# รายงานผลการวิจัย

**เรื่อง** การเพิ่มจำนวนลูกแพะเพศเมียโดยการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเพศ

Increasing female Goat with sexed semen by Artificial Insemination

**ได้รับจัดสรรงบประมาณวิจัย** ประจำปี 2554

จำนวน 293,000 บาท

**หัวหน้าโครงการ** วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์...../...../.....

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญตาราง | ข |
| สารบัญภาพ | ค |
| บทคัดย่อ | 1 |
| Abstract | 2 |
| กิตติกรรมประกาศ | 3 |
| คำนำ | 4 |
| วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 5 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 5 |
| การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง | 6 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 12 |
| ผลการวิจัย | 23 |
| วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย | 32 |
| ข้อเสนอแนะ | 36 |
| เอกสารอ้างอิง | 37 |

# สารบัญตาราง

หน้า


ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งกลุ่มการวิจัยการคัดเพศน้ำเชื้อโดยปฏิกิริยาไซโตทอกซิค จากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน 22

ตารางที่ 2 แสดงระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาและปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้ 26

ตารางที่ 3 แสดงค่า O.D. จากเครื่อง ELISA reader ในการตรวจวัดความจำเพาะต่อเพศ โดยใช้ม้ามโคเป็นแหล่งแอนติเจน จากการสุ่มตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ผลิตแอนติบอดีจำนวน 8 หลอด 27

ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ 28

ตารางที่ 5 แสดงค่า O.D. จากการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อเพศผู้ด้วยวิธี indirect ELISA 29

ตารางที่ 6 แสดงการตอบสนองของแอนติบอดีและแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว ของโคเพศผู้และเพศเมียโดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy 30

ตารางที่ 7 แสดงการเพิ่มขึ้นของสเปิร์มเพศเมียภายหลังการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโต-ทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วาย แอนติเจนโดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

(Ab: Antibody, Com: Complement) 31

# สารบัญภาพ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ภาพที่ 1 | ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน ในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/C. | 23 |
| ภาพที่ 2 | กราฟแสดงค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากจำนวนโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจำนวน 12 โคลน | 24 |
| ภาพที่ 3 | กราฟแสดงค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตอบสนองของแอนติบอดีของโคลน 3D8 ที่ทำการแยกโคลนเดี่ยวซึ่งได้ เลือกโคลน 3D8-11A2 มาใช้ในการศึกษา | 25 |

# การเพิ่มจำนวนลูกแพะเพศเมียโดยการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเพศ

## Increasing female Goat with sexed semen by Artificial Insemination

วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์

**Wiwat Pattanawong**

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

**บทคัดย่อ**

การเพิ่มจำนวนแพะเพศเมียในฟาร์มเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต และการใช้น้ำเชื้อที่มีสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย (Y chromosome) หรือสเปิร์มวาย น้อยกว่าที่มีอยู่ในธรรมชาติจะทำให้อัตรา การเกิดลูกเพศเมียเพิ่มขึ้น การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาไซโตทอกซิค (Cytotoxicity) ในระบบภูมิคุ้มกันที่ใช้แอนติบอดีเป็นปัจจัยสำคัญ เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยทำลายสเปิร์มวายได้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยคือ: ผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAb) ต่อแอนติเจนที่จำเพาะต่อสเปิร์มวาย และหาปฏิกิริยาไซโตทอกซิคที่เหมาะสมในการทำลายสเปิร์มวาย ผลการทดลองพบว่า หนู 1 ใน 20 ตัวมีการสร้างแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนในสัปดาห์ที่ 4 ของการกระตุ้น หลังการเชื่อมเซลล์ 14-21 วันได้ตรวจพบ กลุ่มโคลนลูกผสม (Hybridoma clone) จำนวน 12 โคลน จากทั้งหมด 450 โคลน ที่มีความจำเพาะเจาะจง ต่อเอช-วายแอนติเจน เมื่อนำโคลนหมายเลข 3D8 มาแยกเป็นโคลนเดี่ยวพบว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ชนิด IgG จากนั้นได้เลือกโคลนหมายเลข 3D8-11A2 ที่มีการผลิตแอนติบอดีปริมาณมากที่สุดมาใช้ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิค สำหรับปฏิกิริยาไซโตทอกซิค เป็นการบ่มระหว่าง เซลล์อสุจิแพะกับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี และโปรตีนคอมพลิเมนต์ (Complement) จากหนูตะเภา พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของปฏิกิริยาไซโตทอกซิคเกิดขึ้นที่การเจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1:10 และคอมพลีเมนต์ เจือจางที่ 1:50 เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy พบว่าผลของปฏิกิริยาพบว่าทำให้ลดสัดส่วนของสเปิร์มวาย (ควบคุมการเกิดเพศผู้) ลงเหลือ 11 % หรือทำให้มีปริมาณสเปิร์มเอกซ์ (ควบคุมการเกิดเพศเมีย) เพิ่มเป็น 89

**Abstract**

Increment of female in farms is one way to boost its production. One approach to achieve the goal is using semen with low proportion of Y-bearing spermatozoa, which means that X-bearing is higher than the Y-bearing spermatozoa then prone to give higher possibility of female. Cytotoxic immunological reaction is one method to manipulate the ratio of the Y-bearing spermatozoa in goat semen. To set up the condition of the cytotoxic immunological reaction against the Y-bearing spermatozoa I have to have two components, which are monoclonal antibody (MAb) to cell surface antigen of the Y-bearing spermatozoa and complement protein. Then, the objectives of my research are: (1) to produce (MAb against Y-bearing spermatozoa, which has male specific antigen on its cell surface, and (2) to establish cytotoxic immunological reaction against the spermatozoa (H-Y antigen). It was found that, within 14-21 days after fusion, that one mouse could produce the antibody and able to produce 12 clone. Those clone number 3D8 capable of binding specifically with the bovine H-Y antigen and were classified to be IgG. One of them, clone number 3D8-11A2, was chosen due to its highest antibody activity. In the experiment to find optimum dilution of the antibody and the complement from the Guinea pig in the cytotoxic reaction, It was found that the optimal dilution of the MAb and the complement were 1:10 and 1:50, respectively. When those treated semen were sexed by Immunofluorescence microscopy method (IFM), 89 % of the spermatozoa were identified to be female.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยทุนสนับสนุนงานวิจัยสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้อุปกรณ์ในการทำวิจัย

ผู้วิจัย

# คำนำ

สถานการณ์การเลี้ยงแพะในประเทศไทยจากการที่เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในฟาร์มขนาดเล็กและประสบปัญหาภาวะต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นโดยเฉพาะค่าอาหารซึ่งเป็นสัดส่วนค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะรายย่อยหลายรายต้องเลิกกิจการไปเพราะแบกรับภาระต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น

การเลี้ยงแพะในประเทศไทยมีมานานแล้วส่วนใหญ่เลี้ยงในเขตพื้นที่ทางภาคใต้มากถึง 112,519 ตัว มากกว่าร้อยละ 50 ของจำนวนแพะทั้งประเทศ ปัจจุบันมีการเลี้ยงที่ลดลง ในปี 2551 มีการเลี้ยงที่ลดลงถึง 70,745 ตัว (สำนักงานปศุสัตว์, ปี พ.ศ 2550 – ปี พ.ศ 2551 ) เนื่องจากความต้องการของตลาดมีมากขึ้น พันธุ์แพะที่นำมาเลี้ยงเป็นสายพันธุ์ลูกผสม ส่วนปัญหาด้านการเลี้ยงแพะ อ้างอิงข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2550) พบว่าเกษตรกรมีปัญหาด้านการผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของการขาดแคลนพ่อ-แม่พันธุ์ดี เกษตรกรทุกขนาดฟาร์มระบุว่ามีปัญหาขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ที่ดีสำหรับใช้ ในการปรับปรุงพันธุ์ จากปริมาณความต้องการบริโภคแพะที่เพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากถูกนำไปใช้ในพิธีทางศาสนาอิสลาม คือพิธีกุรบัน (พีทาน) แสดงให้เห็นว่าตลาดจำหน่ายผลผลิตขึ้นอยู่กับผู้บริโภคเป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2550) ที่ได้รายงานไว้ว่าความต้องการเพื่อการบริโภคเนื้อแพะในประเทศนิยมบริโภคในหมู่ชาวไทยมุสลิมเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศซึ่งมีชาวมุสลิมอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก โดยข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานจำนวนสัตว์ - ซากสัตว์เคลื่อนย้ายออก ของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ปี พ.ศ. 2547 - 2548 ) ที่มีการเคลื่อนย้ายแพะไปทางจังหวัดภาคใต้ ในสัดส่วนของการเคลื่อนย้ายไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 ทั้งนี้ความสามารถในการสืบพันธุ์ของแม่แพะจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อผลผลิตรวมของฟาร์มซึ่งนอกจากจะมีผลโดยตรงต่อจำนวนลูกแพะที่ผลิตได้เพื่อส่งตลาดแล้วยังมีผลทางอ้อมต่อการคัดเลือกพันธุ์ด้วย เนื่องจากจะช่วยเพิ่มหรือลดจำนวนสัตว์ และชั่วอายุของสัตว์สำหรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าทางปศุสัตว์

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- ประยุกต์ใช้การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) ต่อแอนติเจนบนผนังเซลล์อสุจิแพะ สำหรับใช้ในน้ำเชื้อแพะคัดเพศแช่แข็งเพื่อเพิ่มการผลิตลูกแพะเพศเมีย

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นองค์ความรู้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) ต่อแอนติเจนบนผนังเซลล์ใดๆ ที่จะเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้กับเซลล์อื่นๆ เช่น แอนติเจนที่จำเพาะต่อสเปิร์มวายของ โคเนื้อ กระบือ และสุกร เป็นต้น
2. ได้รูปแบบปฏิกิริยาไซโตทอกซิคซีดี้ที่สามารถควบคุมอัตราส่วนการเกิดลูกสัตว์เพศเมียที่สูงกว่าการเกิดตามธรรมชาติในสัตว์เลี้ยงชนิดอื่น

## การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

**ความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และ Y**

ความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และ Y ที่ชัดเจนที่สุด คือ อสุจิ X เป็นพวกที่มี X - chromosome DNA ใน nucleus ส่วนอสุจิ Y เป็นพวกที่มี Y - chromosome DNA ใน nucleus นอกนั้นเป็นข้อแตกต่างที่ยังไม่รู้ชัดเจนทั้งสิ้น (อนันต์, 2535) อันได้แก่ความแตกต่างทางรูปร่างของส่วนหัวในอสุจิ X ของมนุษย์เหมือนรูปลิ่ม ส่วน Y เป็นท่อนทรงกลมยอดแหลมถ้ามอง ด้านหน้าของทั้งอสุจิ X และอสุจิ Y จะเป็นรูปไข่ แต่ X ใหญ่กว่าและหางสั้นกว่า Y น้ำหนัก DNA อสุจิ X ของมนุษย์หนักกว่าอสุจิ Y ประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ (Mohri, 1987) ส่วนในโคน้ำหนักต่างกันประมาณ 3.82 - 4.18 เปอร์เซ็นต์

**การคัดแยกอสุจิ X และ Y**

เทคโนโลยีในการคัดเพศสเปิร์มในปัจจุบัน ที่ทันสมัยที่สุดคือการคัดด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี (Flow cytometry) ที่สามารถแยกสเปิร์มเอกซ์ และวายออกจากกันมีความบริสุทธิ์ที่ 85-95% (Welch and Johnson, 1999) เมื่อนำน้ำเชื้อคัดเพศไปผสมกับแม่แพะจะได้ลูกแพะเพศเมีย 91-95 % ถือเป็นข้อเด่นของการใช้เทคนิคนี้ แต่มีข้อเสียหลายประการดังนี้:

(1) ผลของสเปิร์มคัดเพศในการปฏิสนธิกับไข่ (Roberto et al., 2006) มีพัฒนาการเข้าสู่ระยะ blastocyst น้อยกว่าสเปิร์มปกติ (16-18% vs 24-25%) และสเปิร์มเสียความสามารถในการเจาะไข่ 8.8 %

(2) จากเอกสารของฝ่ายส่งเสริมของUniversity of Minesota เครื่อง Flow cytometer มีราคาประมาณ 250,000 $USD/เครื่อง (http://www.thecattlesite.com/articles/1177/sexed-semen-is-it-finally-a-reality)

(3) ผลของการใช้ Flow cytometer ทำให้อัตราการผสมติด (conception rate) ลดจาก 50 เป็น 42%

(4) ต้องการนักเทคนิคที่มีความชำนาญสูง

(5) ข้อจำกัดของเทคโนโลยีนี้คือ หัวสเปิร์มมีลักษณะแบน ทำให้ 30% ของสเปิร์มเท่านั้นที่วางตำแหน่งอย่างถูกต้องเข้าไปในเครื่อง ครึ่งหนึ่งเป็นสเปิร์มเอกซ์ทำให้ได้สเปิร์มคัดเพศเพียง 15% ของที่เข้าไปในเครื่องทั้งหมด การแยกสเปิร์มให้ได้ 20 ล้านตัวต่อหลอดใช้เวลาประมาณ 1.3 ชั่วโมง ทำให้สเปิร์มคัดเพศโดย Flow cytometry มีความเข้มข้นของสเปิร์มต่อหลอดเพียง 2 ล้านเซลล์เท่านั้น

งานวิจัยต่างๆ ที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับการคัดเลือกเพศ (Sexing) ของน้ำเชื้อและตัวอ่อนสำหรับการเพิ่มปริมาณสุกรเพศเมียที่จะส่งผลต่อปริมาณสุกรแม่พันธุ์ที่จะเกิดขึ้น Hendriksen *et al.* (1993) ศึกษาการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายเพื่อแยกอสุจิสุกรและโค ตามโครโมโซมเอ็กซ์และโครโมโซมวาย โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวาย 7 ชนิด คือ anti-H-Y MCAs 5XI, 4 VII, 5 X, 15 XXI, 21 V, 13 XVIII และ 12-49 แล้วใช้การตรวจวัดด้วย fluorescence assay เพื่อดูความเข้มข้น นำอสุจิมาแยกชนิดของโครโมโซมด้วยเครื่อง flow cytometric-sorting โดยต้องใส่สาร Hoechst 3342 หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์การจับด้วย Immunofluorescence assay โดยนำอสุจิไปบ่มร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวาย เติมสาร Goat anti-mouse IgM-Phycoerythrin (GAM-PE) แล้วดูการจับของโปรตีนบนอสุจิ หลังจากนั้นดูเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายโดยการย้อมสี อสุจิที่ย้อมด้วยสาร Hoechst 3342 จะใช้สาร propidium iodide ส่วนอสุจิที่บ่มกับ Anti H-Y MCAs และ GAM-PE ใช้สาร 4',6-diamidino-2-phenylindole ย้อม 5 นาทีแล้วดูการตาย พบว่าการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวาย ในอสุจิที่ไม่ได้ผ่านเครื่อง flow cytometric-sorting มี 2 แบบคือ มีการเรืองแสงน้อย พบบริเวณส่วนหัวของอสุจิ กับมีการเรืองแสงมากพบบริเวณส่วน postacrosomal จากการตรวจด้วย immunofluorescence assay ร่วมกับการตายของอสุจิ พบว่าเมื่อยิ่งมีการจับที่ส่วน postacrosomal มากแสดงว่าเป็นอสุจิที่ตายแล้ว ไม่สามารถบอกได้ว่าสัมพันธ์กับการมีหรือ ไม่มีโครโมโซมวาย ส่วนการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายในอสุจิที่ผ่านเครื่อง flow cytometric-sorting พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์ในการจับกับเซลล์ระหว่างอสุจิวายและอสุจิเอ็กซ์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความบริสุทธิ์ของโครโมโซมวายที่ผ่านเครื่อง flow cytometric-sorting มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าโครโมโซมเอ็กซ์

การผลิตลูกสุกรที่น้ำเชื้อถูกคัดเพศ (Grossfeld et al., 2005) แล้วเพื่อใช้ในเทคนิคผสมพันธุ์โดยไม่ต้องผ่าตัด ทดลองในแม่สุกรพันธุ์เยอรมันแลนด์เรซ 26 ตัว โดยหย่านมลูกครอกที่ผ่านมาในวันที่ 26-30 ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ด้วย equine chorionic gonadotrophin (eCG) 800 IU หลังจากนั้น 84 ชั่วโมงให้ human chorionic gonadotrophin (hCG) 500 IU ทำการเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรมาแยกอสุจิเอ็กซ์และอสุจิวายโดยย้อมด้วย Hoechst 33342 แล้วเข้าเครื่อง flow cytometry วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของอสุจิที่ผ่านเครื่อง หลังจากนั้นจึงทำการตรวจการเป็นสัดของแม่สุกรด้วยพ่อสุกร ทำการผสมหลังจากฉีด hCG40 ชั่วโมงบริเวณภายในมดลูก ใช้ปริมาณน้ำเชื้อ 2 มล. โดยมีอสุจิ 50 X $10^6$ ตัว แล้วทำการตรวจการตั้งครรภ์ ผลคือความบริสุทธิ์ของอสุจิวายเท่ากับ 95% ส่วนความบริสุทธิ์ของอสุจิเอ็กซ์เท่ากับ 92% โดยหลังจากการผ่านเครื่องแยกชนิดอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง,อสุจิถูกทำลายเพิ่มขึ้น กลุ่มที่ใช้อสุจิที่ไม่ผ่านเครื่องแยกชนิดอสุจิ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ใช้อสุจิผ่านเครื่องแยกชนิดอสุจิไม่มีความแตกต่างกันระหว่างอัตราการตั้งท้อง, อัตราการ

หย่านม ในเรื่องการคัดเพศ ลูกสุกรมีเพศถูกต้องตามที่ทำนายไว้ล่วงหน้า 97% การศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการคัดเพศของน้ำเชื้อ เช่น การตรวจสอบน้ำเชื้อก่อนที่จะทำการผสมโดยแยกประเภทของสเปริม์ก่อนที่จะนำมาผสม (Ali et al., 1990) ซึ่งมีวิธีการคัดเลือกที่แตกต่างกัน เทคนิค Flow-cytometric สามารถคัดแยกความแตกต่างของน้ำเชื้อโครมโมโซมเอ็กซ์ และโครโมโซมวายในสุกร (Johnson *et al.*, 2005) และโค (Bodmer *et al.*, 2005) โดยติดฉลากด้วยสี Hoechst 33342 (Bodmer *et al.*, 2005, Grossfeld *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 2005, Welch and Johnsona, 1999) จะสามารถแยกชนิดของอสุจิเอ็กซ์และอสุจิวายตามความเข้มข้น ของสีที่ต่างกัน ในการผลิตตัวอ่อนหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization) ที่ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าว แต่เกิดปัญหาที่ขึ้นกับอสุจิหลังผ่านการคัดเพศโดย Flow-cytometric พบว่าในสุกรการเคลื่อนที่ ของอสุจิลดลง 68.6±4.4% ความผิดปกติของอสุจิ 30.7±7.5% และการเสียหายของ Acrosome เกิดขึ้น 28.0±7.4% หลังผ่านขบวนการ (Grossfeld *et al.*, 2005)

จากการรายงานการวิจัยของ Suh และคณะ (2005) ได้รายงานถึงระดับความดันจากขบวนการ Flow-cytometric ต่อการสูญเสียของอสุจิ พบว่าที่ระดับความดันสูงจะเกิดการเสียหายอย่างมากต่ออสุจิเนื่องจากระดับความดันจะส่งผลต่อการเคลื่อนตัวของอสุจิที่ผิดไป ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง 30 ถึง 40.2% และสัดส่วนเพศที่เกิดขึ้นในสุกรการแยกเพศด้วยวิธีการดังกล่าวสามารถจำแนกอสุจิเอ็กซ์ได้ 92% และอสุจิวายได้ 95% (Grossfeld *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับ Johnson and Welch (1999) พบว่าการจำแนกอสุจิเอ็กซ์ และอสุจิวาย มีค่า 87% และ 77% ตามลำดับ และจากรายงานของ Abeydeera และคณะ (1998) สามารถแยกเพศอสุจิสุกรทั้งอสุจิเอ็กซ์และอสุจิวาย ได้ 100% และ 75% ตามลำดับ

รวมถึงการวิจัยทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาที่เข้ามามีส่วนช่วยในการจำแนกความแตกต่างของสเปริม์ โดยการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของสเปริม์วายที่มีคุณสมบัติของแอนติเจนที่เรียกว่า เอช-วาย แอนติเจน (histocompatibility-Y antigen ; H-Y antigen) ซึ่งเป็นกลุ่มของแอนติเจนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์เพศผู้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสายพันธุ์สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Shapiro and Erickson, 1981) มีความสำคัญต่อการแสดงออกของเพศผู้โดยมีผล มาจากโครโมโซมวาย ที่สังเคราะห์โปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์เพศผู้ พบครั้งแรกจากการศึกษาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูเพศผู้สู่เพศเมียที่ไม่สามารถเข้ากันได้ เนื่องจากผลของ เอช-วาย แอนติเจน ต่อการปลูกถ่ายอวัยวะข้ามเพศ เอช-วายแอนติเจน เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า serologically – defined male antigen (SDMA) (Reilly and Goldberg, 1991) สามารถนำมาตรวจวัดปริมาณของแอนติเจนโดยอาศัยคุณสมบัติความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีได้ ด้วยวิธีเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Link Immunosorbent Assay, ELISA) (Iyer *et al.*, 1989) RIA และ

microcytotoxicity รวมถึงเทคนิค Immunofluorescent สำหรับตรวจหาเอช-วายแอนติเจน ที่บริเวณ acrosomal membrane ของ spermatozoa ของหนูและมนุษย์ (Bradley and Heslop, 1988)

จากคุณสมบัติของโปรตีนที่สามารถใช้เป็นแหล่งของแอนติเจนสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อน้ำเชื้อเพศผู้และน้ำเชื้อเพศเมียได้ 2 วิธีคือ การผลิตในแบบโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal Antibodies) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody) แต่เนื่องจากแอนติบอดีที่ได้จากการผลิตในแบบโพลีโคลนอลแอนติบอดีนั้นมีหลายชนิดให้ความแม่นยำที่ต่ำกว่าแอนติบอดีที่ได้จากการโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทำให้การคัดเพศด้วยแอนติบอดีที่ผ่านมาจากการผลิตแบบโพลีโคลนอลแอนติบอดีไม่นิยมใช้ในการคัดเพศ จะเห็นได้จากการคัดเพศด้วยเอช-วายแอนติเจนที่ผ่านมา ในปี 1988 Wachtel *et al.* ได้นำความสามารถของหนูเพศเมียที่ไวต่อการกระตุ้นจากเซลล์เพศผู้ โดยฉีดเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้ให้หนูเพศเมียเพื่อกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อ เอช-วายแอนติเจน และนำเซลล์ที่ม้ามของหนูเพศเมียที่สร้างแอนติบอดีต่อ เอช-วายแอนติเจนมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อเอช-วายแอนติเจน แอนติบอดีที่ผลิตได้นำมาทดสอบกับตัวอ่อนของหนู แพะ แกะ และโค พบว่าผนังเซลล์ตัวอ่อนสามารถจับกับแอนติบอดีต่อเอช-วาย แอนติเจนได้ประมาณ 73 - 82% เช่นเดียวกับ Christopher and Goldberg (1976) ใช้เอช-วายแอนติบอดีที่ผลิตได้นำมาทดสอบกับตัวอ่อนที่ระยะ 8 เซลล์ของหนูเมาส์โดยวิธี Cytotoxicity พบว่าการแสดงออกของเอช-วายแอนติเจนสามารถการจำแนกเพศผู้ ได้ถึง 65-78% Zaborski (1979) ได้ตรวจสอบหาเอช-วายแอนติเจนในน้ำเชื้อของหนู ที่บริเวณ acrosomal ของอสุจิโดยดูจากระดับการเรืองแสงฟลูออเลสเซ็นต์ที่น้ำเชื้อของหนูก่อนที่จะผสมเทียมมาตรวจสอบเพศด้วย เอช-วายแอนติซีรัม โดยวิธี Cytotoxicity พบสัดส่วนของอสุจิเพศผู้และเพศเมียประกอบอยู่ประมาณ 53.3 : 46.7 Hoppe and Koo (1984) ได้ศึกษาการยับยั้งตัวสเปริม์วายจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนเพื่อผลิตตัวอ่อนหนูเพศเมียในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* production of embryo) สามารถเพิ่มจำนวนลูกเพศเมียได้ประมาณ 6 – 8% อย่างไรก็ตาม เอช-วายแอนติเจนสามารถตรวจพบได้บริเวณ acrosomol membrane เมื่อนำโพลีโคลนอลต่อเอช-วายแอนติเจนมาใช้วิเคราะห์เพศอสุจิโดยเทคนิค Complement – Dependent Cytotoxicity (CDC) ได้ความน่าเชื่อถือ 71-85% (Reilly and Goldberg, 1991) Ali *et al.*, (1990) รายงานการเชื่อมฟลูออเลสเซ็นต์ เข้ากับ เอช-วายแอนติบอดี สำหรับตรวจสอบน้ำเชื้อของโคที่ติดฉลากด้วยโมโนโคลนอลเอช-วายแอนติบอดี เพื่อตรวจหาเอช-วายแอนติเจนจากการเรืองแสงที่หัวของอสุจิ พบว่าสัดส่วนที่เกิดการเรืองแสงและไม่เรืองแสง (โครโมโซมวายและโครโมโซมเอ็กซ์) เท่ากับ 76 : 24 และจากรายงานของ Veerhuis *et al.*, (1994) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วายแอนติเจน มาใช้ในการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนโค สามารถใช้ตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ระยะ

7-8 วันหลังการปฏิสนธิ มีช่วงความแม่นยำของการบ่งบอกเพศ ว่าเป็นเพศผู้อยู่ในระหว่าง 58-71% จากรายงานของ White et al. (1987) ที่ใช้เอช-วายแอนติเจนสำหรับจำแนกเพศตัวอ่อนแกะในช่วงของการฝังตัวซึ่งตัวอ่อนที่นำมาศึกษาได้ตรวจสอบโครโมโซมเพศแล้ว สามารถตรวจสอบการแสดงออกของเพศผู้ได้ประมาณ 88% โดยอาศัยเทคนิค Immunofluorescence

ในการศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประยุกต์ใช้ โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อน้ำเชื้อเพศผู้และเพศเมีย มาใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีต่อน้ำเชื้อเพศผู้และเพศเมีย โดยเทคนิคโมโนโคลนอลแอนติบอดี แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นนำมาใช้คัดเพศน้ำเชื้อแพะจากปฏิกิริยาไซโตทอกซิคซิตี้เพื่อลดสัดส่วนน้ำเชื้อเพศผู้และเพศเมีย ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนที่จำเพาะต่อน้ำเชื้อเพศผู้และเพศเมียร่วมกับระบบ Complement ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิคซิตี้สำหรับการผลิตน้ำเชื้อคัดเพศ เพื่อเพิ่มจำนวนสัดส่วนแพะเพศเมียที่จะเกิดขึ้นให้มากกว่าปกติ (จากปกติสัดส่วนการเกิดเพศผู้และเพศเมีย 50:50 เป็น 20:80 กรณีเพศเมีย และ 80:20 กรณีต้องการลูกเพศผู้) โดยการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านขบวนการคัดเพศที่ขึ้นจากปฏิกิริยาไซโตทอกซิคซิตี้ และพัฒนาไปสู่การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่คัดเพศรูปแบบเชิงการค้า และถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพิ่มสัดส่วนเพศภายในฟาร์มให้กับเกษตรกรที่สนใจ นอกจากนี้ยังเป็นการสนองตอบความต้องการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรของประเทศ รวมถึงการเปิดโอกาสให้นักศึกษาไทยที่มีความสามารถและศักยภาพสูงได้มีโอกาสในการพัฒนาและวิจัยทางด้านอณูพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงยังเป็นการผลิตบุคลากรที่มีความรู้ความสามารถทางด้านอณูพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเป็นฟันเฟืองในการพัฒนาทางวิชาการและเศรษฐกิจของประเทศให้สามารถมีศักยภาพในการแข่งขันได้ทัดเทียมกับนานาประเทศ

จากแนวทางการเพิ่มสัดส่วนเพศเมียภายในฟาร์มจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดเพศเพื่อนำไปสู่การเพิ่มจำนวนประชากรแพะเพศเมีย ที่ใช้สำหรับเป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ สามารถเพิ่มผลผลิตที่จะเกิดขึ้นจากแพะ ซึ่งเป็นผลดีแก่เกษตรกรที่ต้องการเพิ่มจำนวนแม่พันธุ์ภายในฟาร์มให้มากขึ้นกว่าปกติ เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะที่มีแม่แพะทั้งหมดในประเทศกว่า 250,000 ตัว เป็นที่คาดหวังได้ว่าจะทำให้ได้ลูกแพะเพศเมียเพิ่มขึ้นมากกว่าวิธีปกติประมาณ 52,500 ต่อการผลิตลูกปีแรก (250,000*0.7*(0.8-0.5) = 52,500 ตัว) เมื่อจำนวนแพะ = 250,000 ตัว, เปอร์เซ็นต์การตกลูก = 70 และ 0.8 หมายถึงอัตราการเกิดลูกเพศเมีย 80% เมื่อในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดเพศ ส่วน 0.5 หมายถึงอัตราการเกิดลูกเพศเมีย 50% เมื่อในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านกระบวนการผลิตแบบปกติ ซึ่งผลผลิตจากแม่แพะที่เพิ่มขึ้นนั้นจะช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์บางประเภทที่ขาดแคลน อีกทั้งช่วยพัฒนาปริมาณของผลิตภัณฑ์จากแพะที่จะเกิดขึ้นและพร้อม

สำหรับการแข่งขันในตลาดโลกต่อไป ถ้าเกษตรกรสามารถเพิ่มอัตราการเกิดลูกแพะเพศเมียจากร้อยละ 50 เป็น 80 จะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตจากแพะเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 60 (80/50=160)

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## สัตว์ทดลอง

- หนูขาวตัวเล็ก สายพันธุ์ Balb/C เพศเมีย อายุ 4 – 8 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว จาก สถาบันสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล
- หนูตะเภา เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัว จาก สถาบันสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล
- แพะเพศผู้พ่อพันธุ์ ณ ฟาร์มปศุสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

## อุปกรณ์การทดลอง

### สารเคมี

#### สารเคมีที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลอนอลแอนติบอดี

- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) (K29287204, Merck)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) (K19742898, Merck)
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate, $NaHCO_3$) (31437, Riedel-de Haen)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต-12-ไฮเดรท
- (Disodium phosphate monohydrate, $Na_2HPO_4.12H_2O$) (30414, Riedel-de Haen)
- โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride, KCl) (31248, Riedel-de Haen)
- แอมโมเนียซัลเฟต (ammonium sulphate, $(NH_4)_2SO_4$) (101217, Merck)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminiopropyl) - carbodiimide (C7625, Sigma)
- Fetal bovine serum (FBS) (10270-023, Seromed)
- Iscove's Modified Dulbecco's medium (IMDM) (1088539, GIBCOBRL)
- 2-Mercaptoethanl (M-6250, Sigma)
- Hypoxanthine Aminopetrin Thymidine (HAT) (F-0483, Biochrom)
- Hypoxanthine Thymidine (HT) (F-0493, Biochrom)

- Polyethylene glycol (PEG) (P-3640, Sigma)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (802912, GIBCOBRL)
- Thiophilic resin (T-gel) (T5787, Sigma )
- Polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 80) (H0306, Sigma)
- โพแทสเซียม คลอไรด์ (potassium chloride, KCl) (31248, Riedel-de Haen)
- โอ-ฟลีนิลลีล-ไดอามีน-เฮสซีแอล (O-phenylene-diamine-HCl, OPD) (80972, Zymed lab)
- ฮอสแรดิช เพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) (P6782, Sigma)
- เจลาติน (gelatin) (K4988770, Merck)
- ซัลฟูริคแอซิด (sulfuric acid, $H_2SO_4$) (J.T.Baker)
- ซิตริคแอซิด (citric acid) (C2270, Sigma)
- Anti – Mouse IgG-FITC ( AP326F, Chemicon)
- Goat anti-Mouse IgG (M-1131, Sigma)
- Freund's complete adjuvant (E-5881, Sigma)

**อุปกรณ์และเครื่องมือ**

- Hot Air Oven, Model ULE 400, Memmert, Germany
- Spectrophotometer, UV-VIS Biowave S2100, Germany
- Magnetic Stirrer, Model HS115, HL Instrument, Thailand
- Microcentrifuge tube 1.5 ml, Sorenson, Bioscience. Inc. USA
- PCR tube, Sorenson, Bioscience. Inc., USA
- pH meter, Model CG 842, Inc., USA
- Immuno-Plate 24 หลุม บริษัท Nalge Nunc International ประเทศเดนมาร์ก
- จานเลี้ยงเชื้อขนาด 35 x 15 มิลลิเมตร.บริษัท Nalge Nunc International ประเทศเดนมาร์ก
- จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร.บริษัท Becton Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ไมโครไปเปด (micropipette) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัท AB Technology

- ไมโครไปเปต (micropipette) ขนาด 2.5 และ 10 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf
- หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร บริษัท Molecular Bioproducts ประเทศแคนนาดา
- กระบอกฉีดยา ขนาด 5, 10, 20 และ 50 มิลลิลิตร บริษัท Nipro ประเทศญี่ปุ่น
- เข็มฉีดยาเบอร์ 18 และ 20 ความยาว 1.5 นิ้ว บริษัท Nipro ประเทศญี่ปุ่น
- กล้อง Stereomicroscope SZ-ST บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น3611
- เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer UV-visible)โมเดล DU
- บริษัทBeckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวอร์เทกซ์ (vortex mixer) โมเดล K-500 GE บริษัท Labinco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นแยกชนิดปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)โมเดล 6930 บริษัท Kubota
- เครื่องชั่งไฟฟ้า (ความละเอียด 3 ตำแหน่ง) โมเดล 2482 บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน
- เครื่องเขย่า (shaker) โมเดล GFL3015 บริษัท Gesellschaff fur Labortechmik
- ไดอะไลซิ่งทิว (dialysing tube) ไม่ให้สารที่มีโมเลกุลตั้งแต่ 12,000 ขึ้นไปผ่าน โมเดล CelluSep บริษัท Membrane filtration product ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (microplate reader) โมเดล 2010 บริษัท Anthos
- ไมโครเพลท 96 หลุม (microplate 96 well) โมเดล Nunc-Immuno™ บริษัท Nalge Nunc international ประเทศเดนมาร์ก
- ตู้อบ (incubator) บริษัท memmert ประเทศเยอรมันนี
- Column liquid chromatography ขนาด 1 x 30 เซนติเมตร บริษัท Sigma
- ตู้เลี้ยงเซลล์ (CO2 incubator) โมเดล 3194 บริษัท Forma Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปรับ pH (pH meter)โมเดล678 บริษัท EP/KE ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- พาราฟิล์ม บริษัท American NationalCan ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กล้องจุลทรรศน์แบบกลับหัว (inverted microscope) โมเดลCK2 บริษัทOlympus

**วิธีการเตรียมแอนติเจน**

**1. การเตรียมเอช-วายแอนติเจน**

การเตรียมแอนติเจนของเอช-วายแอนติเจนโดยนำน้ำเชื้อแพะ นำไปปั่นล้างที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที จำนวน 5 ครั้งเพื่อนำเอาอาหารเลี้ยงสเปิร์มออกโดยใช้สารละลาย PBS แช่ในการละลาย แล้วนำมานับจำนวนสเปิร์มโดยใช้ Hemacytometer โดยให้จำนวนเซลล์สเปิร์มประมาณ $2 \times 10^6$ เซลล์ ต่อ 100 ไมโครลิตร

**2. วิธีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน**

นำเซลล์ที่ผ่านการล้างและทราบจำนวนเซลล์ที่แน่นอนแล้ว ในสารละลาย PBS 100 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน 100 ไมโครลิตร โดยใช้วิธีโฮโมจีไนเซชั่น (homogenization) ใส่สารทั้งหมดลงในกระบอกฉีดยาที่ต่อกับ 3 ทาง (3-way-stopcock) และกระบอกฉีดยาอีกอันหนึ่ง หลังจากนั้นดันกระบอกฉีดยาไปกลับประมาณ 50 –100 ครั้งจนได้สารละลายสีขาวขุ่น จึงนำไปฉีดในหนูขาวตัวเล็ก ตัวละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ตัว โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณกลางหลัง ทุกๆ 2 สัปดาห์ ก่อนฉีดจะเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 300 ไมโครลิตร นำมาปั่นแยกพลาสมาและเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาตรวจสอบผลการตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน

**3.การวัดระดับแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนด้วยวิธี Indirect ELISA**

เคลือบเพลทด้วยเม็ดเลือดขาวของแพะเพศผู้เนื่องจากความต้องการความจำเพาะต่อเอช-วายแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ จำนวน $10^6$ เซลล์ในสารละลายสำหรับการเคลือบเพลท ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมซีรั่มหนูที่เจือจาง 1:1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม goat anti-mouse เชื่อมติดกับเอนไซม์ฮอสแรดิชเพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase, HRP) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 4N $H_2SO_4$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA – reader

**การผลิตโมโนโคลนอแอนติบอดีต่อต่านเอช-วายแอนติเจน**

**การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา**

1. การเตรียมเซลล์ไมอิโลมา

ใช้เซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63–Ag8.653 โดยเลี้ยงใน 10% FBS ที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ ตรวจนับจำนวนเซลล์และสุขภาพของเซลล์โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

2. การเตรียมเซลล์ม้ามหนูขาวตัวเล็ก

ฆ่าหนูขาวตัวเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 75% แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อวางบนแผ่นโฟม เปิดช่องท้องเพื่อตัดม้าม นำม้ามที่ตัดมาแช่ในสารละลาย IMDM และฉีดชะล้างเซลล์ด้วยสารละลาย IMDM ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยการเติมสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ 0.83% 10 มิลลิลิตร นาน 6 นาที นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย IMDM 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง เติมสารละลาย IMDM 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) ดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว ตรวจนับจำนวนเซลล์ และสุขภาพของเซลล์ โดยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนการเชื่อมเซลล์

**3. การเตรียม Feeder Cell**

ฆ่าหนูขาวตัวเล็กโดยการกระตุกคอ แช่ใน 75% แอลกอฮอล์ นำเข้าตู้ปลอดเชื้อวางบนแผ่นโฟม ดึงหนังหน้าท้องออก ให้เห็นเยื่อบุช่องท้องอยู่ ฉีดสารละลาย IMDM เข้าไปในช่องท้อง 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1 – 2 นาที ดูดสารละลาย IMDM กลับจากช่องท้องใส่ลงในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลาย IMDM ทิ้ง เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว เทลงในถาด (tray) เติมสารละลาย HAT อีก 50 มิลลิลิตร ดูดสารสารละลายใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 6 เพลท นำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปใช้ ต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อน

**4.การเชื่อมเซลล์**

ปั่นเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเพื่อให้เซลล์ทั้งสองตกตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย IMDM 5 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว นับจำนวนเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาก่อนที่จะผสมเซลล์ทั้งสองในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยให้สัดส่วนเซลล์ม้ามและเซลล์ไมอิโลมาเป็น 3:1 นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมสารละลาย 50% PEG 2 มิลลิลิตรภายใน 45 วินาที ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เพื่อทำการเชื่อมเป็นเวลา 45 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที เติมสารละลาย IMDM ให้ครบ 5 มิลลิลิตร ภายใน 2 นาที ผสมให้เข้ากัน เติม IMDM 5 มิลลิลิตรและทิ้งไว้ 3 นาทีก่อนที่จะนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อเป็นการล้าง PEG ออก เติมสารละลาย HAT 10 มิลลิลิตร ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์เข้าออกเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวโดยทั่ว เทลงในถาด เติมสารละลาย HAT อีก 50 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 6 เพลท นำไปเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนมาใช้สารละลาย HT ในการเลี้ยงเซลล์

**5. การตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน**

ใช้วิธี ELISA เช่นเดียวกับการตรวจวัดระดับแอนติบอดี คือเคลือบเพลทด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวแพะเพศผู้เนื่องจากความต้องการความจำเพาะต่อเอช-วายแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ จำนวน $10^6$ เซลล์ในสารละลายสำหรับการเคลือบ ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมเจลาตินที่ละลายในสารละลายสำหรับการเคลือบที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงสลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุมเติมน้ำเลี้ยงที่ได้จากหลุมที่มีเซลล์ไฮบริโดมา ปริมาตร 30 - 40 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติม goat anti-mouse เชื่อมติดกับเอนไซม์ HRP ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้ง ล้างเพลท 5 ครั้งด้วยสารละลายสำหรับการล้าง ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย $4NH_2SO_4$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA – reader

**6.การแยกโคลนเดี่ยว โดยวิธี Limiting Dilution**

เตรียม feeder cell ในไมโครเพลทแบบปลอดเชื้อชนิด 96 หลุม จำนวน 6 เพลท ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดน้ำเลี้ยงเซลล์เข้าออก เพื่อให้เซลล์กระจายในน้ำเลี้ยง นับจำนวนเซลล์โดยเครื่องนับเซลล์ (Haemocytometer) ให้มีเซลล์ไฮบริโดมาจำนวน $1.4x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ต้องการเซลล์ 1,000 เซลล์ ต้องดูดน้ำเลี้ยง 67 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10% FBS 30 มิลลิลิตร เทลงใน Tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดให้เซลล์กระจายโดยทั่วก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% FBS 20 มิลลิลิตร เทลงใน Tray ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดให้เซลล์กระจายโดยทั่วก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 3 และ 4 หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% FBS 10 มิลลิลิตร เทลงในถาด ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดให้เซลล์กระจายโดยทั่วก่อนดูดสารละลายใส่ในไมโครเพลทที่มี feeder cell เพลทที่ 5 และ 6 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือ10 มิลลิลิตรทิ้ง เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ จนกระทั่งพบโคลนของเซลล์ไฮบริโดมาจึงทำการตรวจหาเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนอีกครั้งหนึ่ง

**7.การเพิ่มจำนวนเซลล์ไฮบริโดมา**

หลังจากที่ได้เซลล์ไฮบริโดมาผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน และแยกโคลนเดี่ยวแล้ว การเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ผลิตแอนติบอดี เมื่อจำนวนเซลล์ในหลุมเต็มนำมาขยายที่เพลทชนิด 24 หลุม เลี้ยงด้วย 10% FBS เลี้ยงเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ความชื้นสูง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เมื่อเซลล์เจริญเต็มหลุมแล้ว จึงขยายสู่จานเลี้ยงเซลล์จนกระทั่ง มีจำนวนเซลล์ $10^6 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงนำเซลล์ไปขยายต่อไป

**8.การผลิตแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสมโดยวิธีเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ *(in vitro)***

เป็นการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมในตู้เลี้ยงเซลล์โดยอาศัยน้ำเลี้ยงที่ได้มีการเตรียมขึ้นจากวิธีของกนกวรรณ (2542) โดยเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เตรียมสารละลาย 10% FCS (ตามภาคผนวก ก) ใส่ลงใน tissue culture flask ขวดละ 20 มล. แล้วจึงเติมเซลล์ลูกผสมลงไปให้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น $10^5$-$10^6$ เซลล์/1มิลลิลิตรสารละลาย 10% FCS นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37องศาเซลเซียส 5% $CO_2$ ใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 11 วันหรือสังเกตจากเซลล์ลูกผสมตายเกือบหมด จึงปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำเอาสารละลายไปแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป

**9.การแยกโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์**

แยกแอนติบอดีด้วยการตกตะกอนอิมมูโนโกลบูลิน จี (Immunoglobulin G, IgG) ตามวิธีของ Arvieux and Williams (1988) ดังนี้ นำเอาน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีแอนติบอดี 20 มล. มาปั่นแยกที่แรงเหวี่ยงมากกว่า 10,000 xg นาน 30 นาที เก็บส่วนของเหลว เติม 18 % $Na_2SO_4$ (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 5,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากส่วนที่เป็นตะกอนเติม 16 % $Na_2SO_4$ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไป 33 มล. บ่มไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 5,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอน นำส่วนที่เป็นตะกอนเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไป dialyse ในสารละลาย 50 mMNaCl นาน 3 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยน 50 mMNaCl วันละครั้ง จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน

**ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm x mg/ml.....(1)**

**1.4**

**10. การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย Column Chromatography**

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย thiophilic column chromatography เทสารละลาย ก. (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ลงในคอลัมน์ปริมาตร 100 มล.ปล่อยให้ของเหลวไหลผ่านในอัตรา 1 มิลลิลิตร/ 5 นาที แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการตกตะกอน มาเติม $K_2SO_4$ ให้มีความเข้มข้น 0.5 M ค่อย ๆ หยดสารละลายลงในคอลัมน์จนหมดแล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย ก. ปริมาตร 50 มิลิลตร แล้วล้างออกด้วยสารละลาย ข. (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บของเหลวที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงไว้เพื่อนำไปใช้ต่อไป และล้าง column ด้วยสารละลาย ข. ต่อไปจนได้สารละลายค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 0.005 ซึ่งแสดงว่าไม่เหลือส่วนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากนั้นจึงล้างด้วย สารละลาย ก. อีก 30 – 50 มิลลิลิตร ก่อนเก็บ column ไว้ใช้ในครั้งต่อไป

**การทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วย Column Chromatography**

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย thiophilic column chromatography เทสารละลาย ก. (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ลงในคอลัมน์ปริมาตร 100 มล.ปล่อยให้ของเหลวไหลผ่านในอัตรา 1 มิลลิลิตร/ 5 นาที แล้วนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการตกตะกอน มาเติม $K_2SO_4$ ให้มีความเข้มข้น 0.5 M ค่อย ๆ หยดสารละลายลงในคอลัมน์จนหมดแล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย ก. ปริมาตร 50 มิลิลตร แล้วล้างออกด้วยสารละลาย ข. (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข) ตรวจค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เก็บของเหลวที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงไว้ เพื่อนำไปใช้ต่อไป และล้าง column ด้วยสารละลาย ข. ต่อไปจนได้สารละลายค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 0.005 ซึ่งแสดงว่าไม่เหลือส่วนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากนั้นจึงล้างด้วย สารละลาย ก. อีก 30 – 50 มิลลิลิตร ก่อนเก็บ column ไว้ใช้ในครั้งต่อไป

**การตรวจสอบความแม่นยำของ เอช-วาย แอนติบอดี ด้วย เทคนิค Immunofluorescence microscopy**

นำเม็ดเลือดขาวของแพะเพศผู้จำนวน 10 ตัว และเพศเมียจำนวน 10 ตัว โดยปรับให้มีจำนวนเซลล์ในการเข้าศึกษาที่กันคือ $1x\ 10^6$ ต่อ 1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับเอช-วาย แอนติบอดีที่ระดับความเข้มข้น 1:200 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย Goat anti mouse IgG ติดฉลากด้วย FITC ความเข้มข้น 1 : 1000 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ความเร็วรอบ

1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้นเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปตรวจสอบการเรืองแสงด้วยกล้อง Fluorescence microscopy

**การผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง**

การทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จะใช้วิธีใดก็ได้ แต่ที่นิยม มักทำการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยโยนีเทียม ซึ่งจะได้น้ำเชื้อที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง มากกว่าการรีดเก็บโดยใช้ไฟฟ้า (Electroejaculater) หลังจากได้น้ำเชื้อออกมาแล้ว ทำการตรวจคุณภาพ ควรนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที ขณะที่ทำให้น้ำเชื้อเย็นลง แบ่งน้ำเชื้อทำการตรวจคุณภาพพร้อม ๆ กันไป เมื่อได้น้ำเชื้อคุณภาพดี ก็ทำการตรวจหาความเข้มข้น เพื่อทำการเจือจางน้ำเชื้อ

การเจือจางน้ำเชื้อ มีหลักเกณฑ์ว่า ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง (Deep frozen semen) จะทำการผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งใส่หลอดเล็ก ๆ (Ministraw) มีปริมาตร 0.25 ซีซี ซึ่งแต่ละหลอดจะต้องมีตัวอสุจิประมาณ 20-30 ล้านตัว ดังนั้น ในการเจือจางน้ำเชื้อ จึงต้องคำนวณที่ตัวอสุจิ 20-30 ล้านตัว ต่อ ปริมาตรน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 0.25 ซีซี หรือ 80-120 ล้านตัว ต่อ ปริมาตรน้ำเชื้อ ที่เจือจางแล้ว 1 ซีซี หลังจากทำน้ำเชื้อให้เย็นลง(Cool down) จากอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เหลือ 5 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 90 นาทีแล้ว ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออีกครั้งหนึ่ง โดยตรวจดูเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิต แล้วเก็บน้ำเชื้อต่อไปอีกจนครบ 4 ชั่วโมง เพื่อให้สารเจือจางน้ำเชื้อทำงานจนสมบูรณ์ ระยะเวลาตั้งแต่เติมสารเจือจางน้ำเชื้อ จนทำให้น้ำเชื้อเย็นลงจากอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนเหลือ 5 องศาเซลเซียส และเก็บต่อไปอีกที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสจนครบ 4 ชั่วโมง เรียกระยะเวลานี้ว่า ระยะเวลาสมดุล (Equilibration Time) จึงทำการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอด ด้วยเครื่องบรรจุอัตโนมัติ เมื่อน้ำเชื้อถูกบรรจุลงในหลอดแล้ว ทำการเรียงหลอดน้ำเชื้อลงบนถาด (Rack) ให้หลอดน้ำเชื้อเรียงตัวเป็นแถวเดียว ไม่มีการซ้อนทับกัน เพื่อขณะทำการลดอุณหภูมิในขั้นตอนต่อไป น้ำเชื้อทุกหลอดจะได้รับความเย็นเท่าๆกันในการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดน้ำเชื้อ และการเรียงหลอดน้ำเชื้อบนถาด จะต้องทำในตู้ซึ่งมีอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิเกิดการเปลี่ยนแปลงอาจส่งผลให้ตัวอสุจิตายได้

หลังจากทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อจนอยู่ที่ -140 องศาเซลเซียสภายในเวลา 6 นาทีเรียบร้อยแล้ว จึงนำหลอดน้ำเชื้อแช่ลงในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อนี้ไว้ใช้ได้นานหลายสิบปี เรียกว่า น้ำเชื้อแช่แข็ง (Deep frozen semen) และเรียกวิธีการผลิตนี้ว่า การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากแช่น้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวได้ 24 ชั่วโมง จะนำน้ำเชื้อแช่แข็งนี้มาตรวจคุณภาพอีกครั้ง สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งบางหลอดที่ผลิตในชุดเดียวกัน แช่ลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสทันที โดยแช่น้ำอุ่นนาน 30 วินาที เรียกว่าการละลาย

น้ำเชื้อ (Thaw) จากนั้นทำการตรวจคุณภาพโดยดูจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตควรมีมากกว่า 40 % ของ 20-30 ล้านตัว คือ 8-12 ล้านตัว ถ้าน้อยกว่านี้ น้ำเชื้อที่ผลิตได้ในชุดนี้จะมีคุณภาพต่ำ

**การคัดเพศน้ำเชื้อด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิกซิตี้**

ในขั้นตอนการคัดเพศน้ำเชื้อโดยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน จะทำการนำน้ำเชื้อแพะจำนวน 3 ตัว ที่ผ่านการประเมินค่าเบื้องต้น ประกอบด้วยการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ความเข้มข้น(motility > 50 %) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสเปิร์ม (Extender) ทั้ง 7 กลุ่มการทดลอง โดยทำการศึกษาจำนวน 40 ซ้ำในแต่ละกลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 1) โดยมีแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจนในอาหารเลี้ยงสเปิร์ม สัดส่วน ที่แตกต่างกันตามกลุ่มการทดลอง บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที ปั่นให้สเปิร์มเกิดการตกตะกอนที่ความเร็ว 900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสเปิร์มโดยมี Complement ของหนูตะเภาในอาหารเลี้ยงสเปิร์มในสัดส่วน ที่แตกต่างกันตามกลุ่มการทดลอง บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นให้สเปิร์มเกิดการตกตะกอนที่ความเร็ว 900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ภายหลังจากการปั่นจะเก็บสเปิร์มที่มีชีวิตรอดโดยที่สเปิร์มจะว่ายขึ้นสู่ชั้นบนของหลอดทดลอง จากขั้นตอนนี้จะได้ผลิตภัณฑ์น้ำเชื้อแพะที่ผ่านการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน โดยเก็บสเปิร์มทั้งหมดที่ว่ายขึ้นมาไปวิเคราะห์สัดส่วนเพศด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

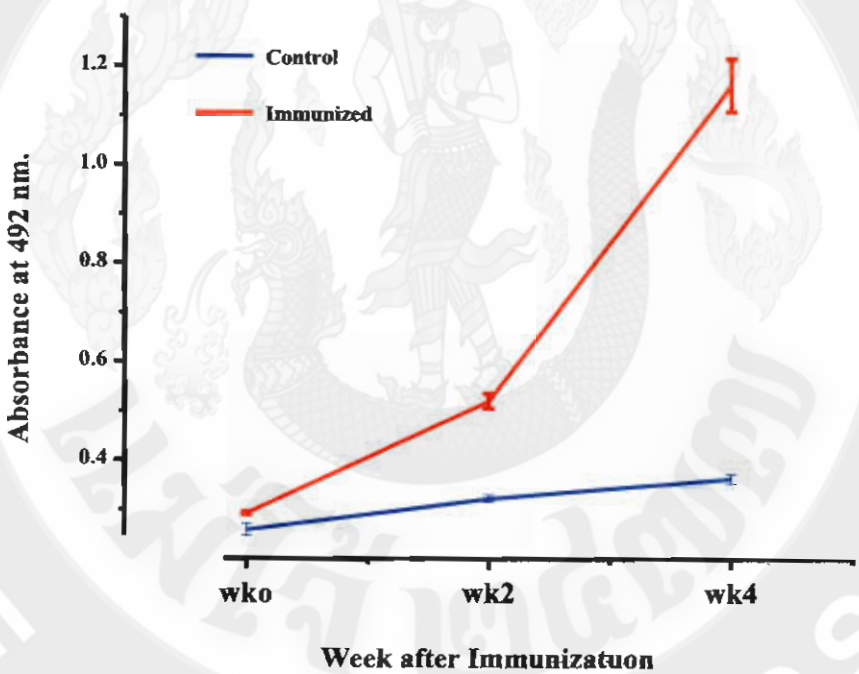
ตารางที่ 1. แสดงการแบ่งกลุ่มการวิจัยการคัดเพศน้ำเชื้อโดยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอล แอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน

| Number | Group | Antibody dilution | Complement dilution |
|---|---|---|---|
| 1 | control | 0 | 0 |
| 2 | 10-50 | 10 | 50 |
| 3 | 10-100 | 10 | 100 |
| 4 | 50-50 | 50 | 50 |
| 5 | 50-100 | 50 | 100 |
| 6 | 100-50 | 100 | 50 |
| 7 | 100-100 | 100 | 100 |

# ผลการวิจัย

## 4.1 ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน

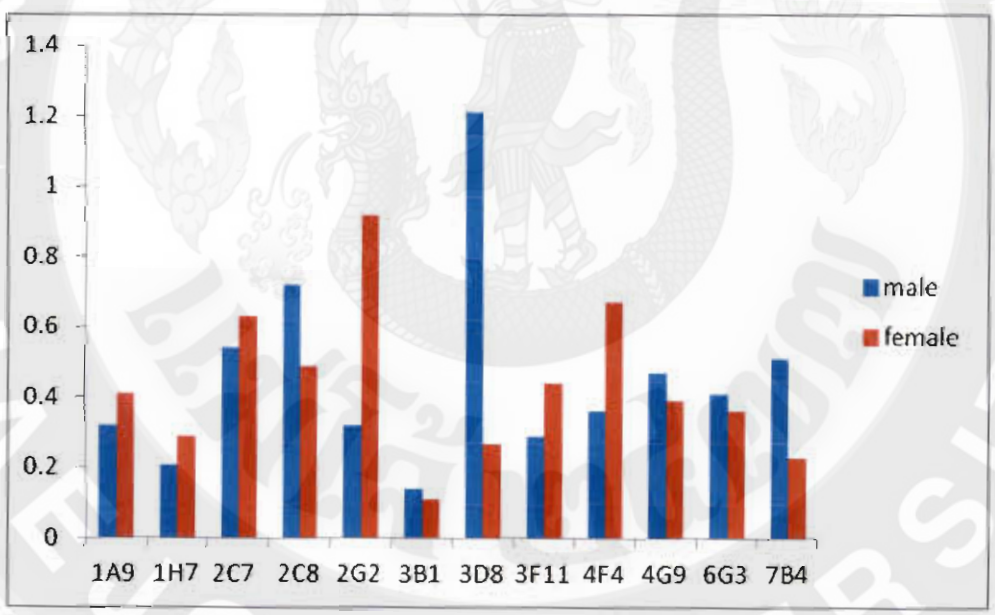
การกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/C ทุก 2 สัปดาห์ เป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ วันที่ 0 สัปดาห์ที่ 2 และ 4 และเก็บเลือดเพื่อนำมาวัดการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้การกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 1)



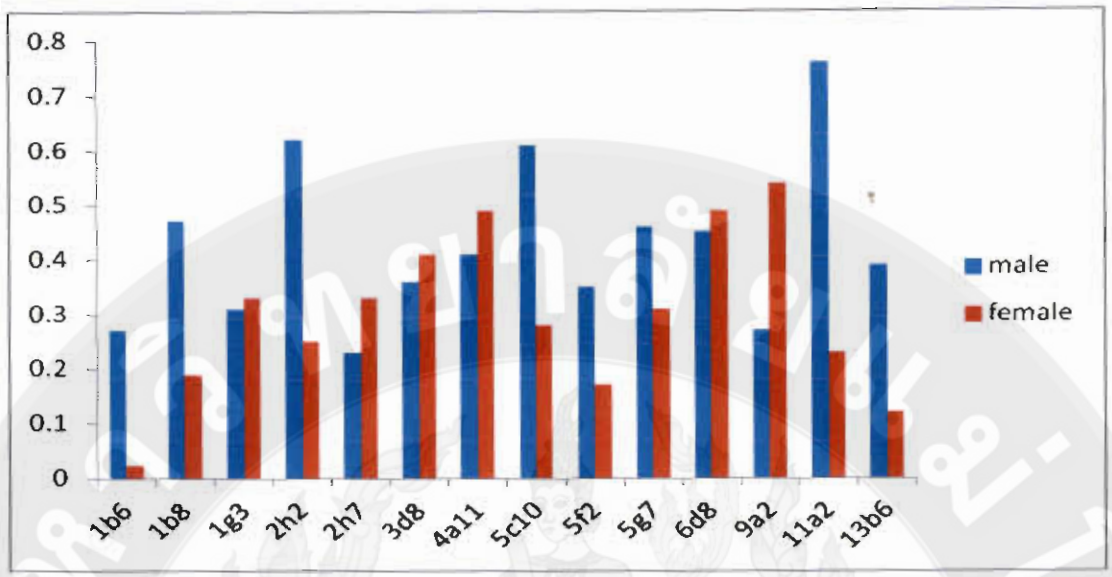

**ภาพที่ 1.** ผลการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวสายพันธุ์ Balb/C.

**4.2 ผลการผลิตเซลล์ลูกผสม**

การเชื่อมเซลล์ (fusion) ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูตอบสนองต่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 ปรากฏกลุ่มเซลล์ลูกผสมหลังจากการเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT แล้วประมาณ 7 วัน พบว่าเกิดโคลนของเซลล์ลูกผสมจำนวน 119 โคลน จากทั้งหมด 450 หลุม คิดเป็น 26.4 % ของการเชื่อมเซลล์ และเมื่อนำ 119 โคลนมาทำการตรวจการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนพบว่ามีโคลนจำนวน 12 โคลนจากทั้งหมด 119 โคลนที่ตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจน คิดเป็น 10.08 % ของโคลนที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 2) จากนั้นเลือกโคลนที่ให้ค่าตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจนที่สูงที่สุดคือ โคลนจากเพลทที่ 3 หลุม D8 ไปทำการแยกโคลนเดี่ยวเป็นเวลา 14-20 วันได้โคลนเดี่ยวทั้งหมด 14 โคลน ซึ่งได้ค่าการตอบสนองตามภาพที่ 3 และได้เลือกโคลนหมายเลข 3D8-11A2 มาใช้ในการศึกษา




**ภาพที่ 2** กราฟแสดงค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากจำนวนโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจำนวน 12 โคลน




**ภาพที่ 3** กราฟแสดงค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากการตอบสนองของแอนติบอดีของโคลน 3D8 ที่ทำการแยกโคลนเดี่ยวซึ่งได้ เลือกโคลน 3D8-11A2 มาใช้ในการศึกษา

**4.3 ปริมาณแอนติบอดีจากการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์**

หลังจากการแยกโคลนเดี่ยวได้นำโคลนที่ให้ค่าผลต่างการดูดกลืนแสงที่สูงสุดคือโคลน 3D8-11A2 มาทำการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี *in vitro* โดยเลี้ยงเซลล์ด้วย serum free media เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ มาตกตะกอนโปรตีนและผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟี ได้ปริมาณแอนติบอดีประมาณ1-2 มิลลิกรัมต่อ 50 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์

**การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย**

สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายทั้งหมด 125 มล. ดังตารางที่ 2 และนำมาตรวจสอบความจำเพาะต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เป็นค่าเฉลี่ย±SE ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร พบว่ามีความจำเพาะต่อเพศผู้และเพศเมียเป็น 0.44±0.03 (n=10) และ 0.13±0.01 (n=10) ตามลำดับ แสดงว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้ ดังตารางที่ 3 จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยคอลัมที่มีโปรตีนจี ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มล. นำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง

spectrophotometer พบว่าในทุกหลอดของแต่ละชุดมีความเข้มข้นของโปรตีนใกล้เคียงกัน โดยเฉลี่ยทั้ง 10 ชุด มีค่าความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย 0.5 mg/ml±0.004 (n=100) ดังตารางที่ 4 แต่เมื่อนำมาตรวจสอบความจำเพาะต่อเพศผู้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าเฉพาะ 2 หลอดแรกของทุกๆ ชุดมีความจำเพาะต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย เฉลี่ยคือ 2.12±0.12 (n=20) ดังตารางที่ 5 แยกเก็บเฉพาะสองหลอดแรก ซึ่งมีค่าความเข้มข้นโปรตีนเฉลี่ย 0.51±0.008 mg/ml (n=20) แล้วรวบรวมแอนติบอดีที่ผลิตได้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งคัดเพศต่อไป

**ตารางที่ 2** แสดงระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาและปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตได้

| ครั้งที่ | งาน | ปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ (ml) |
|---|---|---|
| 1 | thaw cell H-Y # 3D8 petridish | 50 |
| 2 | ขยายลง 24 well (P1) | 400 |
| 3 | ขยายลง 24 well (P2) | 450 |
| 4 | ขยายลง 24 well (P3) | 350 |
| 5 | ขยายลง 24 well (P4) | 350 |
| ปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด | | 1,600 |
| ผลิตเป็น Monoclonal antibody (ml) | | 125 |

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้



**ตารางที่ 3 แสดงค่า O.D. จากเครื่อง ELISA reader ในการตรวจวัดความจำเพาะต่อเพศโดยใช้ม้ามโคเป็นแหล่งแอนติเจน จากการสุ่มตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีจำนวน 8 หลอด**

| หลอดที่ | ค่า O.D. | |
|---|---|---|
| | แหล่งแอนติเจนม้ามโคเพศผู้ | แหล่งแอนติเจนม้ามโคเพศเมีย |
| BG | 0.091 | 0.085 |
| 1 | 0.489 | 0.102 |
| 2 | 0.356 | 0.095 |
| 3 | 0.468 | 0.115 |
| 4 | 0.545 | 0.126 |
| 5 | 0.565 | 0.195 |
| 6 | 0.515 | 0.149 |
| 7 | 0.415 | 0.2 |
| 8 | 0.335 | 0.099 |

**ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml) ของไมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้**

| หลอดที่ | ค่าความเข้มข้นโปรตีน (mg/ml) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ชุดที่ 1 | ชุดที่ 2 | ชุดที่ 3 | ชุดที่ 4 | ชุดที่ 5 | ชุดที่ 6 | ชุดที่ 7 | ชุดที่ 8 | ชุดที่ 9 | ชุดที่ 10 | |
| blank | 0 | | | | | | | | | | mean± se (n=10) |
| 1 | 0.58 | 0.45 | 0.53 | 0.53 | 0.53 | 0.48 | 0.53 | 0.51 | 0.49 | 0.53 | 0.52±0.010 |
| 2 | 0.53 | 0.43 | 0.50 | 0.51 | 0.49 | 0.53 | 0.46 | 0.51 | 0.48 | 0.51 | 0.47±0.008 |
| 3 | 0.50 | 0.51 | 0.50 | 0.50 | 0.51 | 0.48 | 0.48 | 0.50 | 0.43 | 0.54 | 0.50±0.007 |
| 4 | 0.53 | 0.50 | 0.48 | 0.49 | 0.46 | 0.53 | 0.50 | 0.45 | 0.49 | 0.55 | 0.51±0.011 |
| 5 | 0.48 | 0.45 | 0.50 | 0.54 | 0.48 | 0.53 | 0.45 | 0.51 | 0.48 | 0.72 | 0.48±0.008 |
| 6 | 0.54 | 0.45 | 0.45 | 0.45 | 0.46 | 0.54 | 0.48 | 0.54 | 0.51 | 0.48 | 0.50±0.011 |
| 7 | 0.50 | 0.48 | 0.51 | 0.48 | 0.45 | 0.50 | 0.51 | 0.46 | 0.49 | 0.46 | 0.50±0.009 |
| 8 | 0.48 | 0.46 | 0.51 | 0.53 | 0.45 | 0.48 | 0.53 | 0.48 | 0.53 | 0.49 | 0.50±0.008 |
| 9 | 0.53 | 0.48 | 0.48 | 0.57 | 0.48 | 0.43 | 0.51 | 0.50 | 0.51 | 0.50 | 0.49±0.008 |
| 10 | 0.50 | 0.48 | 0.48 | 0.53 | 0.50 | 0.54 | 0.53 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.53±0.023 |

**ตารางที่ 5** แสดงค่า O.D. จากการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเพศผู้ด้วยวิธี indirect ELISA

| | หลอดที่ | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ชุดที่ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| BG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 2.96 | 2.76 | 0.65 | 0.57 | 0.66 | 0.61 | 0.5 | 0.51 | 0.51 | 0.71 |
| 2 | 2.72 | 2 | 0.6 | 0.72 | 0.68 | 0.62 | 0.51 | 0.5 | 0.5 | 0.48 |
| 3 | 1.81 | 2.86 | 0.63 | 0.72 | 0.58 | 0.52 | 0.57 | 0.51 | 0.49 | 0.49 |
| 4 | 2.76 | 1.82 | 0.65 | 0.63 | 0.54 | 0.57 | 0.48 | 0.5 | 0.46 | 0.44 |
| 5 | 2.51 | 1.9 | 0.31 | 0.34 | 0.31 | 0.31 | 0.33 | 0.42 | 0.44 | 0.31 |
| 6 | 2.31 | 1.88 | 0.37 | 0.33 | 0.35 | 0.44 | 0.34 | 0.44 | 0.49 | 0.42 |
| 7 | 1.17 | 1.24 | 0.63 | 0.72 | 0.58 | 0.52 | 0.48 | 0.56 | 0.93 | 0.43 |
| 8 | 1.14 | 1.99 | 0.32 | 0.41 | 0.32 | 0.43 | 0.33 | 0.44 | 0.44 | 0.45 |
| 9 | 1.81 | 2.2 | 0.26 | 0.35 | 0.38 | 0.44 | 0.37 | 0.45 | 0.42 | 0.43 |
| 10 | 2.37 | 2.23 | 0.55 | 0.57 | 0.55 | 0.6 | 0.58 | 0.57 | 0.56 | 0.73 |
| mean ± se (n=10) | 2.16±0.20 | 2.09 ±0.15 | 0.49 ±0.05 | 0.54 ±0.05 | 0.49 ±0.45 | 0.50 ±0.03 | 0.45 ±0.03 | 0.49 ±0.01 | 0.52 ±0.05 | 0.49 ±0.04 |

**4.4 ผลการวัดความแม่นยำของ เอช-วาย เอนติบอดี**

เอช-วายแอนติเจนเป็นเอนติเจนที่พบในเพศผู้จากการตรวจเอกสารของงานทดลองที่ผ่านมา สามารถพบ เอช-วาย แอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของเพศผู้ ดั้งนั้นจึงได้นำเซลล์เม็ดเลือดขาวของแพะเพศผู้และเพศเมียเป็นแหล่งแอนติเจนในการทดสอบความแม่นยำของแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค Immunofluorescence microscopy พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเพศผู้ 89 % (ตารางที่ 6)

**ตารางที่ 6** แสดงการตอบสนองของแอนติบอดีและแอนติเจนบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศผู้และเพศเมียโดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy

| Sex (n) | Average Percentage of Positive signal on immunofluorescence | ±SD | ±SE | Max | Min | $X^2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Male (10) | 89[a] | 2.0 | 1.9 | 93 | 86 | 152.16 |
| Female (10) | 11[b] | 1.6 | 1.5 | 5 | 0 | |

[a,b] means with significance ( $p<0.001$)

**4.4 ผลการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน**

ผลการคัดเพศด้วยด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน ต่อน้ำเชื้อโคนมพบว่าพ่อโคทั้ง 10 ตัวมีแนวโน้มกลุ่มการทดลองที่ใช้แอนติบอดี 1:10 และคอมพลิเมนต์ 1:50 ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิคให้ผลการเพิ่มขึ้นของสเปิร์มเอ็กซ์มากกว่าทุกกลุ่มการทดลองซึ่งแสดงผลดังตารางที่7

**ตารางที่ 7** แสดงการเพิ่มขึ้นของสเปิร์มเพศเมียภายหลังการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วาย แอนติเจน โดยการวัดด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy (Ab: Antibody, Com: Complement)

| Goat | % Y bearing sperm ($\chi \pm SE$, n = 6) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cytotoxicity condition (Sperm : MAb : Complement) | | | | | | |
| | $10^6$ : 0 : 0 | $10^6$ : 1/10 : 1/50 | $10^6$ : 1/10 :1/100 | $10^6$ : 1/50 : 1/50 | $10^6$ : 1/50 : 1/100 | $10^6$ : 1/100 :1/50 | $10^6$ : 1/10 : 1/100 |
| 1 | $52.09 \pm 0.67^{C}$ | $22.26 \pm 1.35^{A}$ | $42.63 \pm 1.45^{B}$ | $46.84 \pm 3.59^{BC}$ | $43.35 \pm 4.64^{BC}$ | $46.03 \pm 3.52^{BC}$ | $42.00 \pm 2.16^{B}$ |
| 2 | $47.76 \pm 2.20^{BC}$ | $17.49 \pm 2.37^{A}$ | $40.90 \pm 2.54^{B}$ | $48.78 \pm 2.77^{BC}$ | $46.20 \pm 4.83^{BC}$ | $51.14 \pm 1.65^{C}$ | $50.47 \pm 1.29^{C}$ |
| 3 | $46.81 \pm 1.65^{C}$ | $25.49 \pm 1.20^{A}$ | $40.78 \pm 2.61^{BC}$ | $41.93 \pm 1.75^{BC}$ | $44.15 \pm 1.60^{BC}$ | $38.34 \pm 3.08^{B}$ | $46.12 \pm 1.26^{C}$ |

# วิจารณ์ผลและสรุปผลการวิจัย

## โมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน

กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/c โดยฉีดสเปิร์มแพะ ให้ได้จำนวน $2x10^6$ เซลล์ต่อปริมาตร100 ไมโครลิตรผสมรวมกับ Freund's complete adjuvant 100ไมโครลิตรทุก 2 สัปดาห์เป็นจำนวน 3 ครั้ง คือ วันที่ 0 สัปดาห์ที่ 2 และ 4 และเก็บเลือดเพื่อนำมาวัดการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนโดยวิธี indirect ELISA พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้การกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีได้มากกว่ากลุ่มควบคุม จากคุณสมบัติของแอนติเจนเมื่อเข้าสู่ในร่างก่ายของสัตว์ (immunization) จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นเรียกว่า immune response (Abbas *et al.,* 1994) เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกายจะเกิดการผลิตแอนติบอดีมากำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นเพื่อป้องกันการเกิดอันตรายแก่ร่างกาย ในการจะกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนใดๆก็ตาม เนื่องจากการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนจากการใช้สเปิร์มแพะเป็นตัวกระตุ้นทำให้หนูได้รับสเปิร์มทั้งเพศผู้และเพศเมีย การทดลองที่ผ่านมา ใช้เซลล์ม้ามเพศผู้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน (Goldberg *et al.,* 1971; Zaborski, 1979; Selden, 1982; Hoppe and Koo, 1984; Brunner *et al.,* 1984; Iyer *et al.,* 1989; Booman *et al.*,1989; Ali *et al.,* 1990) ในขณะที่การทดลองครั้งนี้ใช้สเปิร์มจากน้ำเชื้อแพะเพศผู้แทนและสามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนได้เช่นเดียวกับเซลล์ม้าม ทำให้มีความมั่นใจได้มากกว่าแอนติบอดีที่มาจากการกระตุ้นด้วยเซลล์ม้าม เนื่องจากเป้าหมายของการทดลองครั้งนี้เป็นการกระทำต่อเซลล์สเปิร์มโดยตรง ซึ่งเอช-วายแอนติเจนเป็นแอนติเจนที่จำเพาะเพศผู้ พบได้ที่ผิวของเซลล์อสุจิ จากวิจัยที่ผ่านมา เอช-วาย แอนติเจน เป็นแอนติเจนที่เป็นเอนติเจนที่ส่งผ่านในเพศผู้เท่านั้น (Goldberg *et al.,* 1971) สมมุติฐานที่ผ่านมามีความส่งสัยว่าเอช-วายแอนติเจนแสดงออกมาในช่วงใดของขบวนการ Spermatogenesis พบว่าการแสดงออกของเอช-วายแอนติเจนพบตั้งแต่ Germ cells โดยจะพบการแสดงออกของ receptor ต่อเอช-วายแอนติเจนบริเวณผิวเซลล์ (Bradly และ Heslop, 1988) จะเห็นได้จากรายงานของ Koo *et al.*(1973) ที่ใช้เทคนิค Immunoelectronmicro ที่ตรวจพบเอนติเจนบนผิวเซลล์อสุจิของหนู C56BL/6 เช่นเดียวกับ Zaborski ในปี 1979 พบเอช-วายแอนติเจนที่ผิวเซลล์อสุจิของหนูโดยเทคนิค Immunofluorescent และในน้ำเชื้อโค Peter *et al.*(1993) ได้ใช้เทคนิค Immunofluorescent ในการตรวจหาแอนติเจนที่ผิวเซลล์อสุจิโคและ สามารถแยกอสุจิที่ถูกจับด้วย โมโนโคลนอล ต่อเอช-วาย แอนติเจนด้วย

Flow cytometer ในครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำเทคนิค Immunohistochem มาใช้ในการตรวจสอบเซลล์อสุจิที่มีการจับของโมโนโคลนอล ต่อเอช-วาย แอนติเจน ต่อ เอช-วายแอนติเจนที่ผิวเซลล์อสุจิ (ภาพที่ 4-8)

การวัดการตอบสนองของหนูขาวตัวเล็กสายต่อเอช-วายแอนติเจนนั้นได้ใช้วิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Link Immunosorbent Assay, ELISA) (Iyer *et al.*, 1989) ในรูปแบบของ indirect ELISA โดยใช้เซลล์ม้ามโดเพศผู้ เป็นแอนติเจน เปรียบเทียบได้กับวิธีวิธีวัดเอช-วายแอนติเจนอื่น เช่น Radioimmunoassay (Reillyand Goldberg, 1984; Bradley and Heslop, 1988) เทคนิค Microcytotoxicity (Bradley and Heslop, 1988) เทคนิค Immunofluorescent (Zaborski, 1979) การนำเทคนิค ELISA มาใช้ในการตรวจปฏิกิริยา ระหว่างแอนติบอดีกับเอช-วายแอนติเจน ELISA ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วและมีความแม่นยำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทดลองด้านไซโตทอกซิคซิตี้อื่นได้เป็นอย่างดี

ผลการผลิตเซลล์ลูกผสม หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ Balb/C สามารถผลิดแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่ให้ค่าแอนติบอดีสูงสุดภายในเวลา 4 สัปดาห์หลังการกระตุ้น เซลล์ม้าม (spleenocyte) เชื่อมเข้ากับเซลล์ ไมอิโลมา (Myeloma) สายพันธุ์ X63Ag8.653 ด้วยโพลีเอทีรีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ความเข้มข้น 50 % ผสมกับ 7.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอัตราส่วน 1:2 (Berrebeck and Mollier, 1986) เป็นเวลา 45 วินาทีทำให้ผิวของเซลล์ไมอิโลมามีการอ่อนตัวและเกิดการเชื่อมของเซลล์ทั้งสองชนิด หลังจากการเชื่อมเซลล์ ระหว่างเซลล์ม้ามของหนูที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 หลังจากการเปลี่ยนเป็นสารละลาย HT แล้วประมาณ 7 วัน พบว่าเกิดโคลนของเซลล์ลูกผสมทั้งหมดจำนวน 119 โคลน พบว่ามี 12 โคลนที่แสดงความจำเพาะเจาะจงต่อเอช-วายแอนติเจน หรือประมาณ 10.08 % ของโคลนทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์มีเป็นจำนวนมาก แต่กระนั้นระบบภูมิคุ้มกันยังคงสามารถค้นพบและสร้างแอนติบอดีขึ้นมาต่อต้านได้ เพื่อให้ได้โคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนมากพอจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนครั้งในการเชื่อมเซลล์ให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามคณะวิจัยได้เลือกโคลนที่ให้ผลตอบสนองต่อเอช-วายแอนติเจนที่สูงสุดคือ โคลนจากเพลทที่ 3 หลุม D8 ไปทำการแยกโคลนเดี่ยวเป็นเวลา 14-20 วันได้โคลนเดี่ยว เซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นมานั้นภายในหลุมเดียวกันพบว่ามีโคลนเกิดขึ้นหลายโคลนดังนั้นจึงต้องทำการแยกโคลนเดี่ยวเพื่อให้ได้โคลนที่ผลิดแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนเพียงอย่างเดียว พบว่าเซลล์ลูกผสมของหลุมที่ 11A2 สามารถให้หารตอบสนองของแอนติบอดีสูงที่สุด

การจำแนกชนิดของแอนติบอดีโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนที่ 3D8-11A2 เมื่อนำมาจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิต

ได้นั้นเป็น IgG จากการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจนในหนูขาวตัวเล็กสายนั้นได้ฉีดทุก 2 สัปดาห์อิมมูโนโกลบูลินที่เกิดขึ้นจึงเป็นชนิดจีเพราะอิมมูโนโกลบูลินชนิดจีจะเพิ่มปริมาณสูงมากกายหลังเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงกระตุ้นครั้งที่สอง (secondary response) ซึ่งแตกต่างจากศึกษาเกี่ยวกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่ผ่านมา พบว่าแอนติบอดีที่เกิดจะเป็น IgM เนื่องจากเอช-วายแอนติเจนเป็นกลุ่มของ glycoprotein ที่ส่งผลต่อการกระตุ้น IgM หรือการทำ hyper immunization ก็เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิด IgM ได้เช่นกัน (Booman *et al.*, 1989; Brunner *et al.*, 1984; Iyer *et al.*, 1989; Booman *et al.*, 1989; Ali *et al.*, 1990) ข้อแนะนำการตรวจชนิดของแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่จะเกิดขึ้นหลังการกระตุ้นเพื่อความแม่นยำการตรวจเอช-วายแอนติเจนโดยความแม่นยำจาก IgG ในช่วงวันที่ 10 – 17 ของการกระตุ้นด้วยเซลล์ม้ามเป็นช่วงที่ IgG ถูกผลิตออกมาสูงสุดจากการตอบสนองระยะที่ 2 และเป็นช่วงที่เหมาะสมในการนำมาแอนติบอดีมาใช้ หรือนำผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

**Cytotoxicity Reaction**

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนโดยวิธี Immunofluorescence microscopy โดยใช้เม็ดเลือดขาว (Peripheral white blood cells) พบว่ามีความแม่นยำในการในการจำแนกเพศผู้ได้ถึง 89 % โดยมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นเพียง 11 % เท่านั้น ($P < 0.001$) เป็นการยืนยันว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ความแม่นยำมากกว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดี วิธี Immunofluorescence microscopy จะเป็นเครื่องมือหนึ่งในการวัดผลของปฏิกิริยาไซโตทอกซิคต่อการเปลี่ยนสัดส่วนของสเปิร์มวาย การพัฒนาเครื่องมือที่ใช้วัดอัตราส่วนเพศในน้ำเชื้อโดยเทคนิค Fluoresence – Activated Cell Sorter Analysis ที่ใช้ H-Y antibody ที่ติดสารฟลูออเรสเซนต์และนำไปนับแยกโดย Flow cytometer จะพบอัตราส่วนจำนวนสเปิร์มเอ็กซ์และสเปิร์มวายที่ 46.7:53 (Ali *et al.*, 1990) จากรายงานของ (Seidal *et al.*, 1990) ที่ได้ใช้เทคนิค Flow cytometer ในการคัดเพศพบว่าน้ำเชื้อที่ผ่านขบวนการดังกล่าวสามารถแยกเพศได้ผู้ถึง 15 % และเพศเมีย 85 % ทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบเพศมีอยู่ที่ประมาณ 90 % โดยเทคนิค Flow cytometer (Johnson&Welch,1999)เช่นเดียวกับการใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบสัดส่วนเพศ. พบว่าสัดส่วนเพศผู้และเพศเมียที่เกิดขึ้นภายหลังการคัดเพศด้วยเทคนิค Flow cytometer สามารถแยกสเปิร์มเอ็กซ์ 87% และ สเปิร์มวาย 84.8% (Kawarasaki *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค Flow cytometer ที่ต้องอาศัยการไหลผ่านของสเปิร์มในการตรวจนับ ถ้าไม่มีมาตราฐานของ

ความเร็วที่แน่นอนในหน่วยงานวิจัยสัดส่วนเพศที่ได้ก็จะมีความแตกต่างกันซึ่ง (Johnson&Welch,1999)ได้รายงานถึงการปล่อยการวิ่งของสเปิร์มในการผ่านเครื่อง Flow cytometer ที่ระดับความเร็ว 14,000 สเปิร์มต่อวินาทีประสิทธิภาพในการจำแนกเพศได้ประมาณ 80-90 % แต่เมื่อเพิ่มความเร็วเพื่อลดระยะเวลาในการคัดเพศที่ระดับความเร็ว 30,000 สเปิร์มต่อวินาที ประสิทธิภาพในการจำแนกเพศลดลงเหลือ 70-80 % ทำให้ขาดความแม่นยำในการตรวจสอบเพศถึง 30 % ทำให้สเปิร์มส่วนดังกล่าวถึงคัดทิ้งเมื่อผ่านเครื่อง Flow cytometer อันมีผลมาจากอัตราความเร็วที่ไม่เหมาะสม ทำให้จำนวนสเปิร์มที่ผ่านมาการซ้อนทับกัน สเปิร์มไม่ได้อยู่ในลักษณะที่เหมาะสมกับกับการส่องผ่านของแสงเลเซอร์ทำให้การนับแยกสัดส่วนเพศมีการเปลี่ยนแปลงไป อัตราการสูญเสียในระหว่างการคัดแยกเพศด้วย cell sorter ประมาณ 8.8% (Seidel *et al.*, 1999) และอาจเกิดจากสภาพการย้อมสีที่ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ cell sorter ได้เช่นกัน ( Lu *et al.*, 1990)

ผลการคัดเพศด้วยด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจน ต่อน้ำเชื้อโคนมพบว่ากลุ่มการทดลองที่ใช้แอนติบอดี 1:10 และคอมพลิเมนต์ 1:50 ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิคให้ผลการเพิ่มขึ้นของสเปิร์มที่มีการตายมากกว่าทุกกลุ่มการทดลอง อันเป็นผลมาจากปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วาย แอนติเจนโดยการทำงานร่วมกันกับโปรตีนคอมพลิเมนต์จากหนูตะเภาผ่านวิถีแบบ Classical pathway ในการคัดเพศน้ำเชื้อ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะเวลาและสัดส่วนของแอนติบอดีต่อการทำงานของคอมพลิเมนต์ และต้องมีสัดส่วนที่เหมาะสมจึงจะให้ผลของปฏิกิริยาไซโตทอกซิคสูงที่สุด และที่สำคัญคืออุณหภูมิที่ต้องคงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่คอมพลิเมนต์ทำงานได้ดีที่สุดและต้องระวังเรื่องแสง เนื่องจากอสุจิไม่ชอบแสงจะทำให้ตัวอสุจิตาย และส่งผลที่ผิดพลาดในการทดลอง จากเงื่อนไขในปฏิกิริยาไซโตทอกซิคที่เหมาะสมที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีเจือจาง 1:10 และคอมพลิเมนต์ 1:50 เมื่อวัดสัดส่วนสเปิร์มเอกซ์: สเปิร์มวายโดยวิธี Immunofluorescence microscopy พบว่าได้สเปิร์มเอกซ์ : สเปิร์มวายเปลี่ยนจาก 50:50 เป็น 82 : 18 ในเทคนิคการคัดเพศเดียวกันนี้ได้มีการศึกษาในหนูเช่นกันพบว่าการคัดเพศโดยปฏิกิริยา Cytotoxicity ร่วมกับคอมพลิเมนต์จากกระต่าย (Goldberg et al. 1971) และคอมพลิเมนต์จากม้า (Bennett และ Boyse, 1973) แต่สัดส่วนเพศที่เกิดขึ้นก็ไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจนมากนัก

**ข้อเสนอแนะ**

1. การเตรียมเซลล์สเปิร์มจากน้ำเชื้อเพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเอช-วายแอนติเจน ควรปั่นล้างเซลล์ให้สะอาดไม่ควรมีการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเซลล์อสุจิ จะส่งผลต่อการกระตุ้นได้ ทุกครั้งในขั้นตอนการล้างควรดูดสารละลายเซลล์สเปิร์มปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาตรวจดูการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงน้ำเชื้อ

2. ในการพัฒนารูปแบบการคัดเพศน้ำเชื้อจากแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนที่ผลิตขึ้นร่วมกับComplement ในการผลิตน้ำเชื้อคัดเพศแช่แข็ง ควรมีการทดสอบการทำงานของแอนติบอดีและ Complement ทุกครั้งเมื่อทำการใช้แอนติบอดีและ Complement ที่ได้จากการผลิตใหม่แต่ละครั้ง รวมถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มน้ำเชื้อเพื่อคัดเพศ

3. การคัดเพศด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ควรศึกษาถึงระยะเวลาในการย้อม FITC และ แอนติบอดีที่ผลิตได้จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ควรนำมาเชื่อมกับ FITC โดยตรงเพื่อลดเวลาในการคัดเพศ

4.ศึกษาความแม่นยำในการคัดเพศโดยนำน้ำเชื้อไปวัดด้วยเทคนิค Flow cytometer หรือเทคนิค FISH เพื่อสร้างความมั่นใจในการตรวจสอบเพศ

5.พัฒนาการเชื่อมแอนติบอดีเข้ากับแม่เหล็ก เพื่อใช้ในการแยกเพสอสุจิทนการทำลายสำหรับผลิตน้ำเชื้อเพศผู้ความต้องการของผู้เลี้ยง และพัฒนางานวิจัยไปสู่สัตว์เศรษฐกิจอื่น เช่น โคเนื้อ กระบือ โคนม แกะ และ สุกร

# เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพาณิชย์.2549.สินค้าสุกร.[ระบบออนไลน์].แหล่งที่มา:http://www.dft.moc.go.th/the_files/$$16/level4/สินค้าสุกร.doc (30 ตุลาคม 2549)

กรมปศุสัตว์.2548.สถิติการส่งออกสุกร.[ระบบออนไลน์].แหล่งที่มา:http://www.dld.go.th/ict/yearly/yearly48/book/imex/imex05.xls (30 ตุลาคม 2549)

Abeydeera L.R., Johnson L.A., Welch G. R., Wang W. H., Boquest A. C., Cantley T. C., Rieke A. and Day B. N. 1998. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X ang Y chromosome bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 50:981-988.

Bodmer, M., Janett, F., Ha¨ssig, M., den Daas, N., Reichert, P., and Thun. R. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions .*Theriogenology In Press.*

Bradley, M.P. and Heslop, B.F. 1988. The distribution of sex-specific (H-Y) antigens within the seminiferous tubules of the testis: animmunohistochemical study. *Human Genetics* 79 : 347-351.

Christopher, J. and Goldberg, E.H.. 1976. H-Y (male) antigen : detection on eight-cell mouse embryos. *Science* 191:1134-1135.

Grossfeld, R., Klinc, P., Sieg, B.'and Rath, D . 2005. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology In Press.*

Grossfeld R.,Klinc P.,Sieg B. and Rath D. 2005.Production of piglets with sexed semen Employing a non-surgical insemination technique.*Theriogenology* 63:2269-2277.

Hendriksen P.J.M.,Tieman M.,Lende T.V.D. and Johnson L.A. 1993.Binding of anti-H-Y monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome bearing porcine and bovine sperm.*Molecular Reproduction and Development*.35:189-196.

Hoppe, P.C. and Koo, G.C. 1984. Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro. *Reproductive Immunology* 6:1-9.

Iyer, S. V., Nandedkar, T.D. and Hegde, U.C. 1989. Production of H- Y antibody in the ascites fluid of mouse and localization of the antigen on cell and tissues. *Gamete Research* 22 : 37 – 49.

Johnson, A.L., Rath, D., Vazquez, J.M., Maxwell, W.M.C., and Dobrinsky, J.R. 2005. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology* 63: 615–624.

Johnson, A.L. and Welch, G.R. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of x- and y-sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52 :1323-1341.

Lewis TS, Hunt JB, Aveline LD, Jonscher KR, Louie DF, Yeh JM, et al. Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. Mol Cell 2000;6:1343–54.

Reilly, B.D. and Goldberg, E.H. 1991. Evaluation of a solid-phase cellular enzyme immunoassayFor detection of the serologically defined male antigen. *Journal Immunological Methods* 142 : 121-126

Shapiro, M. and Erickson, R.P. 1981. Evidence that the serological determinant of H-Y antigen is carbohydrate. *Nature* 290 : 503-504.

Suh T.K., Schenk J.L. and Seidel G.E. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64:1035–1048.

Verrhuis, R., Hendriksen, P.J.M., Hengst, A.M., Kruijt, L., Tieman, M. and Booman, P. 1994. The production of anti-H-Y monoclonal antibodies: their potential use in a sex test for bovine embryo. *Veterinary immunology amd immunopathology* 42: 317-330.

Wachtel, S., Nakamura, D., Wachtel, G., Felton, W., Kent, M. and Jaswaney, V. 1988. Sex selection with monoclonal H-Y antibody. *Fertility and Sterility* 50 : 355-360.

White, K.L., Anderson, G.B., Pashen, R.L. and BonDurant, R.H. 1987. Detection of histocompatibility - Y antigen: identification of sex of per-implantation ovine embryos. *Journal Reproductive Immunology* 10 : 27-32.

Zaborski, P. 1979. Detection of H-Y antigen on mouse sperm by the use of *Staphylococcus aureus*. *Transplantation* 27 : 348-350.