

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
อักษรย่อ และสัญลักษณ์	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 วงรอบการเป็นสัดของโคนม	4
2.2 ฮอร์โมนที่ควบคุมวงรอบการเป็นสัด	5
2.3 บทบาทและแหล่งผลิตของฮอร์โมนเอสโตรเจน	7
2.4 เทคนิคเอ็นไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ	9
2.5 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	11
2.6 การเตรียมแอนติเจน	15
2.7 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง	18
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์การทดลอง	20
3.2 วิธีการเตรียมแอนติเจน และการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	22
3.3 การผลิตโมโนโคลนอลต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล	24
3.4 การเก็บตัวอย่างน้ำนมจากโคนม	30
3.5 การวิเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธี ELISA ในไมโครเพลท	31
3.6 การวิเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ	33
3.5 สถานที่ทำการทดลอง	34
3.6 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย	34
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 คุณสมบัติของแอนติเจน 17 $\beta$ -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA ที่เตรียมได้	35
4.2 ผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกระต่าย	36

ณ

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ผลการผลិតลูกผสมข้ามสปีชีส์	39
4.4 ผลของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	46
4.5 ผลของการวัดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี กับแอนติเจน	47
4.6 ผลของปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของแอนติบอดีต่อฮอร์โมน อีสตราไดออก	50
4.7 ผลของการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออก โดยวิธี ELISA	51
4.8 การวัดระดับฮอร์โมนอีสตราไดออก โดยวิธี RIA	59
บทที่ 5 วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง	
5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง	60
5.2 สรุปผลการทดลอง	64
5.3 ข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	71
ประวัติผู้เขียน	78

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลของการผสมเทียมโคในช่วงเวลาต่างๆของการเป็นสัดที่มีต่ออัตราการผสมติด	5
2. แสดงเซลล์ไมอิลอมาที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์สายพันธุ์ต่างๆ	12
3. การผลิตเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์	13
4. แสดงผลการคำนวณการเกาะติดระหว่าง 17 $\beta$ -estradiol-6-(o-carboxymethyl) oxime กับ HSA	36
5. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของเซลล์ที่แสดงการสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล	39
6. แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรจากการตรวจแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ E2-6CMO-HSA ของมีเดียที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายหลังการทำ limiting dilution	42
7. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร จากการตรวจชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการทำปฏิกิริยากับgoat anti-rabbit IgG และ goat anti-rabbit IgA	43
8. แสดงความสามารถในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของ heterohybridomas โคลนต่างๆ ทั้งการผลิตวิธี <i>in vivo</i> และ <i>in vitro</i>	46
9. แสดงผลของปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลกับสเต็มรอยด์ชนิดต่างๆ	50
10. แสดงปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลเฉลี่ยของแม่โคนมจาก ตัวอย่างสกัดจากน้ำนม วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase	54
11. แสดงปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลเฉลี่ยของแม่โคนมจาก ตัวอย่างสกัดจากน้ำนม วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น solid-phase	58
12. แสดงปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลเฉลี่ย ของแม่โคนมจากตัวอย่างสกัดจากน้ำนม วิเคราะห์ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18. แสดงจำนวนและชนิดโครโมโซมของเซลล์ heterohybridomas ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ไมอิโคมากับเซลล์เม็ดเลือดขาวกระต่ายที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่ออีสตราไดออล ถูกครีซีโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริกกับซัปเมตราเซนตริกที่ได้มาจากเซลล์เม็ดเลือดของกระต่าย	45
19. แสดงการเลี้ยงเซลล์ heterohybridomas ใน UltraDOMA-PF เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ภายในตู้เลี้ยงเซลล์.	47
20. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-5E5 กับ E2-6CMO-HSA	48
21. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-5E8 กับ E2-6CMO-HSA	48
22. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-6B5 กับ E2-6CMO-HSA	49
23. แสดงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลน 3F5-6C6 กับ E2-6CMO-HSA	49
24. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ในการไตเตรทหาอัตราการเจือจางของ MAbs (3F5-6D8) กับ estradiol-peroxidase-labeled ที่เหมาะสม สำหรับไมโครเพลท	52
25. แสดงกราฟมาตรฐานเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี จากโคลน 3F5-6D8 โดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase	52
26. แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร จากตัวอย่างสกัดของโคที่เป็นสัตว์และไม่เป็นสัตว์ โดยใช้ไมโครเพลทเป็น solid-phase ในการเกาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3F5-6D8 โดยวิธี ELISA	53
27. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ในการไตเตรทหาอัตราการเจือจางของ MAbs(3F5-6D8) กับ estradiol-peroxidase-labeled ที่เหมาะสม สำหรับแผ่นไนโตรเซลลูโลส	56
28. แสดงกราฟมาตรฐานเมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี จากโคลน 3F5-6D8 โดยใช้ solid-phase เป็นแผ่นไนโตรเซลลูโลส	56

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนชนิดต่างๆในวงรอบการเป็นสัดของโคนม	6
2. แสดงโครงสร้างของฮอร์โมนอีสตราไดออก อีสโตรน และอีสโตรอล	7
3. การสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนในรังไข่	10
4. แสดงขั้นตอนการผลิตโมนโคกลนอลแอนติบอดี	14
5. แสดงโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมน 17-เบต้า-อีสตราไดออก และอนุพันธ์ต่างๆ	16
6. แสดงวิธีการเชื่อมติดระหว่าง 6-ketoestradiol-6-o-carboxymethyl-oxime กับ BSA	17
7. แสดงการต่อระหว่าง 3 ทาง กับ กระบอกฉีดยาเพื่อ โฮโมจีไนซ์ระหว่าง FCA กับแอนติเจน	23
8. แสดงการติดตั้งอุปกรณ์การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์วิธี thiophilic column chromatography	29
9. แสดงการดูดกลืนแสง UV ของ 17 $\beta$ -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime และ HSA	35
10. แสดงการจับ (affinity) ระหว่าง (2,4,6,7,16,17- <sup>3</sup> H) estradiol กับแอนติบอดีจากกระต่าย หมายเลข 4 ใน อัตราเจือจางระดับต่างๆ ค่า activity ของตรีเทียมวัดเป็น ครั้งต่อนาที (cpm). (a), (b), (c) และ (d) เป็นตัวอย่างผลสมาหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 60, 68, 74, และ 81 วัน	37
11. แสดงการจับระหว่าง (affinity)(2,4,6,7,16,17- <sup>3</sup> H) estradiol กับแอนติบอดีจากกระต่าย หมายเลข 5 ในอัตราเจือจางระดับต่างๆ ค่า activity ของตรีเทียมวัดเป็น ครั้งต่อนาที (cpm). (a), (b), (c) และ (d) เป็นตัวอย่างผลสมาหลังจากกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก 60, 68, 74, และ 81 วัน	38
12. แสดงเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่เลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ 2 วัน ( X400 เท่า)	40
13. แสดงเซลล์ไมอีโกลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 ( X100 เท่า)	40
14. แสดง heterohybridomas หลังการทำ limiting dilution ได้ 10 วัน ของโคลน 3F5-5E8 (X 40 เท่า).	41
15. แสดง heterohybridoma หลังการทำ limiting dilution ได้ 10 วัน ของโคลน 3F5-6B7 (X 40 เท่า).	41
16. แสดงจำนวนและชนิดโครโมโซมของกระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนียเฟสผู้มี 22 คู่.	44
17. แสดงจำนวนและชนิดโครโมโซมของเซลล์ไมอีโกลมา สายพันธุ์ X63Ag8.653	45

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
29.	แสดงการเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรจากตัวอย่างสกัดของโคที่เป็นสัดและไม่เป็นสัด โดยใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น solid-phase ในการเกาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน 3F5-6D8 โดยวิธี ELISA

## อักษรย่อ และสัญลักษณ์

ก.	กรัม
°ซ	องศาเซลเซียส
นนค.	นาโนกรัม
พคค.	พิโคกรัม
มก.	มิลลิกรัม
มด.	มิลลิลิตร
มคค.	ไมโครกรัม
มคด.	ไมโครลิตร
ล.	ลิตร
%	เปอร์เซ็นต์
BSA	bovine serum albumin
cpm	count per minute
DMSO	dimethyl sulfoxide
E <sub>2</sub>	estradiol-17-β
E2-6CMO-HSA	17β-estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA
ELISA	enzyme -linked Immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FCA	Freund's complete adjuvant
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
Ig	immunoglobulin
MAb	monoclonal antibody
NRS	normal rabbit serum
O.D.	optical density
OPD	O-Phenylenediamine dihydrochloride
PBS	phosphate buffer saline
PBL	peripheral blood leukocyte

PEG	polyethylene glycol
RIA	radioimmunoassay
SFM	serum free media
TCA	total count activity

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Chiang Mai University