ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดเพศตัวอ่อนโคโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

ผู้เขียน นายวิวัฒน์ พัฒนาวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สัตวศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. เพทาย พงษ์เพียจันทร์	ประธานกรรมการ
อ.จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์	กรรมการ
รศ.นุชา สิมะสาธิตกุล	กรรมการ
อ.ดร.ศุภมิตร เมฆฉาย	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาแนวทางการเพิ่มปริมาณโคนมเพศเมียให้ได้สัดส่วนมากกว่าที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยการคัดเพศตัวอ่อนโคเพศเมียก่อนที่จะทำการย้ายฝากโดยการคัดเพศจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน (H-Y antigen) ที่ได้จากการฉีดน้ำเชื้อโคให้หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/C เพื่อกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน หนูที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายเอนติเจนสูงสุดจะถูกเก็บเซลล์ม้ามมาเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63 Ag8.653 เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน หลังการเชื่อมเซลล์ 14-21 วันได้ตรวจพบกลุ่มโคลนลูกผสม (Hybridoma clone) จำนวน 3 โคลนที่ตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน เมื่อนำโคลนทั้ง 3 มาแยกเป็นโคลนเดี่ยวและจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) พบว่าทั้ง 3 โคลนเป็นชนิด IgG ส่วนการผลิตตัวอ่อน (embryo)ใช้แม่โคลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองxฟรีเซี่ยน (Friesian) จำนวน 12 ตัวมีระดับสายเลือดฟรีเซี่ยน 75–96.25 % ทำการกระตุ้นให้ตกไข่มาก (Superovulation) นำตัวอ่อนที่ผลิตได้มาตรวจเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนโดยวิธี Indirect immunofluorescence และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ชนิด BOVM97 ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเฉพาะโครโมโซม Y พบว่าการตกไข่และตัวอ่อนแสดงเป็นค่า mean±SD (n) มีการตกไข่ของรังไข่ด้านซ้าย, ขวา และจำนวนตัวอ่อนเป็น 5.6±3.06 (12), 5.8±3.67 (12) และ 1.8±2.21 (12), ตามลำดับ ตัวอ่อน จำนวน 9 ตัว ให้ผลการคัดเพศด้วยวิธี PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเพศเมีย 8 ตัวและเพศผู้ 1 ตัว และ ตัวอ่อนอีกกลุ่มจำนวน 7 ตัว เมื่อนำมาตรวจด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายเอนติเจน พบว่า 6 ตัวให้ผลบวก (เป็นเพศผู้) ซึ่งเมื่อนำไปตรวจโดยเทคนิค PCR เป็นเพศผู้เพียง 5 ตัว ฉะนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายเอนติเจนที่ผลิตได้จากการทดลองครั้งนี้ ให้ความแม่นยำในการตรวจเพศผู้ของตัวอ่อนได้ 83 % (5/6) เมื่อยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Sexing of Cow Embryos by Using of Monoclonal Antibodies to H-Y Antigen and Polymerase Chain Reaction
Author	Mr. Wiwat Pattanawong
Degree	Master of Science (Agriculture) Animal Science

Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Petai	Pongpiachan	Chairperson
	Lect. Jurecrat	Sumretprasong	Member
	Assoc. Prof. Nucha	Simasatitkul	Member
	Dr. Supamit	Mekchay	Member

Abstract

The objective of this research is to do sexing cow's embryos by Monoclonal Antibody (MAb) to H-Y antigen and Polymerase Chain Reaction (PCR). The MAb was produced by hybridoma techniques by the used of cattle spermatozoa as antigen to immunize 6 Balb/c mice. The mice which manifested high antibody titer to the H-Y antigen were detected by Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA), were chosen as sources of spleenocytes. The spleenocytes from a mouse that showed the highest titer, were used for fusion with myeloma cells (X63Ag8.653) for the production of the hybridomas. At 14 – 21 days after fusion, hybridoma clones were found 3 wells were identified to be positive clones. When the three clonals were separated and immunoglobinal categorized, they all were Igs. Embryo was made by using the twelve 75-96.25% crossed Friesian cows superovulated. Then sexing verification by Monoclonal antibody to H-Y antigen (MAb), Indirected immunoflurescence method, and by Polymerase Chain Reaction (PRC) that used BOVM97 primer which was specific to Y chromosome. It was found that ovulation of left and right ovaries and number of embryo according to mean $\pm$ SD (n) were 5.6$\pm$3.06 (12), 5.8$\pm$3.67 (12) and 1.8$\pm$2.21 (12) respectively. The result of sexing 9 embryos by PCR technique was eight female and one male. Another group contained 7 embryos were verified by Monoclonal antibody to H-Y antigen (MAb) resulted that 6 were positive (male)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

whereas the PRC technique verification result was just 5 were male. In conclusion, MAb's to H-Y antigen using to sexing in accordance with this study is 83% accurate when benchmarking by PCR technique.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved