

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	๗
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.2 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษา	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	
2.1. วงรอบการเป็นสัดของโคนม (Estrus cycle)	3
2.2. ฮอร์โมนควบคุมการเป็นสัดของโคนม	4
2.3. ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดในโคนม	6
2.4. การตรวจสัดและการผสมติด	9
2.5. การวัดระดับ E ₂	11
2.6. เทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนทแอสเซ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)	13
2.7. แอนติบอดี (Antibodies)	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	
3.1 อุปกรณ์การทดลอง	
3.1.1 สารเคมี	18
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ	19
3.1.3 สัตว์ทดลอง	20

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำนม	20
3.3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ E ₂	
3.3.1 การเตรียมแอนติเจนและการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	20
3.3.2 การวัดระดับแอนติบอดีต่อ E ₂ ด้วยวิธี indirect ELISA	21
3.3.3 เตรียมเซลล์ไมอิโลมา	23
3.3.4 เตรียมเซลล์ม้ามหนูขาวตัวเล็ก	23
3.3.5 การเตรียม feeder cell	23
3.3.6 การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามหนูและเซลล์ไมอิโลมา	23
3.3.7 การคัดเลือกโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E ₂	24
3.4.8 การแยกโคลนเดี่ยว	25
3.4.9 การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	26
3.4.10 การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์	26
3.4.11 การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์	28
3.4.12 การหาค่าปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของแอนติบอดี	29
3.5 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในการทำ ELISA เพื่อวัดปริมาณ E ₂ ในน้ำนมโค	
3.5.1 การหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ MAbE ₂ และ E ₂ -HRP โดยวิธี ELISA	29
3.5.2 การหากราฟมาตรฐาน	30
3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ E ₂ ในน้ำนมด้วยวิธี Competitive ELISA	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1. ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู BALB/c	33
4.2. ผลการเชื่อม (fusion) เซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมา	33
4.3. ผลการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution	34
4.4. ผลการจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	36
4.5. ปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์	36

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4.6. อัตราเจือจางที่เหมาะสมของ MAbE ₂ และ E ₂ -HRP สำหรับใช้ในวิธี competitive ELISA	37
4.7. การสร้างกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนอีสตราไดออก	37
4.8. การวัดปฏิกิริยา Cross reaction ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี	38
4.9. การหา Intra coefficient assay (CV)	38
4.10. ปริมาณ E ₂ จากการวัดโดยวิธี competitive ELISA ที่เตรียมจาก โมโนโคลนอลแอนติบอดี	39
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก ก	58
ภาคผนวก ข	63
ประวัติผู้เขียน	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1. Number of cows with regular ovarian cycles, ovulation and proportions detected in estrus during various periods of continuous observation in cooler and hotter seasons	7
2-2. Intensity and duration of oestrus behavior demonstrated by Holstein cows during cooler and hotter seasons.	8
2-3. Estrus activity on dirt versus concrete surfaces	8
2-4. Follicular size, estradiol concentration, characteristics of estrus for low and high producing low	9
2-5. Relationship between sign of estrus at insemination and conception rate based on calving or known open status	10
2-6. Mean estradiol-17 β concentration (pg/ml) in milk samples	12
4-1. แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตรวจชนิดของโมนโคลอนอลแอนติบอดีต่อ E ₂	36
4-2. แสดงผลปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยวของ MAbsE ₂ โคลน 4B9 1E4 กับฮอร์โมนสเตียรอยด์ชนิดต่าง ๆ	39
4-3. แสดงจำนวนคลื่นและระดับ E ₂ ในน้ำนม (ng/ml) ในวันก่อนผสมเทียม (-1), วันผสมเทียม (0) และวันหลังผสมเทียม (+1) ของ โคกลุ่มที่ผสมติดและผสมไม่ติด	44
ภาคผนวก ก	
1. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เกิดโคลน	58
2. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่เกิดโคลนเดี่ยวหลังจากทำการ limiting dilution.	60

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1. Changes in blood plasma hormone concentrations during the bovine oestrous cycle	5
2-2. A summary of the hormonal control of the ovarian cycle	5
2-3. Synthetic pathway of some Steroid hormone	6
2-4. Concentration of estradiol-17 β in whole milk and serum in cow synchronized for Estrus	11
2-5. Milk estradiol-17 β concentration at each milking period in relation to the onset of estrus	12
2-6. แสดงกระบวนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี	17
3-1. แสดงการต่อระหว่าง 3 ทางกับกระบอกฉีดยา เพื่อ ไฮโมจิในระหว่าง adjuvant กับ แอนติเจน	21
3-2. การวัดระดับแอนติบอดีต่อ E ₂ จากซีรัมหนูและน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ด้วยวิธี indirect ELISA	22
3-3. การเชื่อมเซลล์ระหว่างเซลล์ม้ามหนู BALB/c และเซลล์ไมอีโลมา	23
3-4. การจำแนกชนิดของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA	27
3-5. ขั้นตอนการตกตะกอนแยกแอนติบอดีจากน้ำเลี้ยงเซลล์	28
3-6. แสดงการหาอัตราเจือจางที่เหมาะสมของ MA bE ₂ และ E ₂ -HRP ด้วยวิธี ELISA	30
3-7. แสดงการหากราฟมาตรฐานและการวัดระดับอีสตราไดออลในน้ำนม โดยวิธี Competitive ELISA	32
4-1. ผลการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ของหนู BALB/c 3 ตัว ที่ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วย E ₂ -6-CMO-BSA แสดงเปรียบเทียบกับ BSA	34
4-2. แสดงผลการเชื่อมรวมเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอีโลมา	35
4-3. แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ในการหาอัตราการเจือจางของ MA bE ₂ จากโคลน 4B9 1E4 กับ E ₂ -HRP ที่เหมาะสม	37
4-4. กราฟมาตรฐานฮอร์โมนอีสตราไดออล	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-5. เปรียบเทียบปริมาณ E_2 กลุ่มที่ผสมติดและผสมไม่ติดในวันที่ -1	41
4-6. เปรียบเทียบปริมาณ E_2 กลุ่มที่ผสมติดและผสมไม่ติดในวันที่ 0	41
4-7. เปรียบเทียบปริมาณ E_2 กลุ่มที่ผสมติดและผสมไม่ติดในวันที่ +1	42
4-8. แสดงคลื่น E_2 จำนวน 2 คลื่นในรอบการเป็นสัด	42
4-9. แสดงคลื่น E_2 จำนวน 3 คลื่นในรอบการเป็นสัด	43
4-10. แสดงคลื่น E_2 จำนวน 4 คลื่นในรอบการเป็นสัด	43

อักษรย่อและสัญลักษณ์

มถ.	มิลลิลิตร
%	เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
Ab	antibody
Ag	antigen
BSA	bovineserum albumin
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
E ₂	17β-Estradiol
E ₂ -6-CMO-BSA	17β-Estradiol-6-(o-carboxymethyl)-oxime-BSA
FSH	Follicle stimulating hormone
GnRH	Gonadotrophin releasing hormone
HRP	Horseradish peroxidase
LH	luteinizing hormone
MAbE ₂	Monoclonal antibody to estradiol
Mg	milligram
μg	microgram
ml	milliliter
μl	microliter
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
PAb	Polyclonal antibody
pg	picogram
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standard deviation