# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| สารบัญตาราง | ญ |
| สารบัญภาพ | ฎ |
| อักษรย่อและสัญลักษณ์ | ฐ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 วัตถุประสงค์การวิจัย | 4 |
| 1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4 |
| บทที่ 2 ตรวจเอกสาร | 5 |
| 2.1 ตัวอ่อนและการพัฒนาของตัวอ่อน | 5 |
| 2.2 การผลิตตัวอ่อน | 7 |
| 2.3 การคัดเพศตัวอ่อน | 9 |
| 2.3.1 การคัดเพศตัวอ่อนโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน | 9 |
| 2.3.2 การคัดเพศตัวอ่อนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) | 18 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 21 |
| 3.1 อุปกรณ์การทดลอง | 21 |
| 3.2 วิธีการเตรียมแอนติเจน | 25 |
| 3.3 การผลิตโมโนโคลนอแอนติบอดีต่อต่านเอชวายแอนติเจน | 28 |
| 3.4 การกระตุ้นให้ตกไข่มากกว่าหนึ่งใบ (Superovulation) | 35 |
| 3.5 การเก็บตัวอ่อนและ การหาตัวอ่อน (Flushing Embryo and Collect Embryo) | 37 |
| 3.6 การตรวจสอบเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน | 39 |
| 3.7 การผ่าแบ่งตัวอ่อน (Embryo biopsy) | 41 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญ(ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| 3.8 การตรวจสอบเพศด้วยวิธี PCR | 42 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 44 |
| 4.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอชวายแอนติเจน | 44 |
| 4.2 ผลการผลิตเซลล์ลูกผสม | 45 |
| 4.3 การจำแนกชนิดของแอนติบอดี | 48 |
| 4.4 ปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ | 49 |
| 4.5 การเก็บตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ | 49 |
| 4.6 ผลการคัดเพศตัวอ่อนด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน | 51 |
| 4.7 ผลการคัดเพศตัวอ่อนด้วยวิธี PCR | 54 |
| บทที่ 5 วิจารณ์ผล และสรุปผลการทดลอง | 55 |
| 5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง | 55 |
| 5.2 สรุปผลการทดลอง | 62 |
| 5.3 ข้อเสนอแนะ | 63 |
| เอกสารอ้างอิง | 65 |
| ภาคผนวก ก. | 71 |
| ภาคผนวก ข. | 77 |
| ประวัติผู้เขียน | 83 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญตาราง


| ตาราง | หน้า |
|---|---|
| 2-1. แสดงผลการใช้ฮอร์โมนในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ต่อจำนวนไข่ที่ตกและตัวอ่อนที่ได้ | 9 |
| 2-2. แสดงการตรวจพบเอช-วายแอนติเจนในระยะต่างๆ ของตัวอ่อน | 17 |
| 2-3. แสดง Primer ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศของโค | 20 |
| 3-1. โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ | 36 |
| 4-1. แสดงค่าความการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เกิดโคลน | 45 |
| 4-2. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เกิดโคลนหลังจากการแยกโคลนเดี่ยว (limiting dilution) | 46 |
| 4-3. แสดงค่า OD อิมมูโนโกลบูลินของโคลนโมโนโคลนอลแอนติบอดี | 48 |
| 4-4. แสดงปริมาณแอนติบอดีที่โมโนโคลนอลผลิตได้ | 49 |
| 4-5. ผลการตรวจรังไข่และจำนวนตัวอ่อนในการเก็บตัวอย่างครั้งที่1 และ 2 | 50 |
| 4-6. ผลการตรวจรังไข่และจำนวนตัวอ่อนในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 | 51 |
| 4-7. ผลการตรวจรังไข่และจำนวนตัวอ่อนในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 | 51 |
| 4-8. แสดงผลการคัดเพศตัวอ่อนโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน | 52 |
| 4-9. แสดงผลการคัดเพศตัวอ่อนโคด้วยเทคนิค PCR. | 54 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | หน้า |
|---|---|
| 1-1. แสดงปริมาณน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมที่ผลิตได้ภายในประเทศและนำเข้า | 2 |
| 1-2.แสดงปริมาณ Cheese และ Whey Condensed ที่ผลิตได้ภายในประเทศและนำเข้า | 2 |
| 2-1. แสดงการตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส | 5 |
| 2-2. แสดงตัวอ่อนโคที่ระยะต่างๆ | 6 |
| 2-3. แสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย | 11 |
| 2-4. ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี | 13 |
| 3-1. แสดงวิธีโฮโมจีไนซ์เพื่อเตรียมแอนติเจนในการกระตุ้น | 26 |
| 3-2. แสดงขั้นตอนการวัดระดับแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนด้วยวิธี Indirect ELISA | 27 |
| 3-3. ขั้นตอนการเชื่อมเซลล์ในการผลิตไฮบริโดมาต่อเอชวายแอนติเจน | 30 |
| 3-4. ขั้นตอนการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting Dilution | 32 |
| 3-5. การแยกแอนติบอดีออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ | 35 |
| 3-6. แสดงขั้นตอนการชะล้างตัวอ่อน | 38 |
| 3-7. แสดงตัวอ่อนมีตรวจพบภายในห้องปฏิบัติการ | 39 |
| 3-8. แสดงขั้นตอนการตรวจสอบเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน | 40 |
| 3-9. แสดงตัวอ่อนที่ถูกตัดไปคัดเพศ | 42 |
| 4-1. ผลการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอชวายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c | 44 |
| 4-2. กราฟแสดงจำนวนโคลนที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมา | 47 |
| 4-3. กราฟแสดงจำนวนโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนจากทั้งหมด 18 โคลน | 47 |
| 4-4. กราฟแสดงปริมาณอิมมูโนโกลบูลินของโคลนโมโนโคลนอลแอนติบอดี | 48 |
| 4-5. แสดงผลการคัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวาย | 53 |
| 4-6. แสดงผลการคัดเพศด้วยเทคนิค PCR | 54 |
| **ภาคผนวก ข** | |
| ภาพที่ 1. แสดงขั้นตอนการตรวจสภาพรังไข่ของแม่โคตัวให้ | 78 |
| ภาพที่ 2. การล้างทำความสะอาดบริเวณช่องคลอด | 78 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | หน้า |
|---|---|
| ภาพที่ 3. ขั้นตอนการใส่ CIDR เข้าสู่กระบอกเพื่อนำใส่บริเวณช่องคลอด | 78 |
| ภาพที่ 4. ขั้นตอนการใส่ CIDR เข้าสู่กระบอกเพื่อนำใส่บริเวณช่องคลอด | 79 |
| ภาพที่ 5. ลักษณะที่สมบูรณ์ของชุด CIDR ที่พร้อมสำหรับใส่ให้กับแม่โค | 79 |
| ภาพที่ 6. การใส่ CIDR ให้แม่โคบริเวณช่องคลอด | 79 |
| ภาพที่ 7. แสดงสาย CIDR ที่พ้นออกมาจากช่องคลอดหลังการใส่ | 80 |
| ภาพที่ 8. วันในที่ชะล้างตัวอ่อนจะทำการล้วงตรวจนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียม | 80 |
| ภาพที่ 9. การเตรียมทางยางโฟเลย์สำหรับการชะล้างตัวอ่อน | 80 |
| ภาพที่ 10. การล้างท่อยางโฟเลย์ด้วยน้ำยาชะล้างตัวอ่อน | 81 |
| ภาพที่ 11. การใส่ท่อยางโฟเลย์เข้าสู่ปีกมดลูกที่ละข้าง | 81 |
| ภาพที่ 12. การต่อท่อยางโฟเลย์เข้าท่อยางเดินน้ำยาชะล้างตัวอ่อน | 81 |
| ภาพที่ 13. การควบคุมท่อยางเดินน้ำยาชะล้างตัวอ่อนด้วยที่เปิด-ปิด | 82 |
| ภาพที่ 14. กล้องสเตอร์ริโอที่ใช้ในการหาตัวอ่อน | 82 |
| ภาพที่ 15. เครื่องแช่แข็งตัวอ่อน | 82 |


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

# อักษรย่อและสัญลักษณ์

| | |
|---|---|
| H-Y antigen | Histocompatibility-Y antigen |
| ELSA | 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 |
| I.U. | International unit |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PEG | Polyethylene glycol |
| IVM | *In vitro* maturation |
| IVF | *In vitro* fertilization |
| IVC | *In vitro* culture |
| GnRH | Gonodotrophin-releasing hormone |
| PMSG | Pregnant Mare Serum Gonadotropin |
| LH | Luteinizing hormone |
| CL | Corpus luteum |
| FSH | Follicle Stimulating Hormone |
| $PGF_{2\alpha}$ | Prostaglandin $F_{2\alpha}$ |
| rbST | recombinant bovine somatotropin |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| CIDR® | ฮอร์โมน Progesterone (EAZI-BREED CIDR®) |
| FITC | Fluoresecein conjugated |
| IgG | Immunoglobulin G |
| IgM | Immunoglobulin M |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

## อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

| | |
|---|---|
| dNTPs | deoxynucleotide triphosphate |
| MAb | Monoclonal Antibody |
| HGPRT | Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase |
| TK | Thymidine Kinase |
| CMI | Cell mediated immunity |
| HMI | Humoral immunity |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved