

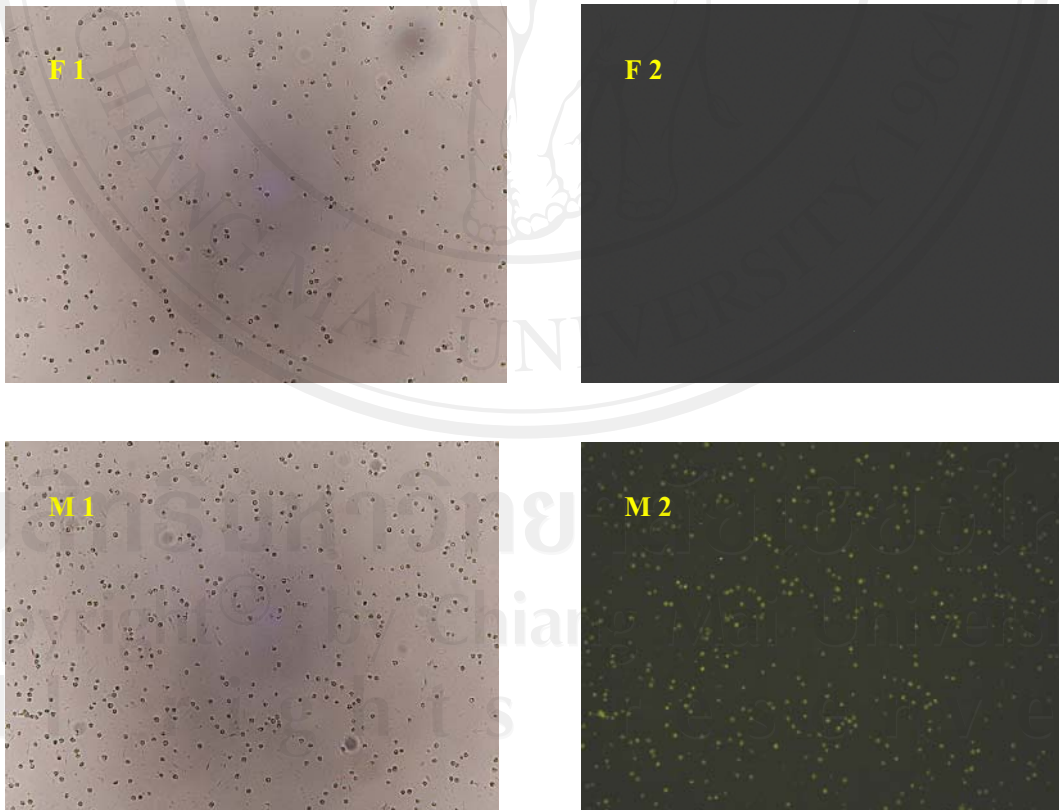
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวัดปริมาณโปรตีนของแอนติบอดีจากการตกตะกอนด้วยโปรตีนจี

หลังจากการแยกโคลนเดี่ยวได้นำโคลนที่ให้ค่าผลต่างการดูดกลืนแสงที่สูงสุด มาทำการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี *in vitro* โดยเลี้ยงเซลล์ด้วย serum free media เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ มาตกตะกอนโปรตีนและผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ปริมาณแอนติบอดีประมาณ 1-2 mg/ml ของอาหารเลี้ยงเซลล์

4.2 ผลการวัดความแม่นยำของ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy



ภาพ 4-1 แสดงการตอบสนองของแอนติบอดีและแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) โดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

จากภาพ 4-1 F1 และ M1 แสดงเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้และเพศเมียภายใต้สภาพแสงปกติ ส่วนภาพ F2 และ M2 แสดงเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้และเพศเมียภายใต้สภาพแสง UV

ตาราง 4-1 แสดงการตอบสนองของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้และเพศเมียโดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

SEX	Mean (%)	±SE	±SD	max	min
male (8)	92.77 a	0.69	1.38	94.73	91.57
female (8)	2.12 b	0.07	0.14	2.32	2.01

a, b
means with significance ($p < 0.05$)

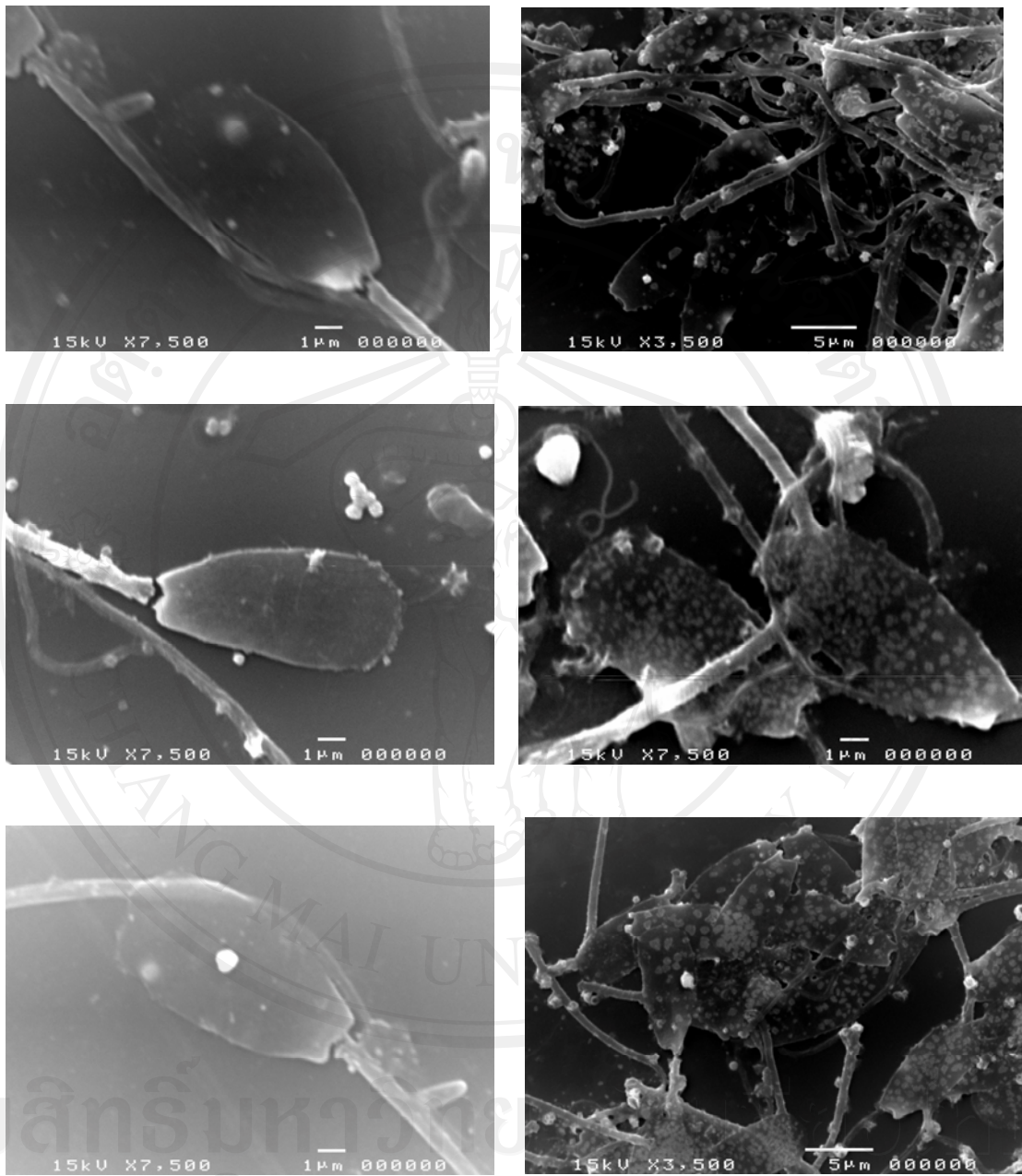
4.3 ผลการรีดน้ำเชื้อพ่อโคชาโลเลย์

ตาราง 4-2 แสดงผลการรีดน้ำเชื้อโคชาโลเลย์ 2 ครั้ง เพื่อทำน้ำเชื้อบรรจุหลอดแช่แข็ง

เบอร์พ่อโครีดครั้งที่ 1	mass movement	% รอด น้ำเชื้อสด	% รอด น้ำเชื้อแช่แข็ง	จำนวนหลอด
B007	++++	80	35	350
B018	+++	75	30	300
B010	+++	75	30	180

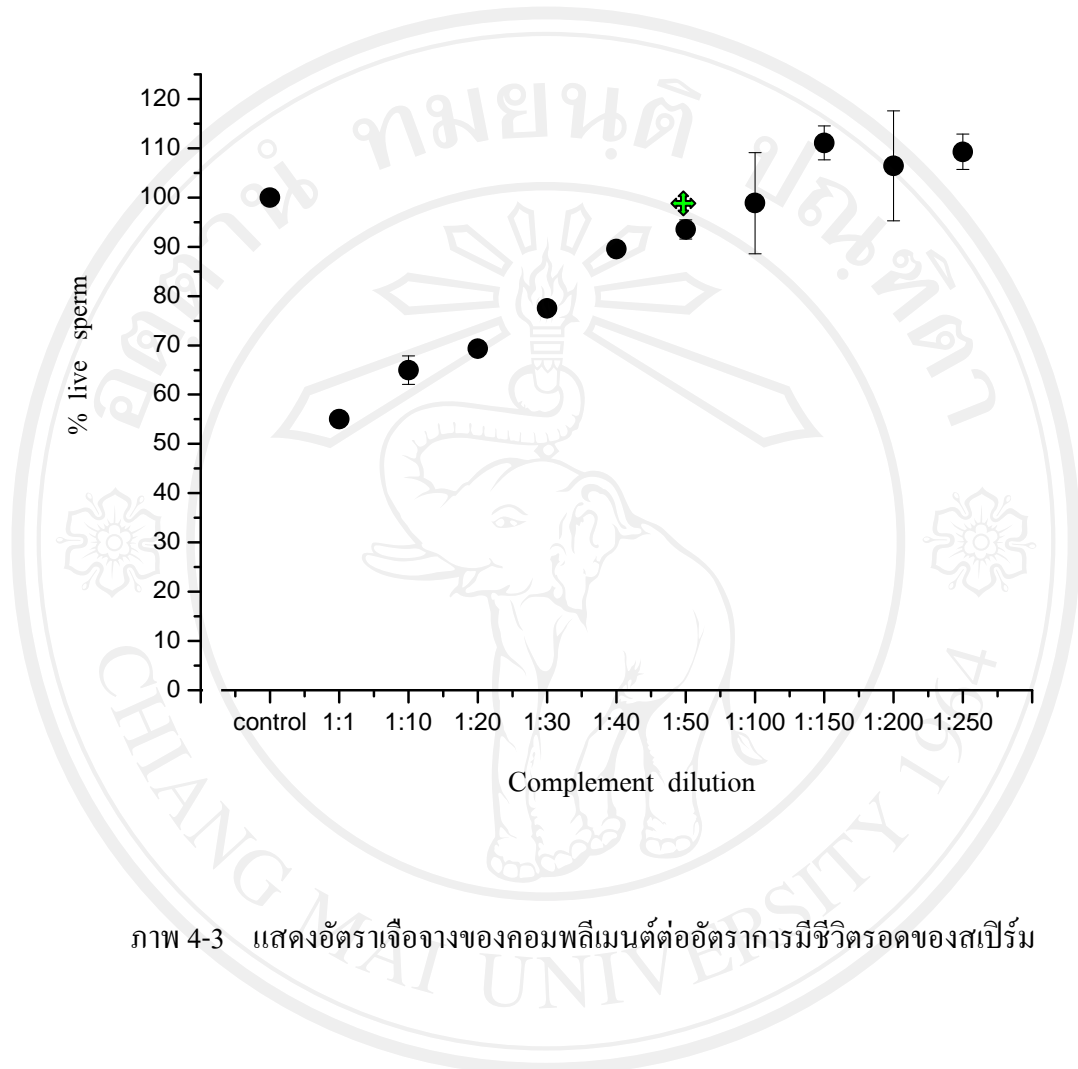
เบอร์พ่อโครีดครั้งที่ 2	mass movement	% รอด น้ำเชื้อสด	% รอด น้ำเชื้อแช่แข็ง	จำนวนหลอด
B007	+++	75	30	290
B016	+++	75	40	260
B010	+++	75	30	433

(หมายเหตุ +++++ ดีมาก +++ ดี ++ พอใช้ + ไม่ดี)



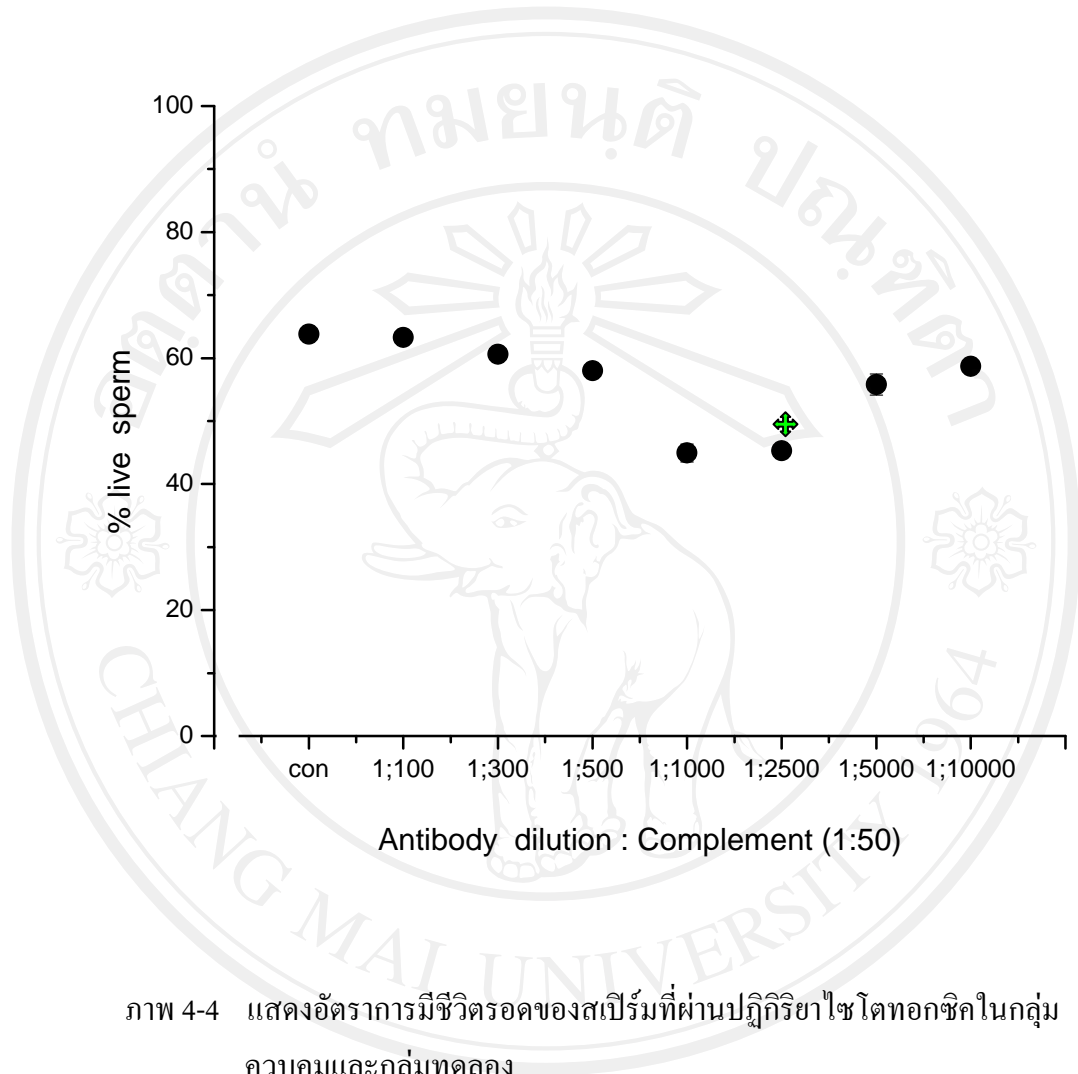
ภาพ 4-2 เปรียบเทียบการเกิดผิวบริเวณผิวของสปอร์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง
จากการตรวจดูด้วยเครื่อง scanning electron microscope (SEM)

4.4 ผลการหาอัตราเจือจางของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิก

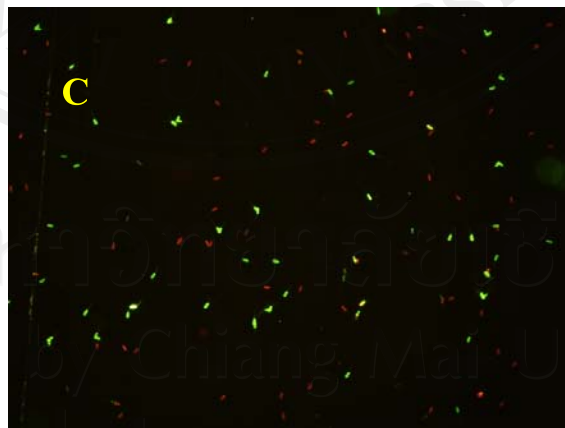
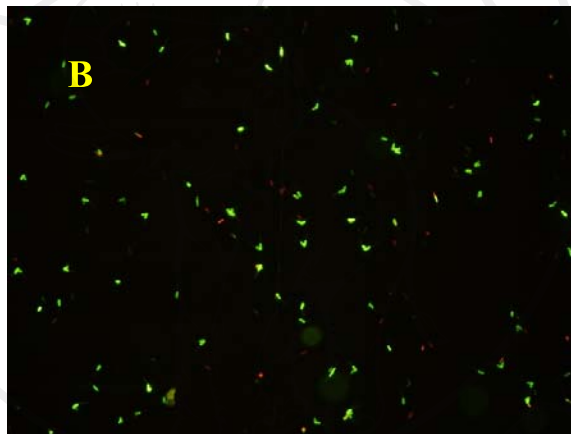


ภาพ 4-3 แสดงอัตราเจือจางของคอมพลีเมนต์ต่ออัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม

4.5 ผลการเกิดปฏิกิริยาไซโตทอกซิก



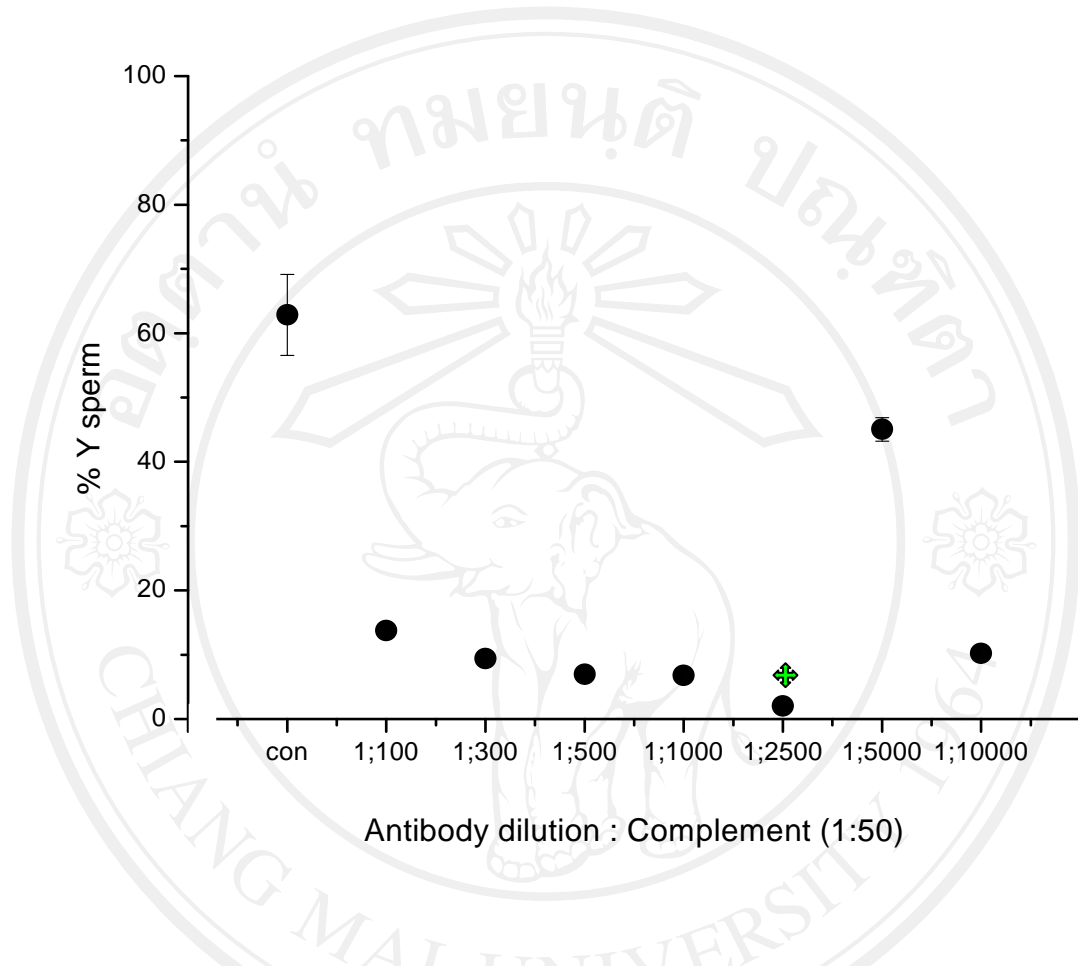
ภาพ 4-4 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



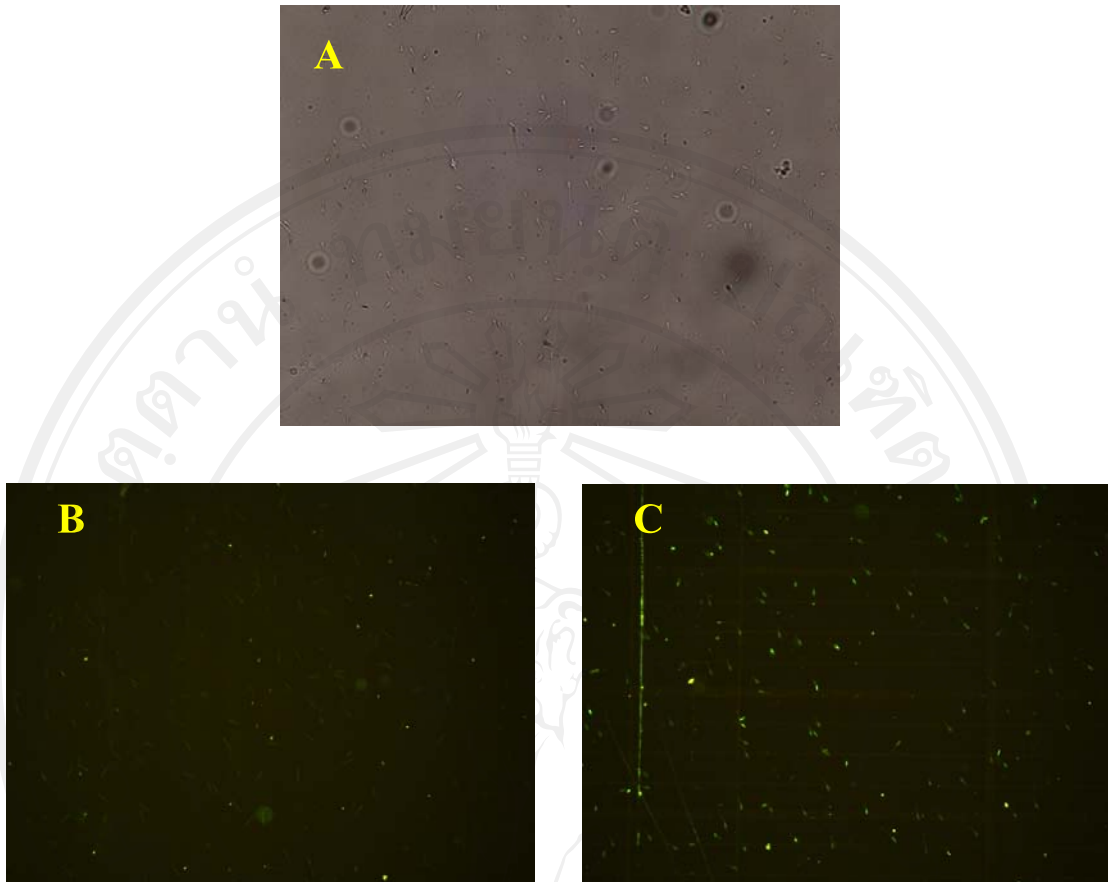
ภาพ 4-5 แสดงสเปิร์มติดสี (FITC) เพื่อคัดสรรการรอดชีวิตจากปฏิกิริยาไซโตทอกซิก

- A) ภาพสเปิร์มภายใต้สภาพแสงปกติ
- B) สีเขียว = สเปิร์มมีชีวิต, สีแดง = สเปิร์มตาย (กลุ่มควบคุม)
- C) สีเขียว = สเปิร์มมีชีวิต, สีแดง = สเปิร์มตาย (กลุ่มทดลอง Ab 1:2,500)

4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย (จำเพาะต่อเพศผู้) จากการย้อมสี FITC



ภาพ 4-6 แสดงเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย (จำเพาะต่อเพศผู้) ที่ทำการ swim up จากตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิก ในอัตราเจือจางของแอนติบอดีระดับต่างๆ พบจำนวนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายลดลง



ภาพ 4-7 แสดงภาพถ่ายของสเปิร์มที่ swim up จากตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิก และย้อมสี FITC ดูความจำเพาะต่อเพศผู้

A สเปิร์มกลุ่มควบคุมภายใต้สภาพแสงปกติ

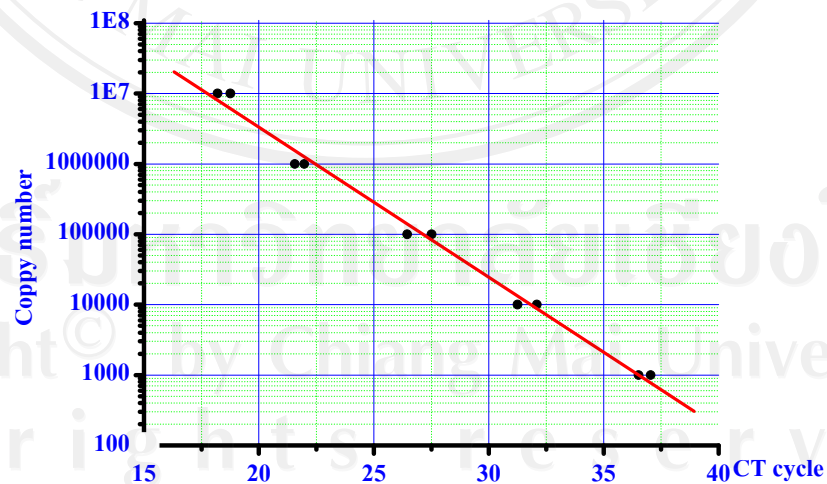
B สเปิร์มกลุ่มผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิก ภายใต้สภาพแสง UV

C สเปิร์มกลุ่มควบคุมภายใต้สภาพแสง UV

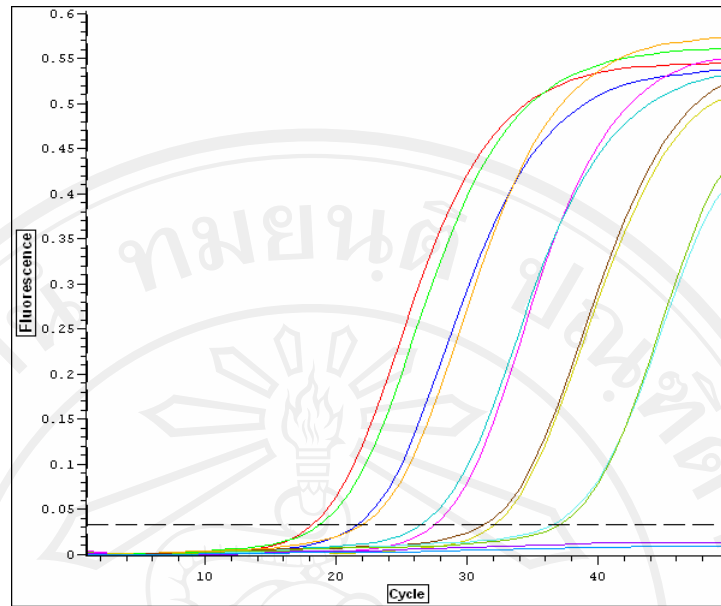
4.7 การยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายจากการคัดเพศด้วยปฏิกิริยา
ไซโตทอกซิกจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Real time PCR

ตาราง 4-3 แสดงการลดลงของยีน BOVM97 ภายหลังจากคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิกจาก
โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยการวัดด้วยเทคนิค Real time PCR

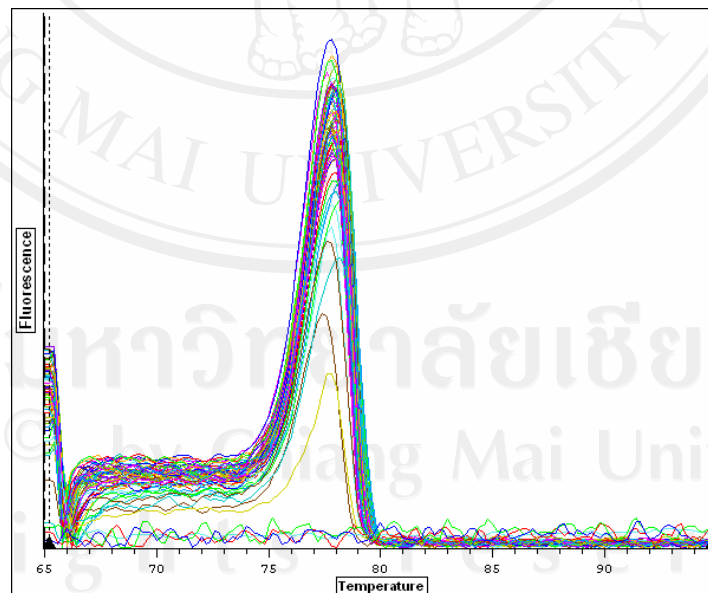
treatment	CT		± se	max	min
	mean	± sd			
control	26.95	0.04	0.03	26.92	26.98
Ab 1:2,500 + complement 1:50	31.14	2.04	1.18	29.11	33.17



ภาพ 4-8 แสดงกราฟมาตรฐานยีน BOVM97จาก Plasmid DNA



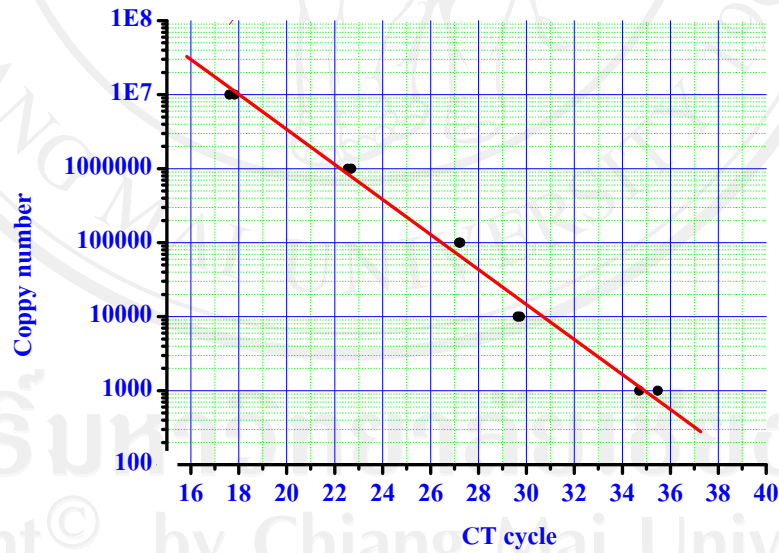
ภาพ 4-9 แสดงการปรากฏของสัญญาณ Fluorescence จาก plasmid DNA BOVM97 ที่ความเข้มข้น 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 ตามลำดับ



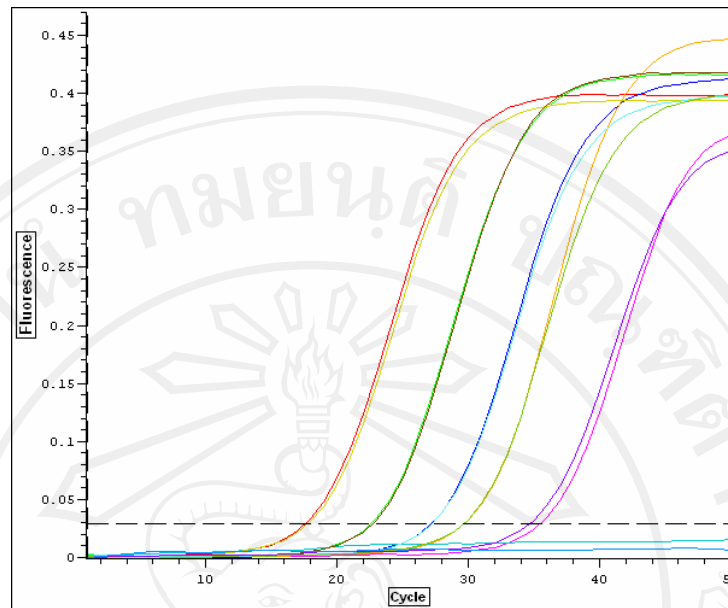
ภาพ 4-10 แสดง Melting curve ของ Plasmid DNA BOVM97 จากการทำ Real time PCR สำหรับ การตรวจผลผลิต

ตาราง 4-4 แสดงการลดลงของยีน β -actin ภายหลังจากตัดเพศด้วยปฏิกริยาไซโตทอกซิกจากโมนิโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอชวาย แอนติเจน โดยการวัดด้วยเทคนิค Real time PCR

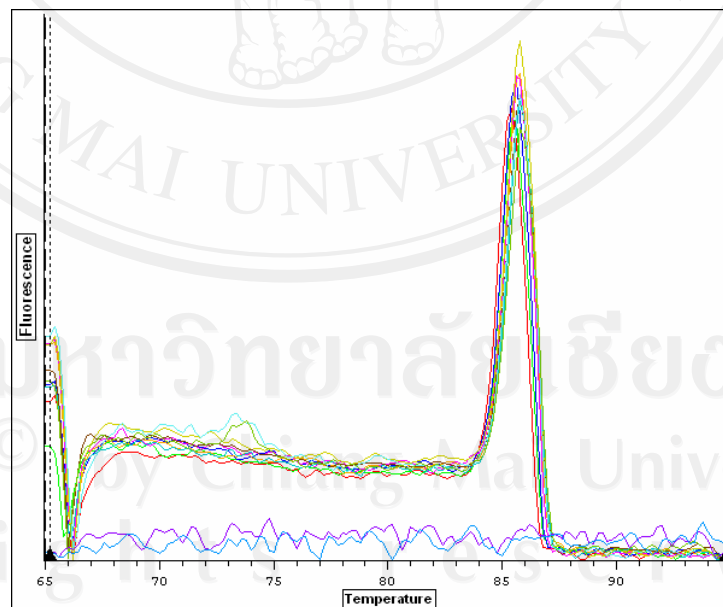
treatment	CT				
	mean	\pm sd	\pm se	max	min
control	26.26	0.25	0.14	26.46	25.95
Ab 1:2,500 + complement 1:50	26.48	0.68	0.39	27.01	25.60



ภาพ 4-11 แสดงกราฟมาตรฐานยีน β -actin จาก Plasmid DNA



ภาพ 4-12 แสดงการปรากฏของสัญญาณ Fluorescence จาก plasmid DNA β -actin ที่ความเข้มข้น 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 และ 10^3 ตามลำดับ เส้นแต่ละคู่เป็นจำนวนซ้ำของการทดลอง (2 ซ้ำ)



ภาพ 4-13 แสดง Melting curve ของ Plasmid DNA β -actin จากการทำ Real time PCR สำหรับการตรวจผลผลิต PCR ว่ามีความเฉพาะเจาะจงระหว่างยีนกับไพรเมอร์ จะเห็นได้จากการเกิดกราฟเพียงตำแหน่งเดียว