บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันการจัดการด้านระบบการสืบพันธุ์ในฟาร์มโคนม ประสบปัญหาส่วนหนึ่งคือการผสมไม่ติดของโคนม สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งคือ การตรวจสัดผิดพลาดทำให้ช่วงระยะเวลาที่สัตว์ได้รับการผสมพันธุ์ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผสมเทียมในโคนม ทำให้ประสิทธิภาพในการเลี้ยงโคนมลดลงและเกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ พบว่าในแต่ละปีประเทศสหรัฐอเมริกามีความสูญเสียทางเศรษฐกิจ เนื่องจากความผิดพลาดในการตรวจช่วงสัดของโคนมประมาณ 300 ล้านเหรียญสหรัฐ (Senger, 1994) เช่นเดียวกับในประเทศไทยที่พบปัญหานี้ในการจัดการระบบการสืบพันธุ์ในฟาร์มโคนม การจับสัดเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบการสืบพันธุ์ของการจัดการฟาร์มโคนม บางฟาร์มสามารถจับสัดได้เพียงร้อยละ 40-60 การใช้เครื่องมือต่าง ๆ จะช่วยทำให้สามารถจับสัดได้มากถึงร้อยละ 80 (สุวิชัย, 2535) พีรศักดิ์ (2528) ได้ศึกษาโดยการตรวจระยะเวลาของการเป็นสัด เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียม ทำการทดลองตรวจการเป็นสัดตั้งแต่เริ่มแรกและผสมเทียมในระยะเวลาที่ต่าง ๆกันของการเป็นสัด แล้วหาค่าอัตราการผสมติดออกมา พบว่าในช่วงกลางของการเป็นสัดจะมีอัตราผสมติดดีที่สุดคือ ประมาณร้อยละ 82 และการผสมเทียมช่วงหมดการ เป็นสัดมีอัตราการผสมติดลดลงเท่ากับร้อยละ 75 และจะมีอัตราการผสมติดลดลงเรื่อยๆ จนถึงช่วงหลังการหมดสัด 48 ชั่วโมงจะผสมไม่ติดเลย

ฮอร์โมนอีสตราไดออล (estradiol) เป็นฮอร์โมนที่ผลิตจากรังไข่ทำหน้าที่หลักคือทำให้เกิดพฤติกรรมการเป็นสัด และเป็นฮอร์โมนที่ทำให้สัตว์แสดงพฤติกรรมทางเพศต่างๆ วงรอบของการเป็นสัดจะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลในช่วงการเป็นสัดสูงเท่ากับ 6.05 mmol/l หลังจากนั้นจะมีระดับฮอร์โมนลดลงเรื่อยๆ หลังจากนั้นอีกประมาณ 24-30 ชั่วโมงจะเกิดการตกไข่ (Dieleman *et al.*,1983) การแสดงอาการเป็นสัดจะเริ่มช่วงใกล้กับระยะที่มีระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล-17-เบต้า สูงสุด และเกิดก่อนที่มีระดับลูทิไนซิ่งฮอร์โมน (luteinizing hormone) สูงสุด Cook และคณะ (1986) มีรายงานถึงลักษณะการเป็นสัดในโคนมมีความสัมพันธ์กับปริมาณของฮอร์โมนอีสตราไดออล-17-เบต้า ซึ่งความสัมพันธ์นี้ไม่เป็นเส้นตรงในโคนม

การวัดระดับของฮอร์โมนอีสตราไดออลเป็นเทคนิคหนึ่งที่บ่งบอกช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์สัตว์ได้ เทคนิคที่นิยมนำมาใช้วัดระดับฮอร์โมนคือ วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ (Dobson, 1983) เทคนิคนี้ใช้สารรังสีเป็นตัวติดตามปฏิกิริยาและวัดค่าของระดับฮอร์โมน เทคนิคนี้มีผลทำให้ผู้ใช้งานมีโอกาสได้รับอันตรายจากสารกัมมันตรังสี และมีปัญหาในการกำจัดขยะที่มีสาร

กัมมันตรังสีปนเปื้อน รวมทั้งเครื่องมือที่ใช้งานมีราคาแพง ดังนั้นการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้กับงานในฟาร์มโคนมจึงเป็นไปได้ยาก ด้วยข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีผู้สนใจใช้เทคนิคอื่นในการใช้งานวัดระดับฮอร์โมนได้แก่ เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) เป็นตัวติดตามปฏิกิริยา ในระยะหลังจะมีผู้ที่สนใจนำเทคนิค ELISA มาใช้เป็นจำนวนมาก เพราะเป็นเทคนิคที่มีความปลอดภัยและสะดวกสำหรับผู้ใช้งาน ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก สำหรับความแม่นยำ ความไว ในการวัดนั้นจะขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดของแอนติบอดี (antibody)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAb) เป็นแอนติบอดีชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (specificity) เนื่องจากแอนติบอดีชนิดนี้ผลิตได้จากเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนชนิดนั้น ๆ ซึ่งเซลล์ลูกผสมนี้ผลิตได้จากการเชื่อมระหว่างเซลล์ไมอิโลมา (myeloma cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวได้เป็นจำนวนมากและไม่มีความสามารถผลิตอิมมูโนโกลบูลินได้ กับเซลล์สัตว์ที่ทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดี ซึ่งส่วนมากนิยมใช้เซลล์ลิมโฟซัยท์ ชนิดบี (B-lymphocyte) จากม้าม แต่นักวิจัยอีกส่วนหนึ่งสามารถใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวมาใช้แทนได้โดยที่วิธีการนี้ไม่ต้องฆ่าสัตว์ ทำให้ลดต้นทุนค่าตัวสัตว์ทดลองลงได้

สำหรับงานวิจัยนี้มุ่งเน้นผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล ซึ่งผลิตได้จากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ ระหว่างเซลล์ไมอิโลมาจากหนูตัวเล็ก (mouse) สายพันธุ์ X63Ag 8.653 กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล เพื่อนำแอนติบอดีที่ได้นำมาใช้ในเทคนิค ELISA เพื่อใช้ตรวจการเป็นสัดของโคนม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล โดยใช้เซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ระหว่างหนูกับกระต่าย
2) เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ในเทคนิค ELISA ในการวัดฮอร์โมนอีสตราไดออล
3) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคการวัดฮอร์โมนอีสตราไดออล ระหว่างเทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเซ กับเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ
4) เพื่อใช้เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซในการตรวจสัดของโคนม

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

การวิจัยนี้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออลจากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ไมอิโลมาของหนูตัวเล็กกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่าย และใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นำไปใช้ในเทคนิค ELISA สำหรับการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออล ในช่วงการเป็นสัดของโคนม เพื่อบ่งชี้การเป็นสัดได้ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนั้นยังสามารถใช้ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยเป็นพื้นฐานและแนวทางสำหรับผู้สนใจด้านการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนต่าง ๆ ต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University