

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** ผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้านแอนติเจนจากโคฟรีเซียนเพศผู้กับ  
ปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อสเปิร์ม โคขาวลำพูน

**ผู้เขียน** นางสาวกรองสุรางค์ คำรงค์ศรี

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สัตวศาสตร์

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

รศ.เพทาย พงษ์เพ็ญจันทร์

ประธานกรรมการ

ผศ.ดร.ศุภมิตร เมฆฉาย

กรรมการ

### บทคัดย่อ

การเลี้ยงโคขาวลำพูนเหตุผลหลักเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ดังนั้นการเพิ่มจำนวนโคเพศเมียจึงเป็นการเพิ่มแม่พันธุ์สำหรับการผลิตจำนวนลูกโคเพิ่มขึ้น เพื่อขยายจำนวนประชากร การใช้เทคนิคปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic reaction) เป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มโอกาสที่จะได้ลูกโคเพศเมียมากขึ้น ซึ่งเป็นการทำงานของแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายร่วมกับโปรตีนคอมพลีเมนต์ทำให้เกิดการทำลายเซลล์อย่างจำเพาะเจาะจง ดังนั้นจึงได้ทำการเพิ่มการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายที่ได้มาจากการกระตุ้นด้วยสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคฟรีเซียนนำมาประยุกต์ใช้กับสเปิร์มของโคขาวลำพูน วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อประเมินผลความเป็นพิษของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสเปิร์มโคขาวลำพูนที่สร้างจากแอนติเจนของโคฟรีเซียน ทำการทดลองโดยเพิ่มการผลิตแอนติบอดีของโคลนหมายเลข 1F9-3B10 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน จี (Immunoglobulin G, IgG) โดยใช้ column Hi Trap™ Protein G และขยายแอนติบอดีได้ 0.36 มก./มล. เป็นจำนวน 7 มล. หลังจากนั้นนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาตรวจสอบความจำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคขาวลำพูนด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy ใช้เม็ดเลือดขาวเพศผู้ 4 ตัวและเพศเมีย 4 ตัว มาบ่มร่วมกับแอนติบอดีแล้วเติม Fluorescein isothiocyanate (FITC) goat anti-mouse IgG นำไปดูความจำเพาะต่อเพศผู้ (เรืองแสง) พบว่ามีความจำเพาะเป็น  $80.91 \pm 2.99\%$  ( $n=4$ ) และ  $2.56 \pm 0.18\%$  ( $n=4$ ) ( $p < 0.05$ ) ตามลำดับ หลังจากนั้นหาอัตราส่วนคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมโดยนำคอมพลีเมนต์ที่เจือจาง 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 และ 1:60 มาบ่มร่วมกับสเปิร์มแล้ววัดอัตรา

การรอดชีวิตของสเปิร์ม พบว่าที่คอมพลิเมนต์ 1:50 มีอัตราการเหมาะสมต่อการทำงานของปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์โดยนำสเปิร์มมาบ่มกับคอมพลิเมนต์ 1:50 จากนั้นเติมแอนติบอดีที่เจือจาง 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 แล้วตรวจวัดอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มในฟอโค 3 ตัว มีอัตราเหมาะสมของแอนติบอดีคือ 1:300 - 1:900 ตามลำดับ ผลการบ่มสเปิร์มร่วมกับคอมพลิเมนต์ 1:50 แล้วเติมแอนติบอดีที่เจือจาง 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 แล้วเติม FITC goat anti-mouse IgG ดูการเรืองแสงพบว่าโคทั้ง 3 ตัว มีระดับแอนติบอดีที่เหมาะสมคือ 1:900 ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) BOVM97 และ PLP ยืนยันผลการลดลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย โดยกลุ่มคัดเพศมีปริมาณยีน BOVM97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 5-6 เท่า และปริมาณยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 4-6 เท่า สรุปได้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สร้างจากแอนติเจนของโคฟรีเซียนสามารถนำมาใช้ในปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อสเปิร์มของโคขาวลำพูนได้และทำให้สเปิร์มที่มีโครโมโซมวายลดลงจาก 50 % เหลือ 12-34 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**Thesis Title** Effects of Monoclonal Antibody Against Friesian Male Cattle Antigen on Cytotoxic Reaction of White Lamphun Cattle Sperm

**Author** Miss Krongsurang Dumrongsri

**Degree** Master of Science (Agriculture) Animal Science

**Thesis Advisory Committee**

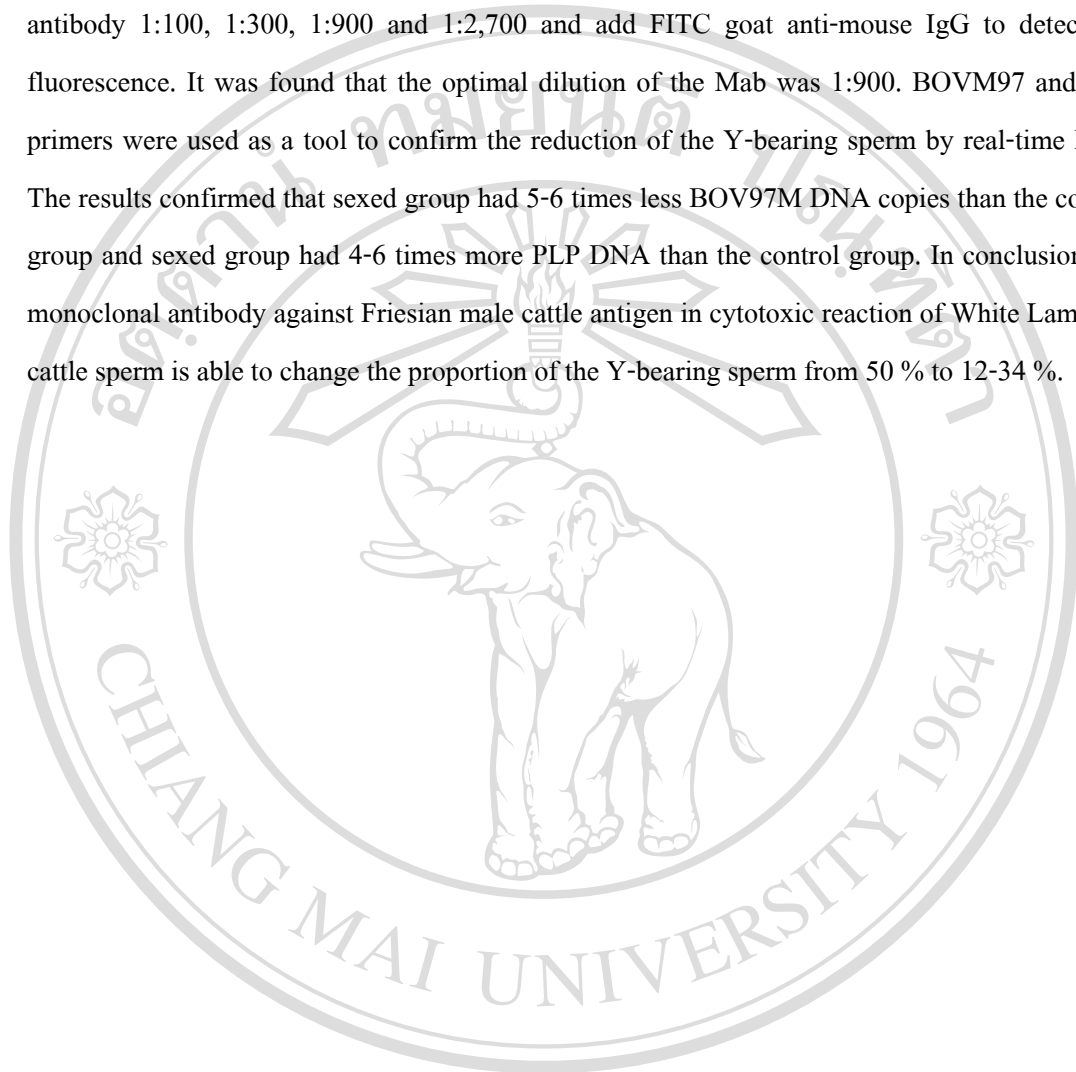
Assoc. Prof. Petai Pongpiachan Chairperson

Asst. Prof. Supamit Mekchay Member

**Abstract**

The main reasons for raising White Lamphun cattle are to conserve and utilize. Increasing the number of female cattle is the way to increase heifers for producing the calve. Cytotoxic reaction is the technology that enhance the opportunity to get female calve that work by Y- bearing sperm antibodies and complement for the specific cell lysis. The monoclonal antibodies (Mab) against the Y- bearing sperm from Friesian cattle antigen was produced against White Lamphun cattle sperm. The objective of this research was to evaluate the cytotoxic reaction of monoclonal antibodies against Friesian antigen on White Lamphun sperm. The antibodies from the 1F9-3B10 hybridoma clone were scaled up and purified by column Hi Trap™ Protein G. The antibodies were produced 0.36 mg/ml (7 ml). After that, the ability of the antibody to specifically bind to the male antigen was analysed by Immunofluorescence microscopy method, 4 males and 4 females White Lamphun lymphocytes were incubated with the antibody and Fluorescein isothiocyanate (FITC) goat anti-mouse IgG before detecting male specification (fluorescence). Results revealed the fluorescence of the male and female lymphocytes were  $80.91 \pm 2.99 \%$  (n=4) and  $2.56 \pm 0.18 \%$  (n=4) ( $p < 0.05$ ), respectively. The optimal dilution of the complement was investigated by incubating of the diluted complement 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 and 1:60 with sperms and the live sperm was observed. It was found that the optimal dilution of the complement was 1:50. Cytotoxic reactions were done by incubating sperm from 3 bulls, complement 1:50 and diluted antibody 1:100, 1:300, 1:900 and 1:2,700. Live sperm were counted after cytotoxic

reaction. The optimal diluted antibodies were 1:300-1:900. When the result was analysed by Immunofluorescence microscopy method that incubated sperm, complement 1:50, diluted antibody 1:100, 1:300, 1:900 and 1:2,700 and add FITC goat anti-mouse IgG to detect the fluorescence. It was found that the optimal dilution of the Mab was 1:900. BOVM97 and PLP primers were used as a tool to confirm the reduction of the Y-bearing sperm by real-time PCR. The results confirmed that sexed group had 5-6 times less BOVM97M DNA copies than the control group and sexed group had 4-6 times more PLP DNA than the control group. In conclusion, the monoclonal antibody against Friesian male cattle antigen in cytotoxic reaction of White Lamphun cattle sperm is able to change the proportion of the Y-bearing sperm from 50 % to 12-34 %.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved