บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

โคเนื้อพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้จำนวน 3 ตัว เบอร์ 862, 863 และ RJ888 จากฟาร์มช่างรุ่ง อ. ดอยหล่อ จ. เชียงใหม่

3.2 สารเคมี

3.2.1 การผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดี

สารเคมี	**Lot number**	**บริษัท**
Ammonium chloride	AF310202	Ajax
Ammonium sulphate	A695617 547	Merck
Di-sodium hydrogen phosphate dehydrate	K30371580 210	Merck
Ethyl alcohol	50009	Merck
Fetal bovine serum (FBS)	41F4453K	Gibco
Goat anti-mouse IgG HRP conjugate (IgG-HRP)	268705	Zymed lab
Glycine	2002722	Fisher
Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM)	1355225	Gibco
2-Mercaptoethanol	45H050815	Sigma
O-phenylene-diamine-HCl (OPD)	80972	Zymed lab
Potassium chloride	K30323436 214	Merck
Potassium dihydrogen orthophosphate	2319134	Fisher
Potassium hydrogen carbonate	AF612009	Ajax
Sodium carbonate	A368192 214	Merck
Sodium chloride	K37352804 721	Merck
Sodium hydrogen carbonate	K22399729 612	Merck
Sodium hydroxide	B231098	Merck
Sodium hydrogen carbonate	K22399729 612	Merck
Teleostean gelatin	111K1359	Sigma

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมี	Lot number	บริษัท
Tween 20	53325	Scharlan
Tris	0854B24	Amresco

3.2.2 การทำ Real time PCR

สารเคมี	Lot number	บริษัท
Ammonium chloride	AF310202	Ajax
Proteinase K	3337B009	Amresco

3.2.3 ชุดสารเคมีสำเร็จรูป

สารเคมี	Lot number	บริษัท
iQ^{TM}SYBG Green Supermix	20065B	BioRad
Live/Dead Sperm viability kit	40289A	Invitrogen
Goat anti-mouse Ig FITC	AP326F	Chemicon
PLP-R Primer	H18783	Bio basic Inc.
PLP-F Primer	H18782	Bio basic Inc.
BOVM97-R Primer	198572-1	1 st Base
BOVM97-F Primer	199027-1	1 st Base
Beta actin-R Primer	180622-1	1 st Base
Beta actin-F Primer	180621-1	1 st Base

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท
Immuno-Plate 24 หลุม	Nalge Nunc International
Immuno-Plate 96 หลุม	Nalge Nunc International
ไมโครเพลท 96 หลุม	Nalge Nunc International
จานเลี้ยงเชื้อขนาด 35 x 15 มิลลิเมตร (มม.)	Nalge Nunc International
ไมโครปิเปตขนาด 5 ไมโครลิตร (มคล.)	AB Technology
ไมโครปิเปตขนาด 2.5 และ 10 ไมโครลิตร (มคล.)	Eppendorf
กระบอกฉีดยาขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร (มล.)	Nipro

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และเครื่องมือ	บริษัท
เข็มฉีดยาเบอร์ 18, 20,21,23 และ 24	Nipro
กล้อง Stereomicroscope SZ-ST	Olympus
เครื่องวอร์เทกซ์	Labinco
เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้	Kubota
เครื่องชั่งไฟฟ้า	Sartorius
เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์	Anthos
ตู้อบ	Memmert
ตู้เลี้ยงเซลล์	Forma Scientific
เครื่องปรับ pH	EP/KE
พาราฟิล์ม	American National Can
กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว	Olympus
เครื่อง spectrophotometer	UV-VIS Biowave S2100
Magnetic Stirrer	HL Instrument
Microcentrifuge tube 1.5 มล.	Bioscience
Low tube strip และ flat cap strips	BioRad

3.4 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี

3.4.1 การเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำเซลล์ไฮบริโดมาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้และสามารถผลิตแอนติบอดีต่อเพศผู้ ซึ่งผลิตโดย วิวัฒน์ (2547) มาใช้ ไฮบริโดมาโคลนที่นำมาทดลองคือไฮบริโดมาโคลนเบอร์ 1F9-3B10 โดยนำออกมาจากตู้ - 80 องศาเซลเซียส จากนั้นตั้งให้ละลาย นำเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มล.แล้วเติม IMDM 10 มล. ทำให้สารเข้ากันด้วยการดูดเป่าเซลล์ให้มีการกระจายตัว (Resuspend) แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสออก เติม 10 % FBS ปริมาณ 5 มล. ทำการ Resuspend แล้วเทลงใน Flask เลี้ยงเซลล์ นำไปเลี้ยงที่ตู้เลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดูการเจริญเติบโตและการปนเปื้อนของเซลล์

3.4.2 การวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการเคลือบไมโครเพลท 96 หลุม ด้วยเซลล์ม้ามโคเพศผู้เนื่องจากต้องการความจำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ จำนวน 10^5 เซลล์ในสารละลายสำหรับการเคลือบ (Coating buffer) ปริมาณ 100 มคล. ต่อหลุม เปรียบเทียบกับการเคลือบไมโครเพลทด้วยเซลล์ม้ามโคเพศเมีย เก็บไว้ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน (ประมาณ 16 ชั่วโมง) ล้างเพลทด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง เคาะเพลทให้แห้ง เติมเจลาตินความเข้มข้น 3 % ซึ่งอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนละลาย ปริมาณ 200 มคล. ต่อหลุม ทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง เคาะเพลทให้แห้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 มคล. ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง เคาะเพลทให้แห้ง เติม Goat anti-mouse IgG ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ฮอสแรดิชเพอร์ออกซิเดส (Horseradish peroxidase, HRP) ปริมาณ 10 มคล. ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง เคาะเพลทให้แห้ง เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี (Substrate buffer) ซึ่งประกอบด้วย Substrate buffer 12 มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์รอกไซด์ (H_2O_2) 20 มคล. และ Orthophenylamine diamine (O.P.D.) 0.018 กรัม ปริมาณ 100 มคล. ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 4N H_2SO_4 (Stop solution) ปริมาณ 100 มคล. ต่อหลุม นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง ELISA-reader

3.4.3 การแยกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution

เตรียมไมโครเพลทชนิดปลอดเชื้อ 96 หลุม จำนวน 6 เพลท ใช้พลาสเจอร์ปิเปต Resuspend ให้เซลล์กระจายตัว นับจำนวนเซลล์โดยเครื่องนับเซลล์ (Haemocytometer) โดยดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณเซลล์ 1,000 เซลล์ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มล. เติมสารละลาย 10 % FBS ปริมาณ 30 มล. เทลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปต Resuspend ก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลท เพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 มคล. เติมสารละลาย 10 % FBS ปริมาณ 20 มล. เทลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปต Resuspend ก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลท เพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 มคล. เติมสารละลาย 10 % FBS ปริมาณ 10 มล. เทลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปต Resuspend ก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลท เพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 มคล. เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งพบโคลนของเซลล์ไฮบริโดมา จึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนอีกครั้งหนึ่ง

3.4.4 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา

ทำการย้ายเซลล์ไฮบริโดมาที่มีการผลิตแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนไปเลี้ยงใน Petridish เติม 10 % FBS 20 มล. และเลี้ยงใน Celline AD 1000 เพื่อให้มีการขยายจำนวนและผลิตแอนติบอดีในปริมาณมาก เติม 10 % FBS ปริมาณ 50 มล. ในส่วนของชั้นอาหารของและปล่อยให้เนื้อเยื่อเลือกผ่านปรับสภาพอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ไฮบริโดมาที่จะเลี้ยงจำนวน 25 x 10^6 เซลล์ ทำให้กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเซลล์ 15 มล. เพื่อให้มีความเข้มข้น 1.5 x 10^6 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 มล. (ในชั้นเลี้ยงเซลล์) แล้วเติม 10 % FBS ปริมาณ 1000 มล. ในชั้นอาหาร นำ Petridish และ Celline AD 1000 ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ 5 % CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ทุก 7 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่

3.4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนจี

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเพศผู้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน จี (Immunoglobulin G, IgG) โดยใช้ Column Hi Trap ™ Protein G ใช้หลอดฉีดยา (syringe) เติมสารละลาย Binding buffer ลงใน Column ปริมาตร 10 มล. ดันของเหลวให้ไหลผ่านอย่างช้าๆ ประมาณ 1 มล./ 1 นาที นำสารผสมระหว่างแอนติบอดีและสารละลาย Binding buffer อย่างละ 10 ml เติมผ่าน Column จนหมด ล้าง Column ด้วยสารละลาย Binding buffer อีกครั้งจากนั้นเติมสารละลาย Elution buffer ปริมาตร 10 มล. เก็บสารละลายในหลอดขนาด 1.5 มล. ซึ่งเติม Neutralization buffer ปริมาตร 140 มคล. เก็บสารละลายประมาณ 1 มล. จำนวน 20 หลอด ทำการล้าง Column ด้วย 20 % Ethanol ปริมาตร 10 มล. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย (มก./มล.)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm}}{1.4}$$

3.4.6 การตรวจสอบความแม่นยำของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

นำเม็ดเลือดขาวของโคขาวลำพูนเพศผู้จำนวน 4 ตัว และเพศเมียจำนวน 4 ตัว ปรับให้มีจำนวนเซลล์ในการศึกษาที่เท่ากันคือ 1 x 10^6 เซลล์ / 250 มคล. บ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพศผู้ที่ระดับความเข้มข้น 1:500 ปริมาตร 250 มคล. ในที่ไร้แสง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลาย Fluorescein isothiocyanate (FITC) goat anti-mouse IgG ความเข้มข้น 1:2,000 ปริมาตร 250 มคล. ในที่ไร้แสง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 100 มคล. แล้วนำไปตรวจการเรืองแสงด้วย Fluorescence microscopy

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3-1 การเก็บตัวอย่างเลือดของโคขาวลำพูนบริเวณโคนหาง

3.5 ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ขาวลำพูน

3.5.1 การรีดน้ำเชื้อสดเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งบรรจุหลอด

รีดน้ำเชื้อจากพ่อโคพันธุ์ขาวลำพูนจำนวน 3 ตัว ด้วยอุปกรณ์รีดน้ำเชื้อโดยเติมน้ำอุ่นประมาณ 37 - 40 องศาเซลเซียส ในกระบอกสำหรับรีดน้ำเชื้อ และมีหลอดทดลองขนาด 15 มล. รองรับน้ำเชื้ออยู่ปลายสุดภายในกระบอกรีด นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจดูการเคลื่อนไหวหมู่ (Mass movement) แล้วทำการให้คะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ โดย 0 = ไม่มีการเคลื่อนไหวหมู่, 1= มีการเคลื่อนไหวหมู่น้อยมาก, 2 = มีการเคลื่อนไหวหมู่น้อย, 3 = มีการเคลื่อนไหวหมู่ปานกลาง และ 4 = มีการเคลื่อนไหวหมู่มาก หลังจากนั้นทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงสเปิร์ม (Extender) นับจำนวนสเปิร์มในน้ำเชื้อด้วย Haematocytometer ให้มีสเปิร์มจำนวน 120 x 10^6 ตัว / 1 มล. แล้วลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อที่ทำการเจือจางแล้วโดยการเติมน้ำแข็งทีละน้อยให้อุณหภูมิค่อยๆ ลดลงแล้วนำไปแช่ตู้เย็นต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดเก็บน้ำเชื้อ (Straw) หลอดละ 250 มคล. ขณะที่ทำการบรรจุจะทำในตู้ที่สามารถคงอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ได้หลังจากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นอีกครั้งเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาลดอุณหภูมิลงโดยการอังบนไอไนโตรเจนเหลวที่อยู่ในภาชนะปิด จนกระทั่งอุณหภูมิภายในหลอดเก็บน้ำเชื้อเท่ากับ - 90 องศาเซลเซียส จึงเก็บใส่ในถังไนโตรเจนสำหรับเก็บน้ำเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3-2 การเก็บน้ำเชื้อพ่อโคขาวลำพูนและการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอด

3.5.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับทดลองปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

นำน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจน ทำให้น้ำเชื้อละลายด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที นำน้ำเชื้อที่ละลายแล้วเติมในหลอดทดลองขนาด 15 มล. ที่มี Extender 5 มล. จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้สเปิร์มที่แข็งแรงว่ายขึ้นมา (Swim up) หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ด้านบนที่มีสเปิร์มออกมานับจำนวนเซลล์ด้วย Haematocytometer เพื่อนำสเปิร์มจำนวน 1×10^6 ตัว / 250 มคล. ไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.6 การทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.6.1 การหาความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสม

ก่อนนำสเปิร์มไปทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ต้องหาระดับของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อหาระดับที่ไม่มีการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ผ่าน Alternative pathway เพื่อให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ผ่าน Classical pathway เท่านั้น ใช้ซีรัมหนูตะเภาจากสำนักสัตว์ทดลอง (ศาลายา) เป็นแหล่งคอมพลีเมนต์ นำมาเจือจางใน Extender เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิคโดยเจือจางที่ 0, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 และ 1:60 ปริมาตร 250 มคล. เติมลงในแต่ละหลอดที่มีสเปิร์ม 1×10^6 ตัว / 250 มคล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสีจาก Sperm viability kit หลังจากนั้นปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ ก่อนนำไปตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มในแต่ละกลุ่มทดลองโดยระดับที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาคือระดับที่มีการตายของสเปิร์มน้อยที่สุด (ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมสเปิร์มที่ Swim up แล้ว 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.

↓

เติมซีรัมหนูตะเภาที่ความเจือจาง 0, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 และ 1:60 ปริมาตร 250 มคล. ในแต่ละหลอดบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

↓

เติมสีจาก Sperm viability kit แล้วปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ ก่อนนำไปตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์ม

ภาพ 3-3 แผนภาพแสดงการหาความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.6.2 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการย้อมสี FITC

ก่อนนำสเปิร์มไปทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ต้องหาระดับของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อหาระดับของแอนติบอดีที่สามารถเห็นสเปิร์มมีการเรืองแสงได้อย่างชัดเจนและการติดสีของสเปิร์มไม่ลดลง ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:3,000 และ 1:4,000 ปริมาตร 250 มคล. เติมลงในแต่ละหลอดที่มีสเปิร์ม 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม FITC goat anti-mouse IgG ที่ความเข้มข้น 1:2,000 ปริมาตร 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ ก่อนนำไปตรวจการเรืองแสงเพื่อหาระดับที่ปริมาณการติดสีของสเปิร์มไม่ลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมสเปิร์มที่ Swim up แล้ว 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.

↓

เติมแอนติบอดีที่เจือจาง 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:3,000 และ 1:4,000 ปริมาตร 250 มคล. ในแต่ละหลอดบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

↓

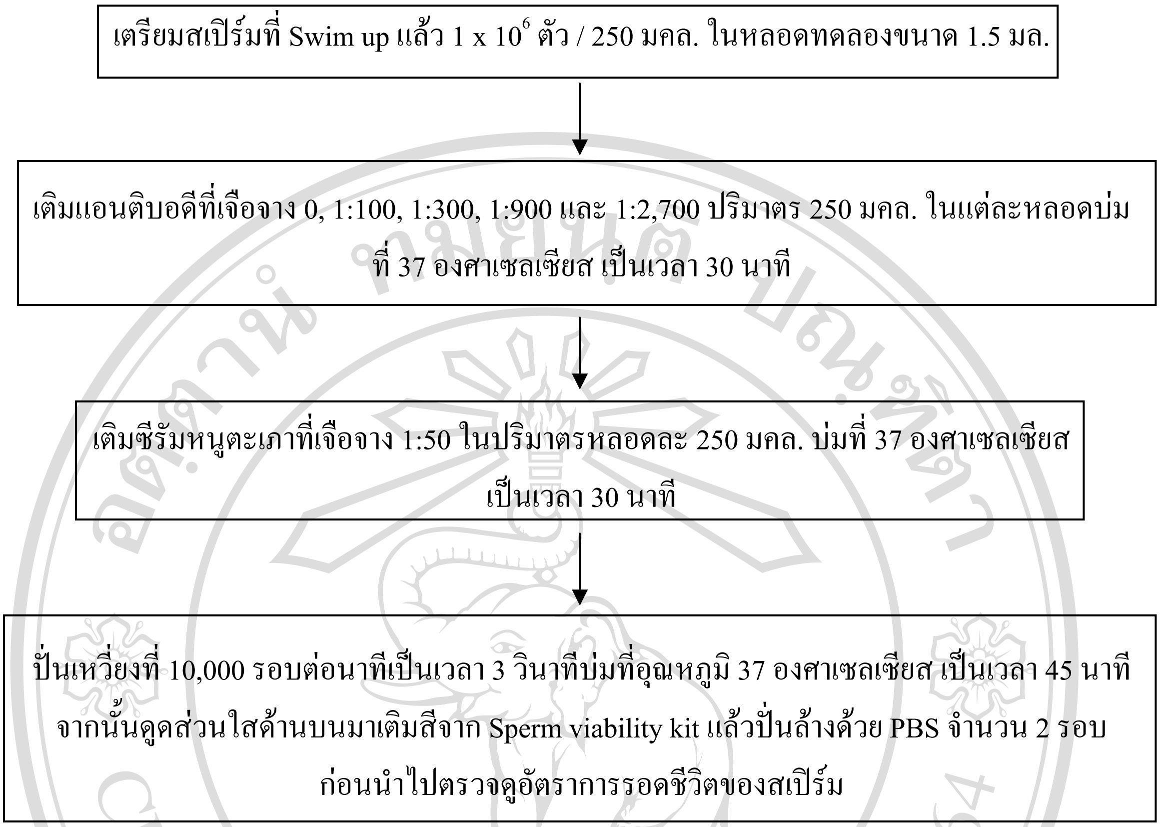
เติม FITC goat anti-mouse IgG ที่เจือจาง 1:2,000 ปริมาตร 250 มคล. เพื่อดูอัตราการติดสีของสเปิร์มในแต่ละกลุ่มทดลอง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ ก่อนนำไปตรวจการเรืองแสง

ภาพ 3-4 แผนภาพแสดงการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการย้อมสี FITC สำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.6.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์ม

นำน้ำเชื้อมาละลาย นำสเปิร์ม 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ที่ผ่านการ Swim up มาบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 ปริมาตร 250 มคล. ในหลอด 1.5 มล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมซีรัมหนูตะเภาที่ความเข้มข้น 1:50 ในปริมาตรหลอดละ 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วินาทีบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนมาเติมสีจาก Sperm viability kit หลังจากนั้นนำมาปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ ก่อนนำไปตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยสเปิร์มที่ติดสีเขียวหมายถึงสเปิร์มมีชีวิต ส่วนสเปิร์มที่ติดสีแดงหมายถึงสเปิร์มตาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3-5 แผนภาพแสดงการหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

3.6.4 สัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย

นำน้ำเชื้อมาละลาย นำสเปิร์ม 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ที่ผ่านการ Swim up มาบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 ปริมาตร 250 มคล. ในหลอด 1.5 มล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมซีรัมหนูตะเภาที่ความเข้มข้น 1:50 ในปริมาตรหลอดละ 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนมาเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ปริมาตร 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น FITC goat anti-mouse IgG ที่ความเข้มข้น 1:2,000 ปริมาตร 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นนำมาปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ นำสเปิร์มไปตรวจวัดความจำเพาะต่อเพศผู้จากการเรืองแสง โดยสเปิร์มที่มีการเรืองแสงถือว่าเป็นสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย ส่วนสเปิร์มที่ไม่มีการเรืองแสงถือว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์ โดยดูสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายซึ่งเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละกลุ่มทดลอง ยืนยันผลที่ได้เทียบกับเทคนิค Real-time PCR

เตรียมสเปิร์มที่ Swim up แล้ว 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.

↓

เติมแอนติบอดีที่เจือจาง 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 ปริมาตร 250 มคล. ในแต่ละหลอดบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

↓

เติมซีรัมหนูตะเภาที่เจือจาง 1:50 ในปริมาตรหลอดละ 250 มคล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วินาทีบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนมาเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 1:500 ปริมาตร 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

↓

เติม FITC goat anti-mouse IgG ที่เจือจาง 1:2,000 ปริมาตร 250 มคล. ทดลอง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำมาปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ นำสเปิร์มไปตรวจวัดความจำเพาะต่อเพศผู้จากการเรืองแสง

ภาพ 3-6 แผนภาพแสดงการหาสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 เทคนิค Real-time PCR

ทำการตรวจเพศโดยอาศัยเทคนิค Real-time PCR ที่ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถตรวจวัดและทราบปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้สีย้อมเรืองแสง (Fluorescent dye) SYBR Green I Dye ที่จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างดีเอ็นเอเส้นคู่ ขณะที่มีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในแต่ละรอบ (Dorak, 2006.) โดยจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน BOVM97, PLP เพื่อดูว่ามีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย (ยีน BOVM97 แสดงออกที่โครโมโซมวาย) และโครโมโซมเอ็กซ์ (ยีน PLP แสดงออกที่โครโมโซมเอ็กซ์) และยีน Beta-actin ที่แสดงออกทั้งโครโมโซมเอ็กซ์และวายใช้เป็นยีนมาตรฐานเพื่อให้ทราบจำนวนดีเอ็นเอตั้งต้นของปฏิกิริยา

นำสารละลายดีเอ็นเอ (100 ng / มคล.) ของน้ำเชื้อโคขาวลำพูนใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยา Real time PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน BOVM97, PLP และ Beta–actin โดยใช้สารเคมีดังต่อไปนี้

Template DNA (100 ng / มคล.)	1.00 มคล.
iQ™ SYBG Green Supermix	10.00 มคล.
forward primer (10 pmol/มคล.)	0.20 มคล.
reverse primer (10 pmol/มคล.)	0.10 มคล.
ddH_2O	8.70 มคล.

สำหรับโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา Real- time PCR มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รอบที่ 1 Denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
รอบที่ 2 Denaturation	94 องศาเซลเซียส	15 วินาที
Annealing	61 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
Plate read	รอบการทำปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 50 รอบ	
รอบที่ 3 Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที
รอบที่ 4 Melting Curve	65-95 องศาเซลเซียส อ่านผลทุก 2 วินาที	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NATANTCGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCA
TGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCAGCACAATGAAGATCAAGATCATCGCACCCCCT
GAGCGCAAGTACTCTGTGTGGATTGGCAGCTCCATCCTGGCCTTGCTGTCCAGCTTCC
AGCAGATGTAGATCAGCAAGCAGGAGTACCACGAGTCTGGCCCCTCCATCGTCCACC
GTAAATGCTTCTAGGCGGACTGTTAGCTGCGTTACACCCTTTAATCACTAGTGAAT
TCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAG
CTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATA
AAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAAACTCACATTAATTGCGTTGCG
CTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCCTGCATTAATGAATCGG
CCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCCNCTCA
TGACTCGCTGCG

ภาพ 3-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta-actin จาก plasmid DNA บริเวณสีเหลืองเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta-actin ที่เข้าสู่ plasmid DNA ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเข้าจับด้วยไพรเมอร์ของยีน Beta-actin (ตัวอักษรสีแดง)

TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGC
GGCCGCGGGAATTCGATTGATCACTATACATACACCACTCTCATCCTACCTAATAG
ATTCCAGCTGATAATTTGCAACTATACTCCAAAGTTTTGTGGAAATGTGAAAGAAAA
TCATTCAGCTCATCTGTTTCAGAGACAGAATTTGTGTTAGCATAGCAATCACTAGTG
AATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCA
TAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCCTGTGTGAAATTGTCATCCGCTCACAATTCCACACCAACATACGAGCCGGAAG
CATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGT
NGCGCTCACTGCCCGCTTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCCTGCATTAATGA
ATCGGGCCAAACGCGCGGGGAGAGGCGGGTTGG

ภาพ 3-8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BOVM97 จาก plasmid DNA บริเวณสีเหลืองเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BOVM97 ที่เข้าสู่ plasmid DNA ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเข้าจับด้วยไพรเมอร์ของยีน BOVM97 (ตัวอักษรสีแดง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TCCTGGGTCTTCCTTCTTTTTTAAAAAACATTTTTTATTGGGGTATAGTTGCTTTACAG
TGTTGTGTTAGTTTCTGCTGTACAATAAAGTGAATCAGCTATATGTATACACATAGCC
CCTCCCTCTTGGACCTCCATCCTACCCTCACCTGCCATCCTACCCATCTAGGTCATCAT
AGAACACAGAGGTGAGCTCTCTGTGCTAATAGAACAGCTTCCCACTAGCTATCTATTT
TACACATGGTAGTGTATATATAGTGAAAGTGAATATATATATATATATATATATATAT
ATATGGGGCTTCCCAGGTGGTGTTAGTGGTAAAGAACCTGCCTGCCAAGGTTCTTGG
TTGGGAAGGTCCTGGGTTGGGAAGGTCCCCTGGAGGAGGGTGTGGCTACCACTCCGG
TATTCCTGCCTAGAGAATCCCCATGGACAGAGGAGCCTGGCGGGCTATGGTCCATAG
TGTCGCAAAGAGCTGGACATGACTGAAGCGACTTAGCACACACACAGTGTATATATA
TGTCAATCCCAATCTCCCAATTTATCCACCCCCCACTCTCTGTCCACACATGTGTTCTG
TACATTTATGTCTCTATTCCTGCCCCACATATAGGTTCATCTGTACCATTTTTTCTAGA

ภาพ 3-9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PLP จาก plasmid DNA บริเวณสีเหลืองเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PLP ที่เข้าสู่ plasmid DNA ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเข้าจับด้วยไพรเมอร์ของยีน PLP (ตัวอักษรสีแดง)

3.8 การตรวจวิการของสเปิร์มด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

นำน้ำเชื้อมาละลาย นำสเปิร์ม 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ที่ผ่านการ swim up มาบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ความเข้มข้น 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 ปริมาตร 250 มคล. ในหลอด 1.5 มล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมซีรัมหนูตะเภาที่ความเข้มข้น 1:50 ในปริมาตรหลอดละ 250 มคล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก ทำให้สเปิร์มแห้งเป็นผงแล้วส่องดูสภาพวิการของสเปิร์มที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดลองด้วยเครื่อง SEM สภาพวิการของสเปิร์มดูจากบริเวณขอบของหัวของสเปิร์มต้องมีขอบไม่เรียบ มีการแตก หัก บิ่น หรือมีลักษณะผิวเซลล์ลอก ส่วนบริเวณตรงกลางของหัวสเปิร์มต้องมีลักษณะผิวเซลล์ลอกจึงจะแสดงว่ามีวิการเกิดขึ้น โดยถ่ายรูปกลุ่มละ 5 ซ้ำ สังเกตตำแหน่งที่เกิดการวิการและทำการเก็บข้อมูลความถี่ในการเกิดวิการพร้อมทั้งขนาดของสเปิร์ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมสเปิร์มที่ Swim up แล้ว 1 x 10^6 ตัว / 250 มคล. ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.

↓

เติมแอนติบอดีที่เจือจาง 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 ปริมาตร 250 มคล. ในแต่ละหลอดบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

↓

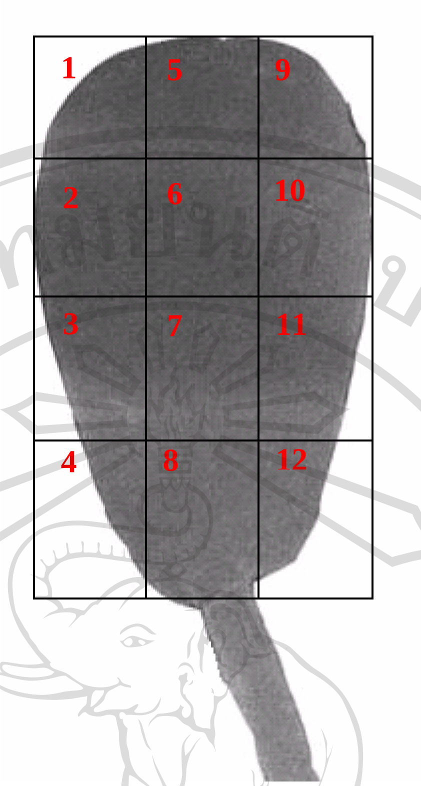
เติมซีรัมหนูตะเภาที่เจือจาง 1:50 ในปริมาตรหลอดละ 250 มคล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก ทำให้สเปิร์มแห้งเป็นผงแล้วส่องดูสภาพวิการของสเปิร์มที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์ในแต่ละกลุ่มทดลอง

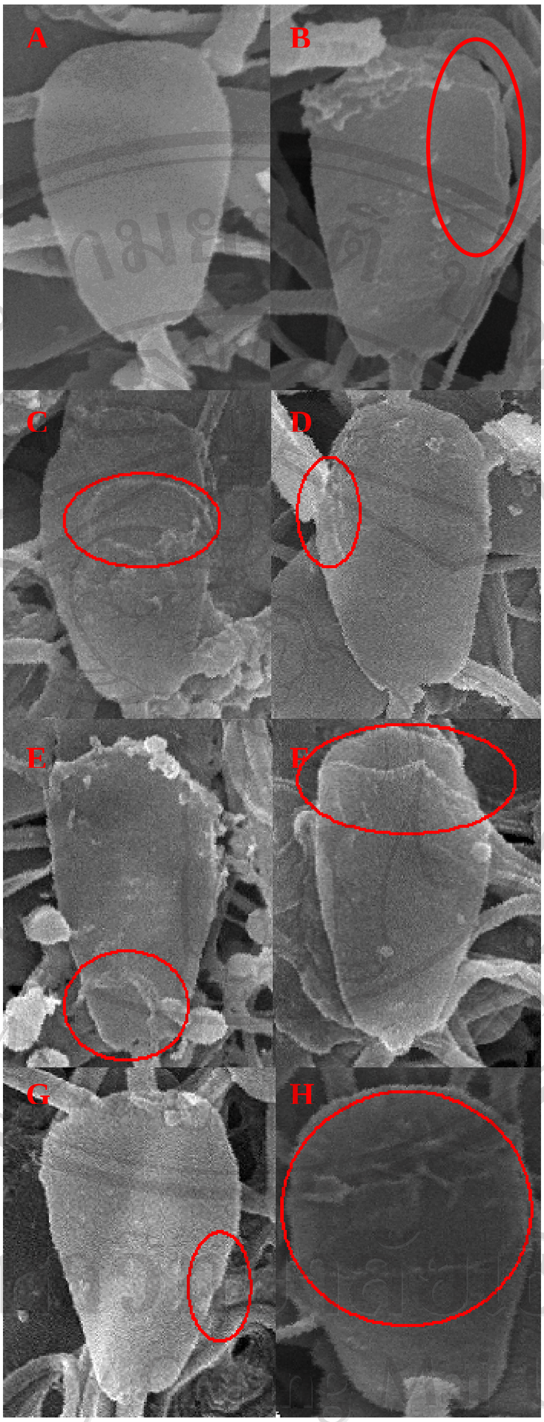
ภาพ 3-10 แผนภาพแสดงการตรวจวิการบนผนังสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3-11 แสดงตำแหน่งบนผนังสเปิร์มโคขาวลำพูนที่เกิดวิการเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3-12 แสดงผนังสเปิร์มโคขาวลำพูนเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเครื่อง SEM โดย (A) คือกลุ่มควบคุม, (B) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 9 และ 10, (C) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 2, 6 และ 10, (D) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 2 และ 3, (E) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 4, (F) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 1, 5 และ 9, (G) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 11 และ (H) คือวิการที่เกิด ณ ตำแหน่ง 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 และ 11

3.9 การวางแผนและวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธีไคสแควร์ (Snedecor and Cochran, 1989) โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 16.0 และ Origin 6.1

ตาราง 3-1 แสดงความเข้มข้นของแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ในปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

Treatment	Antibody dilution	Complement dilution
1	0	0
2	1:100	1:50
3	1:300	1:50
4	1:900	1:50
5	1:2,700	1:50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved