บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัท	เกรด
1. Adjuvant complete Freund	Sigma	AR
2. Ammonium acetate	Fisher Chemicals	AR
3. Ascorbic acid	Fisher Chemicals	AR
4. Bovine serum albumin (BSA)	Sigma	AR
5. Citric acid	Merck	AR
6. Conc. Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	AR
7. Disodium hydrogenphosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	Merck	AR
8. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Fisher Chemicals	AR
9. Ferricchloride hexahydrate	Fisher Chemicals	AR
10. Ferrous ammoniumsulfate hexahydrate	Fisher Chemicals	AR
11. Gelatin	Merck	AR
12. Horseradish peroxidase goat anti-pig IgG	Sigma	AR
13. Hydrochloric acid (HCl)	Merck	AR
14. O-phenylen-diamine-HCl (OPD)	Zymed Lab	AR
15. Potassium chloride (KCl)	Scharlau	AR
16. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)	Scharlau	AR
17. Potassium permanganate ($KMnO_4$)	Merck	AR
18. Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Scharlau	AR
19. Sodium chloride (NaCl)	Merck	AR
20. Sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$)	Merck	AR
21. 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	Fisher Chimecals	AR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24. Trichloroacetic acid	Merck	AR
25. Tween 20	Scharlau	AR

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

ชื่อเครื่องมือ	โมเดล	บริษัท	ประเทศ
1. 3-way stopcock	-	Nipro Medical	ญี่ปุ่น
2. 96-well microplate	-	Nalge Nunc	เดนมาร์ค
3. Aluminium foil		Aluminum	ไทย
4. Atomic absorption Spectrophotometer	3900	Perkin Elmer	เยอรมัน
5.Centrifuge	Mistral300	MSE co.	อังกฤษ
6. Cuvette		L.P.	เยอรมัน
7.Analytical balance	2842	Sartorius	เยอรมัน
8. Furnace	MD-700	Heraeus	เยอรมัน
9. Micropipette	Pipetman	Gilson	ฝรั่งเศส
10. Microplate reader	2010	Anthos Labtech	เยอรมัน
11. Multichannel micropipette 200	-	Eppenddorf	เยอรมัน
12. Needle	-	Nippo	ไทย
13. Oven	ULE 400	Memmert	เยอรมัน
14. Parafilm	-	American	อเมริกา
15. Refrigerated centrifuge	6930	KUBOTA	ญี่ปุ่น
16. Refrigerator (- 20 °C)	WCF-95L	Whirlpool	ไทย
17. Spectrophotometer	Genesys20	ThermoSpectronic	เยอรมัน
18. Syringe	-	Nippo	ไทย
19. Vortex	K-500 GE	Labinco	อเมริกา

3.3 สัตว์ทดลอง อาหารทดลอง และการจัดการ

3.3.1 สัตว์ทดลอง ใช้ลูกสุกรผสม 3 สายพันธุ์ (Largewhite x Land race x Duroc) อายุเฉลี่ย 21 วัน จำนวน 168 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 64 ตัว เพศเมีย 64 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 7.5 กก. โดยก่อนการทดลองลูกสุกรทุกตัวที่อายุ 1 วันจะได้รับการฉีดธาตุเหล็ก (เฟอริกออกไซด์) ปริมาณ 2 ซีซี ตามมาตรฐานของฟาร์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 ลักษณะคอกทดลอง ได้แสดงไว้ใน Figure 3.1-3.3

1. คอกทดลองมีขนาด 1.3 X 1.5 ตร.ม. เรียงติดกันเป็นแถว มี 2 แถวๆ ละ 6 คอก รวมทั้งหมด 12 คอกต่อ 1 ห้องทดลอง มีที่ให้น้ำแบบหัวจุ๊บอยู่ด้านหน้าคอก ที่ให้อาหารแบบรางติดตั้งหน้าคอก ติดกับพื้นคอก และมีเทอร์โมมิเตอร์แบบตุ้มแห้ง-ตุ้มเปียกแขวนอยู่ในห้อง

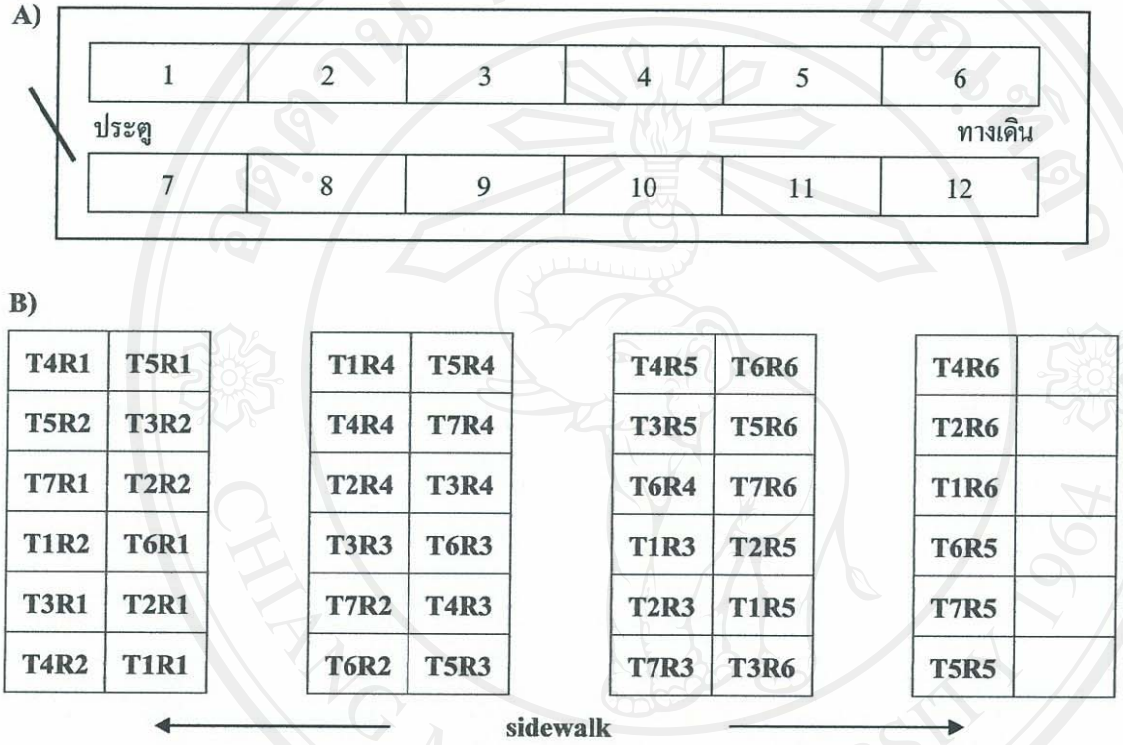

Figure 3.1 Plan of experimental cage (A). 168 piglets were randomly allotted into 7 treatments, in each treatment, 24 piglets were used where 4 piglets were kept in each pen, totally 6 pens (B).

Figure 3.2 Experimental cage design. (from Kittiwat Farm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Figure 3.3 The replicate cage for 4 pigs. (from Kittiwat Farm)

3.3.3 การวางแผนการทดลอง และการจัดสัตว์เข้าคอกทดลอง

3.3.3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม ใช้อาหารทดลองทั้งหมด 7 สูตร ในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต

สูตรที่1 (T1) :อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (CONT) (GON 224 mg/kg)

สูตรที่2 (T2) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 mg/kg) เสริมแกมมา-โอไรซานอล (GON) 3,000 mg/kg ของอาหาร

สูตรที่3 (T3) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 mg/kg) เสริมสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน (PA) 82 มก./กก. ของอาหาร

สูตรที่4 (T4) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์ม (GON 224 mg/kg) เสริมแกมมา-โอไรซานอล (GON) 100 มก./กก.และสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดิน (PA) 65 มก./กก. ของอาหาร

สูตรที่5 (T5) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 2% (GON 540 + PA 204 มก./กก. ของอาหาร)

สูตรที่6 (T6) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 4% (GON 1,080 + PA 408 มก./กก. ของอาหาร)

สูตรที่7 (T7) : อาหารสูตรมาตรฐานของฟาร์มที่ทดแทนรำข้าวด้วยรำข้าวเหนียวก่ำ 6% (GON 1,600 + PA 612 มก./กก. ของอาหาร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ

1. อาหารสูตรควบคุม คือสูตรอาหารที่ใช้ปกติในฟาร์มที่ทำการทดลองมีรำข้าวขาว 2%

2. การเสริมแกมมา-โอไรซานอลสกัดในอาหารแต่ละสูตรอ้างอิงจากปริมาณที่แนะนำให้ใช้ในคน ในลักษณะให้ผล ช่วยลดโอกาสเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคความดัน ที่ระดับ 450 มก./วัน (cited by Teltathum, 2004) และการเสริมสารสกัดโปรแอนโธไซยานิดินโดยรวม 250 มก./วัน อ้างอิงจากระดับที่แนะนำให้ใช้ในคน (Hertog *et al.*, 1993) (วิธีการคำนวณในภาคผนวก ก ข้อที่ 1-2)

3. อาหารทดลองสูตรที่ 4 อ้างอิงจากระดับแกมมา-โอไรซานอลที่แนะนำให้ใช้ในคนปกติ 300 มก./วัน และโปรแอนโธไซยานิดิน 200 มก./วัน ในคนน้ำหนัก 70 กก. ดังนั้นสุกร 16 กก. จะได้รับ 100 มก. และ 65 มก./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ (วิธีการคำนวณในภาคผนวกที่ ก ข้อที่ 3)

4. การใช้รำในอาหารปกติจะใช้รำข้าวขาว และในสูตรที่มีรำข้าวเหนียวก่ำ จะใช้รำข้าวเหนียวก่ำแทนที่รำข้าวขาว และปรับค่าโภชนะ โดยเฉพาะค่าพลังงานโปรตีน และเยื่อใยใน phase เดียวกันให้มีค่าใกล้เคียงกัน (วิธีการคำนวณในภาคผนวกที่ ก ข้อที่ 4)

3.3.3.2 การจัดสัตว์เข้าคอกทดลอง ทำการสุ่มสุกรเข้าในแต่ละคอก แยกขังสุกร 4 ตัวต่อคอก เป็น 1 ซ้ำ และทำการสุ่มอาหารทดลองให้กับสุกรแต่ละคอก จำนวน 6 คอก (6 ซ้ำ) ต่อกลุ่มทดลอง โดยสุกรทั้ง 7 กลุ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเป็น 7.46 7.40 7.44 7.53 7.46 7.53 และ 7.51 กก. ตามลำดับ

3.3.4 การให้อาหาร

อาหารทดลองที่ใช้มีการผสมใหม่ทุกสัปดาห์ แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ตามมาตรฐานอาหารที่ใช้เลี้ยงสุกรของฟาร์มทดลอง) โดยใช้ระบบ phase feeding (Table 3.1) กล่าวคือ ระยะที่ 1 (phase 1) อาหารจะถูกผสมตามสูตร (Table 3.1) และทำการคำนวณให้สุกรได้รับอาหารตัวละประมาณ 5 กก. เมื่อสุกรกินหมดแล้ว จึงเปลี่ยนเป็นอาหารสูตรระยะที่ 2 (phase 2) ให้สุกรกินต่ออีก 8 กก./ตัว จนหมด เมื่อสุกรกินหมดแล้ว จึงเปลี่ยนเป็นอาหารสูตรระยะที่ 3 (phase 3) ให้สุกรกินต่ออีก 8 กก./ตัว จนหมด เมื่อสุกรกินหมดแล้ว จึงเปลี่ยนเป็นอาหารสูตรระยะที่ 4 (phase 4) ให้สุกรกินต่ออีก 7.5 กก./ตัว จนหมด ถือว่าสิ้นสุดการทดลอง สุกรทุกตัวจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) อาหารทดลองที่ใช้จะมีการชั่งใหม่ทุกวัน ด้วยเครื่องชั่งแบบสปริงขนาด 7 กก. ใส่ลงในถังอาหารที่ติดป้ายข้างถังด้วยสีที่ต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1. Experimental diets and chemical composition of phase 1* (continued)

Treatment (%)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed composition							
Broken rice	24.895	24.895	24.895	24.895	24.895	23	21
Dicalciumphosphate	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Fish meal 62%	6	6	6	6	6	6	6
Full fat soybean 36%	30	30	30	30	30	30	30
Monodicalcium-phosphate 21%	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Salt	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tallow	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85	1.85
Sweet whey	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Nuklospray K10	15	15	15	15	15	15	15
Premix[a]	2.505	2.505	2.505	2.505	2.505	2.505	2.505
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
White rice bran	2	2	2	2	0	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	23.24	23.24	23.24	23.24	23.28	23.43	23.58
Crude fat	10.07	10.06	10.06	10.06	10.10	10.37	10.64
Crude fiber	2.38	3.13	3.13	3.13	3.02	3.13	3.24

* Calculated feeding 5 kgs per pig (around 10 days).

[a] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.07 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 2* (continued)

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed composition							
Broken rice	36.198	36.198	36.198	36.198	36.198	34	32
Corn	3	3	3	3	3	3	3
Dicalciumphosphate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Fish meal 62%	5	5	5	5	5	5	5
Full fat soybean 36%	35	35	35	35	35	35	35
Soybean meal 44%	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Monodicalcium-phosphate 21%	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Limestone	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Salt	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tallow	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Molasses	1	1	1	1	1	1	1
Sweet whey	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Nuklospray K10	5	5	5	5	5	5	5
Premix[a]	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025	2.4025
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
White rice bran	2	2	2	2	0	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	21.87	21.87	21.87	21.87	21.91	22.06	22
Crude fat	10.28	10.28	10.28	10.28	10.31	10.58	10.85
Crude fiber	3.28	3.28	3.28	3.28	3.18	3.28	3.39

* Calculated feeding 8 kgs per pig (around 14 days).

[a] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 3* (continued)

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed composition							
Broken rice	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	32.7	30.7
Corn	10	10	10	10	10	10	10
Cassava	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
Dicalciumphosphate	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Fish meal 62%	5	5	5	5	5	5	5
Full fat soybean 36%	35	35	35	35	35	35	35
Monodicalcium-phosphate 21%	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Limestone	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Salt	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Tallow	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sweet whay	2	2	2	2	2	2	2
Nuklospray K10	1	1	1	1	1	1	1
Premix[a]	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55	2.55
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
Wheat bran	2	2	2	2	2	0	0
White rice bran	2	2	2	2	0	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	20.41	20.41	20.41	20.41	20.45	20.59	20.74
Crude fat	9.76	9.75	9.76	9.75	9.79	9.90	9.92
Crude fiber	3.28	3.28	3.28	3.28	3.18	3.28	3.39

* Calculated feeding 8 kgs per pig (around 14 days).

[a] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 3.1 Experimental diets and chemical composition of phase 4*

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Feed composition							
Broken rice	5	5	5	5	5	5	5
Corn	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3
Cassava	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58
Fish meal 62%	5	5	5	5	5	5	5
Full fat soybean 36%	10	10	10	10	10	10	10
Soybean meal	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
Monodicalcium-phosphate 21%	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Limestone	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tallow	2	2	2	2	2	2	2
Premix[a]	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
Gamma-oryzanol	0	0.3	0	0.01	0	0	0
Proanthocyanidin	0	0	0.0082	0.0065	0	0	0
Wheat bran	2	2	2	2	2	2	0
White rice bran	4	4	4	4	2	0	0
Purple rice bran	0	0	0	0	2	4	6
Total weight	100	100	100	100	100	100	100
Chemical composition							
Crude protein	19.60	19.59	19.60	19.59	19.64	19.68	19.73
Crude fat	6.46	6.46	6.46	6.46	6.49	6.56	6.67
Crude fiber	3.73	3.73	3.73	3.73	3.62	3.73	3.83

* Calculated feeding 7.5 kgs per pig (around 5 days).

[a] Premix contained vitamins and minerals; 20% iron sulfate 0.035 kg diet.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การบันทึกข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

3.4.1 บันทึกปริมาณอาหารที่กิน ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน โดยชั่งอาหารที่เหลือและเติมอาหารใหม่ทุกวัน สำหรับการคำนวณปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน ทำโดยนำปริมาณอาหารที่กินเหลือในแต่ละวัน ไปลบออกจากปริมาณอาหารที่ให้สุกรกินในแต่ละวัน

3.4.2 ชั่งน้ำหนักสุกรแต่ละตัว ทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ วันอังคาร เริ่มชั่งที่เวลา 14.00 น. โดยใช้ตะกร้าใส่สุกรก่อนวางลงบนตาชั่งขนาด 50 กก. ดังใน Figure 3.4

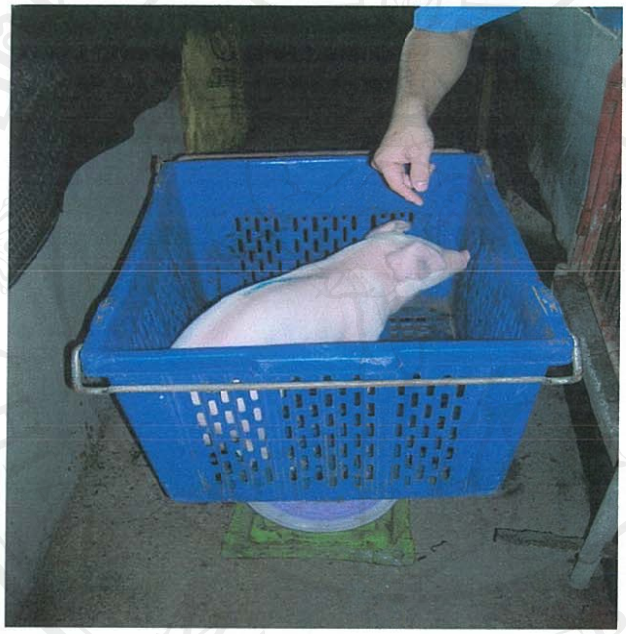

Figure 3.4 Each pig was weighed once a week on Tuesday at 2 pm.

3.4.3 การเก็บตัวอย่างอาหารเพื่อการวิเคราะห์ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทุกครั้งที่มีการผสมอาหารใหม่ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี AOAC (1984) ซึ่งจะวิเคราะห์หาวัตถุแห้ง โปรตีนโดยรวม ไขมันโดยรวม เยื่อใยโดยรวม เถ้า และธาตุเหล็กในอาหารทดลอง (รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์ แสดงในภาคผนวก ข และข้อ 3.7)

3.5 การศึกษาด้านสมรรถภาพการผลิต

บันทึกปริมาณอาหารที่กิน น้ำหนักตัวเริ่มต้น ชั่งน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทุกสัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{อัตราการเจริญเติบโต (kg/d)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}{\text{ระยะเวลาที่เลี้ยง (d)}}$$

$$\text{อัตราการแลกเนื้อ} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (kg)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}$$

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (kg)}}{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (kg)}}$$

3.6 การศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกัน

3.6.1 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในลูกสุกรด้วย Bovine Serum Albumin (BSA)

การเตรียมแอนติเจนจะใช้ BSA ละลายใน Phosphate buffer solution แล้วนำไปผสมกับ Freunds' adjuvant ในปริมาณเท่าๆ กัน โดยใช้ 3-way stopcock แอนติเจนที่ได้นี้จะนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในลูกสุกรในวันที่ 1 14 และ 28 ของการทดลอง

3.6.2 การเก็บตัวอย่างเลือดสุกร

ลูกสุกรจะได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 3 ครั้ง โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ในวันที่ 1 14 และ 28 ของการทดลอง (Figure 3.5) และเก็บตัวอย่างเลือดสุกรจากเส้นเลือดที่คอใส่ลงในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ก่อนนำไปปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นพลาสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำมาใช้หาระดับภูมิคุ้มกันในวันที่ 1 14 28 35 และ 42 ของการทดลอง โดยใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

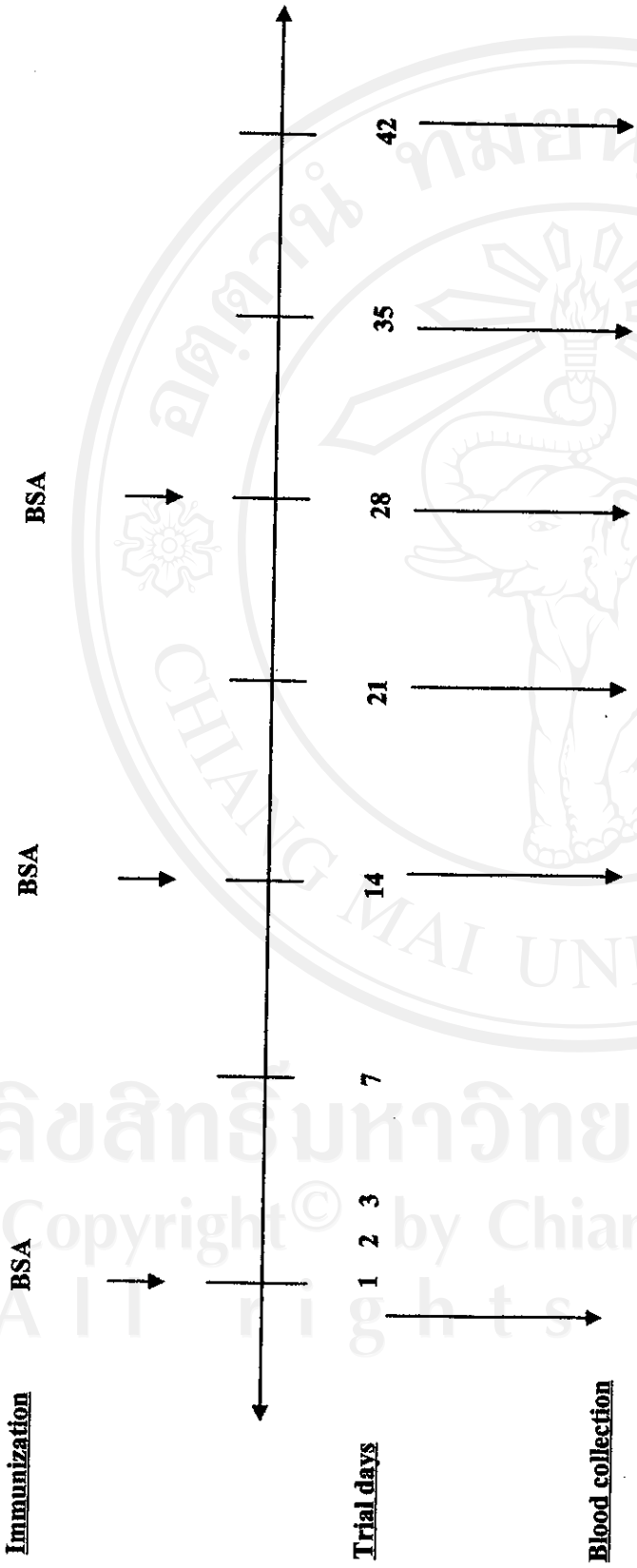

Figure 3.5 Program of blood collection and immunization.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.3 การศึกษาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ BSA โดยใช้ indirect ELISA

หลักการ

indirect ELISA เป็นวิธีการทดสอบหาแอนที่บอดีที่จำเพาะในสิ่งส่งตรวจ โดยเคลือบ solid phase ด้วยแอนติเจน เมื่อเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เคลือบ solid phase แอนติบอดีก็จะจับกับแอนติเจนดังกล่าว หลังจากล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกแล้ว เติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (conjugated) ลงไปในปริมาณที่มากเกินพอ เมื่อล้างแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ออกแล้วจึงเติม substrate การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจ (Crowther, 1995)

วิธีการทำ ELISA (Figure 3.6-3.7)

1. ใช้ BSA ที่ความเข้มข้น 10 มก./มล. เคลือบลงใน 96-well microplate จำนวน 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้ว incubate ที่ 4 °C นาน 16-18 ชั่วโมง

2. ล้าง plate ด้วย washing buffer 200 ไมโครลิตร/หลุม จนครบ 3 ครั้ง แล้วเติม 2% gelatin 200 ไมโครลิตร/หลุม แล้ว incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

3. ล้าง plate ด้วย washing buffer 200 ไมโครลิตร/หลุม จนครบ 3 ครั้ง แล้วเติม pig plasma 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้ว incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

4. ล้าง plate ด้วย washing buffer 200 ไมโครลิตร/หลุม จนครบ 3 ครั้ง แล้วเติม horseradish peroxidase conjugated goat anti-pig IgG 20 ไมโครลิตร/หลุม แล้ว incubate ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง

5. ล้าง plate ด้วย washing buffer 200 ไมโครลิตร/หลุม จนครบ 3 ครั้ง แล้วเติม substrate solution 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้ว incubate ที่ 37 °C นาน 30 นาที

6. เติม stopping solution 100 ไมโครลิตร/หลุม แล้วนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ 492 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

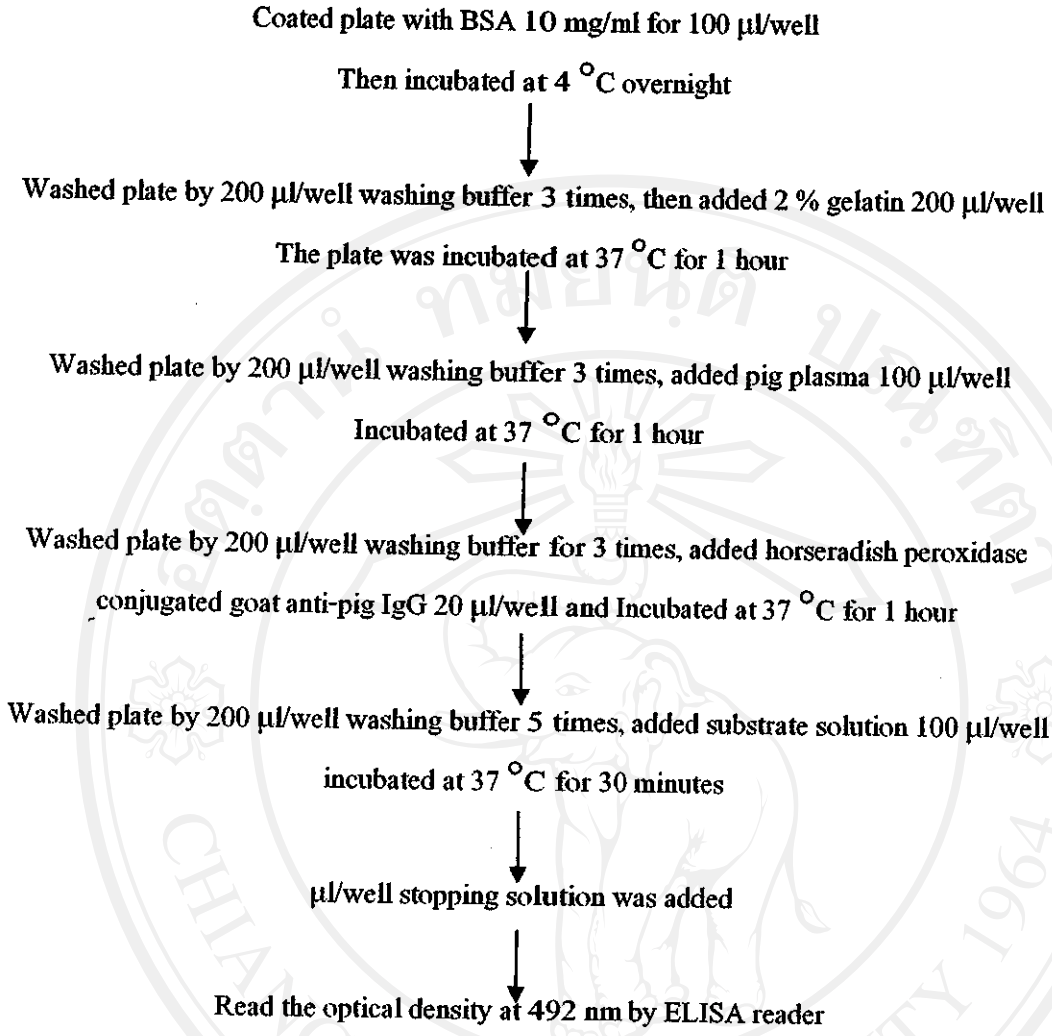

Figure 3.6 Diagram of indirect ELISA method for screening antibody titer in mouse serum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

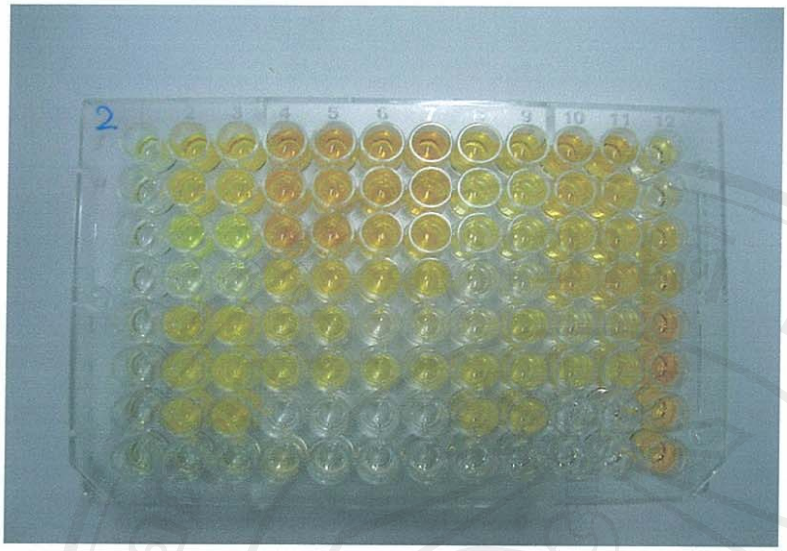

Figure 3.7 Determination of antibody titer using indirect ELISA method, the high IgG titer well showed intense yellow and low IgG titer well showed light yellow.

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในซีรัม (วีกูล, 2525 และ Caraway, 1963)

หลักการ : เหล็กในรูปของ Fe^{2+} จะรวมตัวกับ TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งละลายได้ดีในสารละลายที่เป็นกรด และให้สีน้ำเงินเมื่อ pH สูงขึ้นจนใกล้เป็นกลาง และถ้า pH เป็นด่างจะเปลี่ยนให้สีม่วงซึ่งมีความสามารถสูงสุดในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

การหาค่าเหล็กในซีรัม (serum iron analysis)

1. ดูดซีรัมที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนออกแล้ว ใส่ลงในหลอดทดลอง 2 หลอดๆ ละ 1 ml หลอดหนึ่งเขียนว่า serum blank อีกหลอดหนึ่งเขียนว่า serum test

2. ดูดน้ำที่ปราศจากเหล็ก 1 ml ลงในอีกหลอดหนึ่ง แล้วเขียนว่า reagent blank

3. ผสม ascorbic acid 0.3 g กับ iron buffer 10 ml ก่อนใช้

4. ดูด iron buffer ที่มี reducing agent ที่เตรียมในข้อ 3 ใส่หลอดละ 1.0 ml ทั้ง 3 หลอดแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 4 นาที

5. เติมน้ำยา TPTZ ลงไปในหลอดที่เขียนว่า serum test และ reagent blank หลอดละ 0.5 ml แล้วเติมน้ำ 0.5 ml ลงไปในหลอดที่เขียนว่า serum blank แล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 595 nm โดยใช้ reagent blank ตั้ง 0 แล้วอ่านค่าของ serum test จากนั้นใช้น้ำกลั่นตั้ง 0 แล้วอ่านค่า serum blank (Figure 3.8-3.9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณ

$$SI = \frac{Au-Ab}{As-Ab} \times Cs \quad \mu g/dl$$

Au = ค่าการดูดกลืนแสงของ unknown

As = ค่าการดูดกลืนแสงของ standard

Ab = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

Cs = ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (200)

Figure 3.8 Materials for determination of serum iron.

Figure 3.9 Free of iron in serum blank (left) and iron serum showed blue colour (right).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลด้านสมรรถภาพการผลิต ทั้งปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราการแลกเนื้อ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ส่วนข้อมูลแอนติบอดีไอจีจีไตเตอร์ และปริมาณธาตุเหล็กในซีรัม เนื่องจากค่าเริ่มต้นก่อนการทดลองของสัตว์แต่ละตัวมีค่าแตกต่างกัน จึงนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (analysis of covariance; ANCOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

3.9 สถานที่ทำการวิจัย

1. กิตติวัฒน์ฟาร์ม อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved