

## บทคัดย่อ

การคัดแยกเพศอสุจิของโคมีความสำคัญต่อวงการอุตสาหกรรม และปศุสัตว์เป็นอย่างมาก การคัดแยกเพศอสุจิของโคนั้น มีหลายกระบวนการที่นำมาใช้ การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีในการคัดแยกเพศของอสุจิเป็นหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากการคัดแยกเพศด้วยวิธีนี้ จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิเพศที่ต้องการ การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค โดยโมโนโคลนัลแอนติบอดีนี้ ถูกสร้างขึ้นจากการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูขาวเพศเมียสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 2 ตัว ด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศเพศผู้ของโค หลังการกระบวนการเชื่อมเซลล์ ได้เซลล์ลูกผสมมากกว่า 2000 โคลนี จากนั้นนำเซลล์ลูกผสมทั้งหมดมาตรวจสอบความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคด้วยวิธี ELISA และ ตรวจสอบการจับของแอนติบอดีที่ผิวของอสุจิเพศผู้ของโค ซึ่งพบว่าเซลล์ลูกผสมโคลน G16G14, G16E7 และ G16E8 เป็นเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคได้ จึงได้นำเซลล์ลูกผสมทั้งสามนี้มาผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี เพื่อใช้ในการคัดแยกเพศของอสุจิโค ในขั้นตอนของการแยกเพศของอสุจิโคนั้น อสุจิเพศผู้ของโคที่โมโนโคลนัลแอนติบอดีจับจะถูกทำลาย โดยการทำงานของคอมพลิเมนต์ จากนั้นนำอสุจิที่ผ่านการแยกเพศที่เหลือไปปั่นล้างแล้วไปปฏิสนธิในหลอดทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง และความแม่นยำของกระบวนการแยกเพศอสุจิโค ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วจะถูกนำไปตรวจสอบเพศด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโคเพศผู้ และต่อโค ผลจากการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ได้จากการทดลอง พบว่าเซลล์ลูกผสมทั้งสามสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคได้ โดยอสุจิที่ได้ผ่านการคัดแยกเพศสามารถเพิ่มอัตราส่วนของตัวอ่อนเพศเมียได้ที่ 78.4, 74.4 และ 76 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปฏิสนธิในหลอดแล้วตามลำดับ

## Abstract

Bovine sperm sexing technology is important in industry and livestock sections. Various methods have been used for bovine sperm sexing. Immunological method is one of the favorable methods used, because this method does not affect the wanted sperm quality. This study aimed to produce monoclonal antibody (mAb) against bovine Y-sperm. The mAb were produced by stimulation of 2 female BALB/c mice by bovine Y-sperm. More than 2,000 hybridoma cells were grown after cells fusion. The cultured supernatant of the hybridoma cells were used to determine the specificity against bovine Y-sperm by ELISA and sperm surface binding method. It was found that 3 hybridoma cells, G16G14, G16E7 and G16E8 can produce mAb that are specific to bovine Y-sperm. These hybrid cells were used to produce mAb for sperm sexing. In the sperm sexing method, bovine Y-sperms were destroyed via cytotoxicity using guinea pig complement. The undestroyed X-sperms were used in *in vitro* fertilization (IVF) to determine the accuracy and precision of the sperm sexing method using the produced mAb. The sexes of embryos obtained from the IVF were determined by polymerase chain reaction (PCR) method using bovine and bovine Y-specific primers. The embryos sex determination indicated that the 3 hybridoma cells can produce mAbs, which are specific to bovine Y-sperm. They can increase the ratio of female to 78.4, 74.4 and 76% after sperm sexing and IVF.