บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากขั้นตอนการผลิต $MAbE_2$ นั้น ใช้แอนติเจน 17β-Estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-BSA (E_2-6-CMO-BSA) เนื่องจาก E_2 มีขนาดโมเลกุลเล็กเรียกว่า hapten ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ จึงต้องนำไปเชื่อมกับโปรตีนซึ่งมีโมเลกุลใหญ่ ทำให้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนและกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันได้ (Moran *et al.*, 2002) ในการศึกษาการผลิตแอนติบอดีต่อฮอร์โมนประเภทสเตียรอยด์ส่วนใหญ่ใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนในการเชื่อมติด (carrier protein) ในการศึกษาครั้งนี้พบปัญหาจากการเตรียมแอนติเจนโดย ได้ทำการเชื่อมติด E_2-6-CMO กับ BSA แล้วนำไปกระตุ้นในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c ทุก 14 วัน ใช้เวลาในการกระตุ้น 84 วัน ไม่พบการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ E_2 เลย จึงได้เลือกใช้ E_2-6-CMO-BSA ทางการค้า มีอัตราส่วนโมเลกุลระหว่าง E_2 กับ BSA เป็น 6 : 1 เท่านั้น ซึ่งเป็นการเชื่อมติดที่ต่ำมาก แต่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี และเนื่องจากมีอัตราการเชื่อมติดต่ำจึงได้ทำการเพิ่มปริมาณแอนติเจนที่ใช้จาก 50-100 ไมโครกรัม เป็น 200 ไมโครกรัมต่อตัว ทำให้มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันดีขึ้น ส่วนตำแหน่งในการเชื่อมของสเตียรอยด์แต่ละชนิดก็มีความเหมาะสมแตกต่างกัน เช่น Dehydroepiandrosterone, Progesterone, Testosterone และ Estradiol ตำแหน่งที่เชื่อมคือ 7, 11α, 17β และ 6 ตามลำดับ นอกจากนี้โปรเจสเตอร์โรนสามารถเชื่อม BSA ในตำแหน่งที่ 3 ได้อีกด้วย (Dean *et al.*, 1971; Fantl and Wang, 1984 และ Munro and Stabenfeldt, 1984) และจากการศึกษาของ Fantl and Wang (1984) โดยใช้แอนติเจน 4 ชนิด คือ Dehydroepiandrosterone, Estradiol, Progesterone และ Testosterone พบว่ากลุ่มที่ฉีด Progesterone มีการผลิตแอนติบอดีสูงที่สุด รองลงมาคือ Dehydroepiandrosterone, Estradiol และ Testosterone ตามลำดับ และกลุ่มที่ใช้ Estradiol เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นหนู 6 ตัว พบว่ามีการผลิตแอนติบอดีเพียง 1 ตัวเท่านั้น จะเห็นว่า E_2 มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับโปรเจสเตอร์โรน (P_4) ในห้องปฏิบัติการที่ผู้วิจัยศึกษาอยู่มีการศึกษากระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/ c ด้วย P_4-11α-hemisuccinate-HSA และ P_4-3-CMO-BSA พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีทั้งสองชนิด ค่าแอนติบอดีในซีรั่มหนูที่วัดได้สูงและระดับแอนติบอดีอยู่ได้นานกว่า ส่วน E_2 เมื่อตรวจพบแอนติบอดีในซีรั่มหนูแล้ว หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ก็ลดลง สาเหตุหนึ่งในความสามารถของการเป็นแอนติเจนที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากโครงสร้างของฮอร์โมนแต่ละชนิด เช่น ความต่างกันของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตำแหน่งที่ 17 ของ Testosterone และ E_2 จะเหมือนกันซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนต่ำทั้งสอง และแตกต่างกับ P_4 อย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 2-3)

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำ E_2-6-CMO-BSA ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัว คือ หนูเบอร์ 1N, 2N และ 3N พบว่า มีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นหลังจากฉีดกระตุ้นครั้งแรก โดยตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA แต่เนื่องจากแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นมีองค์ประกอบของ BSA อยู่ด้วย และมีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่กว่าสเตียรอยด์มาก ทำให้แอนติบอดีที่ผลิตเป็นแอนติบอดีต่อ BSA ด้วย ดังนั้นการพิจารณาค่าแอนติบอดีต่อ E_2 ต้องใช้ค่าผลต่างการดูดกลืนแสงระหว่าง E_2-6-CMO-BSA กับ BSA โดยค่าความต่างสูงแสดงว่ามีการผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 สูงด้วยเช่นกัน ซึ่งพบว่าระดับแอนติบอดีต่อ E_2 และ BSA ของหนูเบอร์ 1N, 2N และ 3N เพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจาก boost E_2-6-CMO-BSA ในวันที่ 28, 42 ซึ่งการตอบสนองการกระตุ้นต่อ BSA ในวันที่ 42 เพิ่มขึ้น ทำให้ไม่พบความแตกต่างระหว่างแอนติบอดีต่อ E_2 และ BSA และจากนั้นทำการ boost ในวันที่ 42 พบว่าการตอบสนองต่อ E_2 ในวันที่ 56 ยังคงเพิ่มขึ้น แต่ระดับแอนติบอดีต่อ BSA วันที่ 56 ลดลงในหนูทั้ง 3 ตัว แต่หนูเบอร์ 3N ลดลงทั้งแอนติบอดีต่อ E_2 และ BSA แต่ BSA ลดลงมากกว่า แสดงว่าการสร้างแอนติบอดีต่อ E_2 สามารถเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นต่อไประยะเวลานาน ทำให้ในวันที่ 56 ได้ค่าการดูดกลืนแสงมีผลต่างระหว่าง E_2-6-CMO-BSA กับ BSA เท่ากับ 0.200, 0.253 และ 0.168 ตามลำดับ ค่าที่ได้นำมาใช้ในการเลือกหนู BALB/c โดยพิจารณาเลือกหนูเบอร์ 2N ที่มีค่าผลต่างการดูดกลืนแสงสูงที่สุด เพื่อนำมาเก็บม้ามสำหรับใช้ในการเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมา

ในขั้นตอนการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย E_2-6-CMO-BSA กับเซลล์ไมอิโลมา พบว่า เกิดกลุ่มเซลล์ลูกผสม Hybridoma จำนวน 29 หลุม คิดเป็น 5.5 % ของทั้งหมด 528 หลุม จะเห็นได้ว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ที่น้อยมาก เนื่องจากเป็นการเชื่อมกันแบบสุ่มทำให้โอกาสในการเชื่อมกันของเซลล์ที่ต้องการน้อยลงไปด้วย เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจากประสบการณ์ของผู้วิจัยพบว่า การเพิ่มจำนวนเซลล์ม้าม (Spleenocyte) ที่นำมาเชื่อมให้มากขึ้น ทำให้โอกาสในการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอิโลมาเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อนำกลุ่มโคลนที่ได้ทั้ง 29 หลุม มาทำการตรวจหาการผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 ด้วยวิธี ELISA พบว่า มีจำนวน 12 หลุม ที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E_2 คิดเป็น 41.4 % ของกลุ่มโคลนทั้งหมด จากขั้นตอนการเก็บเซลล์ม้ามทำได้รวดเร็ว ลักษณะเซลล์ก่อนทำการเชื่อมสมบูรณ์ดี รวมทั้งเซลล์ไมอิโลมาที่นำมาใช้มีอัตราการเติบโตดีมาก สภาพเซลล์กลมโต ทำให้กลุ่มโคลนที่ได้มีลักษณะกลมสวย เห็นขอบเซลล์ชัดเจน สุขภาพแข็งแรง และเลือกหลุม 4B9 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร สูงที่สุด มีอัตราการเติบโตดีมาก มาทำการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution หลังจากนั้นประมาณ 10 วัน ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลนเดี่ยวจำนวน 69 โคลน ซึ่งโคลนเดี่ยวที่เกิดขึ้นทั้งหมดให้ผลบวกต่อ E_2 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์ที่นำมาทำ limiting dilution มี uniformity หรือความเหมือนกันที่สม่ำเสมอมาก ซึ่งเป็นจุดเด่นของโคลนเดี่ยวจากวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี แต่เซลล์หลังจากแยกโคลนเดี่ยวสภาพเซลล์อ่อนแอลงบ้าง พบว่ามีการตายของเซลล์หลังจากดูดเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดี เนื่องจากเซลล์ต้องปรับสภาพจากการแยกโคลน ย้ายเพลท และเปลี่ยนน้ำเลี้ยงเซลล์ ทำให้เหลือเซลล์ที่แข็งแรงจำนวน 24 โคลนก็มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเติบโตต่อไป หากพบว่ามีเซลล์อ่อนแอ ฝ่อและตายควรปรับเปอร์เซ็นต์ของ Fetal bovine serum (FBS) เพิ่มขึ้น 5-10 % เพราะใน FBS มีสารหลายชนิดที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ เมื่อเซลล์สภาพดีแล้วค่อย ๆ ปรับให้ FBS มีเปอร์เซ็นต์เท่าเดิมตามที่เลี้ยงปกติ จากนั้นเลือกกลุ่มเซลล์ 4B91E4 และ 4B92D9 ที่มีค่า antibody titer สูงที่สุดและมีการเติบโตของกลุ่มเซลล์ดีมาก เลี้ยงเพิ่มจำนวนใน 10 % FBS และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อแยกเอาแอนติบอดี ได้ปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากกลุ่มเซลล์ 4B91E4 และ 4B92D9 เท่ากับ 11 และ 14 mg/100 ml ของน้ำเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกับการแยกแอนติบอดีจากน้ำเลี้ยงในงานวิจัยของ กนกวรรณ (2542) ซึ่งสามารถแยกแอนติบอดีได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ ประมาณ 1-5 mg/50 ml อย่างไรก็ตามการผลิตแอนติบอดีจากการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์หรือ *in vitro* method นี้เป็นวิธีการที่ทำให้ได้แอนติบอดีในปริมาณที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการผลิตแอนติบอดีโดยการเก็บ ascitic fluid หรือ *in vivo* method ซึ่งเป็นการนำเอาเซลล์ Hybridoma ที่ได้ฉีดเข้าช่องท้องหนู ซึ่งจะทำให้ได้แอนติบอดีปริมาณสูงกว่ามาก (Harlow and Lane, 1988) แต่ข้อดีจุดหนึ่งของการใช้ *in vitro* method คือแอนติบอดีที่ได้จะมีการปนเปื้อนของสารหรือโมเลกุลโปรตีนอื่นๆ น้อยกว่า และเป็นที่ยอมรับมากกว่าในแง่ของ animal welfare ปัจจุบันการเลี้ยงเซลล์ Hybridoma เพื่อผลิตแอนติบอดีได้มีการพัฒนาใช้ชุดสำเร็จรูปสำหรับฉีดเซลล์เข้าไปเลี้ยงในขวดแทนท้องหนู และมีการใช้ น้ำเลี้ยงเซลล์เป็น Fetal free media เพื่อแก้ปัญหาการปนเปื้อนของโปรตีนอื่น ๆ และได้แอนติบอดีในปริมาณมากอีกด้วย

นอกจากนี้ขั้นตอนการทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์เป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะจะทำให้แอนติบอดีมีความเข้มข้นและความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น มีความไว (sensitivity) สูงขึ้น ทำให้สามารถตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อย ๆ หรือสารทีมีการปนเปื้อนของสารอื่นได้ดี จากกระบวนการผลิตทั้งหมดทำให้ได้ $MAbE_2$ ซึ่งเป็นผลผลิตเริ่มต้นที่จะนำไปใช้สร้างกระบวนการวิเคราะห์หา E_2 ในน้ำนมโคนมเพื่อการตรวจสัดที่สะดวก แม่นยำ และไม่จำเป็นต้องอาศัยการสังเกตพฤติกรรมเพียงอย่างเดียว โดยใช้วิธี competitive ELISA คือ นำ $MAbE_2$ มาทำการเคลือบเพลท อัตราส่วนเจือจางที่เหมาะสมคือ 1:64 ซึ่งพบว่าใช้อัตราส่วนแอนติบอดีน้อยกว่าแอนติบอดีที่ยังไม่ทำให้บริสุทธิ์คือใช้อัตราเจือจางที่ 1: 8 เท่านั้น เป็นการสิ้นเปลืองแอนติบอดีมากกว่า และอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

E_2-HRP คือ 1:800 เมื่อนำสารละลายอีสตราไดออลมาตรฐานที่ระดับต่าง ๆ มาทำกราฟมาตรฐานได้ค่า 50 % binding หรือ sensitivity ที่ 50 pg/well สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ E_2 ในตัวอย่างน้ำนมโคนมในวันผสมเทียม ว่ามีความสัมพันธ์กับการผสมติดของโคนมหรือไม่ เพราะถ้าระดับ E_2 สูงย่อมแสดงให้เห็นถึงความพร้อมที่จะผสม ทำให้แสดงพฤติกรรมการเป็นสัดออกมา และเมื่อผสมได้ถูกเวลาย่อมจะทำให้อัตราการผสมติดเพิ่มสูงขึ้น จากการตรวจสัดและการผสมเทียมโคนมของเกษตรกรสหกรณ์โคนมแม่วางจำกัดทั้งหมด 14 ตัว ที่ทำการวิจัยครั้งนี้ พบว่ามีเพียง 6 ตัวเท่านั้นที่ผสมติด (42.85 %) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการตรวจสัดที่ไม่แม่นยำของเกษตรกรผู้เลี้ยง ที่ทำให้อัตราการผสมติดไม่ถึง 50 % จึงจำเป็นต้องหาวิธีอื่นมาช่วยยืนยันว่าควรจะผสมวันไหน โดยทั่วไปสามารถวัดระดับ E_2 ได้จากเลือด ปัสสาวะ และน้ำนม แต่การวัดจากเลือด กับปัสสาวะ จะไม่สะดวกในการปฏิบัติจริงเป็นงานประจำ เนื่องจากการเจาะเลือดเป็นการรบกวนโคทำให้เกิดความเครียดได้ หรือต้องรอเก็บปัสสาวะซึ่งยุ่งยาก และใช้เวลานาน ดังนั้นการวัด E_2 จากน้ำนมจึงเป็นหนทางที่น่าสนใจเพราะสะดวก ทำเป็นประจำ และง่ายในการเก็บตัวอย่างมากที่สุด และสามารถหาความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมได้โดยไม่ต้องทำการสกัด จากการวัดด้วยวิธี RIA ได้ค่า E_2 ใน whole milk เฉลี่ย ± SD (n) วันที่ 5 และ 18 ของวงรอบการเป็นสัดเท่ากับ 0.8 ± 0.3 pg/ml (n = 8) และ 5.4 ± 1.9 pg/ml (n = 8) ตามลำดับ ใน defatted milk เท่า 0.6 ± 0.2 pg/ml (n = 8) และ5.3 ± 1.8 pg/ml (n = 8) ตามลำดับ (Lopez *et al.* 2002) และจากการวัดระดับ E_2 ในน้ำนมโคนมในวันผสมเทียมโดยวิธี competitive ELISA พบว่า ความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมวันก่อนผสมเทียม (-1) และวันผสมเทียม (0) ในโคกลุ่มที่ผสมติดสูงกว่าโคกลุ่มที่ผสมไม่ติดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) คือ วันที่ -1 โคกลุ่มผสมติดมีความเข้มข้น E_2 เฉลี่ย ± SD (min – max, n) เป็น 1.58 ± 1.79 (0.12 - 4.65, n = 6) ng/ml โคกลุ่มผสมไม่ติดเฉลี่ย 0.26 ± 0.24 (0.04 - 0.81, n = 13) ng/ml และวันที่ 0 โคกลุ่มที่ผสมติดมีความเข้มข้น E_2 เฉลี่ย 1.30 ± 0.88 (0.33 - 2.66, n = 6) ng/ml และโคกลุ่มผสมไม่ติดเฉลี่ย 0.51 ± 0.43 (0.03 - 1.36, n = 13) ng/ml ความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมที่วัดวิธี competitive ELISA นี้ได้เป็นระดับ ng ซึ่งมากกว่า การวัด E_2 ในน้ำนมด้วย RIA ของ Lopez *et al.* 2002 ตามที่กล่าวมาแล้ว จากผลการวัดระดับ E_2 ในน้ำนมในช่วงวันเป็นสัดจากการสังเกต ทำให้พบว่าระดับ E_2 ในน้ำนมโคนมมีความสัมพันธ์กับการผสมติดของโคนมจริงตามที่ได้กล่าวไว้ Lyimo *et al.* (2000) ทำการศึกษาวัดระดับ E_2 ด้วยวิธี RIA และพฤติกรรมเป็นสัดในโคนมพันธุ์ Holstein Friesian 14 ตัว พบว่ามีระดับ E_2 ในพลาสมาแสดงค่าเฉลี่ย ± SD (min – max, n) เป็น 7.76 ± 2.39 (0.75 – 13.86, n = 11) pg/ml ในวันที่มีคะแนนพฤติกรรมเป็นสัดสูงสุดและระดับ E_2 ลดลงหลังจากนั้น 6-12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Ronchi *et al.* (2001) ที่ทำการวัดความเข้มข้น E_2 ในพลาสมาด้วยวิธี RIA ได้ความเข้มข้น E_2 อยู่ในช่วง 1-8 pg/ml และมีค่า E_2 สูงสุดในวันที่ 0 ซึ่งการแสดงอาการเป็นสัดอาจเกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก่อนหรือหลังวันที่มี E_2 สูงสุดได้ (Lopez *et al.*, 2002) ถ้าตรวจสัดด้วยการสังเกตเองเพียงอย่างเดียว จึงผิดพลาดได้ ความเข้มข้น E_2 ในแต่ละครั้งที่ผสมและแต่ละตัวแตกต่างกัน ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าส่วนใหญ่โคที่ผสมติดมีความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมในวันผสมเทียมมากกว่า 1 ng/ml แต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น E_2 ของโคตัวนั้น ๆ ด้วย ดังนั้นหากจะกำหนดว่าปริมาณ E_2 ในน้ำนมที่ผสมแล้วทำให้ผสมติดคือมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ng/ml จะสามารถนำไปใช้กำหนดวันผสมเทียมโคได้ 67 % ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ได้กับโคทุกตัว เนื่องจากโคบางตัวมีปริมาณ E_2 ที่ต่ำโดยพื้นฐานอยู่แล้ว ค่าที่สูงสุดอาจเป็นค่าพื้นฐานของโคอีกกลุ่มหนึ่งได้ ในอีกทางหนึ่งที่จะนำไปใช้ได้คือ ต้องโคที่มีประวัติการเป็นสัดมาแล้ว เมื่อทราบวงรอบสามารถนับวันที่คาดว่าจะเป็นสัดแล้วเก็บตัวอย่างน้ำนมต่อกัน 2 วัน เช้าและเย็น ก่อนถึงวันครบรอบมาตรวจความเข้มข้น E_2 เพื่อยืนยันวันผสมที่แน่นอนได้ และในการศึกษานี้มีโคกลุ่มที่ผสมไม่ติด 1 ตัว ในวันที่ 0 ที่ผสมมีความเข้มข้น E_2 น้อยกว่าวันที่ +1 แม้ความเข้มข้น E_2 มากกว่า 1 ng/ml แต่วันที่ผสมระดับ E_2 ยังไม่ถึงค่าสูงสุดในรอบการเป็นสัด แสดงว่าเป็นการผสมก่อน 1 วัน ซึ่งการผสมผิดวันเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้โคตัวนี้ผสมไม่ติด จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการผสมเทียมโคในวันที่มีระดับความเข้มข้น E_2 สูงที่สุดและหลังจากวันสูงสุดภายใน 1 วัน มีโอกาสผสมติดมากกว่าการผสมก่อนถึงระดับสูงสุด 1 วัน เนื่องจากต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถมีชีวิตรอดได้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่โคด้วย จากการนับจำนวนสเปิร์มโคนมในห้องปฏิบัติการของคุณวิวัฒน์ พัฒนาวงศ์ พบว่าสเปิร์มสามารถมีชีวิตอยู่ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง และอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มที่ 24 ชั่วโมงจะต่ำมาก (5 %) ดังนั้นหากผสมเทียมก่อน 1 วัน สเปิร์มจะตายก่อนที่ไข่จะตกจึงทำให้ผสมไม่ติด และหากผสมหลังจากพบระดับ E_2 สูงสุดเกิน 24 ชั่วโมง ก็ทำให้ผสมไม่ติดเหมือนกันจากการวัดความเข้มข้น E_2 ในพลาสมาด้วย RIA ช่วงเป็นสัด ได้ 6.5 -10 pg/ml และหลังจากเป็นสัดจะลดลงจนต่ำสุดที่ 24 ชั่งโมง หลังจากการเป็นสัด คือ 2.5 – 4.0 pg/ml ($P < 0.01$) (Tohei *et al.*, 2001)

การเป็นสัดของโคนมในรอบหนึ่ง ๆ อาจมีคลื่นฟอลลิเคิล 2 คลื่น, 3 คลื่น หรือ 4 คลื่น คือมีฟอลลิเคิลหลาย ๆ ใบเจริญขึ้นมาและฝ่อสลายไปเป็นชุดของฟอลลิเคิล ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดซึ่งเรียกว่า dominant follicle จะมีการตกไข่ (Sakiguchi *et al.*, 2004) รอบการเป็นสัดของโคนมในงานวิจัยนี้มีคลื่น E_2 ขึ้นลง 2 – 4 คลื่น มีช่วงห่างของคลื่นขึ้นลงจากมากไปหาน้อย คือ 2 คลื่น มีช่วงคลื่นยาว 10 – 12 วัน, 3 คลื่น มีช่วงคลื่นยาว 6 - 9 วัน และ 4 คลื่นมีช่วงคลื่นยาวเพียง 6 – 8 วันเท่านั้น โคที่ผสมติดจะมีจำนวนคลื่น E_2 3 คลื่น ซึ่งจะมีลักษณะเหมือนคลื่น E_2 ในโคส่วนใหญ่ ส่วนในโคกลุ่มที่ผสมไม่ติดมีคลื่น E_2 แปรปรวนอยู่ระหว่าง 2- 4 คลื่น เช่นเดียวกับการทดลองของ Wael (2003) ที่ทำการเปรียบเทียบคลื่น E_2 โดยวัดขนาด follicle และหาปริมาณ E_2 พบว่าขนาด follicle ที่ใหญ่ขึ้นไปมีผลเพิ่มความเข้มข้นของ E_2 ด้วย และจำนวนคลื่น 2 และ 3 คลื่นนั้นจะมีผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพิ่มความยาวของระยะเวลาการตกไข่ซึ่งระหว่างจำนวน 2 และ 3 คลื่นแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 2 คลื่น ใช้ระยะเวลาตกไข่เฉลี่ย 19.8 ± 0.6 วัน (n = 7) สั้นกว่า 3 คลื่นที่ใช้ระยะเวลาตกไข่เฉลี่ย 22.5 ± 0.8 วัน (n = 7) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผสมติดระหว่าง 2 คลื่นและ 3 คลื่นพบว่า การผสมในวงรอบที่มี 3 คลื่น ผสมติดสูงกว่า การผสมในวงรอบที่มี 2 คลื่น เนื่องจาก ขนาดของ dominant follicle ในคลื่นที่ 3 มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์กว่า (Sakiguchi *et al.*, 2004) การวัดขนาด dominant follicle วันที่ -1 และวันที่ 0 แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±SEM (n) ได้17.3 ± 0.3 mm. (n = 34) และ 18.7 ± 0.2 mm. (n = 71) ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้น E_2 ในซีรัมที่วัดด้วย RIA วันที่ -1 และวันที่ 0 กลับไม่แตกต่างกัน ซึ่งได้ค่า 8.7 ± 0.5 pg/ml (n = 34) และ 7.8 ± 0.4 pg/ml (n = 71) (Lopez *et al.* 2004) แต่ถ้าวัดจาก follicle โดยตรงอาจได้ค่าความเข้มข้น E_2 ตามขนาดของ follicle เช่นเดียวกับ Silvan *et al.* (1993) ได้ใช้วิธี ELISA ในการตรวจหาระดับ E_2 ใน follicula fluid จากลักษณะขนาดของ follicle ที่แตกต่างกัน เล็ก, กลาง และใหญ่ ผลที่ได้คือ มี E_2 เท่ากับ 77 ±5.2 (n = 490), 111±19 (n = 65) และ 496 ±146 (n = 45) ng/ml ตามลำดับ

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการที่จะใช้ระดับ E_2 ในน้ำนม เป็นเครื่องมือช่วยในการตัดสินใจผสมเทียมโคนม และนำความสัมพันธ์ระหว่างการผสมติดของโคนมกับระดับ E_2 ในน้ำนมในวันผสมเทียมมาเป็นแนวทางที่จะกำหนดความเข้มข้นของ E_2 สำหรับการตัดสินใจผสมเทียมโคนม ซึ่งจากผลการวิจัยทั้งหมดที่เกิดขึ้นก็แสดงให้เห็นว่าสามารถกำหนดวันผสมเทียมโคนมโดยใช้ความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมได้ คือระดับ E_2 ในวันผสมเทียมควรมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ng/ml แต่มีข้อจำกัดสำหรับโคบางตัวที่มี E_2 ในรอบการเป็นสัดต่ำกว่า 1 ng ควรทำการผสมเทียมโคในวันที่มีระดับความเข้มข้น E_2 สูงที่สุดหรือหลังจากวันสูงสุดภายใน 1 วัน โดยต้องศึกษารอบการเป็นสัดของโคก่อน แล้วเก็บตัวอย่างน้ำนมมาตรวจความเข้มข้น E_2 ติดต่อกัน 2 วัน เช้าและเย็น ก่อนถึงวันครบรอบเป็นสัดและควรเก็บน้ำนมหลังวันผสมมาวิเคราะห์ด้วย เพื่อยืนยันวันผสมที่แน่นอนได้ และเพื่อความสะดวกรวดเร็วของการตรวจหาความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมไปใช้งานในฟาร์มโคนม เป็นการพัฒนางานต่อไปควรจะมีการพัฒนาอุปกรณ์และวิธีการให้เป็นชุดตรวจ ซึ่งเกษตรกรสามารถนำมาใช้เป็นชุดตรวจ E_2 ช่วยกำหนดวันทำการผสมเทียม เพื่อให้เกิดการผสมเทียมที่แม่นยำ และนำไปสู่อัตราการผสมติดที่เพิ่มขึ้น และการให้ผลผลิตน้ำนมที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มจำนวนโคนมให้เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามปัจจัยอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น อายุ จำนวนรอบการให้ผลผลิต รวมไปถึง อาหาร การจัดการและความชำนาญในการผสมเทียมยังคงมีผลโดยตรงต่ออัตราการผสมติด ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงจำเป็นต้องให้ความสำคัญกับสิ่งเหล่านี้ควบคู่กันไปด้วย เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้น และเป็นไปตามเป้าหมายที่วางไว้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ E_2 ($MAbE_2$) จากโคลนเบอร์ 4B9 1E4 ได้แอนติบอดี 0.487 ng/ml

2. แอนติบอดีมีความไวที่ 50 % binding เท่ากับ 50 pg/well (2.5 ng)

3. สามารถตรวจหาความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมโคนมด้วยวิธี ELISA ที่เตรียมจาก $MAbE_2$ ได้

4. ความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมโคนมในวันผสมเทียมควรมีระดับ 1.30 ± 0.88 ng/ml หรือเป็นวันที่มีระดับ E_2 สูงสุด

5. สามารถใช้ระดับ E_2 ในน้ำนมโคนมกำหนดเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมโคนมได้

ข้อเสนอแนะ

1. ความเข้มข้นแอนติเจนที่ฉีดกระตุ้นควรคำนึงถึงอัตราการเชื่อมติดระหว่างสเตียรอยด์กับโปรตีนด้วย หากอัตราการเชื่อมติดน้อยควรเพิ่มความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้น

2. เนื่องจากอีสตราไดออลมีความสามารถในการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในระดับต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสเตียรอยด์ตัวอื่น ๆ ดังนั้นควรเพิ่มจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการกระตุ้น

3. ขั้นตอนการเก็บเซลล์ม้ามควรใช้เวลาให้น้อยที่สุด เพื่อจะได้เซลล์ที่แข็งแรง และตรวจดูสภาพเซลล์ไมอิโลมาให้อยู่ในลักษณะที่สมบูรณ์ การเติบโตดีก่อนนำมาเชื่อมเซลล์

4. การเชื่อมเซลล์เป็นแบบสุ่ม ทำให้โอกาสในการเชื่อมกันของเซลล์ที่ต้องการน้อยลงไปด้วย ดังนั้นควรเพิ่มจำนวนเซลล์ม้ามในการเชื่อม เพื่อเพิ่มโอกาสการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ม้ามกับเซลล์ไมอิโลมา ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดเซลล์ Hybridoma เพิ่มขึ้น

5. เมื่อพบปัญหาเซลล์อ่อนแอ ฝ่อและตาย ควรเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ FBS เพราะใน FBS มีสารหลายชนิดที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ เมื่อเซลล์สภาพดีแล้วค่อย ๆ ปรับให้ FBS มีเปอร์เซ็นต์เท่าเดิมตามที่เลี้ยงปกติ

6. การเลี้ยงเซลล์ Hybridoma สำหรับเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์เพื่อแยกเอาแอนติบอดี ควรเลี้ยงใน Fetal free media หรือชุดสำเร็จรูปสำหรับฉีดเซลล์เข้าไปเลี้ยงแทนการฉีดเข้าช่องท้องหนู ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ และได้แอนติบอดีในปริมาณที่มากกว่าการเลี้ยงใน 10 % Fetal bovine serum

7. น้ำนมที่นำมาวิเคราะห์ควรทำการแยกไขมันออกให้ดีเพราะไขมันจะมีผลต่อการวิเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. ควรเพิ่มจำนวนโคในการเก็บตัวอย่าง และเก็บให้ครบทุกฤดูกาลเพื่อให้เห็นปัจจัยจากฤดูกาลที่มีผลต่ออัตราการผสมติด

9. นอกจากวิเคราะห์หา E_2 แล้วน่าจะวิเคราะห์ฮอร์โมนอื่นร่วมด้วยเช่น โปรเจสเตอร์โรน เพื่อยืนยันการตกไข่ และการตั้งท้องต่อไป

10. การพัฒนางานต่อไปควรจะมีการพัฒนาอุปกรณ์และวิธีการให้เป็นชุดตรวจ E_2 เพื่อใช้งานในฟาร์ม

11. สำหรับการนำวิธี ELISA ไปใช้ในการวัดความเข้มข้น E_2 ในน้ำนมควรทำการศึกษาถึงวงรอบการเป็นสัดและระดับ E_2 ในน้ำนมทั้งวงรอบการเป็นสัดของโคด้วย เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการผสมเทียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved