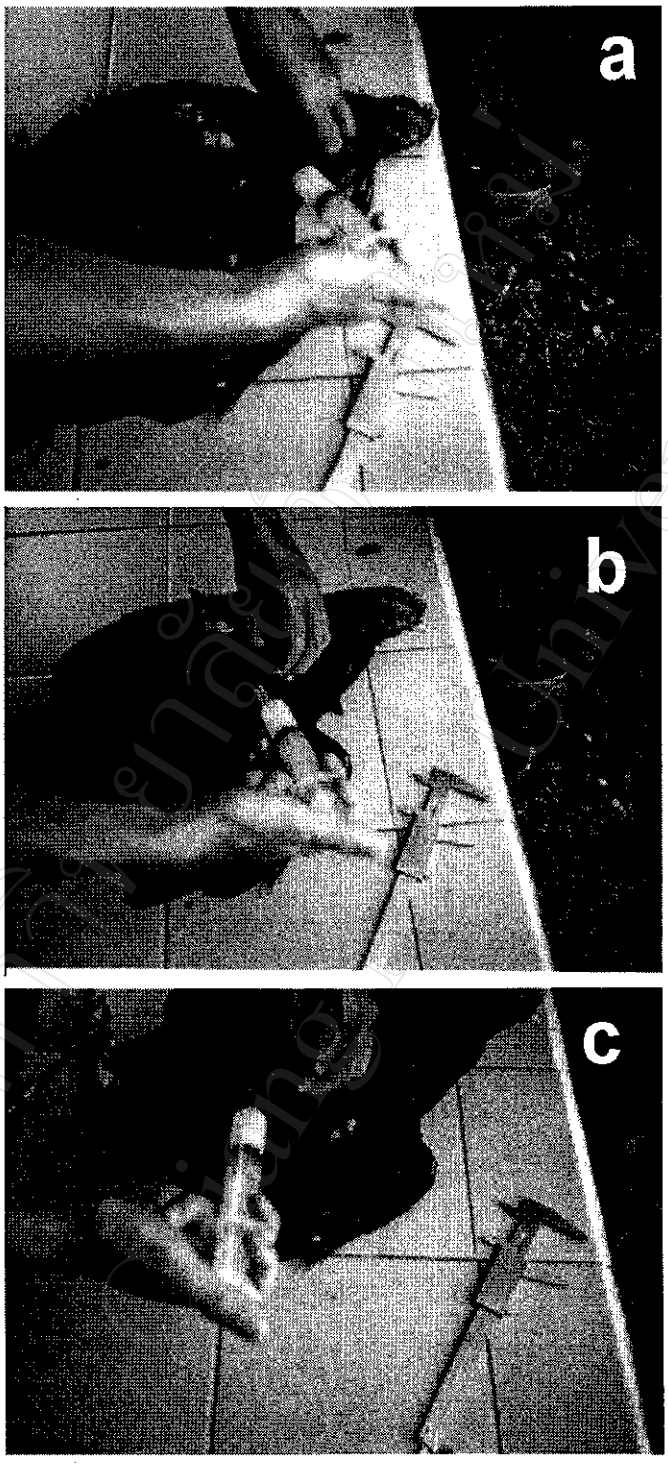
นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณ โดยใช้สูตรของ Johnstone and Thorpe (1982) ผลจากการคำนวณที่ได้จะเป็นปริมาณของ SRIF ที่ไม่เชื่อมติดกับ pHMCN

$$\text{protein concentration} = \frac{1.55 \times \text{absorbance at 280 nm}}{0.77 \times \text{absorbance at 214 nm}}$$

3.3.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunization) ต่อโซมาโตสะแตติน

ไก่พื้นเมือง เตรียมแอนติเจนโดยใช้ SRIF-pHMCN 40 ไมโครกรัม กับ saponin 50 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS 500 ไมโครลิตร และ mineral oil 500 ไมโครลิตรต่อไก่ 1 ตัวทั้งกลุ่มทดลองตัวผู้และกลุ่มทดลองตัวเมีย ส่วนกลุ่มควบคุมตัวผู้และตัวเมียใช้ saponin 50 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS 500 ไมโครลิตรกับ mineral oil 500 ไมโครลิตรต่อไก่ 1 ตัว การผสมระหว่างสารละลาย PBS และ mineral oil ใช้วิธีโฮโมจีไนเซชั่น (homogenization) โดยการใช้หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 20 มล. 2 อันมีข้อต่อ สามทาง (Three-way Stopcock) ฉีดสลับกันไปมาจนกว่าสารละลายจะรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 7) ทำการฉีดแอนติเจนเข้าใต้ผิวหนังไก่ตามแนวกลางสันหลัง 3 จุดคือ บริเวณคอ กลางลำตัว และส่วนท้าย (ภาพที่ 8) ในสัปดาห์ที่ 0, 2, 6, และ 10 สัปดาห์ของการทดลองหรือเมื่อไก่พื้นเมืองอายุ 8, 10, 14, 18 สัปดาห์

ภาพที่ 7. แสดงวิธีโฮโมจีไนซ์เพื่อเตรียมแอนติเจนสำหรับกระตุ้นไก่พื้นเมือง.



ภาพที่ 8. แสดงการฉีดฉีดแอนติเจนบริเวณคอไก่ (a) กลางลำตัว (b) และส่วนท้ายของลำตัว (c).

หนูขาว เตรียมแอนติเจนโดยใช้ SRIF-pHMCN 40 ไมโครกรัม กับ saponin 50 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS 500 ไมโครลิตร และ mineral oil 500 ไมโครลิตรต่อหนู 1 ตัวทั้งกลุ่มทดลองตัวผู้และกลุ่มทดลองตัวเมีย ส่วนกลุ่มควบคุมตัวผู้และตัวเมียใช้ saponin 50 ไมโครกรัม ในสารละลาย PBS 500 ไมโครลิตรกับ mineral oil 500 ไมโครลิตรต่อหนู 1 ตัว การผสมระหว่างสารละลาย PBS และ mineral oil ใช้วิธีโฮโมจีไนเซชั่น โดยการใช้หลอดฉีดยาขนาด 20 มล. 2 อันมีข้อต่อ สามทาง ฉีดสลับกันไปมาจนกว่าสารละลายจะรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านโซมาโตสะแตตินทำการฉีดแอนติเจนเข้าใต้ผิวหนังหนูตามแนวกลางสันหลัง 3 จุดคือ บริเวณคอ กลางลำตัว และส่วนท้าย เมื่ออายุ 4, 6 และ 10 สัปดาห์ โดยการเตรียมวัคซีนทำการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีนของไก่พื้นเมือง

3.3.4 การเก็บตัวอย่างเลือด (Bleeding)

เก็บตัวอย่างเลือดของไก่พื้นเมืองบริเวณเส้นเลือดดำที่ปีก (wing vein)) เมื่ออายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 สัปดาห์หนูขาวเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณเส้นเลือดดำที่หาง (caudal vein) เมื่ออายุ 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ มี EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) เป็นตัวป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลลาร์ (Appendix B-3) จำนวน 200 ไมโครลิตรต่อเลือด 5 มิลลิลิตร เมื่อเก็บตัวอย่างเลือดแล้วจะนำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บพลาสม่า เพื่อวัดแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโซมาโตสะแตติน

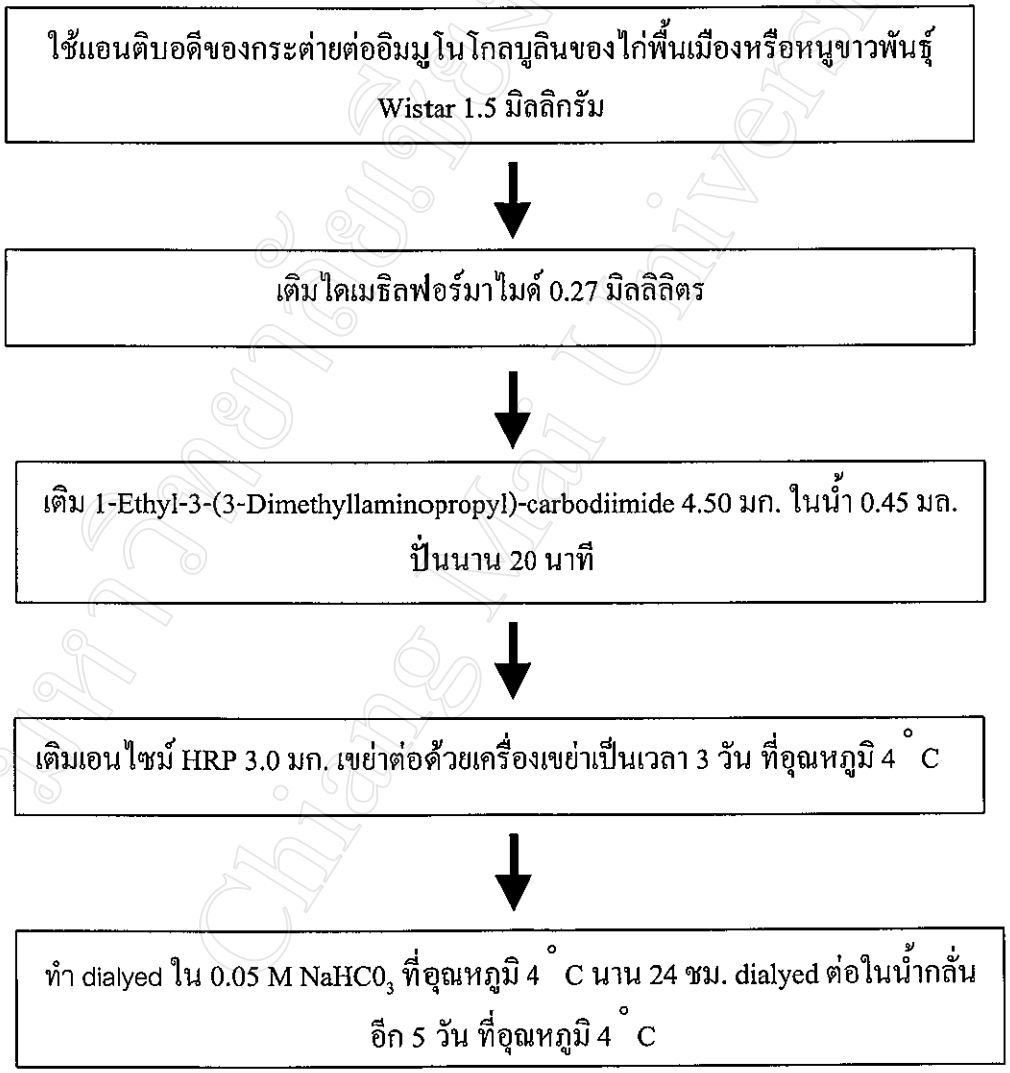
3.3.5 การเตรียมแอนติบอดีของกระต่ายต่ออิมมูโนโกลบูลินไก่พื้นเมือง และหนูขาว

นำพลาสม่าจากไก่พื้นเมือง หรือหนูขาว จากกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองมารวมกัน ปริมาตรประมาณ 1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ Freund's complete adjuvant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาฉีดให้กระต่าย เข้าใต้ผิวหนัง ที่สัปดาห์ที่ 0, 2, 4 เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดที่ใบหูครั้งละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำมาเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บพลาสม่าไว้

3.3.6 การเตรียมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีของกระต่าย

ดัดแปลงจากวิธีของ Erlanger *et al.* (1959) โดยเชื่อมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (HRP) ติดกับแอนติบอดีของกระต่ายต่อพลาสม่าของไก่พื้นเมืองหรือหนูขาว Wistar ใช้แอนติบอดีพลาสม่า ของกระต่ายต่ออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ของไก่พื้นเมืองหรือหนูขาวพันธุ์ Wistar 1.5 มิลลิกรัม เติมไดเมธิลฟอร์มาไมด์ 0.27 มิลลิลิตร เติม 1-Ethyl-3-(3-Dimethyllaminopropyl)-carbodiimide 4.50 มิลลิกรัม ในน้ำ 0.45 มิลลิลิตร ปั่นนาน 20 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ HRP

3.0 มิลลิกรัม เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกสารที่ไม่ต้องการออกโดยใช้วิธี dialysis (ไม่ให้สารที่มีโมเลกุลมากกว่า 12,000 ผ่าน) โดยใช้ถุง dialysing bag ใน 0.05 M $NaHC0_3$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง dialyed ต่อในน้ำกลั่นอีก 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9. แสดงการเตรียมเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีของกระต่าย.

3.3.7 การหาปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์

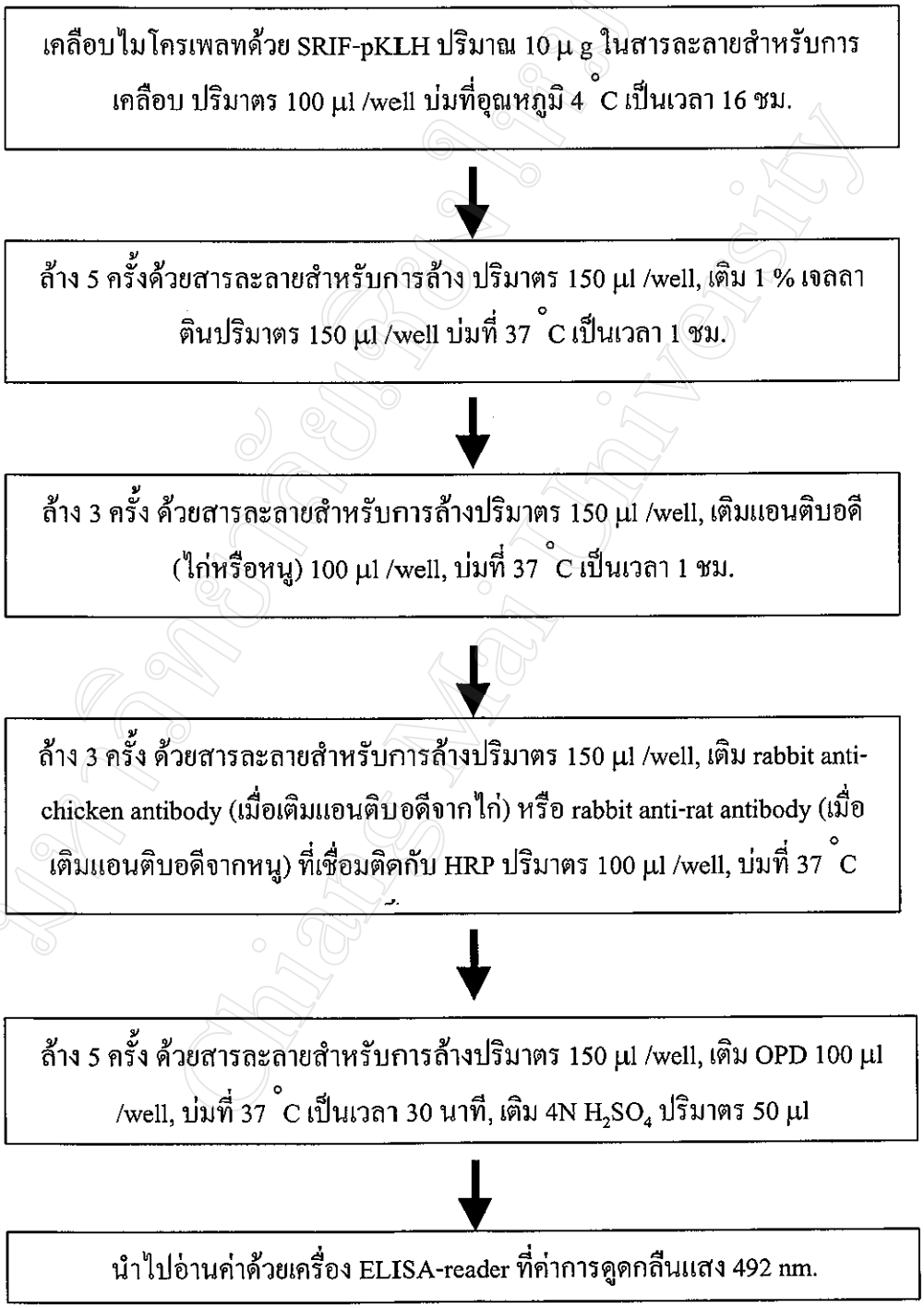
เคลือบไมโครเพลทด้วยแอนติบอดีของไก่ที่เจือจางโดยสารละลายสำหรับการเคลือบ (coating buffer) (appendix B-4) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา16 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง (washing buffer) (appendix B-5) ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายสำหรับการล้างปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม rabbit anti-chicken antibody (เมื่อเคลือบแอนติบอดีจากไก่) หรือ rabbit anti-rat antibody (เมื่อเคลือบแอนติบอดีจากหนู) ที่เชื่อมติดกับ HRP ในความเจือจางต่างๆ ดังนี้ 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:100,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 5 ครั้ง ด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม OPD หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA-reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร

3.3.8 การวัดผลการทดลอง

3.3.8.1 การตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA

เคลือบ plate ด้วย SRIF-pKLH ปริมาณ 10 ไมโครกรัม ในสารละลายสำหรับการเคลือบ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายสำหรับการล้างปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมแอนติบอดี (ไก่หรือหนู) 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายสำหรับการล้างปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม rabbit anti-chicken antibody (เมื่อเคลือบพลาสม่าจากไก่) หรือ rabbit anti-rat antibody (เมื่อเคลือบพลาสม่าจากหนู) ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายในเพลททิ้ง ล้าง 5 ครั้ง ด้วยสารละลายสำหรับการล้างปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม OPD หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการหยุด

ปฏิกิริยาด้วย 4N H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA-reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 492 นาโนเมตร (Catty, 1989) (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10. แสดงการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA.

3.3.8.2 การวัด tibia test

เลาะกระดูก tibia ออกมาตามแนว sagittal แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นแช่ใน acetone 5 นาที ล้างในน้ำกลั่น 3 นาที จากนั้นแช่ใน 2 เปอร์เซ็นต์ silver nitrate 10 นาที ล้างน้ำกลั่นแล้วแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที วัดความกว้างของ epiphyseal plate ด้วย ocularmicro meter (Greenspan *et al.*, 1949)

3.3.8.3 การหาอัตราแลกเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน

ไก่พื้นเมือง ชั่งน้ำหนักตัวทุก 2 สัปดาห์ ที่อายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 สัปดาห์ เพื่อหาประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion ratio, FCR) และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain, ADG)

หนูขาว Wistar ชั่งน้ำหนักตัวที่อายุ 4, 5, 6, 7,8, 9, 10 และ 11 สัปดาห์ เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน

3.3.8.4 การวัดความกว้างหน้าอกและความยาวขา

วัดความกว้างของอก (breast width) ด้วย vernier caliper ขนาด 6 นิ้ว สูง 2 นิ้ว (ภาพที่ 11) วัดเป็นมุมฉากกับแกนกลางของลำตัว ตรงตำแหน่งส่วนยอดของกระดูกอก (sternum) ส่วนความยาวแข้ง (shank length) วัดจากรอยต่อระหว่างกระดูก tibia และ tarsometatarsus กับรอยต่อระหว่าง tarsometatarsus และนิ้วกลางส่วน first phalanx (ภาพที่ 12).

3.3.8.5 การเก็บอวัยวะภายใน

ไก่พื้นเมืองเก็บ ตับ หัวใจ ไต ตับอ่อน ไขมันในช่องท้อง (abdominal fat)ที่อายุ 20 สัปดาห์ หนูขาว Wistar ทำการเก็บ ตับ หัวใจ ไต ตับอ่อน ไขมันในช่องท้อง ไขมันรอบไต (perirenal adipose tissue) ที่อายุ 12 สัปดาห์ แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

3.3.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความความแปรปรวนของประชากรโดยวิธี F test วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยลักษณะน้ำหนักตัว อัตราเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ความกว้างหน้าอก ความยาวแข้ง ค่าแอนติบอดี โดยวิธี *t* test วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของน้ำหนักไขมันในช่องท้อง น้ำหนักตับ หัวใจ ไต ตับอ่อน ม้าม ความกว้างของกระดูก epiphyseal plate ด้วย One-Way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS for window version 7.0

ภาพที่ 11. แสดงการวัดความกว้างของหน้าอกไก่พื้นเมืองด้วย vernier caliper.

ภาพที่ 12. แสดงการวัดความยาวแข้งของไก่พื้นเมืองด้วย vernier caliper.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University