

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. หลักการและเหตุผล	1
1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3. ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	5
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	
2.1. สอร์โอมโปรเจสเทอโรน	6
2.2. ลักษณะทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในโคนม	8
2.3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์	12
2.4. โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)	27
2.5. เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซซ	28
(Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA)	
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1. อุปกรณ์การทดลอง	
3.1.1. สารเคมี	31
3.1.2. อุปกรณ์และเครื่องมือ	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2. สัตว์ทดลอง	34
3.3. การเก็บตัวอย่างน้ำนม	34
3.4. การเก็บข้อมูล	34
3.5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	34
3.6. ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	
3.5.1. การเตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน	37
3.5.2. การวัดระดับแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	38
3.5.3. การผลิตไฮบริโดมา (Hybridoma)	40
3.7. การแยกโคลนเดี่ยวด้วยวิธี Limiting dilution	44
3.8. การตกตะกอนโปรตีน	44
3.9. การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	47
3.10. การหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	49
3.11. การหากราฟมาตรฐาน	49
3.12. การวัด Cross reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	51
3.13. การตรวจปริมาณโปรเจสเตอโรนในน้ำนมด้วยวิธี Competitive ELISA	52
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1. ผลการกระตุ้นสัตว์ทดลองและการผลิตไฮบริโดมา	54
4.2. ผลการตรวจสอบ Isotype ของแอนติบอดี	56
4.3. การสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	57
4.4. การวัดปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	58
4.5. การหา Inter และ Intra coefficient assay	59
4.6. การตรวจปริมาณโปรเจสเตอโรนในน้ำนมด้วยวิธี Competitive ELISA	62

สารบัญ (ต่อ)

4.7. ผลของการทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอดเปรียบเทียบ ระหว่างโคนมลูกผสมและพันธุ์แท้ฟริเซียนในฤดูร้อนและหนาว	63
4.8. ผลของปริมาณโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดเปรียบเทียบ ระหว่างโคนมลูกผสมและพันธุ์แท้ฟริเซียนในฤดูร้อนและหนาว	64
4.9. ผลของคลีนฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด (Progesterone profile) เปรียบเทียบระหว่างโคนมลูกผสมและพันธุ์แท้ฟริเซียน ในฤดูร้อนและหนาว	65
4.10. ผลของแอมพลิจูด (Amplitude) ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด เปรียบเทียบระหว่างโคนมลูกผสมและพันธุ์แท้ฟริเซียนในฤดูร้อนและหนาว	66
4.11. ผลของอัตราการตั้งท้องเปรียบเทียบระหว่างโคนมลูกผสม และพันธุ์แท้ฟริเซียนในฤดูร้อนและหนาว	67
4.12. ผลของปริมาณการผลิตน้ำนม 100 วันแรกหลังคลอดต่อปริมาณฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน 100 วันแรกหลังคลอด	68
4.13. ผลของปริมาณการผลิตน้ำนม 100 วันแรกหลังคลอดต่อปริมาณ โปรเจสเตอโรนต่อวันที่รีงไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด	69
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	70
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	77
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก ก.	89
ภาคผนวก ข.	93
ประวัติผู้เขียน	95

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2-1. แสดงระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะเทียบระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน	15
2-2. แสดงความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายใน follicular fluid และภายใน พลาสมาที่ภายใต้อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ	17
2-3. แสดงความชื้นสัมพัทธ์ (Temperature Humidity Index, THI) ที่มีต่อ Day to first estrus, Duration of first estrus และ Duration of estrus on AI	19
2-4. แสดงถึงความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลต่ออัตราการผสมติด (conception rate) และอัตราการตั้งท้อง (pregnancy rate) ในโคนม	20
2-5. แสดงความชื้นสัมพัทธ์ที่มีผลกลูโคสในพลาสมา	22
2-6. Serum progesterone concentrations in lactating and nonlactating cows during continuous infusion of progesterone at 3 to 5 after feeding	26
3-1. แสดงขั้นตอนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ Progesterone-3CMO-BSA ในหนูขาว สายพันธุ์ BALB/c	37
4-1. แสดงผลของการเชื่อมกันระหว่าง Myeloma cells กับ Spleenocyte จากหนูขาวสายพันธุ์ BALB/c ที่ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อต้าน Progesterone-3CMO-BSA	55
4-2. แสดงค่า Optical density (OD) จากการตรวจสอบ Isotype แอนติบอดีจากไฮบริโดมา โคลน 4B2 ที่ทำปฏิกิริยากับ Progesterone - 3CMO-BSA และ BSA	57
4-3. แสดงค่า % Cross reactivity ของแอนติบอดีจากไฮบริโดมาโคลน 4B2 ต่อสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
4-4. การทำงานของรังไข่ครั้งแรกหลังคลอด (Day to first postpartum ovarian activity) ระหว่างฤดูร้อนและฤดูหนาว	63
4-5. ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด เปรียบเทียบระหว่าง ฤดูร้อนและฤดูหนาว	64
4-6. คลื่นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอด (Progesterone profile) เปรียบเทียบระหว่างฤดูร้อนและฤดูหนาว	65
4-7. แอมพลิจูดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 100 วันหลังคลอดเปรียบเทียบ ระหว่างฤดูร้อนและฤดูหนาว	66
4-8. จำนวนครั้งในการผสมเทียมต่อการผสมติระหว่างฤดูร้อนและหนาว	67
4.9. ปริมาณการผลิตน้ำนม 100 วันแรกหลังคลอดต่อปริมาณโปรเจสเตอโรน 100 วันแรกหลังคลอด	68
4.10. ปริมาณการผลิตน้ำนม 100 วันแรกหลังคลอดต่อปริมาณโปรเจสเตอโรน ต่อวันที่รังไข่ทำงานครั้งแรกหลังคลอด ภาคผนวก ก.	69
1. แสดงค่า Optical density ของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนของไฮบริโดมา	89
2. แสดงค่า Optical density ของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากหลุมที่มีโคลนเดี่ยวภายหลัง การทำ Limiting dilution.	91

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2-1. โครงสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	6
2-2. ขั้นตอนการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	7
2-3. ผลของความเครียดที่เกิดจากความร้อนที่มีต่อการทำงานของรังไข่	13
2-4. แสดงขนาดของ corpus luteum เปรียบเทียบระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน	14
2-5. แสดงระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะลูทีลระหว่างฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน	15
2-6. แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อขนาดหรือพื้นที่ของ corpus luteum และแสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในจิร์ม	18
2-7. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของโคนมที่ตกไข่และวันหลังคลอดที่แปรผันตามความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมาที่สูงและต่ำ	21
2-8. ค่าเฉลี่ย (Mean \pm S.E.) ของระดับโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคนมที่ให้ผลผลิตสูงและต่ำ	24
2-9. แสดงการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	28
2-10. แสดงวิธี Competitive ELISA	30
3-1. การตรวจหาแอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี Indirect ELISA	39
3-2. ขั้นตอนการเชื่อมเซลล์ในการผลิตไฮบริโดมาต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน	43
3-3. แสดงขั้นตอนการทำโมโนโคลนอลให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี (protein G column)	46
3-4. แสดงขั้นตอนการตรวจ Isotype แอนติบอดีต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธี ELISA	48
3-5. แสดงวิธีการหากราฟมาตรฐานด้วยวิธี Competitive ELISA	50
3-6. แสดงวิธีการตรวจหาปริมาณโปรเจสเตอโรนในน้ำนมด้วยวิธี competitive ELISA	53
4-1. แสดงค่า Optical density จากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 3 ตัว ด้วย Progesterone-3CMO-BSA	55
4-2. แสดงโคลนของไฮบริโดมาของหนู BALB/c ต่อ Progesterone-3CMO-BSA	56
4-3. แสดงเส้นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากปฏิกิริยา Competitive ELISA	58
4-4. แสดงระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของโคนมแต่ละตัว	60

อักษรย่อและสัญลักษณ์

มล.	มิลลิลิตร
มก.	มิลลิกรัม
%	เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
BSA	Bovine Serum Albumin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Progesterone-3-CMO-BSA	Progesterone-3-(O-carboxymethyl)-oxime-BSA
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GnRH	Gonadotrophin Releasing Hormone
LH	Luteinizing Hormone
IMDM	Iscove 's Modified Dulbecco 's Medium
OD	Optical Density
OPD	Othro – phenylenediamine acetate
PBS	Radioimmunoassay
HRP	Horseradish peroxidase
mg	milligram
µg	microgram
µl	microliter
ml	milliliter
nm	nanometer
pg	picogram
RIA	Radioimmunoassay

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved