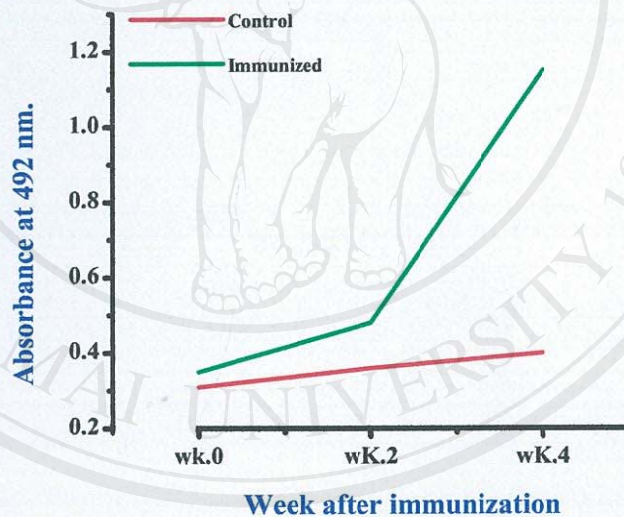


บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน

การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/C ทุก 2 สัปดาห์ เป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ วันที่ 0 สัปดาห์ที่ 2 และ 4 และเก็บเลือดเพื่อนำมาวัดการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1. ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/C.

4.2 ผลการผลิตเซลล์ลูกผสม

การเชื่อมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์มีามของหนูตอบสนองต่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับเซลล์ไมอีโกลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 ปรากฏกลุ่มเซลล์ลูกผสมหลังจากการเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT แล้วประมาณ 7 วัน พบว่าเกิดโคลนของเซลล์ลูกผสมจำนวน 18 โคลน (ตารางที่ 4-1) จากทั้งหมด 528 หลุม คิดเป็น 3.4 % ของการเชื่อมเซลล์ (ภาพที่ 4-2) และเมื่อนำ 18 โคลนมาทำการตรวจการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนพบว่า มีโคลนจำนวน 3 โคลนจากทั้งหมด 18 โคลนที่ตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน คิดเป็น 16.6 % ของโคลนที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 4-3) จากนั้นเลือกโคลนที่ให้ค่าตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจนที่สูงที่สุดคือ โคลนจากเพลทที่ 5 หลุม E5 ไปทำการแยกโคลนเดี่ยวเป็นเวลา 14-20 วัน ได้โคลนเดี่ยวทั้งหมด 7 โคลน คือเพลทที่ 1 หลุม C2 และ F8 เพลทที่ 3 หลุม E4 เพลทที่ 4 หลุม B9 เพลทที่ 5 หลุม B5 และเพลทที่ 6 หลุม C3 และ G2 ซึ่งได้ค่าการตอบสนองตามตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-1. แสดงค่าความการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เกิดโคลน

หลุม	ค่า O.D.*หลุมที่เคลือบด้วย เซลล์มีามโคเทศผู้	ค่า O.D.หลุมที่เคลือบด้วย เซลล์มีามโคเทศเมีย	ค่าความแตกต่าง ของ O.D.
1D2	0.32	0.22	0.10
2E7	0.44	0.39	0.05
3C8	0.66	0.32	0.34
3D6	0.78	0.15	0.63
4F7	0.55	0.29	0.26
4F10	0.41	0.27	0.14
5C6	0.34	0.18	0.16
5D5	0.67	0.58	0.09
5E5	1.21	0.25	0.96
5E10	0.89	0.51	0.38
6D4	0.94	0.29	0.65
6D7	0.71	0.56	0.15

ตารางที่ 4-1(ต่อ). แสดงค่าความการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่เกิดโคลน

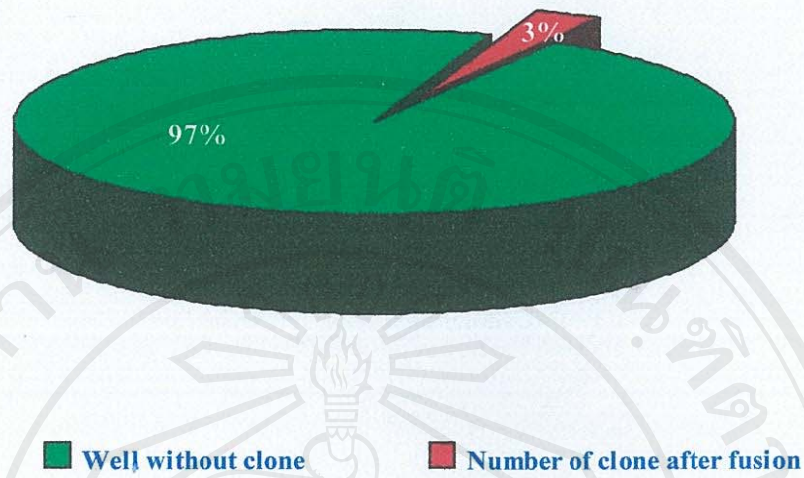
หลุม	ค่า O.D.*หลุมที่เคลือบด้วย เซลล์มีัมโคเทศผู้	ค่า O.D.หลุมที่เคลือบด้วย เซลล์มีัมโคเทศเมีย	ค่าความแตกต่าง ของ O.D.
6E6	0.53	0.43	0.10
6F11	0.48	0.66	-0.18
6G9	0.32	0.27	0.05
6G10	1.21	0.25	0.96
6H3	0.64	0.47	0.17

* O.D. = optical density

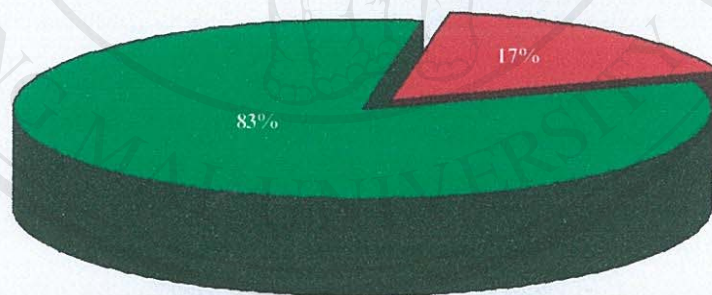
ตารางที่ 4-2. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมที่เกิดโคลนหลังจากการแยกโคลนเดี่ยว (limiting dilution)

หลุม	ค่า O.D.*หลุมที่เคลือบด้วย เซลล์มีัมโคเทศผู้	ค่า O.D.หลุมที่เคลือบด้วย เซลล์มีัมโคเทศเมีย	ค่าความแตกต่าง ของ O.D.
5E5-1C2	1.18	0.33	0.85
5E5-1F8	1.57	0.32	1.25
5E5-3E4	1.44	0.12	1.32
5E5-4B9	1.72	0.29	1.43
5E5-5B5	0.95	0.31	0.64
5E5-6C3	1.04	0.59	0.45
5E5-6G2	1.18	0.45	0.73

* O.D. = optical density



ภาพที่ 4-2. กราฟแสดงจำนวนโคลนที่เกิดขึ้นจากการเชื่อมเซลล์ม้าและเซลล์ไมโอโลมา.



Positive clone Negative clone

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

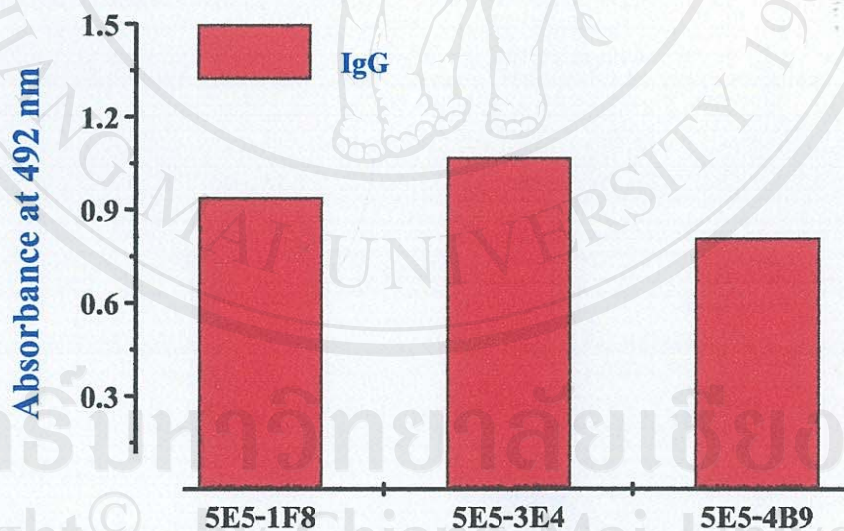
ภาพที่ 4-3. กราฟแสดงจำนวนโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อเฮช-วายแอนติเจนจำนวน 3 โคลน จากทั้งหมด 18 โคลน.

4.3 การจำแนกชนิดของแอนติบอดี

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนที่ 5E5-1F8, 5E5-3E4 และ 5E5-4B9 มาทำการจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ด้วยวิธี Indirect ELISA เพื่อจำแนกระหว่างอิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม (IgM) และ อิมมูโนโกลบูลิน จี (IgG) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นมีค่าการดูดกลืนแสงเป็น IgG (ตารางที่ 4-3) ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 5E5-1F8, 5E5-3E4 และ 5E5-4B9 ที่ผลิตได้เป็น IgG (ภาพที่ 4-4)

ตารางที่ 4-3. แสดงค่า OD อิมมูโนโกลบูลินของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

กลุ่ม	OD
5E5-1F8	0.94
5E5-3E4	1.07
5E5-4B9	0.81



ภาพที่ 4-4. กราฟแสดงปริมาณค่า OD อิมมูโนโกลบูลินของโคลนโมโนโคลนอลแอนติบอดี.

4.4 ปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

หลังจากการแยกโคลนเดี่ยวได้นำโคลนที่ให้ค่าผลต่างการดูดกลืนแสงที่สูงที่สุดคือ โคลน 3E4 มาทำการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี *in vitro* โดยเลี้ยงเซลล์ด้วย serum free media เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ มาตกตะกอน โปรตีนและผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ปริมาณแอนติบอดีประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อ 50 มิลลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4. แสดงปริมาณแอนติบอดีที่โมโนโคลนอลผลิตได้

หลุม	ปริมาณแอนติบอดี (มก)/ 50 มล.
5E5-1F8	1.845
5E5-3E4	2.673
5E5-4B9	1.452

5. การเก็บตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

กระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ครั้งที่ 1 ในโคนมจำนวน 1 ตัวที่สถานีวิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าโคที่ทำการกระตุ้นมีการตอบสนองที่ดี แต่ไม่สามารถเก็บไข่ได้ ในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ครั้งที่ 2 ของโคนมจำนวน 4 ตัว ณ ฟาร์มโคนม สถานีวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหิยะ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าแม่โค ทั้ง 4 ตัวมีการตอบสนองที่เด่นชัดในการแสดงอาการเป็นสัด จึงทำการล้วงตรวจจำนวนคอร์ปัสลูเทียมทางทวารหนัก ซึ่งโคเบอร์ 141 ตอบสนองไม่ดีเท่าที่ควร คือเกิดการตกไข่จำนวนต่ำและไม่คุ้มค่าในการชะล้างเพื่อเก็บตัวอ่อน ดังนั้นจึงทำการเก็บ ตัวอ่อนจากโคทั้ง 3 ตัวที่เหลือ คือโคเบอร์ 53, 119 และ 137 พบว่าโคเบอร์ 53 และ 137 มีจำนวนของคอร์ปัสลูเทียมที่ตอบสนองจากการกระตุ้นจำนวน 9 - 10 คอร์ปัสลูเทียมต่อรังไข่หนึ่งข้าง (ตารางที่ 4-5) ส่วนโคเบอร์ 119 มีการตกไข่ข้างขวาเพียงด้านเดียว จำนวนคอร์ปัสลูเทียมประมาณ 4-5 คอร์ปัสลูเทียมและสามารถเก็บตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ จากแม่โคเบอร์ 53 ได้ 6 ตัวอ่อน แต่สามารถนำไปตัดเก็บเซลล์เพื่อตรวจสอบเพศได้เพียง 3 ใบเนื่องจากตัวอ่อน 2 ตัว เป็นตัวอ่อนที่เกิดการตายในมดลูก (degenerated embryo) มีลักษณะของกลุ่มเซลล์ไม่เป็นรูปร่าง คล้ายผงฝุ่น สีดำ และพบไข่ที่ไม่มีการปฏิสนธิ (unfertilized ova) 1 ใบ สังเกตได้จากมีเซลล์เพียงเซลล์เดียวขนาดใหญ่ภายในไข่มีสีดำ ส่วนตัวอ่อน 3 ตัวที่เหลือ

เป็นตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิสต์ มีความเหมาะสมในการตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง ในส่วนของโคเบอร์ 137 เก็บตัวอ่อนได้ 2 ตัวอ่อน แต่เป็นตัวอ่อนที่ตายในมดลูก และโคเบอร์ 119 ไม่สามารถเก็บไข่หรือตัวอ่อนได้เลย

การเก็บตัวอ่อนครั้งที่ 3 ณ ฟาร์มเกษตรกรอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ แม่โคทั้ง 5 ตัวมีการตอบสนองที่เด่นชัดในการแสดงอาการเป็นสัดจากการกระตุ้นการตกไข่ จึงทำการสังเกตจำนวนคอร์ปัสลูเทียมเพื่อตรวจการตกไข่จากรังไข่ทางทวารหนัก ซึ่งแม่โคหนึ่งตัว (เบอร์ 62) ตอบสนองไม่เต็มที่เท่าที่ควร คือเกิดการตกไข่จำนวนต่ำ ผลจากการสังเกตพบว่าโคเบอร์ 61, 22 และ 31 มีจำนวนของคอร์ปัสลูเทียมที่ตอบสนองจากการกระตุ้นจำนวน 5 - 6 คอร์ปัสลูเทียมต่อรังไข่หนึ่งข้าง (ตารางที่ 4-6) ส่วนโคเบอร์ 44 พบจำนวนคอร์ปัสลูเทียมมากกว่า 10 คอร์ปัสลูเทียมในรังไข่แต่ละข้างและเก็บตัวอ่อน โคเบอร์ 44 ได้ 1 ตัวโคเบอร์ 22 เก็บตัวอ่อนได้ 1 ตัวอ่อน โคเบอร์ 31 เก็บตัวอ่อนได้ 5 ตัวอ่อน โคเบอร์ 61 เก็บตัวอ่อนได้ 3 ตัวอ่อน และโคเบอร์ 62 ไม่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ และตัวอ่อนที่เก็บได้สามารถนำไปตัดเก็บเซลล์เพื่อตรวจสอบเพศได้เพียง 6 ตัวอ่อน เฉพาะที่เป็นตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิสต์ ที่มีความเหมาะสมในการตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง การเก็บตัวอ่อนครั้งที่ 4 จากสถานีวิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ จากโคนมที่ฟักการรีดนมจำนวน 2 ตัว พบว่า โคทั้ง 2 ตัว (เบอร์ 44 และ 15) มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่เด่นชัด โดยมีการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดที่ตรงตามโปรแกรมการกระตุ้น การเก็บตัวอ่อนโคเบอร์ 44 สามารถเก็บตัวอ่อนได้จำนวน 15 ตัวอ่อน ส่วนโคเบอร์ 15 ไม่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ (ตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-5. ผลการตรวจรังไข่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนและจำนวนตัวอ่อนในการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 และ 2

โคทดลอง	จำนวนคอร์ปัสลูเทียม		จำนวนตัวอ่อน
	จากรังไข่ด้านซ้าย	จากรังไข่ด้านขวา	
โคทดลองครั้งที่ 1	4	3	0
โคเบอร์ 53	9	10	6
โคเบอร์ 137	10	10	2
โคเบอร์ 119	0	5	0
โคเบอร์ 141	2	1	0

ตารางที่ 4-6. ผลการตรวจรังไข่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนและจำนวนตัวอ่อนในการเก็บ
ตัวอย่างครั้งที่ 3

โคทคลอง	จำนวนคอร์ปัสลูเทียม จากรังไข่ด้านซ้าย	จำนวนคอร์ปัสลูเทียม จากรังไข่ด้านขวา	จำนวนตัวอ่อน
โคเบอร์ 44	มากกว่า 10	มากกว่า 10	1
โคเบอร์ 22	5	5	1
โคเบอร์ 31	5-6	6-7	5
โคเบอร์ 61	4	7	3
โคเบอร์ 62	4	0	0

ตารางที่ 4-7. ผลการตรวจรังไข่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนและจำนวนตัวอ่อนในการเก็บ
ตัวอย่างครั้งที่ 4

โคทคลอง	จำนวนคอร์ปัสลูเทียม จากรังไข่ด้านซ้าย	จำนวนคอร์ปัสลูเทียม จากรังไข่ด้านขวา	จำนวนตัวอ่อน
โคเบอร์ 44	มากกว่า 10	มากกว่า 10	15
โคเบอร์ 15	4	2	0

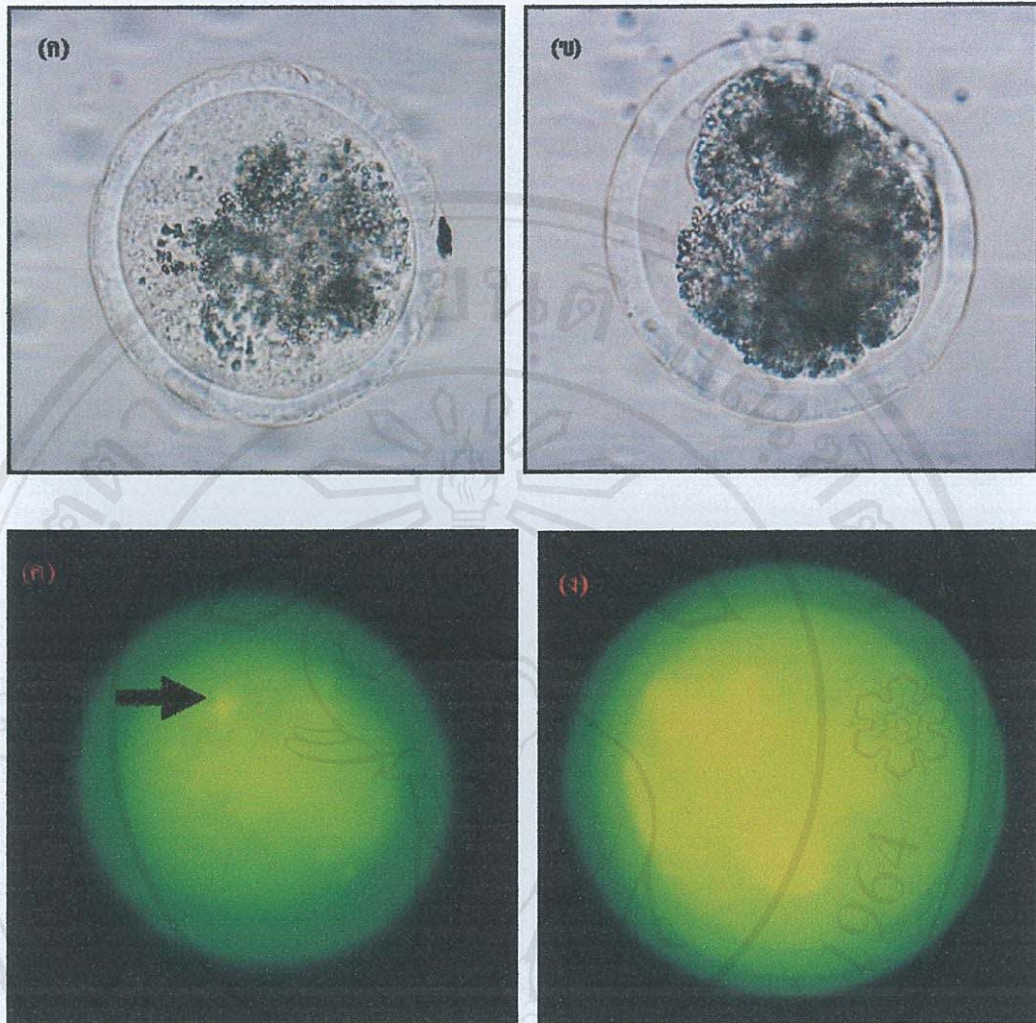
4.6 การคัดเพศตัวอ่อนโคด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

ตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นในครั้งที่ 4 จำนวน 7 ตัวได้ถูกนำมาตรวจสอบเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน โดยจุดตรวจเรืองแสง FITC ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ติดหลอดยวีก่อนจะนำไปตรวจหาเพศอีกครั้งด้วยเทคนิค PCR พบว่า ตัวอ่อนทั้ง 6 ตัวมีการเรืองแสงของจุดที่เป็นการเกาะเกี่ยวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนภายใต้แสงยูวี และมีตัวอ่อนจำนวน 1 ตัวที่ไม่ตรวจพบการตอบสนองโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน (ภาพที่ 4-5) หลังจากนั้นนำตัวอ่อนที่พบและไม่พบจุดตรวจเรืองแสงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน มาตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค PCR พบว่าเป็นเพศผู้จำนวน 5 ตัว และเพศเมียจำนวน 2 ตัว (ตารางที่ 4-8)

ตารางที่ 4-8. แสดงผลการคัดเพศตัวอ่อนโคด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน
และตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค PCR

วิธีการคัดเพศ	เพศ	
	เพศผู้	เพศเมีย
โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน	6	1
เทคนิค PCR	5	2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



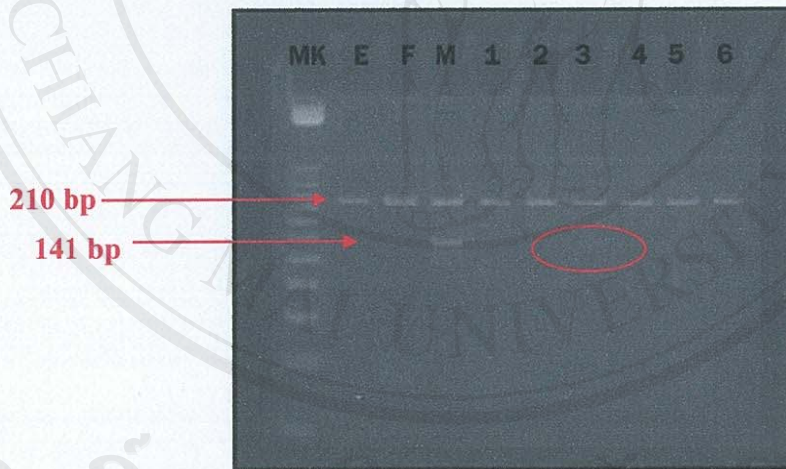
ภาพที่ 4-5. แสดงผลการตัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วาย : ก) และ ข) เป็นภาพถ่ายตัวอ่อนขณะปกติ ค) ภาพตัวอ่อนที่ถ่ายภายใต้แสงยูวีที่ตรวจพบจุดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์บริเวณหัวลูกศรชี้ ง) ภาพตัวอ่อนที่ไม่พบจุดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ภายใต้แสงยูวี

7. การคัดเพศด้วยเทคนิค PCR

ตัวอ่อนที่ได้เก็บได้จากการกระตุ้นในครั้งที่ 2 และ 3 จะถูกตัดแบ่งบางส่วนเพื่อมาคัดเพศ ก่อนที่จะทำการแช่แข็ง จากการคัดเพศด้วยเทคนิคทำ PCR ในการเก็บตัวอ่อนครั้งที่ 2 ตัวอ่อนที่ได้ทั้ง 3 ตัว เป็นเพศเมีย และในการเก็บตัวอ่อนครั้งที่ 3 ตัวอ่อนที่ได้ทั้ง 6 ตัว เป็นเพศเมียจำนวน 5 ตัว เพศผู้ 1 ตัว (ภาพที่ 4-6) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเพศผู้ที่มีขนาด 141 bp และขนาด 210 bp และเพศเมียขนาด 210 bp โดยการวัดเทียบกับแถบมาตรฐานระยะห่างระหว่างแถบ 25 bp

ตารางที่ 4-9. แสดงผลการคัดเพศตัวอ่อนโคด้วยเทคนิค PCR

การเก็บตัวอ่อนครั้งที่	จำนวนตัวอ่อน ที่คัดเพศ	เพศ	
		เพศผู้	เพศเมีย
2	3	-	3
3	6	1	5



ภาพที่ 4-67. แสดงผลการคัดเพศด้วยเทคนิค PCR: ช่อง MK แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 25 bp, ช่อง E เป็นตัวอย่างตัวอ่อนเพศเมีย ช่องที่ M เพศผู้ (ควบคุม), ช่องที่ F เพศเมีย (ควบคุม) ช่องที่ 1, 2, 4, 5 และ 6 ตัวอ่อนเพศเมีย ช่องที่ 3 ตัวอ่อนเพศผู้.