สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 วัตถุประสงค์	3
1.2 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา	3
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 วิธีการคัดเลือกเพศ	
2.1.1 Flow cytometry	4
2.1.2 Cytotoxicity	5
2.1.3 Histocompatibility-Y antigen	10
2.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	12
2.2 น้ำเชื้อโค	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 สัตว์ทดลอง	21
3.2 สารเคมี	
3.2.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	21
3.2.2 การทำ Real-time PCR	22
3.2.3 ชุดสารเคมีสำเร็จรูป	22
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	22

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี	
3.4.1 การเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์	23
3.4.2 การวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA	23
3.4.3 การแยกโคลนเดี่ยว	24
3.4.4 การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา	24
3.4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	25
3.4.6 การตรวจสอบความแม่นยำของแอนติบอดี	25
3.5 ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ขาวลำพูน	
3.5.1 การรีดน้ำเชื้อสด	26
3.5.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับทดลองปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์	27
3.6 การทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์	
3.6.1 การหาความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสม	27
3.6.2 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับย้อม FITC goat anti-mouse IgG	28
3.6.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์ม	29
3.6.4 สัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย	30
3.7 เทคนิค Real-time PCR	32
3.8 การตรวจวิการของสเปิร์มด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope	34
3.9 การวางแผนและวิเคราะห์ทางสถิติ	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ผลการเลี้ยงเซลล์ด้วย Petridish และอุปกรณ์สำเร็จรูป	39
4.2 ผลการวัดความแม่นยำของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้	39
4.3 คุณภาพน้ำเชื้อโคขาวลำพูน	40
4.4 ผลการหาความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสม	42
4.5 ผลการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับย้อม FITC goat anti-mouse IgG	42

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 ผลปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์	43
4.7 ผลการทำ Real-time PCR	48
4.8 ผลการถ่ายรูปสเปิร์มด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope	52
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง	56
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	70
ประวัติผู้เขียน	81

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

3-1 ความเข้มข้นของแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์ในปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 38
4-1 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโค 39
4-2 คุณภาพน้ำเชื้อโคขาวลำพูน 41
4-3 ขนาดของสเปิร์มโคขาวลำพูนเทียบกับโคฟรีเชียนและโคชาร์โรเลย์ 41
4-4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของสเปิร์มโคขาวลำพูน 48
4-5 การทำ Real-time PCR ของยีน BOVM97, PLP และ Beta-actin ของโคเบอร์ 862 51
4-6 การทำ Real-time PCR ของยีน BOVM97, PLP และ Beta-actin ของโคเบอร์ 863 52
4-7 การทำ Real-time PCR ของยีน BOVM97, PLP และ Beta-actin ของโคเบอร์ RJ888 52
4-8 ความถี่และเปอร์เซ็นต์ของวิการบนผนังสเปิร์มโคขาวลำพูน 55

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

1-1 ลักษณะของโคขาวลำพูน 1
2-1 โปรตีนคอมพลีเมนต์ C1 7
2-2 ระบบคอมพลีเมนต์ 8
2-3 กระบวนการลูกโซ่โพลีมอเรส 13
2-4 การทำ Real-time PCR โดยใช้ fluorescent dye 17
2-5 การทำ Real-time PCR โดยใช้ fluorescent probe 18
2-6 องค์ประกอบของสเปิร์มโค 20
3-1 การเก็บตัวอย่างเลือดของโคขาวลำพูนบริเวณโคนหาง 26
3-2 การเก็บน้ำเชื้อพ่อโคขาวลำพูนและการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอด 27
3-3 การหาความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 28
3-4 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการย้อมสี FITCสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 29
3-5 การหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 30
3-6 การหาสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 31
3-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Beta-actin 33
3-8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BOV97M 33
3-9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PLP 34
3-10 การตรวจวิการบนผิวสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 35
3-11 ตำแหน่งบนผนังสเปิร์มโคขาวลำพูนที่เกิดวิการเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 36
3-12 ผนังสเปิร์มโคขาวลำพูนเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเครื่อง SEM 37
4-1 ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโค 40
4-2 ความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 42

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

4-3 ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 43
4-4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 44
4-5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ 862 45
4-6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ 863 45
4-7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ RJ888 46
4-8 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ 862 เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 47
4-9 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ 863 เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 47
4-10 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ 863 เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 48
4-11 กราฟมาตรฐานยีน BOVM97 50
4-12 กราฟมาตรฐานยีน Beta-actin 50
4-13 กราฟมาตรฐานยีน PLP 51
4-14 สเปิร์มในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อสเปิร์มภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 4,300 เท่า 53
4-15 การเกิดวิการบนผนังสเปิร์มของโคเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ 54

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	เปอร์เซ็นต์
มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
มคล.	ไมโครลิตร
Ab	Antibody
Ag	Antigen
H-Y	Histocompatibility-Y antigen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffer saline
FITC	Fluorescein conjugated
IgG	Immunoglobulin G
MAb	Monoclonal antibody
nm	nanometer
O.D.	optical density

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved