สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฎ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์	2
1.2 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 เทคนิคการคัดเพศ	
2.1.1 Flow Cytometry	3
2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	3
2.1.3 Male Specific Monoclonal Antibody	5
2.2 ระบบภูมิคุ้มกัน	
2.2.1 แอนติบอดี	8
2.2.2 ระบบคอมพลีเมนต์	10
2.2.3 ส่วนประกอบของระบบคอมพลีเมนต์	11
2.2.4 การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์	11
2.2.4.1 Classical pathway	11
2.2.4.2 Alternative pathway	12
2.2.4.3 The MBLectin pathway	12
2.3 น้ำเชื้อโค	15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 เทคนิค Real Time PCR 16

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง 19

3.2 สารเคมี 19

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 19

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR 20

3.2.3 สารเคมีสำหรับ Gel Electrophoresis 21

3.2.4 สารเคมีในการเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 21

3.2.5 สารละลาย 22

3.2.6 ชุดสารเคมีสำเร็จรูป 22

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 22

3.4 การเตรียมโมโคลนอลแอนติบอดี 24

3.4.1 การนำเซลล์ไฮบริโดมาออกมาเลี้ยง 24

3.4.2 การตรวจการตอบสนองแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA 24

3.4.3 การแยกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution 25

3.4.4 การเลี้ยงเซลล์ด้วย Celline AD 1000 25

3.4.5 การตกตะกอนโปรตีนจี 25

3.4.6 การตรวจสอบความแม่นยำของ เอชวาย แอนติบอดี ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy 26

3.5 ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ชาโลเลย์ 27

3.5.1 การรีดน้ำเชื้อสดเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งบรรจุหลอด 27

3.5.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับทดลองปฏิกิริยาไซโตทอกซิค 27

3.6 แหล่งคอมพลีเมนต์และการเตรียมคอมพลีเมนต์ 28

3.7 การทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค 28

3.8 เทคนิค Real time PCR 28

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีจากการตกตะกอนด้วยโปรตีนจี 30

4.2 ผลการวัดความแม่นยำของ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy 30

4.3 ผลการรีดน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ชาโลเลย์ 31

4.4 ผลการหาอัตราเจือจางของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิค 33

4.5 ผลการเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิค 34

4.6 แสดงสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายจากการย้อมติดสี FITC 36

4.7 ยืนยันผลการการยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายจากการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Real time PCR 38

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง 42

สรุปและข้อเสนอแนะ 47

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 54

ภาคผนวก ข 60

ประวัติผู้เขียน 63

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

3-1 แสดงสัดส่วนของแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ในปฏิกิริยาไซโตทอคซิค 29

4-1 แสดงการตอบสนองของแอนติบอดีและแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ของโคเพศผู้และเพศเมีย โดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy 31

4-2 แสดงผลการรีดน้ำเชื้อโคชาโลเลย์ 2 ครั้ง เพื่อทำน้ำเชื้อบรรจุหลอดแช่แข็ง 31

4-3 แสดงการลดลงของยีน BOVM97 ภายหลังคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิค จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการวัดด้วยเทคนิค Real time PCR 38

4-4 แสดงการลดลงของยีน β-actin ภายหลังคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิค จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยการวัดด้วยเทคนิค Real time PCR 40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
2-1	แสดงแบบจำลองโครงสร้างแอนติบอดี	9
2-2	แสดงภาพการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ผ่านทาง Classical pathway, Alternative pathway, MBLectin pathway	14
2-3	ภาพแสดงลักษณะตัวสเปิร์มโค	15
2-4	การตรวจสอบโดย SYBR Green I Dye	17
2-5	แสดงการประยุกต์ใช้โมโนโคนอลแอนติบอดีต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเนื้อในปฏิกิริยาไซโตทอกซิกเพื่อให้ทำลายสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายอย่างจำเพาะเจาะจง	18
3-1	แสดงวิธีการการตกตะกอนโปรตีนในถุง dialyze ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่น และวิธีการใช้ Hi Trap ® Protein G column ในขั้นตอนการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	26
4-1	แสดงการตอบสนองของแอนติบอดีและแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้และเพศเมียโดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy	30
4-2	เปรียบเทียบการเกิดวิการบริเวณผิวของสเปิร์มในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจากการตรวจดูด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM)	32
4-3	แสดงอัตราเจือจางของคอมพลีเมนต์ต่ออัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม	33
4-4	แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิค	34
4-5	แสดงภาพของสเปิร์มย้อมติดสี เพื่อดูอัตราการตายในการเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิค	35
4-6	แสดงสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายที่ทำการ swim up จากตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิค ในอัตราเจือจางของแอนติบอดีระดับต่างๆ พบว่าจำนวนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายลดลง	36
4-7	แสดงภาพถ่ายของสเปิร์มที่ swim upจากตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิคและย้อมสี FITC ดูความจำเพาะต่อเพศผู้	37

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

4-8 แสดงกราฟมาตรฐานยีน BOVM97จาก Plasmid DNA 38

4-9 แสดงการปรากฏของสัญญาณ Fluorescence จาก plasmid DNA BOVM97 ที่ความ เข้มข้น 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 และ 10^3 39

4-10 แสดง Melting curve ของ Plasmid DNA BOVM97 จากการทำ Real time PCR สำหรับการตรวจผลผลิต 39

4-11 แสดงกราฟมาตรฐานยีน β-actin จาก Plasmid DNA 40

4-12 แสดงการปรากฏของสัญญาณ Fluorescence จาก plasmid DNA β-actin ที่ความเข้มข้น 10^7, 10^6, 10^5, 10^4 และ 10^3 41

4-13 แสดง Melting curve ของ Plasmid DNA β-actin จากการทำ Real time PCR สำหรับการ ตรวจผลผลิต PCR 41

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	เปอร์เซ็นต์
^{O}C	องศาเซลเซียส
Ab	Antibody
Ag	Antigen
H-Y	antigen Histocompatibility-Y antigen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
HAT	Hypoxanthine Aminopetrin Thymidine
HRP	Horseradish peroxidase
HT	Hypoxanthine Thymidin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's medium
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
PBS	Phosphate buffer saline
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FITC	Fluoresecein comjugated
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
dNTPs	deoxynucleotide triphosphate
MAb	Monoclonal Antibody
CMI	Cell mediated immunity
HMI	Humoral immunity
mg	milligram
ml	milliliter
μl	microliter
ng	nanogram
nm	nanometer
O.D.	optical density

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved