

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการเลี้ยงเซลล์ภายใน Petridish และ ชุดอุปกรณ์สำเร็จรูป Celine AD 1000

จากการตรวจการผลิตแอนติบอดีของเซลล์เมื่อเลี้ยงใน Petridish และชุดอุปกรณ์สำเร็จรูป Celine AD 1000 พบว่าการเลี้ยงเซลล์ใน Petridish ให้ค่า O.D. ที่ตอบสนองต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสเปิร์ม 1.67 ในขณะที่ชุดอุปกรณ์สำเร็จรูปให้ค่า O.D. ที่ตอบสนองต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสเปิร์ม 0.53

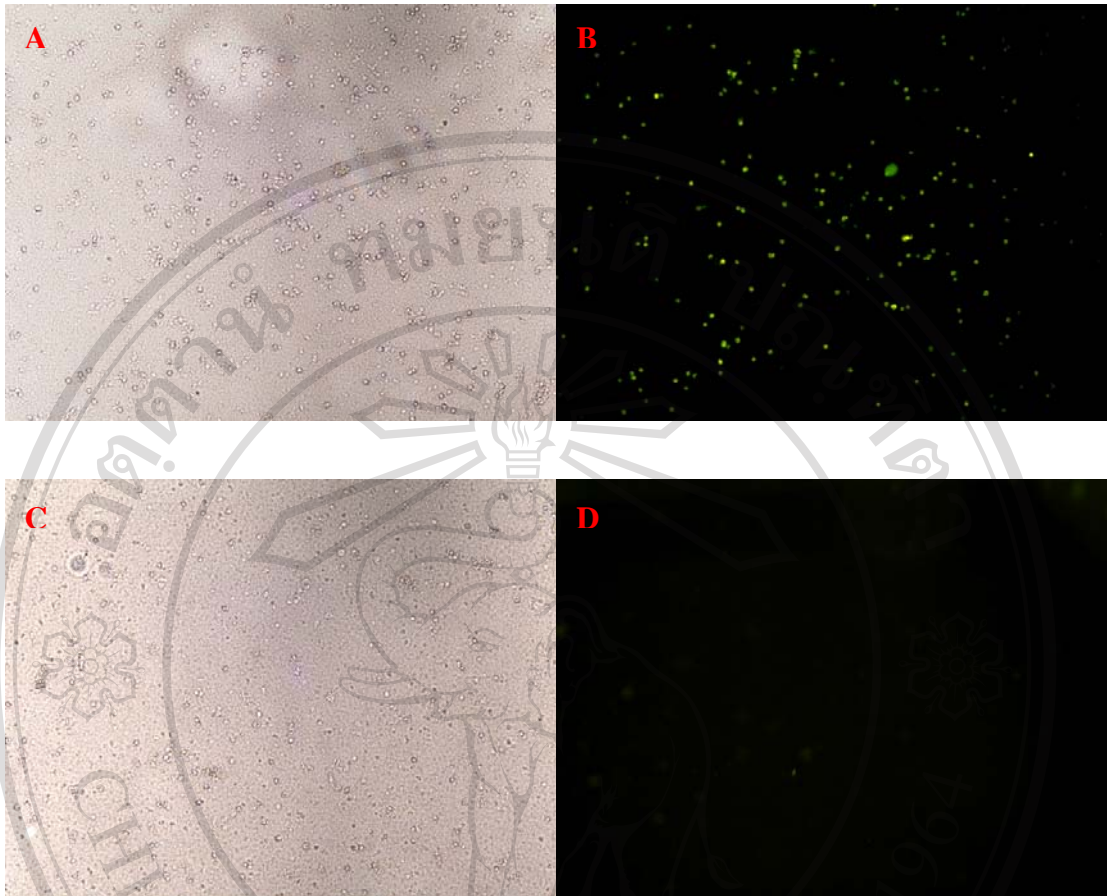
#### 4.2 ผลการวัดความแม่นยำของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

จากการตรวจวัดความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคด้วยการใช้เทคนิค Immunofluorescence microscopy พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้  $80.91 \pm 2.99$  % แสดงว่าสามารถตรวจสอบเพศผู้ได้แม่นยำ 75- 89 % และแทบไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเพศเมีย โดยมีความจำเพาะเพียง  $2.56 \pm 0.18$  % แสดงว่าตรวจสอบเพศเมียได้ 2-3 % ดังแสดงในตารางที่ 4-2 โดยดูจากการเรืองแสงภายใต้สภาพแสง UV ดังแสดงในภาพที่ 4-1

ตาราง 4-1 ความจำเพาะเจาะจงของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้และเพศเมียด้วยการใช้เทคนิค Immunofluorescence microscopy

เพศ	เปอร์เซ็นต์การเรืองแสง (%)	±SE	±SD	Max	Min
ผู้ (n=4)	80.91 <sup>a</sup>	2.99	5.98	88.89	74.8
เมีย (n=4)	2.56 <sup>b</sup>	0.18	0.36	3.03	2.17

<sup>a, b</sup> column means with different superscripts are significance ( $p < 0.05$ )



ภาพ 4-1 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพสผู้และเพสเมีย ด้วยวิธี Immunofluorescence microscopy โดย (A) คือเซลล์เม็ดเลือดขาวเพสผู้ภายใต้สภาพแสงปกติ, (B) เซลล์เม็ดเลือดขาวเพสผู้ภายใต้สภาพแสง UV, (C) เซลล์เม็ดเลือดขาวเพสเมียภายใต้สภาพแสงปกติ และ (D) เซลล์เม็ดเลือดขาวเพสเมียภายใต้สภาพ UV

#### 4.3 คุณภาพน้ำเชื้อโคขาวลำพูน

เก็บน้ำเชื้อจากพ่อโคจำนวน 3 ตัว ได้แก่เบอร์ 862, 863 และ RJ 888 ซึ่ง 2 ตัวแรกทำการเก็บได้ 2 รอบ คุณภาพของสเปิร์มก่อนการแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่า 70 % ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำเชื้อของพ่อโคทั้ง 3 ตัวมาทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ เมื่อนำน้ำเชื้อที่แช่แข็งแล้วมาละลายดูพบว่าสเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่า 35 % ซึ่งแสดงว่าสเปิร์มมีคุณภาพดีสามารถนำไปศึกษาต่อในปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

ตาราง 4-2 คุณภาพน้ำเชื้อโคขาวลำพูนที่นำมาใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

พันธุ์	เบอร์	ปริมาตร น้ำเชื้อ (มล.)	ความเข้มข้น ของสเปิร์ม (ล้านตัว/มล.)	คุณภาพ สเปิร์มสด (ก่อนแช่แข็ง)	จำนวนสเปิร์ม	จำนวนสเปิร์ม
					ที่มีชีวิต (ก่อนแช่แข็ง)	ที่มีชีวิต (หลังแช่แข็ง)
โคขาวลำพูน	862	7.0	945	+++	75 %	40 %
	863	14.2	945	+++	75 %	35 %
	RJ 888	6.5	790	++++	80 %	45 %
โคชาร์โรเลย์	B007	10.5	910	+++	75 %	30 %
	B010	14.0	1,010	+++	75 %	30 %
	B016	7.3	1,080	+++	75 %	40 %
โคฟรีเซียน	178	7.3	1,215	++++	75 %	45 %
	248	7.3	1,664	++++	75 %	40 %
	255	5.0	1,718	++++	75 %	45 %

(หมายเหตุ ++++ ดี +++ ปานกลาง ++ น้อย + น้อยมาก)

จากการถ่ายรูปสเปิร์มด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 4,300 เท่าพบว่าสเปิร์มโคขาวลำพูนมีความกว้างของสเปิร์มมากที่สุดและความยาวของสเปิร์มน้อยที่สุด ส่วนโคชาร์โรเลย์มีความกว้างของสเปิร์มน้อยที่สุดและความยาวของสเปิร์มมากที่สุด หางสเปิร์มโคขาวลำพูนจะมีลักษณะเป็นเกลียวเห็นชัดเจน ในขณะที่โคอีก 2 ชนิดไม่เห็นเป็นเกลียวชัดเจน

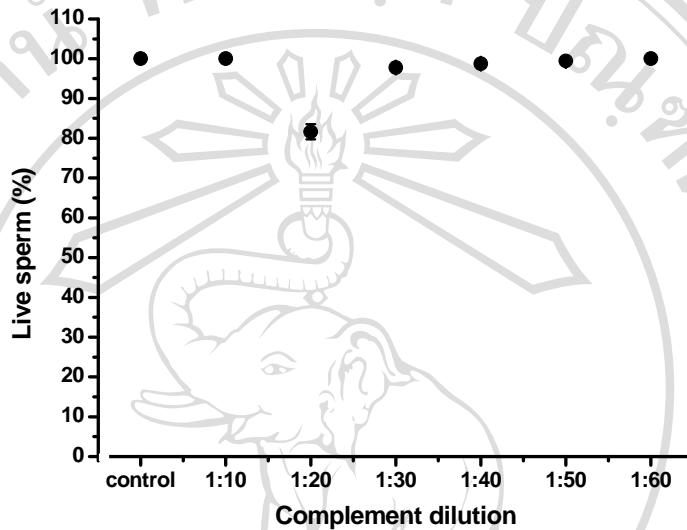
ตาราง 4-3 แสดงขนาดของสเปิร์มโคขาวลำพูนเทียบกับโคฟรีเซียนและโคชาร์โรเลย์

ชนิดวัว		max	min	mean	S.E.
โคขาวลำพูน	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	3.78	3.36	3.633 <sup>a</sup>	0.01638
	(n=20) ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	7.14	6.09	6.657 <sup>c</sup>	0.03332
โคฟรีเซียน	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	3.78	2.94	3.402 <sup>b</sup>	0.02471
	(n=20) ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	7.77	5.88	6.773 <sup>c</sup>	0.04345
โคชาร์โรเลย์	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	3.78	2.94	3.392 <sup>b</sup>	0.02741
	(n=20) ความยาว ( $\mu\text{m}$ )	7.56	6.09	6.804 <sup>c</sup>	0.03866

<sup>a, b, c</sup> column means with different superscripts are significance ( $p < 0.01$ )

#### 4.4 ผลการหาความเข้มข้นของคอมพลิเมนต์ที่เหมาะสม

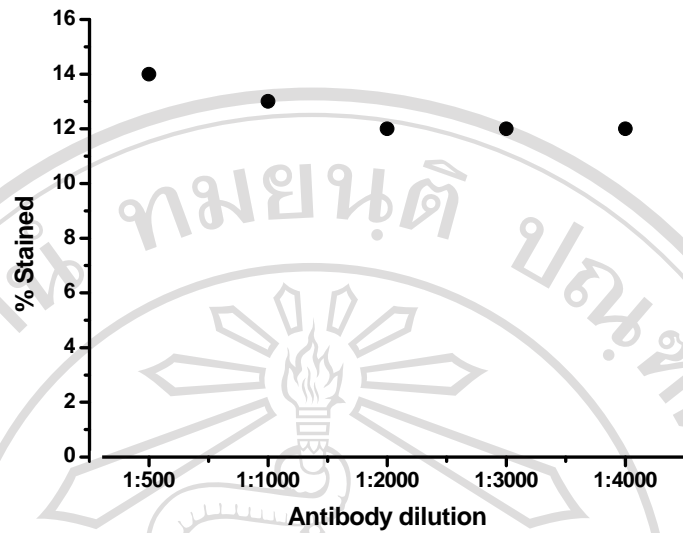
พบว่าที่ระดับคอมพลิเมนต์ 1:50 เป็นระดับที่เหมาะสมโดยมีจำนวนสเปิร์มที่รอดชีวิตใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม คือมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเท่ากับ 99.42 %



ภาพ 4-2 ผลการหาความเข้มข้นของคอมพลิเมนต์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

#### 4.5 ผลการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการย้อมสี FITC goat anti-mouse IgG

ระดับที่เหมาะสมของแอนติบอดีที่สามารถเห็นสเปิร์มมีการเรืองแสงได้อย่างชัดเจนและไม่มีการลดลงของการติดสีคือ 1:500

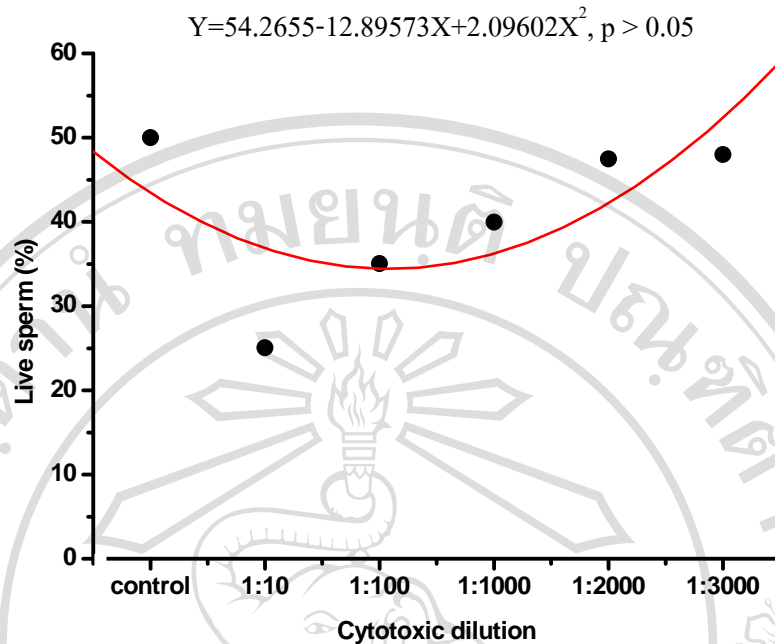


ภาพ 4-3 ผลการหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

#### 4.6 ผลปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

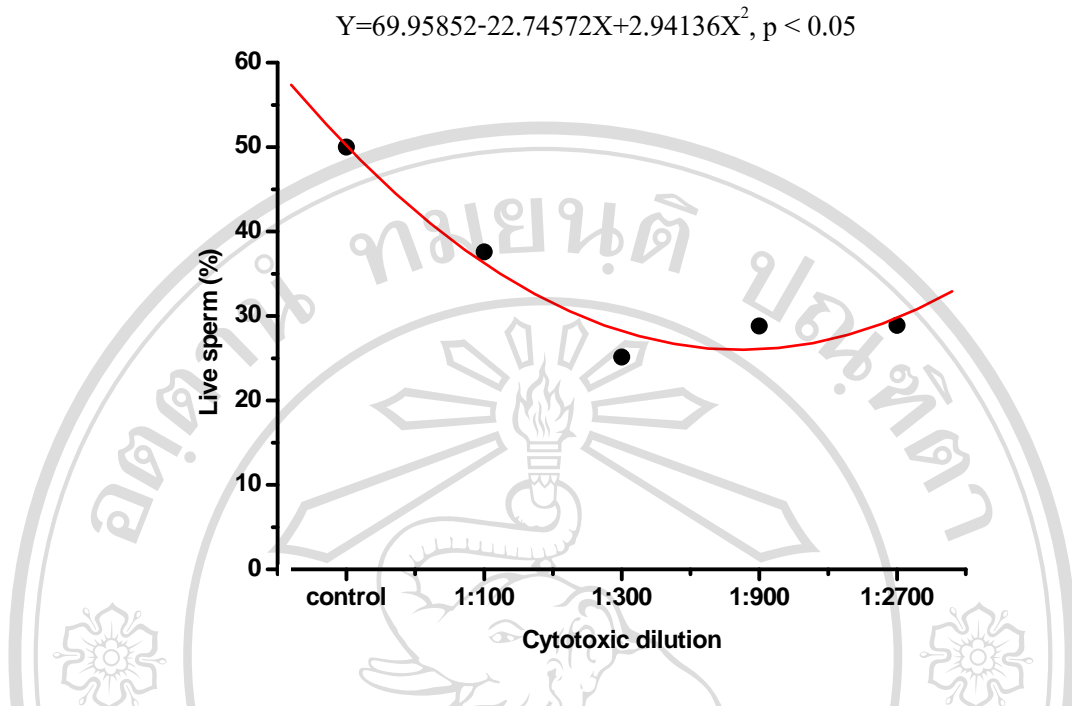
##### 4.6.1 เปอร์เซนต์การรอดของสเปิร์ม

ผลการทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าการใช้แอนติบอดีที่ระดับ 1:100 และ 1:1,000 ร่วมกับคอมพลิเมนต์ที่ระดับ 1:50 เป็นช่วงที่มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเท่ากับ 35.06 และ 39.95 %

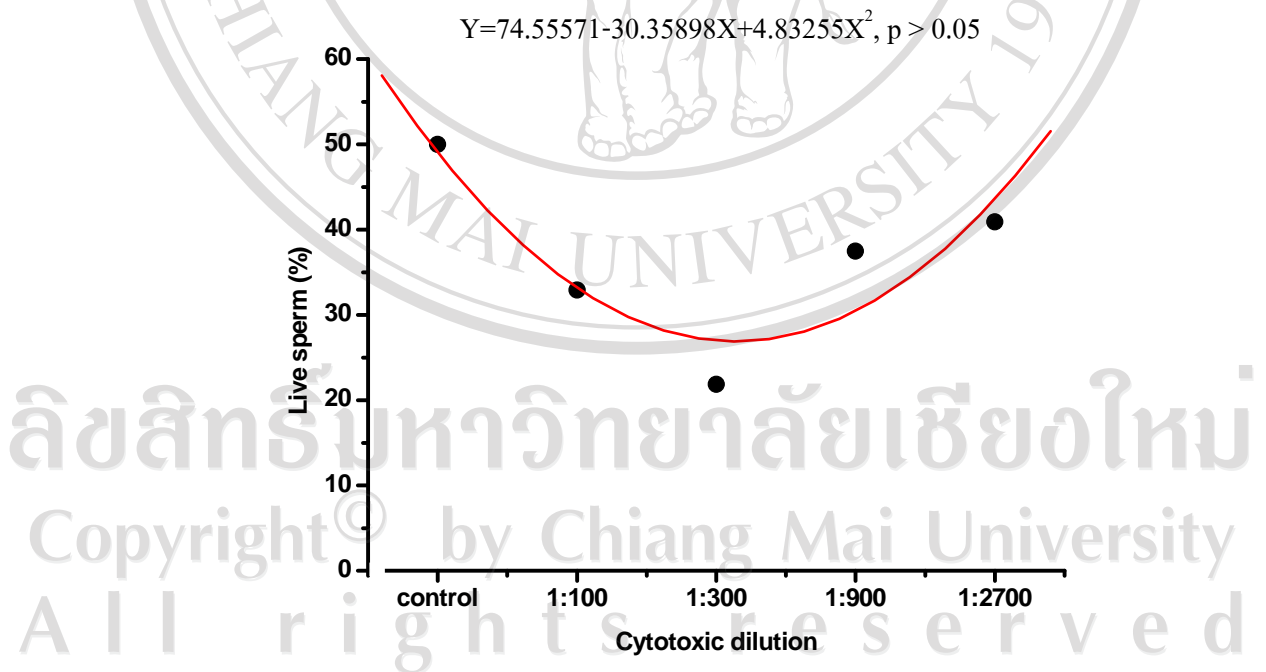


ภาพ 4-4 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

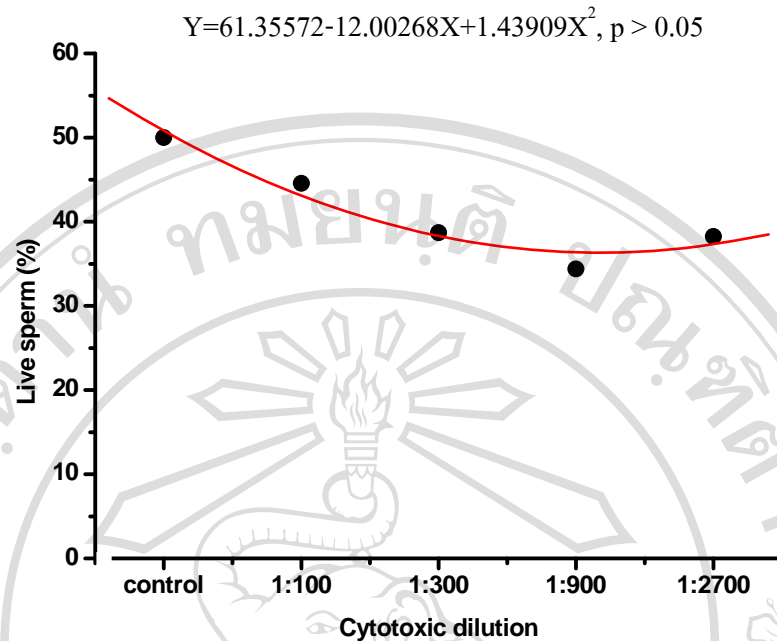
เมื่อทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงแอนติบอดีที่ระดับ 1:100 ถึง 1:2,700 พบว่าในโคเบอร์ 862 และ 863 มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่เหมาะสมที่ระดับแอนติบอดี 1:300 โดยมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 25.11 และ 21.87 % ตามลำดับ ส่วนโคเบอร์ RJ 888 มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่เหมาะสมที่ระดับแอนติบอดี 1:900 โดยมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 34.38 %



ภาพ 4-5 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอริ์ 862



ภาพ 4-6 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอริ์ 863

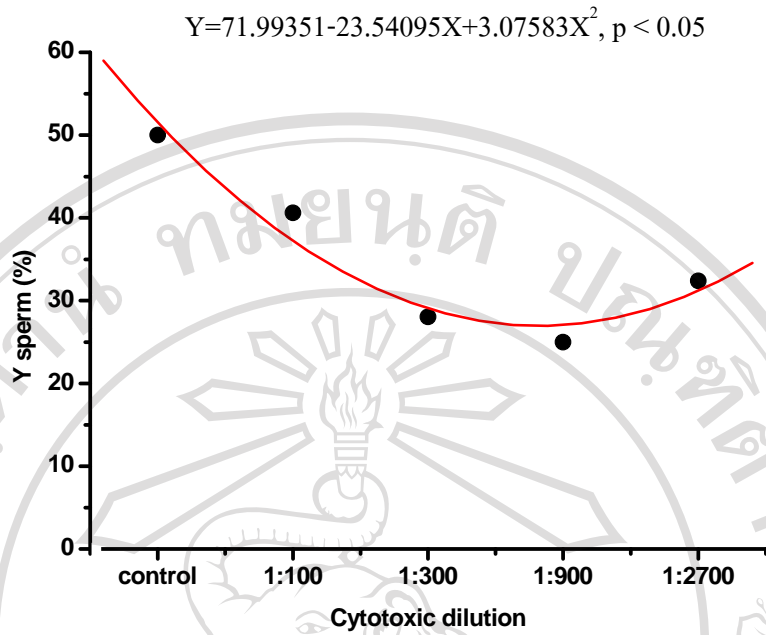


ภาพ 4-7 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ของโคเบอร์ RJ888

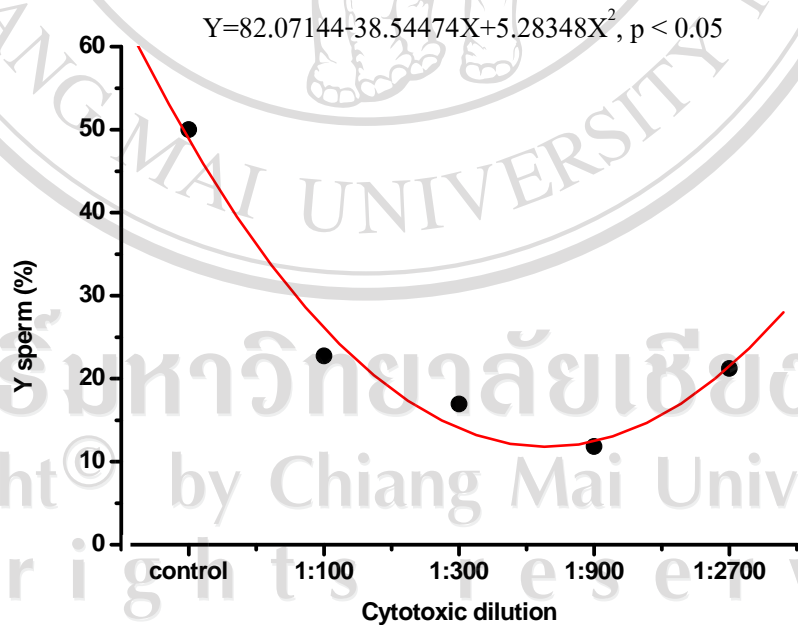
#### 4.6.2 ผลการลดลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายเนื่องจากปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ในช่วงแอนติบอดีที่ระดับ 1:100 ถึง 1:2,700 พบว่าในโคเบอร์ 862, 863 และ RJ 888 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายมากที่สุดที่ระดับแอนติบอดี 1:900 โดยมีสเปิร์มลดลงจาก 50 % เป็น 24.99, 11.84 และ 34.11 % ตามลำดับ โดยโคเบอร์ 862 และ 863 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

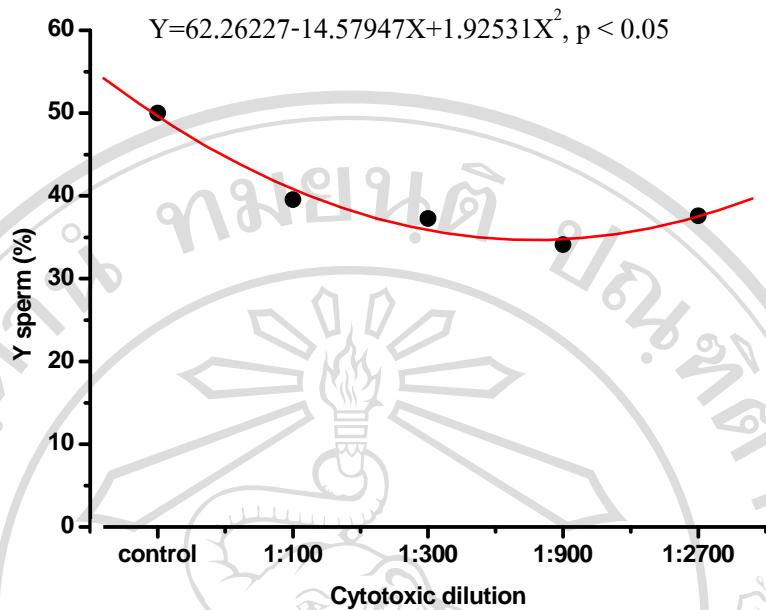




ภาพ 4-8 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ 862 เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์



ภาพ 4-9 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ 863 เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์



ภาพ 4-10 การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ RJ888 เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

ตาราง 4-4 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของสเปิร์มโคบาลำพูน

โคเบอร์	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์ม (%)	เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย (%)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (%)	เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (%)
862 (n=5)	25.11±2.72	24.99±0.56	24.89	25.01
863 (n=5)	21.87±3.45	11.84±0.47	28.13	38.16
RJ888 (n=5)	34.38±1.23	34.11±2.12	15.62	15.89

#### 4.7 ผลการทำ Real-time PCR

เมื่อทำ Real-time PCR ปริมาณยีน BOVM97 (จำเพาะต่อโครโมโซมวาย) ในโคเบอร์ 863 และ RJ888 เมื่อใช้ระดับแอนติบอดี 1:900 มีปริมาณยีนน้อยที่สุด (จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยามากที่สุด) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีปริมาณยีน BOVM97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 5 และ 5 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่เบอร์ 862 เมื่อใช้แอนติบอดี 1:300 จะมีปริมาณยีนน้อยที่สุด โดยมีปริมาณยีน

BOVM97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 6 เท่า ปริมาณยีน PLP (จำเพาะต่อโครโมโซมเอ็กซ์)โคเบอร์ 863 และ RJ888 เมื่อใช้ระดับแอนติบอดี 1:900 มีปริมาณยีนมากที่สุด (จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาน้อยที่สุด) โดยมีปริมาณยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 4 และ 5 เท่าตามลำดับ ในขณะที่เบอร์ 862 เมื่อใช้แอนติบอดี 1:300 จะมีปริมาณยีนมากที่สุด โดยมีปริมาณยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 6 เท่า และ Beta-actin ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกในทั้งโครโมโซมเอ็กซ์และวายมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ทุกกลุ่มทดลองในโคทั้ง 3 เบอร์แสดงว่าปริมาณดีเอ็นเอที่เข้าทำปฏิกิริยาใกล้เคียงกัน และปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อสเปิร์มสามารถลดสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายได้จริง

กราฟมาตรฐานของ Plasma DNA BOVM97 PLP และ Beta-actin ในโค  
ยีน BOVM97

$$Y = A + B1 * X$$

$$Y = \text{ปริมาณดีเอ็นเอ}, X = \text{ค่า CT cycle}, R^2 = 0.99202$$

Parameter	Value	Error
A	10.78708	0.18885
B1	-0.21325	0.00676

ยีน PLP

$$Y = A + B1 * X$$

$$Y = \text{ปริมาณดีเอ็นเอ}, X = \text{ค่า CT cycle}, R^2 = 0.99202$$

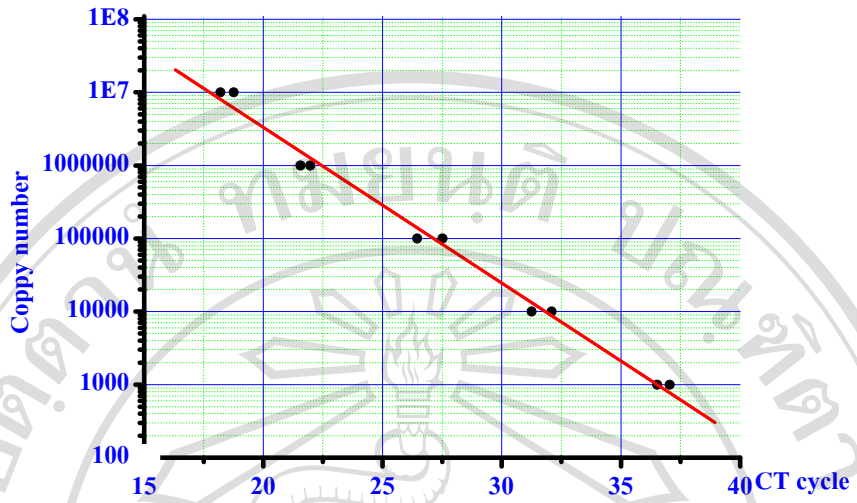
Parameter	Value	Error
A	2.04	0.211
B1	-0.0008396	0.00013

ยีน Beta-actin

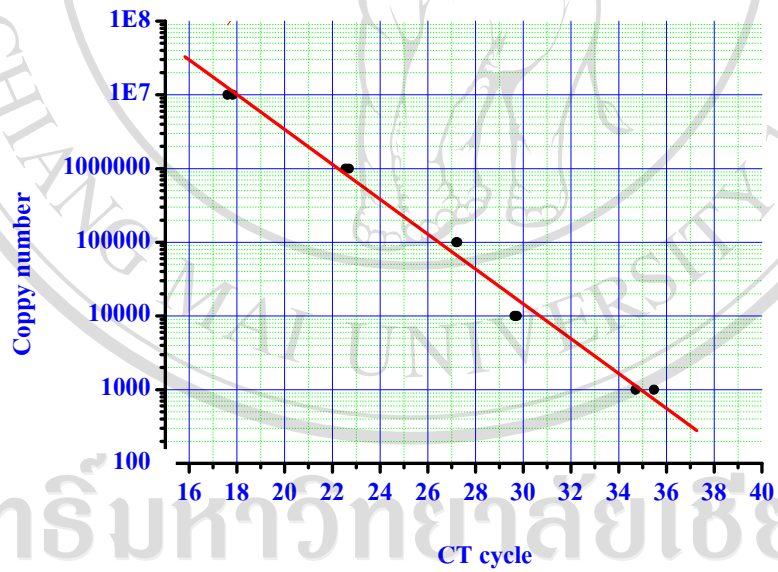
$$Y = A + B1 * X$$

$$Y = \text{ปริมาณดีเอ็นเอ}, X = \text{ค่า CT cycle}, R^2 = 0.99202$$

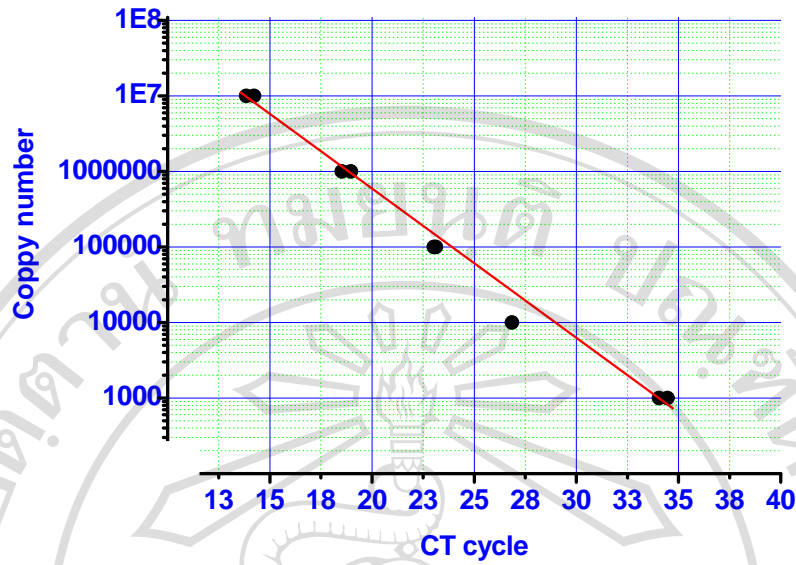
Parameter	Value	Error
A	11.25981	0.24248
B1	-0.23653	0.00894



ภาพ 4-11 แสดงกราฟมาตรฐานยีน BOVM97 จาก Plasmid DNA



ภาพ 4-12 แสดงกราฟมาตรฐานยีน Beta-actin จาก Plasmid DNA



ภาพ 4-13 แสดงกราฟมาตรฐานยีน PLP จาก Plasmid DNA

ตาราง 4-5 แสดงค่า CT จากการทำ Real-time PCR ของยีน BOVM97, PLP และ Beta-actin ของโคเปอร์ 862

Cytotoxic dilution	ยีน BOVM97 (จำนวนรอบ, CT)	ยีน PLP (จำนวนรอบ, CT)	ยีน Beta-actin (จำนวนรอบ, CT)	(ยีน BOVM97) – (ยีน Beta-actin) (จำนวนรอบ, CT)	(ยีน PLP) – (ยีน Beta-actin) (จำนวนรอบ, CT)
0	31.33	23.39	25.88	5.45	-2.49
1:100	32.32	22.29	26.47	5.85	-4.18
1:300	35.01	21.13	26.61	8.40	-5.48
1:900	33.08	22.22	25.95	7.13	-3.73
1:2700	32.90	22.52	26.20	6.70	-3.68

ตาราง 4-6 แสดงค่า CT จากการทำ Real-time PCR ของยีน BOVM97, PLP และ Beta-actin ของโคเบอร์ 863

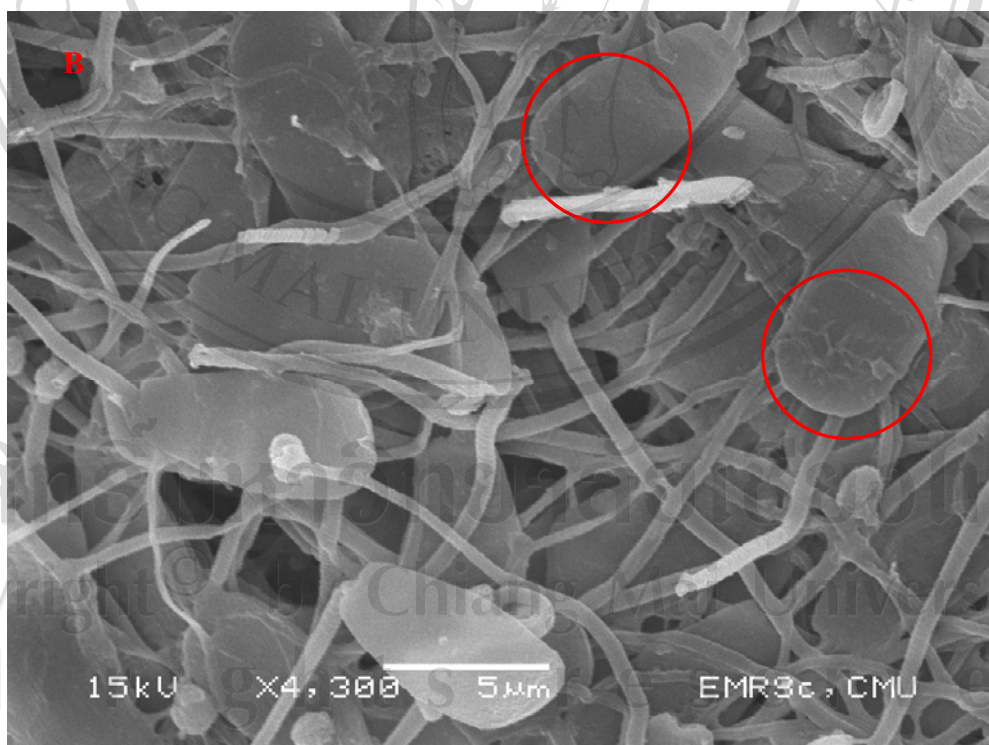
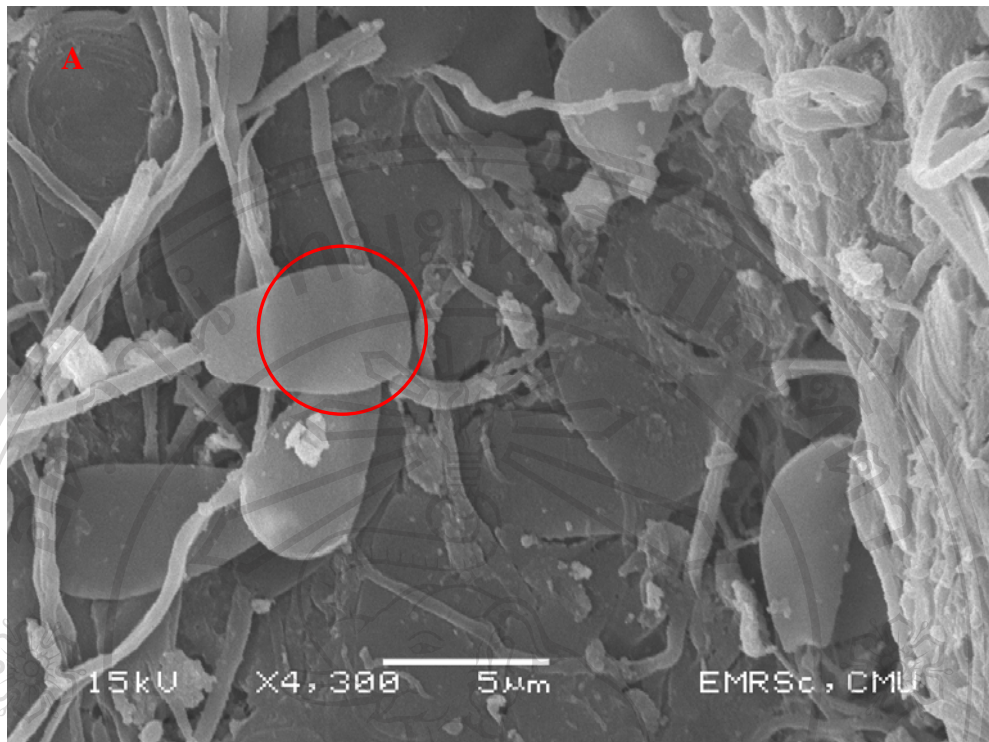
Cytotoxic dilution	ยีน BOVM97 (จำนวนรอบ, CT)	ยีน PLP (จำนวนรอบ, CT)	ยีน Beta-actin (จำนวนรอบ, CT)	(ยีน BOVM97) – (ยีน Beta-actin) (จำนวนรอบ, CT)	(ยีน PLP) – (ยีน Beta-actin) (จำนวนรอบ, CT)
0	28.57	26.14	25.52	3.05	0.62
1:100	28.98	25.46	25.38	3.60	0.08
1:300	30.35	25.01	25.30	5.05	-0.29
1:900	31.58	24.20	25.68	5.90	-1.48
1:2700	30.94	25.28	25.34	5.60	-0.06

ตาราง 4-7 แสดงค่า CT จากการทำ Real-time PCR ของยีน BOVM97, PLP และ Beta-actin ของโคเบอร์ RJ888

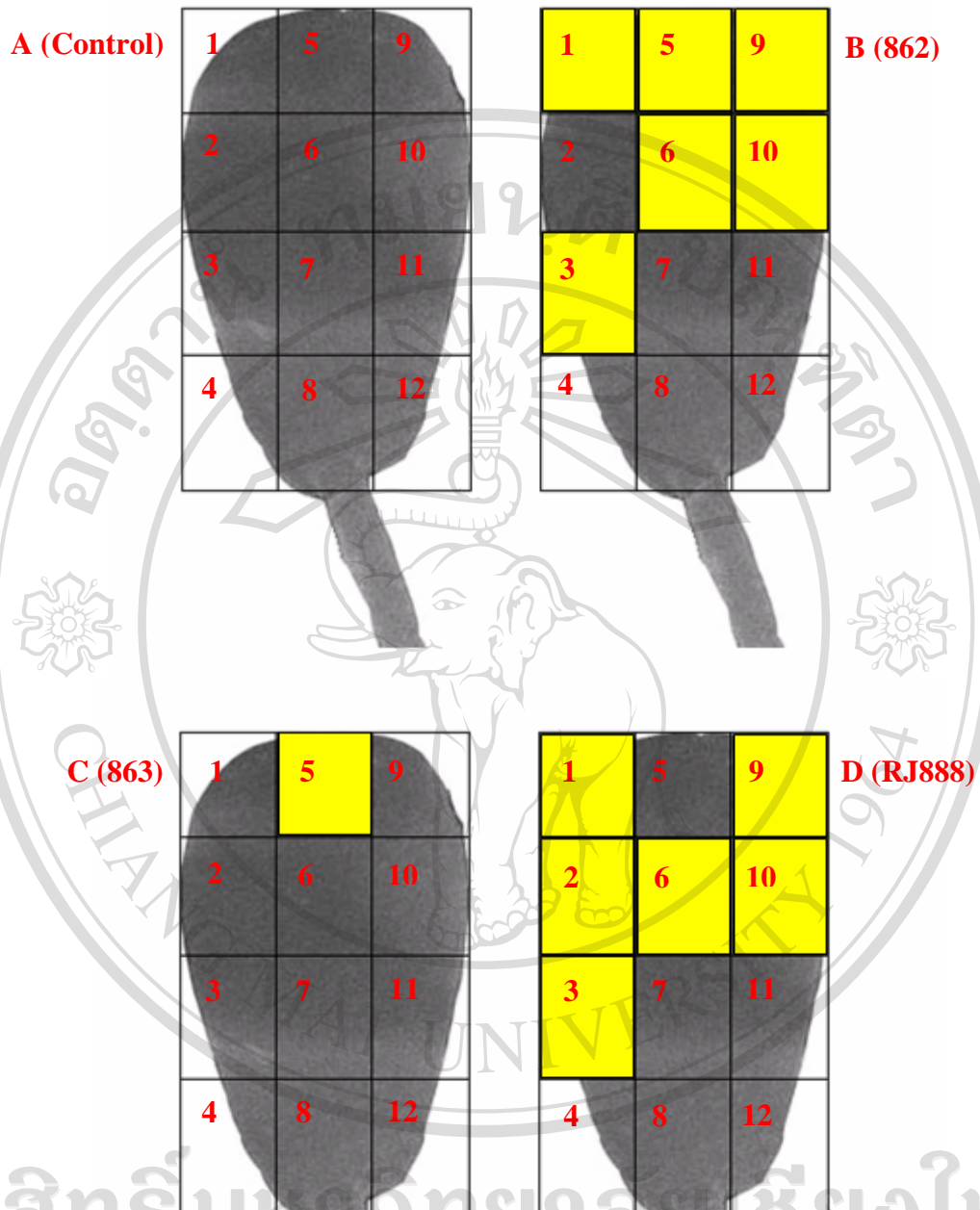
Cytotoxic dilution	ยีน BOVM97 (จำนวนรอบ, CT)	ยีน PLP (จำนวนรอบ, CT)	ยีน Beta-actin (จำนวนรอบ, CT)	(ยีน BOVM97) – (ยีน Beta-actin) (จำนวนรอบ, CT)	(ยีน PLP) – (ยีน Beta-actin) (จำนวนรอบ, CT)
0	27.03	26.01	25.50	1.53	0.51
1:100	28.49	25.42	26.19	2.30	-0.77
1:300	30.28	25.36	26.29	3.99	-0.93
1:900	31.30	24.55	26.91	4.39	-2.36
1:2700	29.33	26.04	26.20	3.13	-0.16

#### 4.8 ผลการถ่ายภาพสเปิร์มด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM)

เมื่อดูการเกิดวิการบนผิวสเปิร์มพบว่าสเปิร์มในกลุ่มควบคุมโคเบอร์ 863 และ RJ888 มีตำแหน่งที่เกิดวิการเล็กน้อยและมีความถี่ในการเกิดวิการเล็กน้อย แต่โคเบอร์ 862 ไม่พบวิการ ในกลุ่มทดลองโคเบอร์ 862 มีการเกิดวิการที่ตำแหน่ง 1, 3, 5, 6, 9 และ 10 แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โคเบอร์ 863 มีการเกิดวิการที่ตำแหน่ง 5 แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และโคเบอร์ RJ888 มีการเกิดวิการที่ตำแหน่ง 1, 2, 3, 6, 9 และ 10 แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่โคทั้ง 3 ตัวมีความถี่ในการเกิดวิการมากที่สุดที่ตำแหน่ง 9 คือส่วนหัวสเปิร์มด้านบนขวา



ภาพ 4-14 แสดงสปอร์ในกลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มที่ทำปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อสปอร์ (B) ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 4,300 เท่า



ภาพ 4-15 แสดงการเกิดวិการบนผนังสเปิร์มของโคเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดย (A) คือ สเปิร์มกลุ่มควบคุมของโคเบอร์ 862, 863 และ RJ888, (B) คือสเปิร์มของโคเบอร์ 862, (C) คือสเปิร์มของโคเบอร์ 863 และ (D) คือสเปิร์มของโคเบอร์ RJ888 ช่องสี่เหลี่ยมที่มีการเกิดวិการอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



ตาราง 4-8 แสดงความถี่และเปอร์เซ็นต์ของวิธีการ ณ ตำแหน่งต่าง ๆ บนผนังสเปิร์มโคขาวลำพูนเมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์

เบอร์วัว			จุดที่ 1	จุดที่ 2	จุดที่ 3	จุดที่ 4	จุดที่ 5	จุดที่ 6	จุดที่ 7	จุดที่ 8	จุดที่ 9	จุดที่ 10	จุดที่ 11	จุดที่ 12	รวม	
862	Control	ความถี่	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>	0/60 <sup>a</sup>
		เปอร์เซ็นต์	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
	Sexed	ความถี่	5/72 <sup>b</sup>	1/72 <sup>a</sup>	2/72 <sup>b</sup>	0/72 <sup>a</sup>	5/72 <sup>b</sup>	2/72 <sup>b</sup>	0/72 <sup>a</sup>	0/72 <sup>a</sup>	0/72 <sup>a</sup>	6/72 <sup>b</sup>	2/72 <sup>b</sup>	0/72 <sup>a</sup>	0/72 <sup>a</sup>	23/72 <sup>b</sup>
		เปอร์เซ็นต์	(6.94)	(1.39)	(2.78)	(0)	(6.94)	(2.78)	(0)	(0)	(0)	(8.33)	(2.78)	(0)	(0)	(31.94)
863	Control	ความถี่	1/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	1/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	0/36 <sup>a</sup>	2/36 <sup>a</sup>
		เปอร์เซ็นต์	(2.78)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2.78)	(0)	(0)	(0)	(5.56)
	Sexed	ความถี่	4/72 <sup>a</sup>	1/72 <sup>a</sup>	0/72 <sup>a</sup>	1/72 <sup>a</sup>	4/72 <sup>b</sup>	1/72 <sup>a</sup>	1/72 <sup>a</sup>	1/72 <sup>a</sup>	1/72 <sup>a</sup>	5/72 <sup>a</sup>	1/72 <sup>a</sup>	0/72 <sup>a</sup>	0/72 <sup>a</sup>	19/72 <sup>b</sup>
		เปอร์เซ็นต์	(5.56)	(1.39)	(0)	(1.39)	(5.56)	(1.39)	(1.39)	(1.39)	(1.39)	(6.94)	(1.39)	(0)	(0)	(26.39)
RJ888	Control	ความถี่	1/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	3/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	2/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	1/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	7/96 <sup>a</sup>
		เปอร์เซ็นต์	(1.04)	(0)	(0)	(0)	(3.13)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2.08)	(0)	(1.04)	(0)	(7.29)
	Sexed	ความถี่	7/96 <sup>b</sup>	5/96 <sup>b</sup>	3/96 <sup>b</sup>	0/96 <sup>a</sup>	7/96 <sup>a</sup>	4/96 <sup>b</sup>	2/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	8/96 <sup>b</sup>	4/96 <sup>b</sup>	1/96 <sup>a</sup>	0/96 <sup>a</sup>	41/96 <sup>b</sup>
		เปอร์เซ็นต์	(7.29)	(5.21)	(3.13)	(0)	(7.29)	(4.17)	(2.08)	(0)	(0)	(8.33)	(4.17)	(1.04)	(0)	(42.71)

<sup>a, b</sup> column means with different superscripts are significance ( $p < 0.05$ )