

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
อักษรย่อ และสัญลักษณ์	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. หลักการและเหตุผล	1
1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	4
2.1. ปัจจัยที่มีผลต่อการเป็นสัตว์ และการตั้งท้องของโคนม	4
2.1.1. รอบการเป็นสัตว์	4
2.1.2. สอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัตว์	5
2.1.3. การตั้งท้อง	6
2.1.4. สอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการตั้งท้อง	6
2.2. สอร์โมน โปรเจสเตอโรน	7
2.3. การวินิจฉัยการตั้งท้องในโคนม	11
2.3.1. การวัดระดับสอร์โมน โปรเจสเตอโรน	11
2.3.2. การวัดโดยใช้เครื่อง ultrasonic	11
2.3.3. การสังเกต	12
2.4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	12
2.4.1. หลักการของ ELISA	12
2.4.2. โมโนโคลนอลแอนติบอดี	14
2.4.3. วิธีการ sandwich ELISA	15

สารบัญ (ต่อ)

2.4.4. วิธีการ indirect sandwich ELISA	15
2.4.5. Strip ELISA test kit	15
2.5. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์	18
2.5.1. ปัจจัยเนื่องจากผลผลิตน้ำนม	18
2.5.2. ปัจจัยเนื่องจากสภาพภูมิอากาศ	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	21
3.1. อุปกรณ์การทดลอง	21
3.2. สัตว์ทดลอง	23
3.3. การเก็บตัวอย่างน้ำนม และวิเคราะห์ข้อมูล	24
3.4. ขั้นตอนการเตรียม โมโนโคลนอลแอนติบอดี	25
3.4.1. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ลูกผสม	25
3.4.2. การผลิตแอนติบอดีโดย <i>in vitro</i>	26
3.4.3. การทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	26
3.4.4. วิธี column chromatography	27
3.5. การหากราฟมาตรฐาน	29
3.6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรเจสเทอโรนในน้ำนมโดยวิธี strip ELISA kit	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	34
4.1. ปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลให้บริสุทธิ์	34
4.2. อัตราเจ็องที่เหมาะสมสำหรับโพลีโคลนอล และโมโนโคลนอลแอนติบอดี	35
4.3. การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรเจสเทอโรน	37
4.4. การหา intra และ inter assay coefficient	38
4.5. การผลิต strip ELISA kit	38
4.6. การหา cross reactivity ของ strip ELISA kit	38
4.7. ปริมาณโปรเจสเทอโรนจากการวัดโดยใช้ strip ELISA kit เปรียบเทียบ กับการวัดโดยใช้ indirect sandwich ELISA	42

สารบัญ (ต่อ)

4.8. การศึกษาสมรรถภาพการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในช่วงเดือนตุลาคม 2543 - มีนาคม 2544 และเดือนเมษายน - มิถุนายน 2544 โดยการวัดระดับ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของโคนมพันธุ์แท้ และลูกผสมฟรีเซียน	43
4.9. การศึกษาสมรรถภาพการทำงานของระบบสืบพันธุ์ของ โคนมลูกผสม และ พันธุ์แท้ที่ให้ปริมาณน้ำนมต่าง ๆ กัน	47
4.10. ผลเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และ temperature humidity index ในวัน ก่อนและหลังการผสมเทียมครั้งแรกต่อปัจจัยทางด้านระบบสืบพันธุ์	50
บทที่ 5 วิจัยผล และสรุปผลการทดลอง	59
5.1. วิจัยผลการทดลอง	59
5.2. สรุป	64
5.3. ข้อเสนอแนะ	66
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	74
ประวัติผู้เขียน	77

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1. อายุที่เข้าสู่วัยผสมพันธุ์ และระยะเวลารอบการเป็นสัดของโคนม	5
2.2. ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ฮอร์โมนเอสโตรเจน และลูทีนไนซิง ฮอร์โมนในพลาสมาในช่วงรอบการเป็นสัดของโค	5
4.1. ปริมาณ โมนโคสนอลแอนติบอดีที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์	34
4.2. ผลเนื่องจากการวัดโดยใช้ strip ELISA kit เปรียบเทียบกับการวัดโดยใช้ วิธี indirect sandwich ELISA	42
4.3. ระยะเวลาที่ยืดตลอดการทดลอง (135 วัน) จากการวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซียน ในช่วงเดือนตุลาคม 2543 – มิถุนายน 2544	45
4.4. เปรียบเทียบสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในช่วงเดือนตุลาคม 2543 – มิถุนายน 2544 ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซียน	46
4.5. ระยะเวลาที่ยืดตลอดการทดลอง (135 วัน) จากการวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซียน ที่ให้ผลผลิตน้ำนมต่าง ๆ	48
4.6. เปรียบเทียบสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำนมต่ำ ปานกลาง และสูง ของโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟรีเซียน	49
4.7. สมการรีเกรซชันวิเคราะห์ผลเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และ temperature-humidity index ระหว่างก่อน และหลังวันผสมเทียมครั้งแรกต่อ จำนวนครั้งที่ผสมก่อนการตั้งท้องใน โคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ไฮลสไตน์ฟรีเซียน	53
4.8. สมการรีเกรซชันวิเคราะห์ผลเนื่องจากอุณหภูมิ ความชื้น และ temperature-humidity index ระหว่างก่อน และหลังวันผสมเทียมครั้งแรกต่อ ระยะเวลาระหว่างวันคลอดจนถึงผสมติดใน โคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ไฮลสไตน์ฟรีเซียน	54
4.9. สมการรีเกรซชันวิเคราะห์ผลเนื่องจากปริมาณน้ำนมระหว่างก่อน และหลังวันผสมเทียมครั้งแรกต่อจำนวนวันที่ผสมติดใน โคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ไฮลสไตน์ฟรีเซียน	55

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1. การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในกระแสเลือดที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัด	6
2.2. โครงสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	7
2.3. การสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยรก	8
2.4. กลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยมีโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้น	9
2.5. กลไกควบคุมการทำงานของฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ผ่าน กลไก hypothalamo – pituitary axis	10
2.6. การเกิดพันธะระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี	13
2.7. ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดีเปรียบเทียบระหว่าง good fit และ bad fit	13
2.8. หลักการของวิธี sandwich ELISA	16
2.9. หลักการของวิธี indirect sandwich ELISA	17
2.10. กลไกการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนใน theca และ granulosa cell ที่รังไข่	19
3.1. การสกัดฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนในน้ำนม	24
3.2. การตกตะกอนแยก IgG จากน้ำเลี้ยงเซลล์	27
3.3. การทำให้ IgG จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography	28
3.4. การหากราฟมาตรฐาน	30
3.5. การหา cut off point ของวิธี Strip ELISA kit	33
4.1. ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (ซีรัมกระต่าย) ที่ อัตราการเจือจางต่าง ๆ	36
4.2. ค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีเซลล์โคลน 8E2 ที่ อัตราการเจือจางต่าง ๆ	36
4.3. กราฟมาตรฐานฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยวิธี indirect sandwich ELISA	37
4.4. ภาพของ Strip ELISA kit.	39
4.5. ผลการวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยใช้วิธี Strip ELISA	39
4.6. ปฏิกริยา cross reaction ระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน กลุ่มเซลล์ 8E2 และอีสตราไดออล	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7. ปฏิกริยา cross reaction ระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน กลุ่มเซลล์ 8E2 และ androstenediol	40
4.8. ปฏิกริยา cross reaction ระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน กลุ่มเซลล์ 8E2 และ hydrocortisone	41
4.9. ปฏิกริยา cross reaction ระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรเจสเตอโรน กลุ่มเซลล์ 8E2 และเทสโทสเตอโรน	41
4.10. อุณหภูมิสูงสุด (MAXT) ในวันที่ 10 หลังการผสมที่มีผลต่อจำนวนครั้งผสมที่ผสม ต่อการผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์ฟรีเซียน	56
4.11. อุณหภูมิต่ำสุด (MINT) ในวันที่ 10 หลังผสมที่มีผลต่อระยะเวลาระหว่างคลอดจนถึง ผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์ฟรีเซียน	56
4.12. ความชื้นสูงสุด (MAXH) ในวันที่ 3 ก่อนผสมที่มีผลต่อจำนวนครั้งผสมที่ผสมต่อ การผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์ฟรีเซียน	57
4.13. ความชื้นสูงสุด (MAXH) ในวันที่ 20 หลังผสมที่มีผลต่อจำนวนครั้งผสมที่ผสมต่อ การผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์ฟรีเซียน	57
4.14. อุณหภูมิต่ำสุด (MINT) ในวันที่ 20 หลังผสมที่มีผลต่อระยะเวลาระหว่างวันคลอดจนถึง วันผสมติดในกลุ่มโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์ฟรีเซียน	58

อักษรย่อและสัญลักษณ์

°ซ	องศาเซลเซียส
ก.	กรัม
นก.	นาโนกรัม
มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
%	เปอร์เซ็นต์
BSA	Bovine serum albumin
DTC	Days to Conception
DTFAI	Days to first A.I.
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HF	Holstein Friesian
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxide
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LH	Luteinizing Hormone
MAXH	Maximum humidity
MAXT	Maximum temperature
MINH	Minimum humidity
MINT	Minimum temperature
ml	milliliter
ng	nanograms
NSAI	Numbers of successful A.I.
OD	optical density
OPD	Otho-phenylenediamine acetate
PBS	Phosphate buffer saline
RIA	Radioimmunoassay
TF	Thai Friesian