บทที่ 5

วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

5.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

5.1.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน

กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c โดยฉีดสเปิร์มโคนมให้จำนวน $2x10^6$ เซลล์ต่อปริมาตร100 ไมโครลิตรผสมรวมกับ Freund's complete adjuvant 100 ไมโครลิตรทุก 2 สัปดาห์เป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ วันที่ 0 สัปดาห์ที่ 2 และ 4 และเก็บเลือดเพื่อนำมาวัดการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้การกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่ากลุ่มควบคุม จากคุณสมบัติของแอนติเจนเมื่อเข้าสู่ในร่างก่ายของสัตว์ (immunization) จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นเรียกว่า immune response (Abbas *et al.*, 1994) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการผลิตแอนติบอดีมากำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายแก่ร่างกาย ในการจะกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนใดๆก็ตาม เนื่องจากการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจากการใช้สเปิร์มโคเป็นตัวกระตุ้นทำให้หนูได้รับสเปิร์มทั้งเพศผู้และเพศเมีย แตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้เซลล์ม้ามโคเพศผู้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้น (Goldberg *et al.*, 1971; Zaborski, 1979; Selden, 1982; Hoppe and Koo, 1984; Brunner *et al.*, 1984; Iyer *et al.*, 1989; Booman *et. et al.*,1989; Ali *et al.*, 1990) พบว่าสามารถใช้สเปิร์มโคเป็นตัวกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนได้เช่นเดียวกับเซลล์ม้ามแต่ขั้นตอนในการตรวจสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต้องเซลล์ที่เป็นแหล่งของเอช-วายแอนติเจนที่ไม่มีเซลล์อื่นปนมา เช่น เซลล์ม้ามเพศผู้หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวของเพศผู้เช่นกัน เนื่องจากเซลล์ทั้งสองสามารถแสดงออกถึงแหล่งของเอช-วายแอนติเจนได้

การวัดการตอบสนองของหนูขาวตัวเล็กสายต่อเอช-วายแอนติเจนนั้นได้ใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Link Immunosorbent Assay, ELISA) (Iyer *et al.*, 1989) ในรูปแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ indirect ELISA โดยใช้เซลล์ม้ามโคเพศผู้ เป็นแอนติเจน เนื่องจากความต้องการความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตต่อเอช-วายแอนติเจนบนผิวเซลล์ม้ามเพศผู้ แต่วิธีวัดเอช-วายแอนติเจนมีได้หลายวิธี เช่น RIA เทคนิค microcytotoxicity (Bradley and Heslop, 1988) เทคนิค radioimmunobinding (Reilly and Goldberg, 1984) เทคนิค immunofluorescent (Zaborski,1979) และเทคนิค cytotoxicity การนำเทคนิค ELISA มาใช้ในการตรวจปฏิกิริยา ระหว่างแอนติบอดีกับเอช-วายแอนติเจน พบว่าเทคนิค ELISA มีความใกล้เคียงกับเทคนิค cytotoxicity ซึ่งเทคนิค cytotoxicity จะมีผลต่อการแตกของเซลล์ แต่ ELISA จะรวดเร็วและมีความแม่นยำมากกว่า ข้อเสนอแนะให้มีการทำ RIA เทียบกับ ELISA เพื่อเพิ่มความแม่นยำของแอนติบอดีที่ได้มา เนื่องจาก การวัดค่าเอช-วายแอนติเจนจากเซลล์ที่ต้องการตรวจสอบนั้น ค่าของปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นจะแปรผันตามแหล่งของแอนติเจน และจำนวนเซลล์ที่ใช้ตรวจ เนื่องจากการแสดงออกบริเวณผิวเซลล์ของเอช-วายแอนติเจน (Brunner *et al.*, 1984) เพราะฉะนั้นการวัดค่าของเอช-วายแอนติเจนที่จะแสดงออกมานั้นจากการทำ ELISA ที่ใช้เซลล์ม้ามเป็นแหล่งแอนติเจนตรวจสอบควรมีการควบคุมปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการทำ PCR โดยมีกลุ่มควบการแสดงออกของเอช-วายแอนติเจน เช่น อาจใช้เอติบอดีชนิดใดที่สามารถจับกับแอนติเจนอื่นๆบนผิวเซลล์มาเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาในการทำ ELISA

5.1.2 ผลการผลิตเซลล์ลูกผสม

หนูขาวตัวเล็กสายที่ตรวจพบว่ามีการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่ให้ค่าแอนติบอดีสูงสุดมาเก็บเซลล์จากม้าม จะได้บีเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดี การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้าม (spleenocyte) และเซลล์ไมอิโลมา (myeloma) สายพันธุ์ X63Ag8.653 ด้วยโพลีเอทีรีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ความเข้มข้น 50 % (Schelling, 1995) ผสมกับ 7.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 1:2 (Berrebeck and Moller, 1986) เป็นเวลา 45 วินาทีทำให้ผิวของเซลล์ไมอิโลมามีการอ่อนตัวและเกิดการเชื่อมของเซลล์ทั้งสองชนิด หลังจากการเชื่อมเซลล์ ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 หลังจากการเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT แล้วประมาณ 7 วัน พบว่าเกิดโคลนของเซลล์ลูกผสมจำนวน 18 โคลน จากทั้งหมด 528 หลุม คิดเป็น 3.4% ของการเชื่อมเซลล์ จากการเชื่อมเซลล์ทุกครั้งที่ผ่านมาได้ใช้เวลาในการเชื่อม 30 วินาทีไม่พบกลุ่มโคลนใดๆ เกิดขึ้น ดังนั้นถ้าเพิ่มระยะเวลาการเชื่อมเพิ่มขึ้นก็จะส่งผลต่อจำนวนโคลนที่จะเพิ่มขึ้นแต่ต้องระวังเรื่องความเป็นพิษของสารเคมีต่อเซลล์เช่นกัน ได้เลือกโคลนที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ผลตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจนที่สูงสุดคือ โคลนจากเพลทที่ 5 หลุม E5 ไปทำการแยกโคลนเดี่ยวเป็นเวลา 14-20 วันได้โคลนเดี่ยวทั้งหมด 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 เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นมานั้นภายในหลุมเดียวกันพบว่ามีโคลนเกิดขึ้นหลายโคลนดังนั้นจึงต้องทำการแยกโคลนเดี่ยวเพื่อให้ได้โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนเพียงอย่างเดียว พบว่าเซลล์ลูกผสมของหลุมที่ 5E5 สามารถแยกโคลนเดียวได้ถึง 7 โคลนและในขั้นตอนการแยกโคลนเดี่ยวอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ การดูดอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจหาแอนติบอดี ต้องเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มาให้ได้มากที่สุดทำให้ติดเซลล์บางส่วนมาด้วยทำให้เซลล์ที่ต้องการได้หายไปจากขั้นตอนการดูดอาหาร ถ้าจะป้องกันการสูญหายของเซลล์ที่จะเกิดขึ้นควรจะขยายจำนวนโคลนลูกผสมที่เกิดขึ้นทั้งหมดก่อนที่จะแยกโคลนเดี่ยวโดยการนำเซลล์ไปเพิ่มจำนวนใน เพลทชนิด 24 หลุมเพราะจะง่ายต่อการเก็บอาหารและได้จำนวนมากเพียงพอสำหรับขั้นตรวจหาแอนติบอดีจากอาหารเลี้ยงเซลล์

5.1.3 การจำแนกชนิดของแอนติบอดี

โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนที่ 5E5-1F8, 5E5-3E4 และ5E5-4B9 เมื่อนำมาจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นั้นเป็น IgG จากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายนั้นได้ฉีดทุก 2 สัปดาห์อิมมูโนโกลบูลินที่เกิดขึ้นจึงเป็นชนิดจีเพราะอิมมูโนโกลบูลินชนิดจีจะเพิ่มปริมาณสูงมากภายหลังเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงกระตุ้นครั้งที่สอง (secondary response) (อรวดี, 2539) ซึ่งแตกต่างจากศึกษาเกี่ยวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ที่ผ่านมาพบว่า แอนติบอดีที่เกิดจะเป็น IgM เนื่องจากเอช-วายแอนติเจนเป็นกลุ่มของ glycoprotein ที่ส่งผลต่อการกระตุ้น IgM หรือการทำ hyperimmunization ก็เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิด IgM ได้เช่นกัน (Booman *et al.*, 1989; Brunner *et al.*,1984; Iyer *et al.*, 1989; Booman *et al.*,1989; Ali *et al.*, 1990) ข้อแนะนำการตรวจชนิดของแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่จะเกิดขึ้นหลังการกระตุ้นเพื่อความแม่นยำการตรวจเอช-วายเอนติเจนโดยความแม่นยำจาก IgG ในช่วงวันที่ 10 – 17 ของการกระตุ้นด้วยเซลล์ม้ามเป็นช่วงที่ IgG ถูกผลิตออกมาสูงสุดจากการตอบสนองระยะที่ 2 และเป็นช่วงที่เหมาะสมในการนำมาแอนติบอดีมาใช้ หรือนำผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่และการเก็บตัวอ่อน

การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในการทดลอง พบว่าโคที่ทำการศึกษามีการตอบสนองที่แน่ชัดต่อฮอร์โมนที่ให้สำหรับการกระตุ้นโดยโคจะแสดงอาการเป็นสัดที่ชัดเจน จะพบการถูกขึ้นทับโดยโคตัวอื่น (mounted) บ่อยในวันที่ 14 ของโปรแกรมการกระตุ้น อันเป็นผลมาจากฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เพิ่มสูงสุดและมีปริมาณที่มากกว่าปกติ เพราะจำนวนฟอลลิเคิลที่พัฒนาเป็นฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ ทำให้ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นและส่งผลต่อพฤติกรรมการเป็นสัด และเมื่อทำการล้วงตรวจจำนวนคอร์ปัสลูเทียม พบการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นโดยมีจำนวนคอร์ปัสลูเทียม เฉลี่ย 11 ± 3.02 (n=12) ต่อตัว จากรายงานของ Krininger *et al.*. (2003) พบการตอบสนองของรังไข่โคพันธุ์ โฮลสไตน์ อยู่ที่ 16.6 ± 4.14 (n=24) คอร์ปัสลูเทียม ต่อตัว เช่นเดียวกับ Sartori *et al.* (2003) ที่พบจำนวนคอร์ปัสลูเทียมเฉลี่ย 1.4 ± 3.6 (n=10) ต่อตัว และพบว่าโคเขตร้อน (*Bos indicus*) มีค่าเฉลี่ยในการตอบสนองของรังไข่ โดยมีจำนวนคอร์ปัสลูเทียมเฉลี่ยอยู่ที่ 10.89 ± 1.80 (n=18) ต่อตัว (Barros and Nogueira, 2001) แสดงว่าโคที่ได้รับการกระตุ้นในการทดลองนี้สามารถตอบสนองต่อโปรแกรมการกระตุ้นเป็นอย่างดี

การทดลองครั้งนี้สามารถเก็บตัวอ่อนได้จำนวน 18 ใบ และเป็นตัวอ่อนที่อยู่ในระยะบลาสโตซีสจำนวน 9 ใบ ที่เหลือเป็นตัวอ่อนที่ไม่สมบูรณ์คือมีการตายก่อนการเก็บ หรือเป็นไข่ที่ไม่ได้รับการผสม การที่เก็บตัวอ่อนได้จำนวนน้อยอาจเป็นผลมาจากการชะล้างตัวอ่อนและระบบสืบพันธุ์ของโค ทั้งนี้ในการทดลองครั้งที่ 2 โคทดลองเป็นโครีดนม และอยู่ในช่วงสภาพอากาศร้อน-ชื้น ส่งผลต่ออัตราการผสมติดต่ำทำให้ไข่ที่พบส่วนใหญ่เป็นไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และการทดลองครั้งที่ 3 ที่ทำในช่วงอากาศเย็นแห้งเพื่อลดอัตราการผสมติดที่ต่ำลงแต่ในระบบการชะล้างน้ำยาที่ชะล้างได้มีการเปลี่ยนแปลงทำให้น้ำยามีความหนืดลดลงส่งผลต่อการชะล้างทำให้ไม่สามารถเก็บไข่ออกมาได้ตามจำนวนคอร์ปัสลูเทียมที่ตรวจพบ

มีรายงานการกระตุ้นการตกไข่ ในโคพันธุ์ Holstein (Krininger *et al* ., 2003) ว่าสามารถเก็บตัวอ่อนได้เฉลี่ย 9.3 ± 2.93 (n=24) และ 10.9 ± 2.93 (n=29) ในโคพันธุ์บรามัน อย่างไรก็ตามวิธีการชะล้างก็อาจส่งผลถึงจำนวนตัวอ่อนที่จะได้ด้วย จากรายงานของ Sartori *et al.* (2003) ที่เปรียบเทียบลักษณะของการชะล้างโดยการปล่อยน้ำยาชะล้างเข้าสู่ปีกมดลูกอย่างช้าๆ พบว่าสามารถเก็บตัวอ่อนได้ถึง 63.9 ± 8.6 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บตัวอ่อนครั้งที่ 4 ที่กระตุ้นการตกไข่กับโคที่พักการรีดนม พบว่าโคมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ดีมากและเมื่อทำการล้วงตรวจจำนวนคอร์ปัสลูเทียม พบการตอบสนองต่อการกระตุ้นมากกว่า 10 คอร์ปัสลูเทียมต่อรังไข่หนึ่งข้าง แต่เมื่อตรวจหาตัวอ่อนหลังการชะล้างพบว่ามีโค 1 ตัวที่ไม่สามารถเก็บตัวอ่อนได้เนื่องจากระบบการชะล้าง มีการเปลี่ยนแปลงน้ำยาที่ชะล้างทำให้น้ำยามีความหนืดลดลงส่งผลต่อการชะล้างทำ ซึ่งโคที่เหลือสามารถเก็บตัวอ่อนได้ 16 ตัวอ่อนและเป็นตัวอ่อนที่มีชีวิต 9 ตัวอ่อน ที่เหลือเป็นไข่ที่ไม่ได้รับการผสมหรือไม่มีการพัฒนาหลังการผสม ดังนั้นการใช้โคที่พักการรีดนมเป็นโคตัวให้จะให้ผลที่ดีกว่าโครีดนม เนื่องจากโครีดนมที่ใช้จะเก็บตัวอ่อนเป็นโคที่ให้น้ำนมปริมาณที่สูง ส่งผลให้โคมีการผสมติดที่ต่ำเป็นผลมาจากโภชนะที่โคได้รับจะมีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งส่งผลต่อระดับกรดในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนหลังการผสม จากการศึกษาครั้งนี้เราได้พบวิธีในการลดต้นทุนค่าน้ำยาชะล้างตัวอ่อนที่สามารถเตรียมได้ในห้องปฏิบัติการโดยใช้สารละลาย PBS ปริมาตร 1 ลิตรผสมกับ FBS 10 มิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะ ทำให้การเก็บตัวอ่อนมีต้นทุนที่ลดลง 15-20 % แต่ยังต้องมีการพัฒนาความเหมาะสมของน้ำยาชะล้างตัวอ่อนต่อไปเนื่องความหนืดของน้ำยายังต่ำเมื่อเทียบกับแบบการค้าทำให้เกิดการสูญเสียของน้ำยาในการชะล้างมาก หรือต้องใช้น้ำยาที่มากถึง 1 ลิตร ต่อการชะตัวอ่อน 1 ข้างปีกมดลูก อีกทั้งจำนวนตัวอ่อนที่ควรจะเก็บได้มีจำนวนน้อยกว่าคอร์ปัสลูเทียมที่ตรวจพบ ถ้ามีการพัฒนาเพื่อผลิตน้ำยาชะล้างตัวอ่อนที่เหมาะสมก็จะลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บตัวอ่อนโดยวิธีการชะล้างได้อีกแนวทางหนึ่ง

จากการกระตุ้นการตกไข่เพื่อการผลิตตัวอ่อนนั้น ในการศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างของแม่โคตัวให้ (donor) ที่อยู่ในช่วงการให้ผลผลิตที่ต่างกันคือ ช่วงหลังคลอดหรือช่วงที่ให้ผลผลิตในปริมาณสูงและช่วงพักการรีดนม พบว่าแม่โคที่อยู่ในช่วงพักการรีดนมให้ผลตอบสนองต่อการกระตุ้นและเก็บตัวอ่อนได้ดีกว่าแม่โคที่อยู่ในช่วงการให้ผลผลิตเนื่องมาจากสาเหตุเรื่องของพลังงานและระดับของโภชนะที่แม่โคได้รับอาจจะไม่เพียงพอความความต้องการ ซึ่งส่งผลต่อระบบฮอร์โมน เช่น การลดลงของอินซูลินไลค์โกรทแฟรคเตอร์ (insulin like growth factor, IGF) ส่งผลต่อการลดจำนวนฟอลลิเคิลสติมูเลติง ฮอร์โมน รีเซ็บเตอร์ (follicle stimulating hormone receptor) ทำให้แม่โคมีการตอบสนองจากการกระตุ้นไม่ดี อีกทั้งทำให้เกิดตายของตัวอ่อนเนื่องจาก IGF จะช่วยในการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนไม่ให้มีการสูญเสียเกิดขึ้น ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงการใช้ฮอร์โมนบางชนิดร่วมในโปรแกรมการกระตุ้นเพื่อช่วยเพิ่มระดับของ IGF ในทางอ้อมเช่นสังเคราะห์ recombinant bovine somatotropin (rbST) (Hasler *et al.*, 2003) แต่การเพิ่มการจัดการด้านอาหารให้กับแม่โคที่เข้ารับการกระตุ้นให้ได้รับโภชนะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มากกว่าปกติก็อาจจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ IGF ได้อีกทางหนึ่ง (Robinson, 1996; Santos *et al.*, 2004)

5.3 การคัดเพศตัวอ่อนด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

ผลการคัดเพศตัวอ่อนด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน การบ่มตัวอ่อนในสารละลายเลี้ยงตัวอ่อน M-199 200 ไมโครลิตร ผสมแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนในสัดส่วน 2:1 เป็นเวลา 45 นาที และบ่มในสารละลายเลี้ยงตัวอ่อน M-199 200 ไมโครลิตร ที่เจือจาง goat anti – mouse IgG-FITC ความเข้มข้น 1:1,000 เป็นเวลา 45 นาที ล้างตัวอ่อนในสารละลาย PBS 200 ไมโครลิตร พบว่าตัวอ่อนที่เกิดจุดการเรืองแสง FITC มีจำนวน 6 ตัวจากตัวอ่อนทั้งหมด 7 ตัว พบลักษณะส่วนอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องอาจเนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ ในการบ่มใน Goat Anti – Moues IgG-FITC ใช้ระยะเวลานานเกินไปอีกทั้งระดับความเข้มข้นที่สูง อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ในการคัดเพศด้วยแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่ผลิตขึ้นมานั้นพบว่าเป็นเพศผู้ 85.7 % ซึ่งมีความใกล้เคียงกับรายงานของ Stephen *et al.* (1988) ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน พบว่าผนังเซลล์ของตัวอ่อนของหนู แพะ แกะ และโคจับกับแอนติบอดีต่อ เอช-วาย แอนติเจนได้ประมาณ 73 - 82 % นอกจากนี้ Christopher and Goldberg (1976) ได้ฉีดเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้เข้าในหนูเพศเมียเพื่อกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อ เอช-วาย แอนติเจน และนำแอนติบอดีที่ได้ทดสอบกับตัวอ่อนที่ระยะ 8 เซลล์ของหนูเมาส์โดยวิธี cytotoxicity พบว่า แอนติเจนสามารถจำแนกเพศของเพศผู้ ได้ 65-78 % สำหรับตรวจสอบน้ำเชื้อของโค ที่ติดฉลากด้วย โมโนโคลนอลเอช-วายแอนติบอดี พบว่าสัดส่วนที่เกิดการเรืองแสงและไม่เรืองแสง (โครโมโซม Y และ X) เท่ากับ 76 : 24 (Ali *et al.*, 1990) และ Veerhuis *et al.* (1994) โมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อเอช-วายแอนติเจนที่ผลิตได้ มาใช้ในการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนโค สามารถใช้ตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ระยะ 7-8 วันหลังการปฏิสนธิ และมีช่วงความแม่นยำของการบ่งบอกเพศว่าเป็นเพศผู้อยู่ในระหว่าง 58-71 % Gardon *et al.* (2004) จำแนกเพศจากระยะต่างๆของตัวอ่อนโคที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน พบว่าตัวอ่อน มีความแตกต่างกันในสัดส่วนเพศผู้และเมียที่เกิดขึ้นเท่ากับ 85.8:14.2 ดังนั้นการเพิ่มระดับของแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนตั้งแต่ 3-5 % เพื่อเพิ่มคุณภาพการตรวจเพศตัวอ่อนม้าและโค มีความแม่นยำต่อตัวอ่อนเพศผู้ประมาณ 88 % (Ramalho *et al.*, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สาเหตุที่แอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ระดับ 80 -90 % น่าจะเป็นผลมาจากขั้นตอนการล้างตัวอ่อนหลังการย้อมหรือการที่แอนติบอดียังไม่มีความเข้มข้นไม่เหมาะสมกับการคัดเพศ ในงานศึกษาครั้งต่อไปน่าจะมีการศึกษาถึงระดับของแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่เหมาะสมกับการคัดเพศและศึกษาการเชื่อมสีฟลูออเลสเซนต์เข้ากับแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนเพื่อลดระยะเวลาในการคัดเพศตัวอ่อนได้อีกแนวทางหนึ่ง ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาแอนติบอดีที่ได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีหรือโพลีโคนอลแอนติบอดีจะเป็นชนิด IgM ส่งผลเกิดปฏิกิริยาร่วม (cross reaction) ทำให้ไม่มีความจำเพาะมีผลต่อความแม่นยำของแอนติเจนต่ำลงไป เพราะฉะนั้นการใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจนในการตรวจเซลล์เพศผู้ที่แสดงแหล่งของเอช-วายแอนติเจน ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะได้ผลประมาณ 55 – 86 % (Goldberg *et al.*, 1971) เนื่องจากเอช-วายแอนติเจนเป็นกลุ่มของ Glycoprotein ที่ส่งผลต่อการกระตุ้น IgM หรือการทำ hyperimmunization ก็เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิด IgM ได้เช่นกัน ซึ่งแนะนำการตรวจชนิดของแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่จะเกิดขึ้นหลังการกระตุ้นเพื่อความแม่นยำการตรวจเอช-วายแอนติเจนโดยความแม่นยำจาก IgG ในช่วงวันที่ 10 – 17 ของการกระตุ้นด้วยเซลล์ม้ามเป็นช่วงที่ IgG ถูกผลิตออกมาสูงสุดจากการตอบสนองระยะที่ 2 และเป็นช่วงที่เหมาะสมในการนำมาแอนติบอดีมาใช้ หรือนำผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน และเปรียบเทียบการทำ RIA กับ ELISA เพื่อเพิ่มความแม่นยำของแอนติบอดีที่ได้มา และใช้สารแขวนลอยในอัณฑะเป็นสิ่งตรวจสอบแหล่งของเอช-วายแอนติเจน

5.4 การคัดเพศตัวอ่อนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

ตัวอ่อนที่คัดเพศโดยเทคนิค PCR เพื่อตรวจหาโครโมโซมเพศผู้ (โครมโมโซมวาย) โดยใช้ primer BOV97M ที่มีขนาด 141 bp ร่วมกับ primer bovine specific เพื่อตรวจสอบว่าดีเอ็นเอที่นำมาศึกษาเป็นของโคที่มีขนาด 210 bp พบว่าจากตัวอ่อนที่ศึกษาจำนวน 9 ตัวตรวจพบเพศผู้ที่ตำแหน่ง 141 bp จำนวน 1 ตัว รายงานของ Hochman *et al.* (1995) และ Park *et al.* (2001) ที่ใช้ primer BOV97M เพื่อตรวจหาตัวอ่อนเพศผู้ที่ตำแหน่ง 141 bp ในการตรวจเพศโดยเทคนิค PCR Herr and Reed (1991) ได้เสนอข้อควรระวังในการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมจากเซลล์ที่มาจากแหล่งอื่นๆ ดังนี้ (1) น้ำยาที่ใช้ใส่ตัวอ่อนขณะคัดเพศ ที่มี โบวายซีรัมอัลบูมิน หรือฟีตัลคาล์ฟซีรัม ปนอยู่ (2) เซลล์ที่เกาะรอบโซน่า เพลลูซิด้า (3) สเปิร์มที่เกาะบนโซน่า เพลลูซิด้า พบว่าสเปิร์มที่ไม่สามารถเจาะเปลือกได้จะติดอยู่ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ (4) การปนเปื้อนในขั้นตอนการล้างใบมีดที่มีการติดของเซลล์ก่อนหน้านี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รวมถึงจากฝุ่นละออง (5) จากสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (6) จากสารต่างๆ ที่วิเคราะห์เมื่อครั้งก่อนการเพิ่มความแม่นยำของ primer ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศ เช่น การออกแบบ primer ชนิดใหม่ที่เหมาะกับเพศผู้ (Chrenek *et al.*, 2000; Virta *et al.*, 2002; Zeleny *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003) หรือการติดสารเรืองแสงเข้ากับ primer เพื่อความรวดเร็วในการตรวจเพศโดยลดขั้นตอนในการทำ gel electrophoresis (Virta *et al.*, 2002) Hasler *et al.* (2003) เสนอการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ต่างๆ เช่น k-casein ที่บ่งบอกโปรตีนในนม ร่วมกับการตรวจสอบเพศเพื่อการเพิ่มคุณค่าตัวอ่อนในการคัดเพศ

ดังนั้นการคัดเพศตัวอ่อนโดยเทคนิค PCR สามารถส่งผลให้สัดส่วนเพศที่จะได้จากวิธีธรรมชาติในสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1:1 เปลี่ยนไปได้ เมื่อตัวอ่อนได้ผ่านขบวนการคัดเพศก่อนการย้ายฝากตัวอ่อน

สรุปผลการทดลอง

1. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c โดยใช้เซลล์สเปิร์มเป็นแอนติเจนสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน หลังจากการเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูตอบสนองต่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 พบว่าเกิดโคลของเซลล์ คิดเป็น 3.4 % ของการเชื่อมเซลล์และการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนพบว่ามีโคลนที่ตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน คิดเป็น 17 % ของโคลนที่เกิดขึ้น การแยกโคลนเดี่ยวทั้งหมด 7 โคลน มี 3 โคลนที่ตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน

3. การจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ของอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG

4. การตกไข่และตัวอ่อนที่ได้จากโคนมที่ศึกษา จำนวน 12 ตัว แสดงเป็นค่า mean±SD พบว่ามีการตกไข่ของรังไข่ด้านซ้าย, ขวา และจำนวนตัวอ่อนเป็น 5.8±3.06, 5.8±3.67 และ 1.8±2.21, ตามลำดับ

5. ขั้นตอนการเก็บตัวอ่อนสามารถพัฒนาน้ำยาชะล้างตัวอ่อนขึ้นเองภายให้ห้องปฏิบัติการ โดยใช้ PBS ร่วมกับ 1 % FBS สามารถลดต้นทุนน้ำยาในการเก็บตัวอ่อนได้ถึง 15-20 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การคัดเพศตัวอ่อน จำนวน 7 ตัวได้ถูกนำมาตรวจสอบเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน โดยดูจุดการเรืองแสง FITC ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตัวอ่อนทั้ง 6 ตัวมีการเรืองแสงของจุดที่เป็นการเกาะเกี่ยวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ภายใต้แสงยูวีและมีตัวอ่อนจำนวน 1 ตัวที่ไม่ตรวจพบการตอบสนองโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ความแม่นยำของการตรวจคิดเป็น 83 % ของตัวอ่อนเพศผู้ที่ตรวจพบจากการยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR

7. การคัดเพศด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอรเรส ตัวอ่อนทั้ง 9 ตัวอ่อน เป็นเพศเมียจำนวน 8 ตัว เพศผู้ 1 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเพศผู้ที่มีขนาด 141 bp และขนาด 210 bp และเพศเมียขนาด 210 bp

8. การคัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจะมีความแม่นยำที่น้อยกว่าการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แต่ตัวอ่อนที่คัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจะถูกกระทบกระเทือนน้อยกว่าการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเนื่องจากตัวอ่อนจะไม่ถูกตัดแบ่งเซลล์ออกมา ดังนั้นการพัฒนาเพื่อเพิ่มความแม่นยำของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ก็จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนได้เช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

1. การเตรียมเซลล์สเปิร์มจากน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน ควรปั่นล้างเซลล์ให้สะอาดไม่ควรมีการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเฉพาะไข่แดง จะส่งผลต่อการกระตุ้นได้ ทุกครั้งในขั้นตอนการล้างควรดูดสารละลายเซลล์สเปิร์มปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาตรวจดูการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงน้ำเชื้อ

2. การคัดเลือกโคตัวให้ ควรใช้โคที่พักการรีดนม จะตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ดีและให้ตัวอ่อนจำนวนที่มากกว่าโครีดนม เนื่องจากไม่มีอิทธิผลจากการให้นมมารบกวนระบบสืบพันธุ์

3. พัฒนาอุปกรณ์และน้ำยาในการเก็บตัวอ่อนให้มีต้นทุนที่ต่ำลงและมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำยาทางการค้า ควรเสริม growth factor ลงในน้ำยาชะล้าง เพราะเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับตัวอ่อน และคงตัวอ่อนให้อยู่ในน้ำยาชะล้างได้นานก่อนที่จะนำไปใช้งานต่อไป

4. การคัดเพศด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอรเรส ควรมีการทดสอบความแม่นยำของ primer ที่จะใช้ตรวจเพศก่อนนำมาใช้จริง และขั้นตอนการเก็บตัวอ่อนมาตรวจเพศต้องเก็บเซลล์ให้ได้มากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การคัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ควรศึกษาถึงระยะเวลาในการย้อม FITC และเพิ่มจำนวนของตัวอ่อนในการศึกษาเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศ

6. แอนติเจนที่ผลิตได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ควรนำมาเชื่อมกับ FITC โดยตรงเพื่อลดเวลาในการคัดเพศ และลดความพิษของ FITC ต่อเซลล์ตัวอ่อนหลังการย้อมโดยล้างตัวอ่อนใน PBS หลายๆ ครั้ง อีกทั้งการคัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ตัวอ่อนจะได้รับความกระทบกระเทือนน้อยกว่าการคัดเพศด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากตัวอ่อนจะถูกตัดเซลล์บางส่วนไปคัดเพศ แต่การคัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจะมีความแม่นยำน้อยกว่าเทคนิค PCR ที่คัดเพศจากการจำแนกโครโมโซมเพศ

7. พัฒนารูปแบบการคัดเพศน้ำเชื้อจากแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่ผลิตขึ้นร่วมกับ complement ในการผลิตน้ำเชื้อคัดเพศแช่แข็ง

8.พัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน โดยใช้เทคนิคอื่นๆ ร่วมเช่น การตรวจวัดการตกไข่ที่แน่นอนเพื่อกำหนดเวลาผสม โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนเอสโตรเจนและฮอร์โมนลูทีไนซิงค์เพื่อให้บอกช่วงเวลาการตกไข่ที่แม่นยำมากกว่าการจัดสัดด้วยตาเปล่า และการตรวจท้องหลังการย้ายฝากจากการตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน เพื่อช่วยในการจัดกลุ่มการจัดการที่เหมาะสมสำหรับแม่โคต่อไป

9. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ เอช-วายแอนติเจนที่เชื่อมกับ FITC ในขั้นตอนการหาตัวอ่อนจากการชะล้างนั้น ควรผสมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ เอช-วายแอนติเจนลงไปเพื่อช่วยลดเวลาในการค้นหาและคัดเพศตัวอ่อน เมื่อนำไปหาภายใต้ฟิลเตอร์ยูวีของกล้องจุลทรรศน์อีกทั้งจะช่วยให้แยกตัวอ่อนเพศผู้ได้เร็วขึ้น โดยจะสังเกตได้จากการเรืองแสงของตัวอ่อนภายใต้แสงยูวี และช่วยลดอัตราการตายของตัวอ่อนเนื่องจากเวลาที่ตัวอ่อนจะอยู่ภายนอกลดน้อยลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved