ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล เพื่อการตรวจสัดในโคนม โดยวิธีการวิเคราะห์เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์

ชื่อผู้เขียน นางสาว กนกวรรณ ศรีงาม

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต เกษตรศาสตร์ (สาขาวิชาสัตวศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ. เพทาย	พงษ์เพียจันทร์	ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. ปรัชญา	คงทวีเลิศ	กรรมการ
ผศ.ดร. ทิพวรรณ	สิงห์ไตรภพ	กรรมการ

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออล เพื่อนำไปใช้เป็นแอนติบอดีในการวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธีเอนไซม์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ซึ่งนำไปพัฒนาในการใช้ตรวจการเป็นสัดของโคนม การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อฮอร์โมนอีสตราไดออล ได้ทำการเตรียมแอนติเจน คือ 17β-estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA สำหรับการกระตุ้นกระต่ายพันธุ์แคลิฟอร์เนียจำนวน 2 ตัว จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวของกระต่ายที่ได้ตรวจพบการผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเซ (Radioimmunoassay, RIA) มาเชื่อมกับเซลล์ไมอิโลมาสายพันธุ์ X63Ag8.653 ประมาณ 14-21 วันจะพบโคลนของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ (heterohybridomas) ในหลุม แล้วทำการคัดเลือกโคลนของเซลล์ลูกผสมข้ามสปีชีส์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมนอีสตราไดออลได้ พบว่าเซลล์ heterohybridomas ที่ผลิตแอนติบอดีต่อต้านฮอร์โมน

อีสตราไดออล 12 หลุมจาก 21 หลุม (57.14%) นำกลุ่มเซลล์ heterohybridomas จากหลุมหนึ่งมาแยกโคลนเดี่ยว ได้เซลล์ heterohybridomas ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ได้ 18 โคลน แล้วจำแนกชนิดของอิมมูโนโกลบูลินพบว่าทั้งหมดเป็นชนิด IgG นำ MAb จากแต่ละโคลนตรวจการจับกันกับแอนติเจน (antigen-antibody complex) พบว่า MAb จากทุกโคลนสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ แต่คุณสมบัติในการจับกับแอนติเจนจะแตกต่างกันออกไป หลังจากนั้นเลือก MAb จากเซลล์ heterohybridomas โคลน 3F5-6D8 และ 3F5-6C6 ทำการหาปฏิกิริยาการเกาะเกี่ยว (% cross reaction) กับสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่าย พบว่ามีความแตกต่างที่ฮอร์โมนอีสโตรนโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายมีค่า % cross reaction เท่ากับ 1.502 % ส่วน MAb โคลน 3F5-6D8 และ 3F5-6C6 เท่ากับ 0.024 และ 0.53 % ตามลำดับ การผลิต MAb ในการทดลองนี้ทำได้ 2 วิธี ได้แก่ วิธี *in vivo* เลี้ยง heterohybridomas ในช่องท้องของหนูตัวเล็ก (ascitic fluid) และวิธี *in vitro* เป็นการเลี้ยง heterohybridomas ในตู้เลี้ยงเซลล์โดยอาศัย UltraDOMA-PF เมื่อผลิต MAb ได้ปริมาณมาก นำ MAb จากโคลน 3F5-6D8 ไปใช้ในการวัดปริมาณฮอร์โมนอีสตราไดออลโดย วิธี ELISA ซึ่งเลือกใช้ชนิดของพื้นผิวที่สามารถดูดจับแอนติบอดีได้ (solid-phase) ได้แก่ ไมโครเพลท จากการทดลองพบว่า 50 % binding ของการวัดอยู่ที่ 8 พิโครกรัม/มล. และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโคนมที่เป็นสัดและไม่เป็นสัดได้ จากการทดลองเดียวกันนี้ได้เลือกใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลสเป็น solid-phase พบว่า 50 % binding ของการวัดอยู่ที่ 50 พิโครกรัม/มล. การตรวจระดับฮอร์โมนอีสตราไดออลที่สกัดจากตัวอย่างน้ำนมโคนมโดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ สามารถแยกความุแตกต่างระหว่างโคที่เป็นสัดกับไม่เป็นสัดได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้นอกห้องปฏิบัติการต่อไป

Thesis Title Heterohybridomas Monoclonal Antibodies Production Against Estradiol-17-β for Estrus Detection in Dairy Cows by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Author Miss Kanokwan Sringarm

M.S. Agriculture (Animal science)

Examining Committee:

Assoc. Prof.	Petai	Pongpiachan	Chairman
Asst. Prof. Dr.	Phachya	Kongtawelert	Member
Asst. Prof. Dr.	Tippawan	Singtripop	Member

ABSTRACT

The objective of this research is to use hybridomas techniques for a production of monoclonal antibody (MAb) to estradiol-17β (E_2). The MAb will be used for a development of Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) for detected E_2 level in a milk of a cow. To produce of MAb against estradiol-17β in rabbits, 17β-estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-HSA is used as antigen to immunized 2 rabbits. These rabbits, which manifested high antibody titer to E_2 by Radioimmunoassay, were chosen as a source of peripheral blood lymphocyte (PBL). The PBL was used for a fusion with myeloma cells (X63Ag8.653) to produce mouse–rabbit heterohybridomas. Estimate 14-21 days after fusion, heterohybridomas clones were found in 21 wells where 12 wells (57.14 %) were identified to have positive clones. One of positive wells was

limiting dilution. 18 clones were found and characterized as IgG. The MAb reacted against estradiol but each clone was differential affinity. The MAb of clone 3F5-6D8 and 3F5-6C6 had % cross reaction with estrone (0.024% and 0.53%) lower than polyclonal antibody from serum of rabbit (1.502%). This research had 2 methods to cultured heterohybridomas to produce MAb that one method was *in vivo* used mouse and the other method was *in vitro* cultured with UltraDOMA-PF in incubator. The competitive ELISA method using MAb from a clone 3F5-6D8 was developed to detect sample of milk. This research used MAb attached to microplate that the result was 50% binding at 8 pg/ml. And the solid-phase changed to nitrocellulose paper. The result was 50% binding at 50 pg/ml. Both of solid-phase could detect estradiol for estrus and unestrus cows without using any spectrophotometer. The results of this study indicate that using MAb to estradiol for estrus detection can be done on farm site without a spectrophotometer for the improvement of reproductive efficient in dairy or beef cows.