Thesis Title Decreasing of Y Spermatozoa in Cattle Semen by Cytotoxicity Reaction from Monoclonal Antibodies to Male Specific Antigen

Author Mr. Wiwat Pattanawong

Degree Doctor of Biotechnology (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Petai Pongpiachan Chairperson

Assoc. Prof. Apichart Oranratnachai Member

Asst. Prof. Dr. Supamit Mekchay Member

Abstract

The objectives of this research were : (1) to produce monoclonal antibodies (MAb) against specific antigen of Y- bearing sperm, (2) to find out the optimal cytotoxic reaction to lysis Y-bearing sperm and (3) to produce frozen semen to enhance ratio of X- over Y-bearing sperm. Within 14 - 21 days after fusion, 3 wells with hybridoma clones of 148 clones were identified to be a positive clone and classified to be an IgG. The clone number 1F9-3B10, which produced highest antibody titer, was chosen to be used in cytotoxic reaction. Cytotoxic reaction is the reaction among dairy sperm, monoclonal antibody and complement proteins from guinea pig. We found that the optimal dilution of the MAb and the complement were 1 : 10 and 1 : 50, respectively. When the result was analysed by immunofluorescense microscopy method, it was found that cytotoxic reaction reduced the ratio of Y-bearing sperm (control expression of male phenotype) to 19 % or increased the ratio of X- bearing sperm (control expression of female phenotype) to 81 %. We confirmed that the results from the Real time PCR method, which the BOV97M primer was used to copy the DNA that specific to the Y-bearing sperm and the PLP primer, was used to copy the DNA that specific to X-bearing sperm. The results confirmed that sexed-semen had 10 times less BOV97M DNA copies than the control group and the sexed-semen had 6 times more PLP DNA than control group. We used the sexed semen for *in vitro* embryo production and found out that the male : female ratio was 27 : 73. In conclusion, using of cytotoxic reaction which was the combination of MAb and complement from guinea pig could be able to change female calve from 50 to 81 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การลดสัดส่วนสเปิร์มวายในน้ำเชื้อโคนมโดยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้

ผู้เขียน นายวิวัฒน์ พัฒนาวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. เพทาย พงษ์เพียจันทร์ ประธานกรรมการ
รศ. อภิชาติ โอฬารรัตนชัย กรรมการ
ผศ.ดร.ศุภมิตร เมฆฉาย กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยคือ (1) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody, MAb) ต่อแอนติเจนที่จำเพาะต่อสเปิร์มวาย (2) หาปฏิกิริยาไซโตทอกซิคซิตี้ที่เหมาะสมในการทำลายสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย และ (3) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนเพศและการพัฒนาของตัวอ่อนภายหลังการผสมด้วยน้ำเชื้อคัดเพศ พบว่าหลังการเชื่อมเซลล์ 14 - 21 วันได้ตรวจพบกลุ่มโคลนลูกผสม (Hybridoma clone) จำนวน 3 โคลน จากทั้งหมด 148 โคลน ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ เอชวายแอนติเจน เมื่อนำโคลนทั้ง 3 มาแยกเป็นโคลนเดี่ยวพบว่าเป็นอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ชนิด IgG ทั้ง 3 โคลน จากนั้นเลือกโคลนหมายเลข 1F9-3B10 ที่มีการผลิตแอนติบอดีปริมาณมากที่สุดมาใช้ในปฏิกิริยาไซโตทอกซิค ปฏิกิริยาไซโตทอกซิค เป็นการบ่มระหว่างสเปิร์มโคนมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี และโปรตีนคอมพลีเมนต์ (Complement) จากหนูตะเภา พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของปฏิกิริยาไซโตทอกซิคคือระดับ โมโนโคลนอลแอนติบอดีเจือจางที่ 1 : 10 และคอมพลีเมนต์เจือจางที่ 1 : 50 เมื่อวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy พบว่าผลของปฏิกิริยาทำให้สัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายลดลง (ควบคุมการเกิดเพศผู้) เหลือ 19 % หรือทำให้มีปริมาณสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์ (ควบคุมการเกิดเพศเมีย) เพิ่มเป็น 81 % จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy และเมื่อตรวจผลการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศด้วยเทคนิค Real time PCR เพื่อวัดสัดส่วนของดัชนีชี้วัดทางพันธุกรรมด้วยยีน BOV97M ที่จำเพาะเจาะจงต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย และยีน PLP ที่จำเพาะเจาะจงต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์ พบว่าน้ำเชื้อโคที่ผ่านปฏิกิริยาไซโตทอกซิค มีสัดส่วนของท่อนดีเอ็นเอ BOV97M น้อยกว่าถึง 10 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับยีน PLP กลุ่มคัดเพศมีท่อนดีเอ็นเอ PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 6 เท่า เมื่อใช้น้ำเชื้อคัดเพศใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การผลิตตัวอ่อนหลอดแก้วพบว่าสัดส่วนเพศที่เกิดขึ้นของเพศผู้ : เพศเมีย มีสัดส่วนเท่ากับ 27 : 73 ดังนั้นการคัดเพศด้วยปฏิกิริยาไซโตทอกซิคระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้และโปรตีนคอมพลีเมนต์ สามารถเพิ่มโอกาสการเกิดลูกโคนมเพศเมียจาก 50 เป็น 81 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved