

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อผลิต MAbE<sub>2</sub> สำหรับการพัฒนากระบวนการวัดฮอร์โมน E<sub>2</sub> ในน้ำนมของโคนมโดยวิธี ELISA เพื่อใช้ระดับ E<sub>2</sub> ในน้ำนมเป็นเครื่องมือช่วยในการตัดสินใจทำการผสมเทียมโคนม ในการศึกษาใช้หนูขาวตัวเล็กสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 3 ตัว เซลล์ไมอีโลมา (Myeloma) สายพันธุ์ X63Ag.8.653 และใช้ 17 $\beta$ -estradiol-6-o-carboxymethyl-oxime-BSA (E<sub>2</sub>-6-CMO-BSA) เป็นแอนติเจน ร่วมกับ Freund's complete adjuvant ในการกระตุ้นครั้งแรก ส่วนครั้งต่อไปใช้ Freund's incomplete adjuvant ในการผลิต MAbE<sub>2</sub> เริ่มจากฉีดแอนติเจนเข้าใต้ผิวหนังหนูด้วยความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อตัว ทุกวันที่ 14, 28, 42 และ 56 ใช้วิธี indirect ELISA ตรวจหาแอนติบอดีทั้งในซีรัมหนูและน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา ผลการทดลองพบว่า เกิดโคลน Hybridoma ทั้งหมด 29 หลุม จากทั้งหมด 528 หลุม ได้หลุมที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อ E<sub>2</sub> 12 หลุม คิดเป็น 41.4 % ของหลุมที่เกิดโคลน จากนั้นได้เลือกโคลนจากหลุมเบอร์ 4B9 มาทำการแยกโคลนเดี่ยวโดยวิธี limiting dilution พบว่า จากทั้งหมด 576 หลุม เกิดโคลนเดี่ยวจำนวน 69 โคลน และเป็นโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อ E<sub>2</sub> ได้ทั้งหมด (100 %) จากโคลนที่ได้ มี 24 โคลนที่มีสุขภาพดี และในกลุ่มนี้ ได้เลือกโคลนเดี่ยวเบอร์ 4B9-1E4 เนื่องจากเป็นโคลนที่มี antibody titer สูงที่สุดคือ 3.317 การผลิตแอนติบอดีได้ปริมาณมาก และมีการเติบโตของเซลล์ดี สามารถผลิตแอนติบอดีได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.487 mg/ml เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ E<sub>2</sub> ในน้ำนมโคนม ด้วยวิธี competitive ELISA โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำนมโคนม ลูกผสมที่มีสัดส่วนพันธุกรรมของโคฟรีเซียน (Friesian) 93.75 % จำนวน 14 ตัว จากฟาร์มเกษตรกรรมโคนมแม่ว่างจำกัด อำเภอแม่ว่าง จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าความไวในการวัดที่ 50 % binding คือ 50 pg/well (2.5 ng/ml) เมื่อวัดความเข้มข้น E<sub>2</sub> ในน้ำนมวันก่อนผสมเทียม (-1) และวันผสมเทียม (0) พบว่าในโคลกลุ่มที่ผสมติดมี E<sub>2</sub> สูงกว่าโคลกลุ่มที่ผสมไม่ติดอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ส่วนวันที่ +1 ความเข้มข้น E<sub>2</sub> เหลือไม่แตกต่างกันทางสถิติ และพบว่าปริมาณ E<sub>2</sub> ในน้ำนมโคที่ผสมแล้วทำให้ผสมติดคือมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ng/ml ซึ่งสามารถนำไปใช้กำหนดวันผสมเทียมโคได้ 67 % และวันที่ผสมเทียมควรเป็นวันที่มีความเข้มข้น E<sub>2</sub> สูงสุด จากงานวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถวัดความเข้มข้น E<sub>2</sub> ในน้ำนมโคนมด้วยเทคนิค competitive ELISA ที่เตรียมจาก MAbE<sub>2</sub> ได้ ซึ่งพบว่าระดับ E<sub>2</sub> ในน้ำนมในวันผสมเทียมมีความสัมพันธ์กับการผสมติด โดยวันที่ผสมเทียมควรเป็นวันที่มี E<sub>2</sub> สูงสุด

The objective of this study was to improve the  $E_2$ -milk cow measurement to determine  $E_2$  concentration for making a decision on dairy cows' A.I. Three six-week-old female BALB/c mice were used to produce MAb $E_2$ . The 17 $\beta$ -estradiol-6-*o*-carboxymethyl-oxime-BSA ( $E_2$ -6-CMO-BSA) as antigen reagent was mixed with the Freund's complete adjuvant and injected subcutaneously to mice at the first immunization. After that, the Freund's incomplete adjuvant was used as a mixed reagent with the antigen. Each mouse was injected with 200 micrograms of  $E_2$ -6-CMO-BSA every days 14<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup>, 42<sup>th</sup> and 56<sup>th</sup> until a high antibody was reached. The MAb $E_2$  concentration of the mice's sera and hybridoma culture medium was determined by using indirect ELISA method. It was found that there were 29 wells with hybridoma clones out of 528 wells. Twelve out of twenty nine wells produced antibodies to  $E_2$  (41.4 %). Positive well number 4B9 contained healthy cells suitable to establish MAb $E_2$  clones by limiting dilution method. Only twenty four out of sixty nine clones were healthy and could be used to produce antibody to  $E_2$  (100 %). Clone number 4B9-1E4 gave the highest antibody-producing titer. This clone was grown better, and produced an antibody concentration of 0.487 mg/ml. The MAb $E_2$  will be used to determining  $E_2$  of cows' milk by using competitive ELISA method. Milk samples were collected from 14 crossbred dairy cows (93.75 % Friesian) from Mae Wang Dairy Cows Cooperative Limited, Mae Wang district, Chiang Mai Province, Thailand for analyzing. It was found that the highest sensitivity at 50 % binding was 50 pg/well (2.5 ng/ml). The  $E_2$  concentration the day before A.I. and the first of A.I. was determined (day -1, and day 0, respectively), it was found that the pregnant cow group gave a higher  $E_2$  concentration than the non-pregnant cow group ( $P < 0.05$ ). At day +1, it was found that the  $E_2$  concentration of both groups were not significantly different. In this experiment, four of the six pregnant cows showed  $E_2$  concentration  $\geq 1$  ng/ml in their cows' milk confirmed that 67 % of the cows have been successfully insemination. The highest the  $E_2$  concentration on day 0, the more successful A.I. is. It was concluded that the competitive ELISA method by preparing MAb $E_2$  might be a useful technique to determine  $E_2$  concentration. It was found that the  $E_2$  concentration is correlates with a successful insemination and that the highest  $E_2$  concentration level can determine the best time for insemination.