ในปัจจุบันเทคนิค *In situ* hybridization สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบโครโมโซมเพศจากเซลล์อสุจิได้ โดยการผลิตดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซม X หรือโครโมโซม Y โดยการติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี มีความแม่นยำ และรวดเร็วในการตรวจสอบผลของชนิดอสุจิ (wang *et al.,* 1994) จากผลการตรวจสอบสัดส่วนของอสุจิ Y ด้วยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าน้ำเชื้อก่อนผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินมีค่าเฉลี่ยสัดส่วนของอสุจิ Y ต่ออสุจิ X ของพ่อสุกรทั้ง 3 ตัวรวมกัน เท่ากับ 49.85 : 50.15 ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับค่าสัดส่วนเพศในทางทฤษฎี (X : Y; 50 : 50) และภายหลังนำน้ำเชื้อของพ่อสุกรทั้ง 3 ตัวมาปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าเฉลี่ยสัดส่วนอสุจิ Y โดยรวม เท่ากับ 50.23, 50.48, 50.40 และ 50.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำผลรวมของค่าเฉลี่ยอสุจิ Y ของน้ำเชื้อพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว ทั้งก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มาวิเคราะห์ไค-สแควร์เปรียบเทียบผลรวมสัดส่วนของอสุจิ Y พบว่ามีค่าเฉลี่ยอสุจิ Y โดยรวมไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) และเมื่อนำน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวมาแยกวิเคราะห์สัดส่วนอสุจิ Y ทั้งก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพ่อสุกรตัวที่ 1 มีสัดส่วนอสุจิ Y เท่ากับ 49.85, 51.41, 51.18 และ 51.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พ่อสุกรตัวที่ 2 มีสัดส่วนอสุจิ Y เท่ากับ 50, 49.41, 50.44, 49.43 และ 51.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพ่อสุกรตัวที่ 3 มีสัดส่วนอสุจิ Y เท่ากับ 50.33, 49.89, 50.31, 50.54 และ 50.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ไค-สแควร์เปรียบเทียบสัดส่วนอสุจิ Y ในน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมิน กับน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวก่อนปล่อยผ่าน มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ดังตารางที่ 9

จากรายงานความแตกของลักษณะการว่ายของอสุจิ X และอสุจิ Y (Goodall and Robert, 1976) และขนาดของอสุจิ X มีขนาดที่ใหญ่กว่าอสุจิ Y (Cui and Matthew, 1993) จึงมีผลต่อน้ำหนัก ความเร็วในการเคลื่อนที่ และพื้นที่ผิวสัมผัสของอสุจิ ทำให้อสุจิ X ต้องว่ายผ่านสารละลายตัวกลางที่มีความหนืดมากกว่าอสุจิ Y ซึ่งอาจเป็นเหตุผลให้อสุจิ Y เคลื่อนที่ลงส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ X เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายโบวายซีอัลบูมินที่สูงขึ้น (Ericsson *et al.,* 1973; Beernink *et al.,* 1993) ซึ่งการทดลองคัดแยกชนิดอสุจิก่อนหน้านี้ได้รายงานผลการคัดแยกอสุจิจากการปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับต่างๆกัน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนอสุจิ Y มากกว่าอสุจิ X ที่ส่วนล่างของหลอด ทั้งในน้ำเชื้อคน (Ericsson *et al.,* 1973; Dmowski *et al.,* 1979; Quinlivan *et al.,* 1982; Pyrzak and Garrison., 1990; Glover *et al.,* 1990;

Beernink *et al.,* 1993) โค (Ericsson, 1980) และแกะ (White and Mendoza, 1984) โดย Ericsson *et al.* (1973) รายงานว่าภายหลังปล่อยน้ำเชื้อผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ความเข้มข้น 3 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์สามารถแยกอสุจิ Y ได้ โดยพบว่าอสุจิ Y สามารถแสดงลักษณะของ F-body ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนไหวสูง ส่วนอสุจิ X ยังคงค้างอยู่ที่ผิวหน้าของสารละลาย สอดคล้องกับรายงานการทดลองนำอสุจิหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมาผสมเทียมในผู้หญิง พบว่ามีโอกาสได้ลูกเพศชายถึง 75-79 เปอร์เซ็นต์ (Dmowski *et al.,* 1979; Beernink *et al.,* 1993) และจากการตรวจสอบชนิดของอสุจิด้วยเทคนิค fluorescent *in situ* hybridization หลังจากนำน้ำเชื้อมาผ่านการแยกชนิดอสุจิด้วยสารละลายชนิดนี้ พบว่าแยกอสุจิ Y ได้ถึง 55-70 เปอร์เซ็นต์ (Pyrzak and Garrison, 1990; Glover *et al.,* 1990; Pyrzak, 1994) ขณะที่ในสัตว์ พบว่าหลังจากนำอสุจิแกะผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 6 เปอร์เซ็นต์ มาผสมเทียมให้กับแม่แกะ พบว่าเป็นลูกเพศผู้ 75 เปอร์เซ็นต์ และเพศเมีย 25 เปอร์เซ็นต์ (White and Mendoza., 1984)

แต่จากผลการทดลองตรวจสอบความจำเพาะของอสุจิ Y ด้วยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization ในครั้งนี้ พบว่าน้ำเชื้อจากพ่อสุกร 3 ตัวที่เก็บได้ในส่วนล่างของสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินแต่ละหลอด มีค่าเฉลี่ยสัดส่วนของอสุจิ Y โดยรวมของน้ำเชื้อทั้งก่อนและหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ใช้ในครั้งนี้คือ 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีอิทธิพลต่อการคัดแยกอสุจิ Y ออกจากอสุจิ X ได้ เหตุผลประการแรกอาจเป็นเพราะลักษณะของการว่ายหรือพื้นที่ผิวสัมผัสของอสุจิ X และอสุจิ Y ในสัตว์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงทำให้ความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินไม่มีความสัมพันธ์กับการคัดแยกชนิดของเซลล์อสุจิ หรือเหตุผลประการที่สอง ความแตกต่างของความเร็วในการว่ายของอสุจิสุกรทั้งอสุจิ Y และอสุจิ X มีค่าน้อยมากจนไม่สามารถแยกได้โดยความเข้มข้นของสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานต่างๆของ Vadal *et al.*(1993); Wang *et al.* (1994); Classsens *et al.* (1995); Aribarg *et al.* (1996); Chen *et al.* (1997); Flaherty *et al.* (1997) หลังนำอสุจิที่ผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมาตรวจสอบความจำเพาะของอสุจิ Y ด้วย fluorescent *in situ* hybridization หรือนำอสุจิที่คัดแยกได้มาปฏิสนธิกับไข่ของหนูแฮมเตอร์ แล้วตรวจสอบจากโครโมโซมเพศของตัวอ่อนด้วย karyotype analysis (Brandiff *et al.*, 1986) หรือตรวจสอบชนิดของอสุจิจากความแตกต่างกันของปริมาณ DNA ด้วยเครื่องคัดแยกเซลล์ flow cytometer (Beal *et al.,* 1984; Pinkel *et al.,* 1985) พบว่าจากการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการทั้ง 3 วิธี ให้ผลการตรวจสอบสัดส่วนของอสุจิ Y หลังผ่านความเข้มข้นสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน แตกต่างอย่างไม่มี

นัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน อีกทั้งพบว่าเมื่อนำเชื้อสุกรหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4 ระดับความเข้มข้น (0 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์) และน้ำเชื้อโคหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์ มาผสมเทียมให้กับสัตว์เพศเมีย พบว่ามีสัดส่วนของลูกเพศผู้ ต่อเพศเมียแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (รพีพรรณ และคณะ., 2539; Dixon *et al.,* 1980) จึงทำให้สัดส่วนของอสุจิ Y และสัดส่วนของอสุจิ X ทั้งก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองเพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ และสัดส่วนอสุจิ โดยการตรวจสอบอสุจิ Y โดยเทคนิค Nonradioactive *In situ* hybridization ด้วย digoxigenin-labeled porcine male-specific probe ในน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองสรุปดังนี้

1. ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ

คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่า

1.1 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

ความเข้มข้นของน้ำเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) โดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของน้ำเชื้อก่อน และหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 213.15, 55, 47.22, 34.44 และ 25 ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ

1.2 การเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิ

การเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) โดยคะแนนการเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิที่ปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.66, 2.33, 1.94 และ 1.55 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.05

1.3 เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังการปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 73.88, 76.11, 80 และ 83.33

ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.44

1.4 เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น

เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$) โดยเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็นหลังการปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80.77, 80.44, 85.69 และ 89.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 69.44 เปอร์เซ็นต์

1.5 ลักษณะอสุจิที่รูปร่างผิดปกติ

เปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิรูปร่างผิดปกติโดยรวมลักษณะ head, midpiece, tails และ cytoplasmic droplet ของน้ำเชื้อภายหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมเท่ากับ 16.12, 14.56, 11.54 และ 7.23 ตามลำดับ โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติรวมของน้ำเชื้อก่อนปล่อยผ่านสารละลายซึ่งมีเท่ากับ 27.46

2. สัดส่วนอสุจิ Y หลังจากตรวจสอบโดย Nonradioactive *In Situ* Hybridization

การเตรียม Porcine male-specific probe ด้วยปฏิกิริยา พีซีอาร์ จากคู่ porcine male-specific primer ขนาด 236 คู่เบส โดยพบว่า Porcine male-specific probe มีความจำเพาะต่อโครโมโซมวายของสุกรถึง 100 เปอร์เซ็นต์หลังการเกิดการไฮบริไดเซชั่นกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสุกรเพศผู้ และน้ำเชื้อสุกร ซึ่งสัดส่วนอสุจิ Y ในน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสัดส่วนอสุจิ Y ในทุกกลุ่มความเข้มข้นของของโบวายซีรั่มอัลบูมินแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับค่าสัดส่วนเพศในทางทฤษฎี (X : Y; 50 : 50)

ข้อเสนอแนะ

1. คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมีคุณภาพดีขึ้น แต่เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำเชื้อค่อนข้างต่ำ หากต้องการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการผสมเทียม เช่นในกรณีต้องการใช้พ่อพันธุ์ที่ให้ลักษณะทางพันธุกรรมดี แต่มีปัญหาเรื่องคุณภาพน้ำเชื้อ จึงควรใช้วิธี intrauterine insemination (IUI) หรือกรณีที่ต้องเตรียมอสุจิสำหรับใช้ร่วมกับ *In vitro* Fertilization หรือ Intracytroplasmic sperm injection (ICSI)

2. หากมีการศึกษาครั้งต่อไปควรศึกษา sensitivity หาสัดส่วนที่เหมาะสมของ DNA probe กับ เซลล์อสุจิตัวอย่าง เพื่อให้มี DNA probe เพียงพอที่จะเข้าไปเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์เซชั่นในเซลล์อสุจิ

3. การตรวจสัดส่วนอสุจิด้วยเทคนิค *In Situ* Hybridization ควรเพิ่ม DNA probe ที่มีความจำเพาะกับโครโมโซม X หรือโครโมโซมร่างกาย เพื่อการตรวจสอบสัดส่วนเพศอสุจิมีความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น

4. จากผลการทดลองคัดแยกอสุจิ Y ควรมีศึกษาการใช้ความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมากกว่า 1 ชั้นความเข้มข้น โดยแต่ละชั้นมีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน อาจทำให้สามารถพบอสุจิ Y ที่ส่วนล่างของหลอดได้มากขึ้น

5. การศึกษาสัดส่วนอสุจิสุกรดูรอค ถือเป็นการทดลองเริ่มต้นที่มีการยืนยันผลการคัดแยกชนิดอสุจิสุกรหลังผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินโดยนำเทคนิค Nonradioactive *In Situ* Hybridization มาใช้ในการตรวจสอบโครโมโซมเพศจากเซลล์อสุจิ ซึ่งหากมีการคิดค้นและพัฒนาเทคนิคดังกล่าวต่อไปให้ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่สั้นลง จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานภาคสนามได้ในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จรัญ จันทลักขณา. 2535 . **สถิติวิธีวิเคราะห์และการวางแผนงานวิจัย.** บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชจำกัด, กรุงเทพฯ. 468 น.

ฉัตรชัย จันทร์สมบูรณ์. 2538. **การศึกษาการกำหนดเพศในสุกร โดยใช้น้ำเชื้อปั่นเหวี่ยง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประมวล แซ่โค้ว. 2542. **คุณภาพและศักยภาพการกำหนดเพศลูกสุกรของน้ำเชื้อหลังผ่านการแยกอสุจิเอ็กซ์-วาย โดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ปาริฉัตร สุขโต และ มุขดา รัตนภาสกร. 2539. **การคัดแยกเพศตัวอสุจิ X และ Y ในน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ ด้วยวิธี Layering spermatozoa on protein column**. สัตวแพทย์สาร. ปีที่ 47 เล่มที่2. 55น.

วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี ลี้ชนะชัย, วาสนา ศิริรังษี. 3539. **วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน**. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิค คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 1. พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์

ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2542. **คู่มือปฏิบัติการผสมเทียมในสุกร. ศูนย์วิจัย และฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 234น.

ศรีสุวรรณ ชมชัย และ เจตนา คงวัฒนา. 2537**. ผลของความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อพ่อสุกรต่อสัดส่วนทางเพสลูกสุกร. น.226-233.** *ใน* การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์ สัตวแพทย์ศาสตร์ ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุวรรณ ช่างกลึงดี. 2534**. ผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ และสภาพพีเอช ของมดลูก ต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่สุกร และสัดส่วนเพศของลูก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนันต์ ศรีขาว. 2535. **วิธีการคัดแยกอสุจิ X และ Y ในปศุสัตว์ก้าวหน้าไปถึงไหน. น. 1-25. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ X-and Y-Chromsome bearing sperm separation prospective., 24-26 มิถุนายน 2535**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อเนก อารีพรรค. 2535**. การคัดเลือกบุตร.วิธีการคัดแยกอสุจิ X และ Y ในปศุสัตว์ ก้าวหน้าไปถึงไหน. น. 121-127. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ X- and Y-Chromsome bearig sperm separation prospective., 24-26 มิถุนายน 2535.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอื้อมศักดิ์. 2548. **การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ และปริมาณอสุจิ Y โดยเทคนิค Fluorecent *In Situ* Hybridization ของน้ำเชื้อพ่อโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน หลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adimoelja, A. 1987**.** Sephadex gel for sex preselection, pp. 491-499. In H. Mohri(ed). **New Horizon in Sperm Cell Research.** Gordon and Breach Sci. Publ., New York.

Amann, R. P., and J. O. Almquist. 1976. Bull management to maximize sperm output. In Sixth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. **National Association of Animal Breeders,** Columbia, MO. 1-10.

Ariburg, A., J. Ngeamvijawat, Y. Chanprasit and N. Sukcharoen. 1996. Determination of the ratio of X and Y bearing spermatozoa after albumin gradient method using double-labelled fluorescence *in situ* hybridization. **Med Assoc Thai. Dec; 79** Suppl 1: S88-95.

Bahr, G. F. 1971**.** Separation of X- and Y- bearing spermatozoa by gravity : A reconsideration , **In a Symposium : Sex Ration at Birth Prospects for control.** Amer. Soc. Anim. Sci. 28-37 pp.

Barlow, P., and C. G. Vosa. 1970. The Y chromosome in human spermatozoa. **Nature 226(249):**961-962.

Batzofin, H. J. 1987**.** XY sperm separation for sex selection**. Urol. Clin. Nor. Amer. 14 (3)**: 1432-1436

Bearden, H. J. And J. W. Fuquay. 1992 . **Applied Animal Reproduction. 3 rd ed.,** Prentice Hall, Inc., New Jersey. 352 p.

Bredderman, P. J. and R. H. Foot. 1971. Factors stabilizing bull sperm cell volume and prolonging motility at high dilution. **Exp. Cell. Res. 66:** 458

Beal, W.E., L.M. White and D.L. Garner. 1984. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa**. J. Anim. Sci. 58:** 1432-1436

Beatty, R. A. 1977. F-bodies as Y-Chrosome markers in mature human sperm heads : a quantitative approach. **Cytogenetic and Cell Genet. 18 :** 33-49.

Beernink, F. J., and R. J. Ericsson. 1982. Male sex preselection through sperm isolation. **Fertil. Steril. 38(4):** 493-495.

Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm**. Fertil. Steril. 59:** 382-386.

Björndahl, L., C. R. L. Baratt. 2002. **Sex selection. A survey of laboratory methods and clinical results**. Assisted Conception Unit, Birmingham Women's Hospital, and Reproductive Biology and Genetics Group, University of Birmingham, B15 2TH, United Kingdom. 20p.

Brandiff, B. F., L. A. Gordin, S. Haendel, S. Singer, D. H. Moore, and B. L. Gledhill.1986. Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin- isolatedhuman sperm. **Fertil. Steril**. **46:** 678-685.

Carter, D. C. and Ho, J. X. 1994**. Structure of serum albumin.** Adv. Protein Chem. 45 : 153-203.

Chen, M. J., H. F. Guu, and E. S. Chu Ho. 1997. Effect of sex pre-selection of spermatozoa by albumin separation method evaluated by double-labelled fluorescence *in-situ* hybridization. **Human. Reprod., 12.** 1920-1926.

Classens,O.E.,C. J. Oosthuizen, J. Brusnicky, D. R. Franken, and T. F. Kruger. 1995.Fluorescent in situ hybridization evaluation of human Y-bearing spermatozoa separated by albumin density gradients**. Fertil. Steril. 63(2):** 417-418.

Corson, S. L., F. R. Batzer, N. J. Alexander, S. Schlaff, and C. Otis. 1984. Sex selection by sperm separation and insemination**. Fertil. Steril. 42(5):** 756-760.

Cui, K. H. and C. D. Matthews. 1993. X larger than Y. **Nature, 366**, 117-118.

Cui, K.H. 1997. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. **Mol. Hum. Reprod., 23:** 11-20.

David, G., Jeulin. C., Boyce. A. And Schwartz, D. 1977. Motility and percentage of Y- and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage though bovine serum albumin. **J. Reprod. Fert. 50**, 377-379.

Dixon, K. E., Songy, E. A., Thrasher, D. M. And Kreider, J. L. 1980.Effect of bovine serum albumin on isolatation of boar spermatozoa and their fertility. **Theriogenology 13 :**437-444 .

Dmowski, W.P., Gaynor, L., Rao, R., Lawrence, M. and Scommegna, A. 1979. Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. **Fertil. Steril. 31:** 52-57.

Ericsson, R. J., C. N. Langevin, and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature 246(5433):** 421-424.

Ericsson, R. J., B. Cassou and G. Dapremant.1980. Isolation of progressively motile mammalian sperm: To select for Y sperm or improve fertility. Proc. IX Int. Cong. Anim. Reprod. Artificial Insemination III: 286. Cited by Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm. **Fertil. Steril. 59**: 382-386.

Estienne, M. J., J. W. Knight and W. E. Beal. 1988. Isolation of population intact, highly-motile porcine spermatozoa using a discontinuous bovine serum albumin. **Theriogenology 29:** 771.

Estienne, M. J. , J. W. Knight and W. E. Beal. 1989.Long-term liquid storage of porcine spermatozoa separated using a discontinuous bovine serum albumin gradient. **J.Anim. Sci.** 1497-1502.

Evan, J. M., Douglas, T. A. & Renton, J. P. 1975. An attempt to separate fraction rich in human Y sperm. **Nature (London) 253:** 352.

Farrell, P. B., R.H. Foote, M.E. Simkin, E.D. Clegg and R. J. Wall, l993. Relationship of semen quality, number of sperm inseminated and fertility in rabbits**. J Androl. 14:**464-471.

Figge, J., Rossing. T. H and Fencl, V. 1991. The Role of serum protein in Acid-Base Equilibria. **J. Lab. Clin. Med. 117;** 453-467.

Flaherty, S. P., J. Michalowska, N. J. Swann, W. P. Dmowski, C. D. Matthews, and R. J. Aitken. 1997. Albumin gradients do not enrich Y-bearing human spermatozoa**. Hum. Reprod. 12(5):**938-942.

Garner, D. L., B. L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson, M. A. Van Dilla and L. A. Johnson. 1983. Quantification of the X-and Y-chromosome –bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry**. Biol. Reprod. 28:** 312.

Glover, T.D., Well, M., Lewis, F.A. and Lilford. R.D. 1990. Separation of X and Y spermatozoa by in situ hybridization. The Annual Conference of the Fertility Society of Australia, Preth. Cited by Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm. **Fertil. Steril. 59:** 382-386.

Glaub, J. C., Mills, R. N. and Katz., D. F. 1976. Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach. **Fertil. Steril. 27:** 1283-1976.

Gledhill, B. L. 1988. Selection and separation of X- and Y- chromosome-bearing mammalian sperm. Gamete Res. 20(3):377-395.

Goodall, H. and A. M Roberts. 1976. Differences in motility of human X and Y bearing spermatozoa . **J. Reprod. Fertil. 48:** 433-436.

Graves, J. A. M. And R. V. Short. 1990. Y or X-which determines sex ?. **Reprod. Fertil. Dev.2:** 729-735.

Guttenbach. M, Michelmann . H. W., Hinney. B, Engel. W, Schimid. M. 1997. Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47, XXY klinefelter ' s karyotype ; a fish analysis. **Hum. Genet 99:** 474-7.

Harrison, R. A. P., Dott, H. M. and Foster, G. C. 1978. Effect of ionic strength , serum albumin and other macromolecules on the mainternance of motility and surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. **J. Reprod. Fertil. 52:** 65

Han, T. L., S. P. Ford, G. C. Webb, S. p. Flaherty, A. Correl and C. D. Mettews. 1993b. Stimultanous detecttion of X – and Y- bearing human sperm by doulble fluorescence in situ hybridization. **Mol. Reprod. Dev. 34 :** 308-313.

Hunter, R. H. F. 1995. **Sex Determination, Differention, Differentiation and Intersexuality in placenta Mammals.** Cambridge University Press, Cambridge, London. 312p.

Iwasaki, S., Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara. 1988. Sex ratio of early embryo fertilizd in vitro with spermatozoa separated by percoll. **Theriogenology 30 (6):** 1191-1198.

Ishijima, S.E., M Okunu, Y. Nahori, S. Seki, S. Nagafuchi, S.Kaneko and H. Mohri. 1992. Identification of X –and Y- Chromosome bearing sperm separate by free-flow electrophotoresis Using Y-specific polymerase chain reaction. **Biomed. Res. 13:** 221-224.

Jafar. S. I., Flint. A. P. F. 1995. Sex selection in mammals : A review. **Theriogenology. 46:** 191-200.

Jeng, H.,K.M. Liu and W.C. Chang. 1993. Purificatio and characterization of reversible sperm motility inhibitors form porcine seminal plasma**. Biochemical and Biophysical Research Communication.** 191. 435-440.

Johnson L.A. and R. N. Clark. 1988. Flow sorting of X and Y chromosome beraing mammalian sperm : activate and pronuclear development of sorted bull, boar and ram sperm microinjected into population. **Gamete. Res. 21 :** 335-343.

Johnson, L. A., J. P. Flook, and H. W. Hawk. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting**. Biol. Reprod. 41(2):** 199-203.

Johnson, L. A. 1991. Sex preselection in swine: altered sex ratios on offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. **Reproduction in Domestic Animals 26:** 309-314.

_____. 1992. Racent progress in preselection of swine for sex. **Pig New and Information 13 (2)** : 63-65.

_____.1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review, **Reprod. Fertil. Dev., 7:** 893-903.

Kaneko, S., J. Yamaguchi, T. Kobayashi, and R. Iizuka. 1983. Separation of human Xand Y-bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. **Fertil. Steril. 40(5):** 661-665.

Kaneko, S., J. Yamaguchi, T. Kobayashi, and R. Iizuka. 1983. Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimention in percoll density gradient.**Biomend Res. 5 (2)** 197-194.

Kawarasaki,T., K. Matsumoto, J. Murofushi, M. Chikyu, Y. Itagaki, A. Horiuchi. 2000. Sexing of porcine embryo by in situ hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. **Theriogenology, 53:** 1501-1509.

_____ , T., Welch GR, Long CR, Yashida M, Johnson L. 1998. A verification of flow cytrometrically-sort X and Y–bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. **Theriogenology, 50**: 625-635.

_____ , T., T. Kohsaka, M Sone, M. Yashida and K. Bamba. 1996. Rapid and simultaneous detection of chromosome Y –and –bearing porcine spermatozoa by fluorescence in situ hybridization. **Mol. Reprod. Dev.43** :548-553.

_____ , T., T. Kohsaka, M Sone, M. Yashida and K. Bamba. 1995. Detection of Y- bearing porcine spermatozoa by in situ hybridization using digoxigenin labeled, porcine male – specific DNA prob proceduced by polymerase chain reaction . **Mol. Reprod. Dev.40** :455-459.

Keller, G.H., and M.M. Manak. 1989. **DNA probes**. Stockton Press, New York.

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

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

Lo Y-MD, Mechal WZ, Fleming KA. 1990. Incorporation of biotinylated dUTP. In Ma Innis, DH Gelfand, JJSninsky, TJ White (eds): " PCR Protocols: **A Guide to Methods and Applications** " San Diego: Academic Presss, pp 113-118.

MacGraw, J.A, Jacobson RJ, Akamatsu M. 1988. A male-specific repeated DNA sequence in domestics pig. **Nucleic Acids Res 16:** 10389.

Mc Evoy, J. D. 1992. Alteration of the sex ration. **Anim. Breed Abstr. 60:** 97-111.

Mohri. H. S. Oshio, S. Kaneko, T. Kobayawshi and R. Lizuka. 1987. Separation characterization of mammalian X- and Y- bearing sperm, pp. 469-481. In H. Mohri(ed.) **New Horizon in sperm cell research.** Gordon and Breach Sci. Publ., Baston.

Nalbandov. A. V. 1976. **Reproductive Phisiology of Mammal and Birds** . 2 nd ed., W.H. Freeman and Company, San Francisco. 333p.

Noakes, D.E., T.J. Parkinson and G.C.W. England. 2001. **Arthur' s Veterinary Reproduction and Obsterics**, 8th ed. W.B.Saunders, New York.

Ogawa, S., H. Yamakawa, J Yamanoi, S. Kano, T. Takeshima, K. Tauchi and H. Nagashima. 1988. Are fluorescent bodies of Y- spermatozoa detectable in common with mammalian species. **Theriogenology 29 :** 1083-1089.

Pearson, P. L., W. Boblow, C. C. Vosa and P. Barlow. 1971. Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes . **Nature (London). 231:** 326-329.

Petrvalsky, E. And O. Sova. 1986. Possible separation of ram and bull spermatozoa by a novel method : Industrail autofocusing. **J. Chromat 358:** 279-283

Pinkel D, D. L. Garner, B. L. Gledhill, S. Lake, D. Stephenson, L. A. Johnson. 1985. Flow cytometric determination of the proportion of X- and Y-bearing sperm in samples of purportedly separate bull sperm. **J. Anim Sci. 60.** 1303-1307.

Pyrzak, R. And Garrison. C. P. 1990. Application of DNA in situ hybridization using biotinylated probes of human X and Y sperm**. J. Androl., 11 (Meetings Suppl.), 46p.**

Quinlivan, W. L., K. Preciado, T. L. Long, and H. Sullivan. 1982. Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. **Fertil. Steril. 37 (1):** 104-107.

Roberts, S. J. 1971. **Vetrinary Obstetrics and Genetic Diseases**. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, MI.

Rohde, W., T. Porstman, S. Prehn and G. Dorner. 1975. Gravitational pattern of the Y- bearing human spermazoa in density gradient centrifugation. JH. **Repro. Fertil.42 :** 587-591.

Rose G.A. and Wong A. 1998. Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection. **Human Reproduction, 13:** 146-149.

Ross A, Robinson. J. A, Evan. H. J. 1975. Failure to confirm separation of X and Y- bearing human sperm using BSA gradients**. Nature; 253 :** 354-5.

Sambrook, J., Russell, D. W. 2001: Molecular cloning--a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

SAS. 1998. **SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6 ed. SAS** Institute Inc., North Carolina. 378p.

Schilling, E. And Schmid. 1967. Unterschiedliche Geschwrigkeiten leichter and schwerer Spermien im Ejakulat. Cite by E. Schilling. 1971. Sedimentation as and approach to the problem of separation X- and Y- chromosome bearing Spermatozoa, pp.76-84. **In A Symposium : Sex Ratio at Brith – Prospect for control.** Amer. Sco. Anim. Sci.

Schilling, E. 1971. Sedimentation as and approach to the problem of separation X- and Y- chromosome bearing Spermatozoa, pp.76-84. **In A Symposium : Sex Ratio at Brith – Prospect for control.** Amer. Sco. Anim. Sci.

Schwerin, M., S. Blottner, P. D. Thomsen. D. Rcschiau and G. Brockmann. 1991. Quantification of Y chromosome bearing spermatozoa of cattle using in situ hybridization. **Mol. Reprod. Dev.30 :** 39-43.

Short. R. V. 1982. Sex determination and and differentiation. Pp. 70-113. In C. R. Austin and R. V. Short (ed.). **Embyonic and Fetal Development.** Cambride Univ. Press. Cambridge.

Sinclair, A. H., P. Berta., M.S. Palmer., J. R. Hawkins., B. L. Griffiths., M. J. Smith ., J. W. Foster., A. M. Frischaut., R. Lovell-Badge and P. N.Goodfellow. 1990. A gene form the human sex-determination region encoding a protein with homology ta a conserved DNA –binding motif. Cited by J. A. M. Graves and R. V. Short. 1990. Y- and X-sperm Which Determine Sex. **Reprod. Fertil. Dev. 2 :** 729-735.

Singer, R., M. Sagiv, M Barbnet, D Allalouf, B. Landay , E. Segenreich and Servado. 1980. Properties of spermatozoa from homospermic and oligospermic human semen fractionated on column of discontinous gradients of albumin**. Int. J. Fertil. 25:** 51.

Totsukawa, K., T. Kayada, Y. Oshawa, H. Ueno, S. Suto and M. Togashi. 1988. Separation of boar spermatozoa using percoll density gradient centrifugation and detection of corpuscle- like fluorescent bodyies. **Jap. J. Anim. Reprod. 25 (3) :** 147-152.(Abstr.)

Ueda, K., and R. Yanagimachi. 1987. Sperm chromosome analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation. **Gamete Res. 17(3):** 221-228.

Upreti, G.C., P.C. Riches and L. A. Johnson. 1988. Attempted Sexing of bovine spermatozoa by fraction on a percoll density gradient. **Gamete. Res. 20 :** 83-92.

van Kooij, R. J., and B. A. van Oost. 1992. Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison. **Fertil. Steril. 58(2):** 384-386.

Vidal, F., M. Moragas, V. Catala, M. J. Torello, J. Santalo, G. Calderon, C. Gimenez, P. N. Barri, J. Egozcue, and A. Veiga. 1993. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. **Hum. Reprod. 8(10):**1740-1743.

Vocani, R., D. Amir and U. Lavon. 1969. Report to united states grovenment from the national and university insttute of agriculture. Cited by G. F. Bahr. Separation of X- and Y-bearing spermatozoa by gravity : a reconsideration, pp. 28-37. ***In*** **A Symposium : Sex ratio at birth – Pros – Pects for control.** Amer. Soc. Anim. Sci.

Wall, R. J. D.A Jerrard and R. H. Foote. 1980. Separation of rabbbit and bull spermatozoa on bovine serum albumin gradients. Biol. Reprod. 22 (suppl.1) :94 (Abstr.) Cited by Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. 1993. Sex preselection through albumin separation of sperm**. Fertil. Steril. 59:** 382-386.

Wang, H. X., S. P. Flaherty, N. J. Swann and C. D. Matthews. 1994(b):Assessment of the separation of X- and Y-bearing sperm on albumin gradients using double-label fluorescence in situ hybridization. **Fertil. Steril. 61**, 720-726

White, L.M., W. E. Beal, J. H. Bame,R . G. Saacke and C. E. Marshall.1984. Characteristic of bovine spermatozoa after migration though a bovine serum albumin gradient. **J. Anim. Sci. 59:** 545.

White, I. G. And Mendoza, G. 1984. Preselection of sex of lamb by layering spermmatoa on protein columns. **Reproduction in sheep.** 299-300.

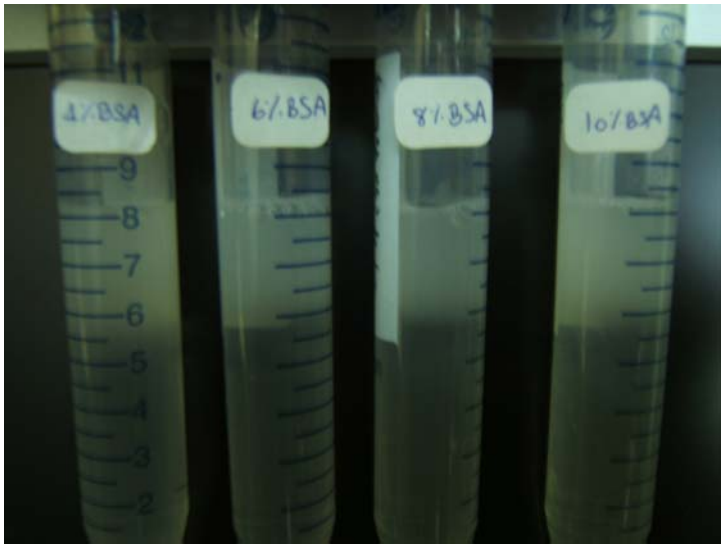
White, K. L. 1989. Embryo and gamete sex selection, pp. 179-202. In L. A. Babiux and J. P. Philips (eds.). **Animal Biotechnology.** Pergamon Press, Oxford.

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

ภาคผนวก

<u>ตารางผนวกที่ 1</u> สูตรอาหารสุกรพ่อพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ	ปริมาณ(Kg)
ข้าวโพด	48.25
รำละเอียด	25.00
กากถั่วเหลือง	17.00
ปลาป่น(58%)โปรตีน	5.00
ไขมันสัตว์	1.00
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	3.00
เกลือ	0.50
ฟรีมิกซ์	
รวม	100
ปริมาณโภชนะโดยการคำนวณ	
โปรตีน(เปอร์เซ็นต์)	17.00
พลังงานใช้ประโยชน์ได้(กิโลแคลอรี)	3013.11
ไขมัน(เปอร์เซ็นต์)	6.47
เยื่อใย(เปอร์เซ็นต์)	5.45
แคลเซียม(เปอร์เซ็นต์)	1.12
ฟอสเฟตใช้ประโยชน์ได้(เปอร์เซ็นต์)	0.86
ไลซีน (เปอร์เซ็นต์)	0.92



<u>ภาพผนวกที่ 1</u> การปล่อยน้ำเชื้อผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน