นิพนธ์ต้นฉบับ

ปริมาณอสุจิวายของโคเนื้อหลังการคัดเลือกผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ อิน ซิตู ไฮบริไดเซชัน

เอื้อมศักดิ์ เงินประดับ[1] กัญจนะ มากวิจิตร์[2] และ ธีระพล ศิรินฤมิตร[3]

Abstract

Ngernpradub, A.[1], Markvichitr, K.[1], and Sirinarumitr, T.[2]

Quantification of Y-bearing spermatozoa of beef cattle throught ciscontinuous Percoll gradient centrifugation using fluorescent *in situ* hybridization

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(5) : 1359-1366

An appropriated procedure for proportion of Y-bearing spermatozoa is needed, especially to monitor sperm separation techniques. In this study was aimed to determine the Y-bearing spermatozoa proportion in bull semen through pre and post 6 layers discontinuous Percoll centrifugation and by using fluorescent *in situ* hybriddization (FISH) technique with digoxigenin (Dig)-labeled bovine Y-specific probe, which prepared by polymerase chain reaction (PCR) using BC1.2 primers. This results fould that the metaphase male lymphocyte was clearly shown green-yellow fluorescence spot on the short arm of Y-chromosome, whereas an interphase male lymphocyte showed this signal within nuclei, in conversely, both interphase and

[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, [2]Department of pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok, 10900 Thailand.

[1]วท.ม. (สัตวศาสตร์) [2]Dr.Med.Vet. (Vet Andrology and Breeding Hygiene) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์ [3]Ph.D. (Veterinary Pathology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 19000

Corresponding e-mail: assve56@hotmail.com

รับต้นฉบับ 8 พฤษภาคม 2549 รับลงพิมพ์ 27 กันยายน 2550

metaphase female lymphocytes were not shown this signal. An average interphase male lymphocyte obviously showed the signal 96.8%. The proportion of Y-bearing spermatozoa in semen pre and post discontinuous Percoll centrifugation were 48.78% and 41.68%, respectively (P>0.05). These results indicated that FISH protocol with Dig-labeled bovine Y-specific probe could be used to mornitor the proportion of Y-bearing spermatozoa through discontinuous Percoll centrifugation in bull semen which after sperm separation, the proportion of Y-chromosome trend to be not significantly reduced.

Key words : Y-specific probe, bovine spermatozoa, FISH, Percoll

บทคัดย่อ

เอื้อมศักดิ์ เงินประดับ กัญจนะ มากวิจิตร์ และ ธีระพล ศิรินฤมิตร

ปริมาณอสุจิวายของโคเนื้อหลังการคัดเลือกผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์โดยเทคนิค ฟลูออเรสเซนต์ อิน ซิตู ไฮบริไดเซชัน

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(5) : 1359-1366

มีความต้องการวิธีการตรวจสอบอสุจิวายเพื่อหาสัดส่วนอสุจิภายหลังการคัดเลือกเพศอสุจิ สำหรับการทดลองนี้เพื่ออธิบายวิธีตรวจสอบปริมาณอสุจิวายในน้ำเชื้อของพ่อโคเนื้อก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ ด้วยเทคนิค ฟลูออเรสเซนต์ อิน ซิตู ไฮบริไดเซชัน (fluorescent *in situ* hybridization; FISH) โดยใช้ digoxigenin (Dig)-labeled bovine Y specific probe ซึ่งเตรียมจากเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากคู่ไพรเมอร์ BC1.2 พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อเพศผู้ระยะเมตาเฟสแสดงสัญญาณเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมวายและในนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อเพศผู้ระยะอินเตอร์เฟส ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อเพศเมียทั้งในระยะเมตาเฟสและอินเตอร์เฟสไม่ปรากฏสัญญาณเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และปริมาณอสุจิวายในน้ำเชื้อก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์เท่ากับ 48.78% และ 41.68% ตามลำดับ (P>0.05) จากผลการทดลองนี้พบว่าสามารถใช้สัญญาณ Dig-labeled bovine Y specific probe ตรวจสอบปริมาณอสุจิวายในน้ำเชื้อโคหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ด้วยเทคนิค FISH ได้ และปริมาณอสุจิวายหลังผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์มีแนวโน้มลดลง

การกำหนดเพศตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกิดขึ้นหลังเกิดการปฏิสนธิ ซึ่งการคัดเพศลูกที่เกิดได้จะช่วยในการปรับปรุงพันธุกรรม เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสัตว์ รวมถึงช่วยลดต้นทุนการผลิต การคัดเลือกเพศลูกสัตว์สามารถคัดเลือกได้สองระยะคือการคัดเลือกก่อนการปฏิสนธิและการคัดเลือกหลังการปฏิสนธิ โดยการคัดเลือกก่อนการปฏิสนธิเป็นการคัดเลือกชนิดอสุจิ ถ้าอสุจิเอ็กซ์ผสมกับเซลล์ไข่จะได้ลูกเพศเมีย และอสุจิวายผสมกับเซลล์ไข่จะได้ลูกเพศผู้ มีรายงานการพัฒนาเทคนิคในการคัดเลือกอสุจิเอ็กซ์และ/หรืออสุจิวาย แต่ยังมีความต้องการวิธีในการตรวจสอบสัดส่วนอสุจิที่ถูกต้องหลังผ่านการคัดเลือก (Windersor และคณะ, 1993) Ericssion and Glass (1982) รายงานการตรวจสอบอสุจิวายในมนุษย์ด้วยการย้อมสี quinacrine mustard พบว่าเฉพาะอสุจิวายที่ปรากฏจุดเรืองแสง (F-body) ที่ส่วนหัว แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบอสุจิของสัตว์ชนิดอื่นได้ และพบว่าอสุจิวายในน้ำเชื้อของคนก่อนการคัดเลือกมีค่าต่ำกว่า 40% (Barlow and Vosa, 1970) ส่วนการตรวจสัดส่วนเพศจากลูกสัตว์ที่เกิดถือว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องมาก แต่เป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลานาน มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องการจำนวนลูกสัตว์ปริมาณสูง (Moor and Glendhill, 1988) การตรวจสัดส่วนอสุจิเอ็กซ์และอสุจิวายจากการวิเคราะห์ลักษณะโครโมโซมเพศหลังจากการผสมกับไข่ของหนูแฮมสเตอร์ (Yanagimachi, 1984) และวิธี fluorescence-aided cell sorting (FACS) (Amann,

1989; Johnson และคณะ, 1989) เป็นเทคนิคที่ต้องมีความละเอียด ทักษะและความชำนาญเฉพาะของผู้ตรวจสอบ

ปัจจุบันมีรายงานการใช้เทคนิค FISH ในการตรวจเพศทารกและความผิดปกติโครโมโซมของตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว (preimplantation) และจากน้ำคร่ำ (Delhant และคณะ, 1993; Munne และคณะ, 1993) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสูง และตรวจสอบได้รวดเร็ว มีรายงานการใช้สัญญาณติดตามโครโมโซมวายใน FISH เพื่อตรวจสอบอสุจิวายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น คน (Han และคณะ, 1992; Han และคณะ, 1993) และสุกร (Kawarasaki และคณะ, 1995; Kawarasaki และคณะ, 1996) และโคเนื้อ (Kabayashi และคณะ, 1999) รายงานนี้เพื่ออธิบายวิธีการตรวจสอบอสุจิวายในน้ำเชื้อพ่อโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ ด้วยเทคนิค FISH โดยใช้สัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อที่เตรียมจากปฏิกิริยา PCR จากคู่ไพรเมอร์ BC1.2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียม bovine Y-specific probe ด้วยปฏิกิริยา PCR

การทดลองนี้ใช้คู่ไพรเมอร์ BC1.2 (Cotinot และคณะ, 1991) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5′-AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T-3′ และ 5′-ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG-3′

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1 μg male genomic DNA, digoxigenin (Dig) labeling buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dATP, 0.1 mM dCTP. 0.1 dGTP, 0.065 mM dTTP, 0.035 mM Dig-11 dUTP (Roche Diagnostics GmbH) และ 0.72 μM each primer) and 1.5 units Recombinant Taq DNA Polymerase เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR เกิดในเครื่อง thermal cycler (Gene Amp PCR System, Perkin Elmer) ดังนี้ denaturation 94°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น denaturation เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 60°C เป็นเวลา 30 วินาที, extension 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ให้ปฏิกิริยาเกิด 35 รอบ และในรอบสุดท้าย extention เป็นเวลา 10 นาที แบ่ง PCR product มาตรวจขนาดด้วย electropholysis บนแผ่นวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอทิเดียม โบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัม/มล.) ตรวจขนาดภายใต้แสง UV (265 nm) Bovine Y-specific Probe ที่เหลือ เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

การคัดเลือกอสุจิ

รีดเก็บน้ำเชื้อจากโคเนื้อเพศผู้พันธุ์กำแพงแสนจำนวน 3 ตัว อายุ 40 เดือน ปัจจุบันใช้เป็นพ่อโคสำหรับรีดน้ำเชื้อเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่ศูนย์สาธิตการเลี้ยงโคเนื้อครบวงจร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน รีดเก็บน้ำเชื้อเป็นเวลา 8 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน นำมาปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 6 ระดับชั้น (60, 50, 40, 30, 20, และ 10%) นำน้ำเชื้อโคเนื้อใส่ด้านบนของชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,700 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนส่วนล่างนำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง และเก็บตะกอนอสุจิมาละลายในสารละลาย Tris-buffer (ความเข้มข้น 120 x 10^6/มล.)

การเตรียมตัวอย่างอสุจิ

นำอสุจิก่อน และหลังการปั่นเหวี่ยงมา decondense ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Kobayashi และคณะ (1999) ดังนี้ นำอสุจิใส่ในสารละลาย PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที (2 ครั้ง) เก็บตะกอนอสุจิมาใส่ใน 2 mM dithiothreitol (DTT, Sigma chemical) ในสารละลาย TBS เป็นเวลา 45 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แช่อสุจิในกรดอะซิติก: เมทธานอลที่เย็นจัด (1:3) หลังจากนั้นหยดอสุจิลงบนสไลด์ปล่อยให้แห้ง นำไปตรวจด้วย FISH

การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาว

เก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณคอจากโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสนเพศผู้ 2 ตัว อายุ 20 เดือน น้ำหนัก 250 กก. และเพศเมีย 2 ตัว อายุ 30 เดือน น้ำหนัก 350 กก. จำนวน 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน นำเลือดใส่หลอดที่เคลือบสารป้องกันการแข็งตัว (heparin) นำมาเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Gosden และคณะ (1992) ดังนี้

นำเลือดโคมาเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 (fetal bovine serum 10%) ที่อุณหภูมิ 37°C ควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 72 ชม. หลังจากใส่สารละลายโคลซีมิด (colcemid solution, 10 µl/ml, Gibco) เป็นเวลา 2 ชม. ใส่สารละลาย KCl 0.075 M นาน 10 นาที แช่เซลล์เม็ดเลือดขาวในกรดอะซิติก:เมทธานอลที่เย็นจัด (1:3) หลังจากนั้นหยดเซลล์เม็ดเลือดขาวลงบนสไลด์ ปล่อยให้แห้ง นำไปตรวจด้วย FISH

การตรวจ Fluorescent *in situ* hybridization

แช่สไลด์ตัวอย่าง (เซลล์อสุจิ และเซลล์เม็ดเลือดขาว) ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยดสารละลาย proteinase K (50 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง นำสไลด์มาแช่ในเอทธานอล 70, 90 และ 100% (2 นาที) ตามลำดับ

หยดสารละลาย 50% prehybridization buffer นำไปวางบนแผ่นควบคุมความร้อนอุณหภูมิ 90°C นาน 10 นาที เตรียมสารละลายติดตามจาก digoxegenin-labeled probe: 50% prehybridization buffer (1: 10) แล้วใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 90°C นาน 10 นาที หลังจากนั้นหยดสารละลายติดตามบนสไลด์แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำใส่กล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 ชม.

แช่สไลด์ใน Tris-base solution (TBS, pH 8.0) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย standard saline citrate (SSC) ที่ระดับความเข้มข้น 2x SSC, 1xSSC และ 0.5xSSC (SSC, 0.15M NaCl และ 0.015M Sodium citrate, pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วย 0.5xSSC ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. หยดสารละลายนมผง 5% แล้วนำสไลด์ใส่ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. ล้างด้วยสารละลาย TBS ที่ 25°C นาน 5 นาที เตรียมสารละลาย anti-digoxigenin-fluorescein (Roche diagnostic GmbH) ด้วยสารละลาย bovine serum albumin 3% แล้วหยดลงบนสไลด์ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 ชม. ในกล่องชื้นและมีดล้างด้วย TBS ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที (3 ครั้ง) หยด propiodium iodide (PI, 0.3 µg/ml, Sigma chemical) ในสารละลาย anti-fade solution (1.25% diazabicyclo-octan, 90% glycerol in PBS) ตรวจหาโครโมโซมวายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope; excitation 400-490 nm, BX-60, Olympus)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์สัดส่วนอสุจิวายในน้ำเชื้อก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับเพอร์คอลล์ด้วยการวิเคราะห์ Chi-square test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเตรียมสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อด้วย PCR จากคู่ไพรเมอร์ BC1.2 ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 192 คู่เบส (Figure 1) แตกต่างกับรายงานในอดีต (Schwerin และคณะ, 1992; Kobayashi และคณะ, 1998) ที่รายงานว่าการใช้คู่ไพรเมอร์ BC1.2 ในปฏิกิริยา PCR จะให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 250 คู่เบส ซึ่งความแตกต่างที่ปรากฏผู้ศึกษาไม่ทราบว่าเกิดจากสาเหตุใด แต่จากการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 192 คู่เบสกับดีเอ็นเอในฐานข้อมูล พบว่าสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อจากการทดลองนี้มีความคล้ายกับตำแหน่ง Bos taurus Y chromosome-specific repetitive DNA (Sohn and Jun, 2003) ถึง 98% โดยมีรายงานว่าตำแหน่ง BC1.2 เป็น repettitive sequence มีขนาด 54 คู่เบส พบประมาณ 2,000-2,500 ชุด บนแท่งโครโมโซม Y ในโคตระกูล Bos และ Bison (Cotinot และคณะ, 1991) และมีความจำเพาะต่อโครโมโซมวาย จึงสามารถนำมาใช้ประยุกต์เตรียมสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อ และพบว่าสามารถเตรียมสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อได้ภายในเวลา 90 นาที ซึ่งรวดเร็วกว่ารายงานในอดีต (Schwerin และคณะ, 1992; Kobayashi และคณะ, 1998)

การใช้สัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อในปฏิกิริยา FISH เพื่อติดตามโครโมโซมวายของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อ พบว่าปรากฏจุดเรืองแสงบนแขนข้างสั้นของโครโมโซมวายของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อเพศผู้ระยะเมตาเฟส (Figure 2) และในนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดโคเพศผู้ระยะอินเตอร์เฟส (Figure 3) ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อเพศเมียไม่ปรากฏจุดเรืองแสงบนแท่งโครโมโซมและในนิวเคลียส จาก Table 1 พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเนื้อ

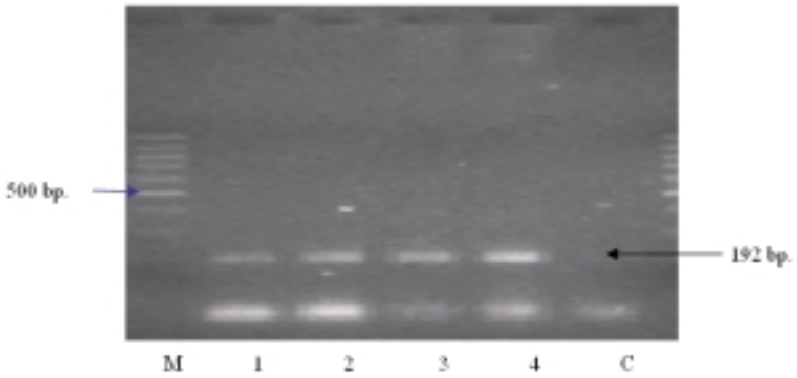

Figure 1. PCR product 192 bp. of BC1.2 primer at PCR condition : denaturation 94°C, 30 sec; annealing 60°C, 30 sec; extension 72°C, 30 sec M = Marker 100 bp, 1,2, 3, 4 = male DNA, C = control (No DNA)

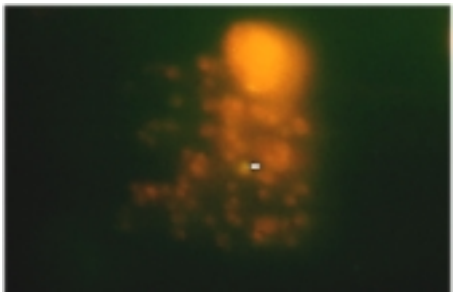

Figure 2. Detection of the bovine Y-specific probe on a bovine metaphase spread. Signal on the Y-chromosome (⇐)

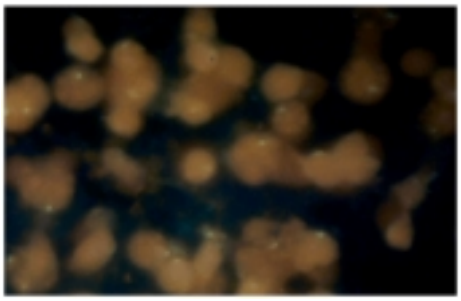

Figure 3. Detection of the bovine Y-specific probe on bovine interphase nucleus preparation. Signal within nuclei.

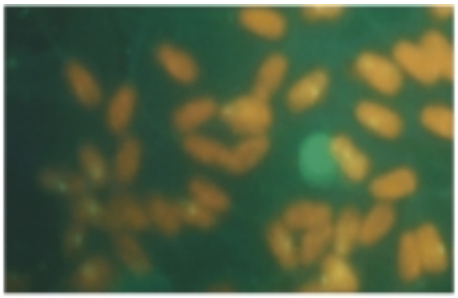

Figure 4. Detection of the bovine Y-specific probe on bovine spermatozoa. Signal within the head was classified Y-bearing sperm, and without signal was X-bearing sperm.

(Color figure can be viewed in the electronic version)

เพศผู้ระยะอินเตอร์เฟสปรากฏจุดเรืองแสง 96.8% ในขณะที่เพศเมียปรากฏจุดเรืองแสงเพียง 0.4% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานการใช้ BC-PCR ในการตรวจเพศโคเนื้อด้วยเทคนิค *in situ* hybridization โดยพบว่า BC-PCR จะเข้าไฮบริดซ์กับตำแหน่ง Yp13 ของโครโมโซม Y และไฮบริดซ์เฉพาะแถบดีเอ็นเอของโคเพศผู้ หลังการตัด

Table 1. Detection of bovine Y-specific DNA by Fluorescence *In Situ* Hybridization on Bovine Lymphocytes (n = 16)

sex	No. (%) of nuclei		
	Examined	With signal	Without signal
Male	1619	1567 (96.8)	52 (3.2)
Female	818	3 (0.4)	815 (99.6)

Table 2. Proportion of Y-bearing sperm in semen pre and post discontinuous percoll centrifugation (n = 22 ejaculates/3 bulls.)

	Total Sperm	No. Y-sperm	% Y-sperm
Pre Percoll Centrifugation	6715	3276	48.78a
After Percoll Centrifugation	6670	2780	41.68 a

a : not different significance (P>0.05)

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Schwerin และคณะ, 1992) วิธี *in situ* hybridization (ISH) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ 1) การสังเคราะห์หรือการเตรียมสัญญาณติดตามจำเพาะ 2) การเตรียมเนื้อเยื่อที่จะตรวจสอบ 3) การไฮบริไดเซชันระหว่างสัญญาณติดตามกับเนื้อเยื่อเป้าหมายและล้างสัญญาณติดตามส่วนที่ไม่ไฮบริดซ์ออก 4) การตรวจผลการไฮบริไดเซชัน (Alcamo, 1999) ซึ่งมีความหลากหลายของชนิดและวิธีการเตรียมสัญญาณติดตามรวมถึงวิธีการตรวจผลการไฮบริไดเซชัน มีการปรับปรุงวิธีการเตรียมสัญญาณติดตามด้วย non-radioactive labeled probe ด้วย digoxigenin และตรวจผลการไฮบริไดเซชั่นด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent *in situ* hybridization; FISH) (Kobayashi และคณะ, 1998) มีรายงานการใช้เทคนิค FISH เพื่อ 1) แผนที่ยีน 2) ตรวจความผิดปกติของโครโมโซม และ 3) ศึกษาการจัดเรียงตัวของโครโมโซมในระยะอินเตอร์เฟส (Weier และคณะ, 1990) ซึ่งความถูกต้องของเทคนิค FISH ขึ้นอยู่กับความจำเพาะและความยาวของสัญญาณติดตาม

Figure 4 แสดงอสุจิวายหลังการตรวจโดย FISH ด้วยสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อที่ปรากฏจุดเรืองแสงที่ส่วนหัวอสุจิ ส่วนอสุจิที่ไม่ปรากฏจุดเรืองแสงคืออสุจิเอ็กซ์ และจาก Table 2 พบว่าสัดส่วนอสุจิวายในน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงมีค่าเฉลี่ย 48.78% และสัดส่วนอสุจิวายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับเพอร์คอลล์มีค่าเฉลี่ย 41.68% (P>0.05) การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์มีผลทำให้สัดส่วนอสุจิเปลี่ยนแปลงแต่ไม่มีนัยสำคัญ ในขณะที่มีว่าน้ำเชื้อคนภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์มีปริมาณอสุจิเอ็กซ์เพิ่มขึ้น (Lin และคณะ,1998) และ Kobayashi และคณะ (2004) รายงานว่าน้ำเชื้อโคเนื้อส่วนล่างหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ พบว่าสัดส่วนอสุจิวายลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

สรุปผลการทดลอง

การเตรียมสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อด้วย digoxigenin จากคู่ไพรเมอร์ BC1.2 โดยเทคนิค PCR ให้สัญญาณติดตามโครโมโซมขนาด 192 คู่เบส และสามารถใช้ในการตรวจเพศโคเนื้อ และตรวจสอบอสุจิวายด้วยเทคนิค FISH ได้ ปริมาณอสุจิวายในน้ำเชื้อหลังผ่านการปั่นเหวี่ยงต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์มีแนวโน้มลดลง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากโครงการวิจัยแม่บทการปรับปรุงสายพันธุ์โคเนื้อกำแพงแสน สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนอุดหนุนและ

ส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายปรีชา อินนุรักษ์ และนายริเชษฐ์ พึ่งชัย (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตกระบือและโค มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม) สำหรับโคทดลอง และความอนุเคราะห์ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ และขอบคุณ น.สพ.เกรียงไกร วิฑูรย์-เสถียร (ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม) ที่ให้คำแนะนำในการเตรียมสัญญาณติดตามโครโมโซมวายโคเนื้อและเทคนิค fluorescent *in situ* hybridization

เอกสารอ้างอิง

Alcamo, I.E. 1999. DNA Technology, 2nd ed. Academic Press. SanDiego, California.

Amann, R.P. 1989. Treatment of sperm to predetermine sex. Theriogenology 31: 49-60.

Barlow, P. and Vosa, G. 1970. The Y chromosome in human spermatozoa. Nature 226: 961-962.

Cotinot, C., Kirszenbaum, M., Leonard, M., Gianquinto, L. and Vaiman, M. 1991. Isolation of bovine Y-derived sequence : potential use in embryo sexing. Genomic 10: 646-653.

Delhant, J.D., Griffin, D.K., Handyside, A.H., Haper, J. Atkinson, G.H., Pieters, M.H. and Winston, R.M. 1993. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during pre-implantation sex determination by fluorescent *in situ* hybridization, (FISH). Hum. Mol. Genet 3: 1183-1185.

Ericsson, R.J. and Glass, R.H. 1982. Function differences between sperm bearing the X- and Y-chromosome, 201-211. In Prospects for Sexing Mammalian Sperm. Boulder (eds. Amann, R.P. and Seidel, G.E.) Colorado Associated University Press.

Gosden, C.M., Davidson, C. and Robertson, M. 1992. Lymphocyte culture, 31-54. **In** Human Cytogenetics: A Practical Approach. Volume I Constitutional Analysis 2nd ed. (eds. Rooney, D.E. and Czepulkowski, B.H.). Oxford University Press, New York.

Han, T.L., Ftaherty, S.P., Ford, J.H. and Matthews, C.D. 1993. Detection of X and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. Fertil. Steril. 60: 1046-1051.

Han, T.L., Webb, G.C., Flaherty, S.P., Correll, A. Matthews, C.D. and Ford, J.H. 1992. Detection of chromosome 17- and X-bearing human spermatozoa using fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Reprod. Dev. 33: 189-194.

Kawarasaki, T. Kohsaka, T. Sone, M. Yoshida, M. and Bamba, K. 1995. Detection of Y-bearing procrine sperrmatozoa by *in situ* hybridization using digoxigenin-lacled, procrine male-specific DNA probe produced by polymerase chain reaction. Mol. Reprod. Dev. 40: 455-459.

Kawarasaki, T., Sone, M., Yoshida, M. and Bamba, K. 1996. Rapid and simultaneous detection of chromosome Y- and -bearing procrine spermatozoa by fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Reprod. Dev. 43: 548-553.

Kobayashi, J., Kohsaka, T., Sasada, H., Umezu, M. and Sato, E. 1999. Fluorescence *in situ* hybridization with Y chromosome-specific probe in decondensed bovine spermatozoa. Theriogenology 52: 1043-1054.

Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H. and Sato, E. 2004. Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fraction by discontinuous Percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization. J. Reprod. And Develop. 50, 463-469.

Kobayashi, J., Sekimoto, A., Uchida, H., Wada, T., Sasaki, K., Sasada, H., Umezu, M. and Sato, E.1998. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. Mol.Reprod.Dev. 51: 390-394.

Johnson, L.A., Flook, J.P. and Hawk, H.W. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. Biol. Reprod. 41: 199-203.

Lin, S.P., Lee, R.K.K., Tsai, Y.J., Hwu, Y.M. and Lin, M.H. 1998. Separating X-bearing human spermatozoa through a discotinuous Percoll density gradient proved to be inafficient by double-label fluorescent *in situ* hybridization. J. Assist. Reprod. Genet. 15: 565-569.

Moor, D.H. and Glendhill, B.L. 1988. How large should my study be so that I can detect an altered sex ratio? Fertil. Steril. 50: 21-25.

Munne, S. Weler, H.U. Stein, J. Grifo, J. and Cohen, J. 1993. A fast and efficient method for simultaneous X and Y *in situ* hybridization of human blastomeres. J. Assist. Reprod. Genet. 10: 82-90.

Schwerin, M., Gallagher, D.S., Miller, J.R. and Thomsen, P.D. 1992. Mapping of repetitive bovine DNA sequence on cattle Y chromosome. Cytogenet. Cell Genet., 61: 189-194.

Sohn, S.H. and H.J. Jun. 2003. Bos taurus Y chromosome-specific repetitive DNA sequence (AY303974) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=31790288 (12/10/2004)

Weier, H.C., Segraves, R., Pinkel, D. and Gray, J.W. 1990. Synthesis of Y chromosome-specific labeled DNA probes by *in vitro* DNA amplification. J. Histochem. Cytochem. 38: 421-426.

Windsor, D.P., Evans, G. and White, I.G. 1993. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome bearing sperm : A review. Reprod. Dev. 5: 155-171.

Yanagimachi, R. 1984. Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res. 10: 187-232.