การประเมินการคัดแยกอสุจิที่นำโครโมโซมวายในสุกรโดยผ่านความเข้มข้นต่างๆ ของโบวายซีรั่มอัลบูมิน

An Assessment of the Separated Y-bearing Boar Sperms through the Bovine Serum Albumin Concentration

คำนำ

การกำหนดเพศในสัตว์เลี้ยงถือเป็นเรื่องที่มีประโยชน์ต่อการผลิตสัตว์เป็นอย่างมาก ซึ่งความเป็นไปได้ในการกำหนดเพศสัตว์ก่อนคลอดมีส่วนสำคัญต่อแนวทางการจัดการฟาร์มให้เหมาะสมกับเพศสัตว์ การปรับปรุงประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของฝูงสัตว์ในฟาร์ม และการวางโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ ตัวอย่างเช่นในการผลิตสุกรพันธุ์แท้ดูรอค เกษตรกรต้องการได้ลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมียเพื่อหวังผลิตเป็นสุกรสายพ่อพันธุ์ขายให้แก่ฟาร์มที่ผลิตสุกรขุนเลือด 3 สาย โดยนำไปผสมกับแม่พันธุ์เลือดผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์×แลนด์เรซ) ในทางกลับกันฟาร์มที่ผลิตสุกรขุนเลือดผสม 3 สายต้องการลูกสุกรเพศเมียเลือด 2 สาย เพื่อสร้างฝูงแม่พันธุ์ทดแทนให้เพียงต่อการผลิตของเล้าแม่พันธุ์ หรือส่วนหนึ่งเพื่อการขุนขาย เพราะสุกรเพศเมียมีคุณภาพเนื้อแดงดีกว่าเพศผู้เป็นต้น

ซึ่งการกำหนดเพศในสัตว์ก่อนการปฏิสนธิมีอยู่ด้วยกัน 2 วิธีคือวิธีที่ 1 ให้อสุจิเคลื่อนที่ผ่านเครื่อง flow cytometer โดยอาศัยความแตกต่างของปริมาณ DNA ระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y (Johnson, 1992) นำอสุจิที่แยกได้มาปฏิสนธินอกตัวสัตว์แล้วทำการฝากถ่ายตัวอ่อนรอผลการคลอดของแม่สัตว์ พบว่าสามารถให้ลูกสัตว์ที่มีเพศตรงกับความต้องการแต่วิธีการนี้อสุจิต้องผ่านแสงเลเซอร์ และผ่านสารเคมีซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมในเซลล์อสุจิ อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง วิธีที่ 2 ให้อสุจิเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์สารละลาย (sperm selection by gradient) เช่น การใช้สารละลายเพอร์คอลล์ต่างระดับความเข้มข้นในการคัดแยกอสุจิ X (Kaneko *et al.,* 1983) หรือการใช้ความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน เพื่อคัดแยกอสุจิ Y โดยมีรายงานว่าเมื่อให้อสุจิเคลื่อนที่ผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมินสามารถแยกอสุจิที่นำโครโมโซมวายได้สำเร็จในคนถึง 85 เปอร์เซ็นต์หลังตรวจสอบด้วยการย้อมสี Quinacrine hydrochloride (Ericsson *et al.,* 1973) นอกจากนี้ความเข้มข้นของซีรั่มอัลบูมินชนิด Human serum albumin สามารถแยกอสุจิ Y ได้ถึง 55-70 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบโครโมโซมอสุจิ Y จาก DNA probe (Pyzak and Garrison.,

1990; Glover *et al.,* 1990) ในอดีตการประเมินความสำเร็จการคัดแยกอสุจิในสัตว์จึงขึ้นอยู่กับ 2 วิธี คือ การวิเคราะห์โครโมโซม (chromosome analysis) หลังทำการปฏิสนธินอกตัวสัตว์ หรือนำน้ำเชื้อที่คัดแยกเพศของอสุจิแล้วไปผสมเทียมให้แก่แม่สัตว์เพื่อรอดูเพศจากลูกแรกคลอด (sex ratio) (Johnson *et al.,*1989) ในปัจจุบันการประเมินความสำเร็จของการคัดแยกอสุจิอาศัยความจำเพาะระดับกรดนิวคลีอิกเป็นการตรวจสอบการเข้าจับกันระหว่าง labeled nucleic acid probe กับ complementary sequence ในโครโมโซมซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยการเรืองแสง (fluorescien) (wang *et al.,*1994; Lin *et al.,*1998) หรือตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาเอนไซม์และสับเตรท ซึ่งผลของการทำปฏิกิริยาจะให้สีเกิดขึ้น (Kawarasaki *et al.,*1995) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินการคัดแยกอสุจิ Y ในน้ำเชื้อสุกรก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน โดยตรวจสัดส่วนของอสุจิ Y ด้วยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาความสำเร็จในการแยกอสุจิวายจากน้ำเชื้อพ่อสุกรด้วยการผ่านชั้นความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับแตกต่างกัน โดยมีการศึกษาดังต่อไปนี้

1. ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกร หลังจากผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินโดยตรวจสอบ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ การเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น และความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ

2. ศึกษาสัดส่วนระหว่างอสุจิ X ต่ออสุจิ Y ของสุกรหลังจากผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับแตกต่างกัน โดยวิธี nonradioactive *in situ* hybridization

การตรวจเอกสาร

การกำหนดเพศในทางธรรมชาติ

การกำหนดเพศในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่าง ๆ จะเกิดขึ้น เมื่อโครโมโซม X หรือ Y ของอสุจิได้รับการปฏิสนธิกับไข่ของสัตว์เพศเมีย (อเนก, 2535) ผลของการปฏิสนธิจะเกิดการกำหนดเพศเป็น 2 ลักษณะ คือ เพศเมีย หรือเพศผู้โดยกรณีที่อสุจิ Y ตัวอ่อนจะพัฒนาต่อไปเป็นสัตว์เพศผู้ โครโมโซมเพศที่ถูกกำหนด คือ XY (heterogametic sex) หากเป็นกรณีของอสุจิ X ตัวอ่อนจะพัฒนาต่อไปจนเป็นเพศเมียมีโครโมโซมเพศเป็น XX (homogametic sex) (Grave and Short, 1990; Hunter, 1995)

ในทางทฤษฎีการกำหนดเพศของสัตว์เพศใดเพศหนึ่งจะมีโอกาสในการเกิดอย่างละเท่าๆ กันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Guttenbach *et al.,* 1997) โดย Short (1982) กล่าวว่าการแสดงออกของลักษณะทางเพศจะขึ้นอยู่กับการควบคุมของยีนหลายชุดที่ทำงานร่วมกันซึ่งยีนนั้นๆ จะอยู่บนโครโมโซม X และโครโมโซม Y ยีนที่ควบคุมลักษณะเพศผู้คือยีนTDF (testis-determining factor gene) มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม Y และจะพบได้ที่ pseudo-autosomal เท่านั้น ยีน TDF เป็นตัวเริ่มต้นในการกำหนดเพศของตัวอ่อน (sex determination) ก่อให้เกิดอัณฑะและเริ่มขบวนการหลั่งฮอร์โมนชักนำให้มีการพัฒนาลักษณะของเพศผู้ หน้าที่ของยีน TDF จะเปลี่ยนแปลง undifferentiate stroma ให้กลายเป็น sertori cell (somatic differentiation) (Sinclair *et al.,* 1990) นอกจากนี้ยีนตัวอื่นๆ ที่อยู่บนโครโมโซม Y และโครโมโซม X จะควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ germ cell ให้กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell differentiation) ซึ่งภายหลังจากการกำหนดเพศเกิดขึ้นตัวอ่อนจะมีการพัฒนารูปร่างสรีระ และพฤติกรรมที่แตกต่างไปตามลักษณะของเพศที่ถูกกำหนดขึ้น (Nalbadov, 1976; Graves and Short, 1990)

เทคโนโลยีการคัดแยกเพศในลูกสัตว์ (Sex selection)

ความพยายามคิดค้น และพัฒนาเทคนิคการคัดแยกเพศของลูกสัตว์มีจุดมุ่งหมายเพื่อหวังเพิ่มสัดส่วนทางเพศของสัตว์เพศใดเพศหนึ่ง ด้วยวิธีการคัดแยกอสุจิก่อนนำไปผสมในสัตว์เพศเมีย การคัดแยกเพศจะส่งผลโดยตรงต่อสัดส่วนทางเพศของลูกสัตว์ที่กำเนิด และผลตอบแทนทางมูลค่าเศรษฐกิจ การพัฒนาเทคนิคการคัดแยกเพศแบ่งเป็น 2 แบบ คือการคัดแยกเพศก่อนการปฏิสนธิ

(Pre-conception technique) และการคัดแยกเพศหลังการปฏิสนธิ (Post-conception technique) (Bearden and Fuquay, 1992; McEvoy, 1992)

เนื่องจากการกำหนดเพศทางธรรมชาติถูกกำหนดขึ้นโดยชนิดของอสุจิ X และอสุจิ Y การคัดแยกอสุจิชนิดใดชนิดหนึ่งออกจากกันได้แล้วนำมาปฏิสนธิกับไข่ย่อมมีความเป็นไปได้ที่ลูกสัตว์หลังคลอดจะให้เพศตามต้องการ ซึ่งการคัดแยกเพศก่อนการปฏิสนธิ ถือเป็นเทคนิคเริ่มแรกที่มีการพัฒนาขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานความแตกต่างเฉพาะตัวของอสุจิ X และอสุจิ Y (อนันต์, 2535; BjÖrn and Barratt, 2002) ดังนี้

1. ความแตกต่างด้านรูปร่าง

รูปร่างของตัวอสุจิมีลักษณะคล้ายใบพายโดยอสุจิ X ของคนเมื่อมองจากด้านบนเส้นขอบข้างมีลักษณะเหมือนลิ่ม ส่วนอสุจิ Y จะเป็นท่อนทรงกลมยอดแหลม (Bahr, 1971) ขนาดของอสุจิ X โดยเฉลี่ยของส่วนหัวถึงคอ และหางจะมีขนาดใหญ่ และมีความยาวมากกว่าอสุจิ Y (Cui, 1997) เมื่อนำความยาวหารด้วยความกว้างของส่วนหัวอสุจิ X และอสุจิ Y พบว่ามีค่าประมาณ 1.6 และ 1.7 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Mohri *et al.,* 1987)

2. ความแตกต่างของความหนาแน่นของปริมาณ DNA และอัตราการตกตะกอน

ในคนปริมาณ DNA และโปรตีนภายในนิวเคลียสของอสุจิ X จะมากกว่าอสุจิ Y อยู่ประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y และอสุจิ X ของมนุษย์และโคจะมีสัดส่วนของน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y ใกล้เคียงกันคือประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ (Mohri *et al.,* 1987) ส่วนอสุจิ X ในสุกร พบว่าน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y มีประมาณ 3.7 เปอร์เซ็นต์ (Johson and Clark, 1989) ผลของความแตกต่างเนื่องจากน้ำหนักจะมีผลให้ค่าเฉลี่ยความถ่วงจำเพาะของอสุจิในสัตว์เลี้ยงในฟาร์มมีค่าประมาณ 1.0376-1.1000 (Volcani *et al.,* 1969) ซึ่งส่งผลให้ค่าความหนืดในการปล่อยของอสุจิทั้งสองมีความแตกต่างกันประมาณ 7×10^{-4} gcm^{-3} (Winsor *et al.,* 1993)

3. ความแตกต่างของลักษณะการว่ายของอสุจิ

เนื่องจากขนาด และน้ำหนักของอสุจิ X ที่มากกว่าทำให้อสุจิ Y เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอสุจิ X (Ericsson, 1973) และส่วนคอและหางของอสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y (Cui, 1997) อสุจิ X ในโค และแกะจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ช้ากว่ากว่าอสุจิ Y ประมาณ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการทดสอบให้อสุจิทั้งสองชนิดเคลื่อนผ่านเมือกจากคอมดลูก (cervical mucus) ภายในหลอดทดลองพบว่าอสุจิ Y เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอสุจิ X (Shilling and Schmid., 1967)

4. ความแตกต่างของประจุบนตัวอสุจิ

Kaneko *et al.* (1983) รายงานว่าที่ผนังเยื้อหุ้มเซลล์ของอสุจิ X จะมีประจุลบมากกว่าอสุจิ Y เนื่องจากมีพื้นที่ผิวส่วนหัวมากกว่าอสุจิ Y ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ผลรวมประจุลบมีมากกว่า (Mohri *et al.,*1987) และภายในเยื้อหุ้มเซลล์ของอสุจิ X เป็น glycoprotein จำพวก sialic acid และ sulphate ซึ่งมีมากกว่าอสุจิ Y เมื่อผ่านกระบวนการ electrophoresis ทำให้อสุจิ X เคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ (cathode) และอสุจิ Y จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode) (Ishijima *et al.,* 1992) ทำให้ค่าความแตกต่างของการเคลื่อนที่เข้าหาประจุไฟฟ้า (electrophoresis motilities) ของอสุจิ X และอสุจิ Y มี Isoelectric point (PI) ที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังผ่านสารละลายที่มีความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน เมื่ออสุจิเคลื่อนที่ถึงจุด จุดหนึ่งอสุจิจะหยุดเคลื่อนที่แสดงว่าอสุจิชนิดนั้นอยู่ในระดับค่า PI ของอสุจิชนิดนั้นแล้ว (Petrvalsky and Sova, 1986)

5. ความสามารถในการติดสี Quinacrine fluorochromes

การย้อมสีอสุจิด้วย Quinacrine hydrochloride ทำให้ตัวอสุจิ Y เกิดการเรืองแสงเป็นจุดกลม เรียกว่า F-body ภายในนิวเคลียสของโซมาติกเซลล์โดยจุดเรืองแสงที่ปรากฏจะมีขนาด 0.25 ไมโครเมตร (Barlow and Vosa, 1970) แต่เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบได้เฉพาะกับโครโมโซม Y ของอสุจิคน และลิงกอลิล่าเท่านั้น (Person *et al.,* 1971) ส่วนผลการตรวจสอบอสุจิในสัตว์เลี้ยงอื่นๆ พบว่าเกิดจุด F-body เพียง 5-40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Ogawa *et al.,* 1988) ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชนิดอสุจิในสัตว์ได้ เนื่องจากลักษณะ F-body ที่ย้อมตัวอสุจิ Y บางตัวไม่ติดสี และมีบางส่วนที่ไม่ใช้อสุจิ Y แต่สามารถเกิดลักษณะ F-body (Beatty, 1977) จึงไม่ประสบผลสำเร็จในการแยกความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ในสัตว์ชนิดอื่น (Iwasaki *et al.,* 1988)

6. ความเป็นกรด-ด่าง

สุวรรณ (2534) และ Kaneko *et al.* (1983) กล่าวว่าอสุจิ Y มีความสามารถที่ทนต่อสภาพความเป็นด่างได้ดีกว่าอสุจิ X ขณะเดียวกันอสุจิ X จะทนต่อสภาพความเป็นกรดได้ดีกว่าอสุจิ Y ความสามารถในการทนทานต่อสภาพความเป็นกรด-เป็นด่างอาจเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของประจุที่บนตัวอสุจิแต่ละชนิดและ Schilling (1971) ได้ทดสอบความสามารถในการทนทานต่อความเป็นกรดเป็นด่างของอสุจิ และพบว่าอสุจิทั้ง X และ Y มีความสามารถทนต่อสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต และกรดแลกติกแต่ไม่สามารถทนต่อสารละลายกรดมาลิก กรดแอสคลอบิก และกรดไฮโดรคลอริกในส่วนของกรดซิตริก และกรดแลกติกจะมีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวของอสุจิ

7. แอนติเจนบนผิวบนตัวอสุจิ

ผนังเซลล์ของอสุจิ Y (sperm plasma membrane) มีความแตกต่างจากอสุจิ X คืออสุจิ Y สามารถพบ Y-linked histocompatibility antigen (H-Y antigen) บนส่วนของโซมาติกเซลล์ของเพศชาย ซึ่ง H-Y antigen เกี่ยวข้องกับการควบคุมยีนของโครโมโซม Y ของสัตว์เลี้ยงลูกเลี้ยงด้วยนม จากการทดลองในหนูเพศเมีย พบว่าไม่สามารถยอมรับการปลูกถ่ายผิวหนังจากหนูเพศผู้ถึงแม้ว่าหนูเพศผู้นั้นจะคลอดออกมาเพศเดียวกัน แต่กลับยอมรับผิวหนังที่ได้จากเพศเมียด้วยกันเท่านั้น (Gledhill, 1988) อย่างไรก็ตามปัจจุบัน ยังไม่พบว่ายีน H-Y expression ที่ส่วน long arm หรือ centromere ของโครโมโซมของคน (Jafar and flint, 1995)

<u>การคัดแยกเพศก่อนการปฏิสนธิ (Pre-conception technique)</u>

ความรู้พื้นฐานเบื้องต้นในด้านของความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกอสุจิก่อนนำมาปฏิสนธิ (pre conception) เพื่อนำอสุจิไปใช้ผสมเทียมในขั้นต่อไปแนวทางของวิธีการคัดแยกก่อนการปฏิสนธิ (pre-conception selection methods) สามารถทำได้ 2 วิธีหลักคือ วิธีแรกให้อสุจิเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์สารละลาย (sperm selection by gradient) และวิธีที่สองอสุจิเคลื่อนที่ผ่านเครื่อง flow cytometer นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆเช่นวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunnological techniques) หรือการผ่านกระบวนการ electrophoresis เป็นต้น

การคัดแยกเพศโดยอสุจิผ่านคอลัมน์สารละลาย (Sperm selection by gradient)

หลักการโดยรวมการคัดแยกเพศโดยอสุจิผ่านคอลัมน์สารละลายจะอาศัยความแตกต่างของรอบการปั่นเหวี่ยงโดยให้น้ำเชื้อผ่านคอลัมน์ของสารละลายเช่น Albumin หรือ Percoll™ และ Ficoll™ หรือผ่านเม็ดเจล Sephadex™ อสุจิจะปล่อยผ่านชั้นสารละลายเหล่านี้ โดยคำนึงถึงการเคลื่อนที่ของอสุจิแบบ migration ผ่านความเข้มข้นของสารละลายชั้นต่างๆ ภายในคอลัมน์ที่ใช้แยกตามวิธีการและขั้นตอนของสารละลายแต่ละชนิด (BjÖrndahl and Barratt, 2002)

Albumin gradient

Ericsson (1973) รายงานว่า เมื่อนำอสุจิมาว่ายผ่านชั้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าอสุจิ Y จะว่ายได้เร็วกว่าอสุจิ X ทำให้มีจำนวนอสุจิ Y จะเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของชั้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน หลังจากตรวจสอบการย้อมอสุจิที่ผ่านชั้นสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินด้วย quinacrine dihydrochoride dye โดยพบว่าที่ชั้นล่างสุดของสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินจะเกิดการเรืองแสงของอสุจิ Y ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากรายงานนี้แพร่หลายออกไปได้มีนำสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินมาทำการทดลองแยกอสุจิของคน และสัตว์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งพบว่ามีทั้งที่ประสบผลสำเร็จ และไม่ได้ผลสำเร็จ เช่นการแยกเพศอสุจิของคนด้วยโบวายซีรั่มอัลบูมินแทนที่จะแยกได้อสุจิ Y กลับแยกอสุจิ X ได้มากกว่า (Brandriff *et al.,* 1980) หรือสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y ได้เล็กน้อย (Ueda and Yanagimachi, 1987) อย่างไรก็ตามได้มีการทดลองยืนยันผลของการใช้สารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน เพื่อเพิ่มสัดส่วนของอสุจิ Y ในคนโดยให้ผลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dmowski *et al.,* 1979; Beerink and Ericsson, 1982; Corson *et al.,* 1984; Beerink *et al.,* 1993; Rose and Wong, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถแยกอสุจิ Y ของแกะได้ด้วย (White and Mendoza, 1984)

Density gradient centifugation

วิธีการแยกอสุจิโดยวิธีนี้ จะอาศัยความแตกต่างระหว่างน้ำหนักของอสุจิโดยใช้แรงเหวี่ยงจากเครื่องมือทำการปั่นแยกอสุจิโดยอสุจิ X ซึ่งมีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y จะสามารถตกลงสู่ก้นหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y การผ่านนำน้ำเชื้อผ่านสารละลายในระดับที่มีความหนาแน่น

แตกต่างกันจะมีประสิทธิภาพในการแยกอสุจิเพิ่มขึ้น (อนันต์, 2535) สารตัวกลางที่ใช้แยกอสุจิเช่น Percoll และ Ficoll หรือ Sephadex (BjÖrndahl and Barratt, 2002) หรือซูโครส (Rhode *et al.,* 1975)

การใช้สารละลายต่างความเข้มข้นของ Percoll เพื่อนำมาใช้คัดแยกเพศในคน พบว่า สามารถแยกสัดส่วนของอสุจิ X ให้เพิ่มมากขึ้น โดยแยกอสุจิได้จากส่วนของก้นหลอดของสารละลาย และแสดงลักษณะการติดสีย้อม F-body เพียง 27.7 ±3.4 เปอร์เซ็นต์ (Kaneko *et al.,* 1983) และการทดลองของ Morhi *et al*. (1987) พบว่าติดสีย้อม F-body 23.3 ±6.3 เปอร์เซ็นต์ แต่การทดลองของ Totsukawa *et al*. (1988) รายงานว่าอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดที่ผ่านการแยกโดย Percoll แสดง F-body 43-44 เปอร์เซ็นต์แสดงว่ามีอสุจิ X อยู่ประมาณ 55-56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่อนข้างจะใกล้เคียงกันมาก และพบว่าการใช้วิธีปั่นแยก และไม่ปั่นแยกให้อสุจิผ่านสารละลาย Percoll ทำการตรวจสอบ DNA ของอสุจิที่ส่วนล่างของก้นหลอดซึ่งให้ผลไม่มีความแตกต่างกัน

Iwasaki *et al.* (1988) รายงานว่าเมื่อนำน้ำเชื้อโคมาปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลาย Percoll นำไปผสมเทียมในแม่โค แล้วตรวจเพศของตัวอ่อนระยะ blastocyste โดยวิธี chromosome analysis ให้สัดส่วนของลูกโคเพศเมียและเพศผู้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Upreti *et al.,* (1988) อสุจิโคที่ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลาย Percoll พบว่าค่าสัดส่วนเพศมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากตรวจสอบการคัดแยกอสุจิด้วยวิธี flow cytometer ในสุกรพบว่าน้ำเชื้อสุกรที่ผ่านสารละลาย Percoll ปั่นแยกอสุจิ พบว่า กลับเพิ่มสัดส่วนลูกเพศผู้มากขึ้น (ประมวล, 2540)

Sephadex gel filtration จะอาศัยหลักการแยกโมเลกุลใหญ่ (อสุจิ X) ออกจากโมเลกุลเล็ก (อสุจิ Y) ด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยโมเลกุลเล็กสามารถผ่านลูกปัดเจลเข้าไปแล้วถูกจับไว้ภายในคอลัมน์ ส่วนโมเลกุลใหญ่จะสามารถผ่านรูเม็ดวุ้นได้ จึงแทรกตัวผ่านตาข่ายวุ้นลงไปก่อน (อนันต์, 2535) วิธีการนี้สามารถแยกอสุจิ X ถึง 95 เปอร์เซ็นต์จากการตรวจสอบด้วย F-body หลังจากน้ำเชื้อผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 (Adimoelij, 1987) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากขนาดของอสุจิ X และอสุจิ Y แตกต่างกันน้อยมากกลไกการแยกกันของอสุจิทั้งสองชนิดอาจไม่ใช่เพียงแต่ขนาดของอสุจิเท่านั้น แต่อาจเนื่องมาจากการดูดซึมของอนุภาควุ้นต่ออสุจิ Y มากกว่าอสุจิ X (Batzofin, 1987)

Flow cytometer

หลักการของเครื่องนี้คือปริมาณ DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y เมื่อให้แสงเลเซอร์ส่องผ่านอสุจิทั้งสองชนิดจะเกิดหักเห และมุมกระเจิงที่แตกต่างกันโดยมีคอมพิวเตอร์ประมวลผลการกระเจิงของแสงที่ตกกระทบกับตะกอนแขวนลอยอสุจิ ทำให้สามารถแยกอสุจิ X ออกจากอสุจิ Y (Johnson, 1995) ในสัตว์เลี้ยงพบว่าความแตกต่างของ DNA ที่เป็นองค์ประกอบของอสุจิ X และอสุจิ Y จะมีค่าประมาณ 3.5-4.5 เปอร์เซ็นต์ (Johnson and Clare, 1988) การคัดแยกอสุจิด้วยวิธีนี้สามารถแยกชนิดของอสุจิ X ได้เฉลี่ย 92.7±1.6 เปอร์เซ็นต์ อสุจิ Y เฉลี่ย 91.2±2.6 เปอร์เซ็นต์ Johnson (1991, 1992) พบว่าเมื่อนำกลุ่มอสุจิ X ที่ผ่านการคัดแยกมาผสมเทียมในแม่สุกร ได้ลูกเพศเมียแรกคลอดคิดเป็น 74 เปอร์เซ็นต์และเพศผู้ 26 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันนำกลุ่มอสุจิ Y ทำการผสมเทียมได้ลูกแรกคลอดเพศผู้ 68 เปอร์เซ็นต์และเพศเมีย 32 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Johnson (1989) ที่นำน้ำเชื้อกระต่าย มาผ่านการแยกด้วยวิธีแบบเดียวกับในสุกร แล้วนำมาผสมเทียมพบว่า กลุ่มอสุจิ X ที่แยกได้จะให้ลูกเพศเมียแรกคลอด 94 เปอร์เซ็นต์และเพศผู้ 6 เปอร์เซ็นต์และเมื่อทดสอบนำอสุจิ Y ที่แยกได้มาผสมจะให้ลูกเพศผู้ 81 เปอร์เซ็นต์และเพศเมีย 19 เปอร์เซ็นต์ การแยกอสุจิด้วยวิธีการนี้ อสุจิต้องผ่านแสงเลเซอร์ และผ่านสารเคมี ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดปกติของ DNA (mutation) ของอสุจิเป็นผลให้อัตราการผสมติดต่ำลง (McEvoy, 1992) อีกทั้งไม่สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ได้ เนื่องจากใช้อัตราในการคัดแยกอสุจินาน 350,000 ตัวต่อชั่วโมง และอัตราการตายของตัวอ่อนสูงอาจเป็นเพราะ fluorochrome ที่ติดอยู่ที่ DNA ของอสุจิ และเครื่องคัดแยกอสุจิ Flow cytrometer มีราคาค่อนข้างสูง (Bearden and Fuquay, 1992; Johnson, 1995) อย่างไรก็ตามหากนำวิธีนี้มาใช้ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) หรือการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo transfer) จะให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่ามากกว่า (Johnson, 1995)

<u>การตรวจสอบประสิทธิภาพการคัดแยกอสุจิ X และอสุจิ Y</u>

การตรวจสอบเพื่อเป็นการยืนยันว่าอสุจิที่ทำการแยกได้โดยวิธีต่างๆ นั้นมีจำนวนและสัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y มากหรือน้อย ประสบผลสำเร็จจากการแยกอสุจิชนิดใดมากกว่ากัน ซึ่งมีวิธีการตรวจสอบดังนี้

1. จำนวนลูกแรกเกิด (Sex of offspring)

เป็นการตรวจประสิทธิภาพการคัดแยกอสุจิในทางอ้อม โดยนับจำนวนลูกที่เกิดว่ามีสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย อสุจิที่แยกได้นำไปผสมเทียมเพื่อดูเพศลูกเมื่อแรกคลอด วิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์ จำนวนลูกมีชีวิต และประสิทธิภาพในการคัดแยกชนิดอสุจิแต่ละวิธี แต่เนื่องจากต้องรอให้แม่สัตว์ตั้งท้องจนกระทั่งคลอด เพื่อเก็บข้อมูลสัดส่วนเพศให้มีจำนวนมากพอมาใช้วิเคราะห์ในทางสถิติ จึงสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น (Windsor *et al.,* 1993)

2. การเรืองแสง (Quinacrine staining)

เป็นการย้อมอสุจิด้วยสารเรืองแสง Quinacrine เพื่อการตรวจสอบเฉพาะอสุจิ Y เท่านั้น ซึ่งสามารถแยกได้ดีกับอสุจิของคน และลิงกอลิล่า (Barlow and Vosa, 1970) การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ยังพบว่า นอกเหนือจากการติดสีกับอสุจิ Y แล้วยังสามารถติดสีกับส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่อสุจิ Y ได้อีกด้วย (Beatty, 1977; Goodall and Robert, 1976) จากการเปรียบเทียบกับการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การวิเคราะห์โครโมโซมอสุจิ (Ueda and Yanagimachi, 1987; Brandriff *et al.,* 1986) หรือการตรวจสอบ DNA (DNA probe) (Van Kooij and Van Oost, 1992) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เพื่อจำแนกชนิดของอสุจิชนิดใดชนิดหนึ่งได้ ซึ่งหากมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบด้วยสี Quinacrine ให้มีความสามารถติดอสุจิ Y ในสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นมากขึ้นจะมีประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากขั้นตอนไม่ซับซ้อน และง่ายต่อการปฏิบัติ (อนันต์, 2535)

3. การตรวจสอบโครโมโซมอสุจิ (Sperm karyotype analysis)

การวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของโครโมโซมโดยการให้อสุจิเจาะผ่าน zona free hamster egg หลังเจาะผ่านแล้วโครโมโซมจะเริ่มคลายตัว และเข้าสู่การแบ่งเซลล์ระยะ Metaphase นำโครโมโซมที่แบ่งตัวในระยะนี้มาวิเคราะห์ว่าเป็นโครโมโซม X หรือโครโมโซม Y แต่วิธีการค่อนข้างซับซ้อนจึงต้องมีความละเอียดในขั้นตอนการตรวจสอบ (Ueda and Yanagimachi, 1987) เป็นการตรวจสอบที่ต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมากกว่า 250 ตัวอย่างเพื่อกำจัดค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น จากขั้นตอนสุ่มการปฏิสนธิของอสุจิ X และอสุจิ Y (Amann,1989) วิธีนี้ใช้เวลามากและมีข้อจำกัดของตัวอย่างในการวิเคราะห์ ทำให้การเก็บข้อมูลได้จำนวนน้อย แต่มีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจสอบด้วยสี Quinacrine (Windsor, 1993)

4. Flow Cytometer

อสุจิจะถูกย้อมด้วย DNA-specific fluorescent เช่น Hoechst33342 ซึ่งเป็น bisbenzimide จะทำปฏิกิริยาเข้าจับกับเบส adenine-thymine ที่สาย DNA อสุจิที่ถูกย้อมด้วยสีดังกล่าว เมื่อเคลื่อนผ่านเครื่อง flow cytometer จะถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ แล้วทำการประมวลผลจากแสงที่ตกกระทบกับอสุจิ จากการแสดงลักษณะเรืองแสงที่แตกต่างกันออกไประหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ตามปริมาณ DNA จึงสามารถแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ออกจากกันได้ (Johnson *et al.,* 1988) เป็นการตรวจสอบที่ให้ผลรวดเร็ว และแม่นยำสูง (Johnson, 1995) เสียเวลา และค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการตรวจชนิดของอสุจิจากการดูสัดส่วนของลูกแรกคลอด (White, 1989)

5. H-Y Antibodies

อสุจิ Y มี H-Y Antigen บนผนังเซลล์มากกว่า และมีปริมาณ DNA น้อยกว่าอสุจิ X โดยใช้ antibody ชนิดที่ 1 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ H-Y Antigen ของอสุจิ Y จากนั้นใช้ antibody ชนิดที่ 2 ซึ่งจำเพาะกับ antigen ชนิดที่ 1 จับทำให้สามารถนับอสุจิ Y ได้จากการนับอสุจิที่ติดสารเรืองแสง fluorescent จึงสามารถแยกอสุจิ X ออกจากอสุจิ Y ได้ (อนันต์, 2535)

6. การตรวจสอบ DNA

จำเป็นต้องทราบลำดับเบสบางส่วนบนโครโมโซม Y ซึ่งสามารถนำมาตรวจสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) หรือ fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (Windsor *et al.,* 1993) จากการตรวจสอบชนิดของอสุจิในคน (Han *et al.,* 1993b) ในอสุจิโค (Schwerin *et al.,* 1991) สุกร (Kawarasaki *et al.,* 1995) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถตรวจสอบชนิดของอสุจิที่มีความแม่นยำสูง และใช้เวลาน้อย (Mc Evoy, 1992)

<u>ประสิทธิภาพสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินต่อการคัดแยกเพศ และการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อ</u>

ซีรั่มอัลบูมิน หรือพลาสม่าอัลบูมิน เป็นกลุ่มโปรตีนที่ละลายน้ำ และมีความสำคัญต่อระบบหมุนเวียนโลหิตในร่างกาย คือ ช่วยลดแรงดันออสโมติกในเลือด 80 เปอร์เซ็นต์ (Carter and Ho, 1994) รักษาระดับ pH ในเลือด (Figge *et al.,* 1991) จึงไม่เป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ

เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการคัดแยกอสุจิ Y และเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อ (Ericsson *et al.,* 1973; Estienne *et al.,* 1988; 1989)

Robert (1971) กล่าวว่าในการคัดแยกเพศจากอสุจิ โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของลักษณะของรูปร่าง และการว่ายผ่านความเข้มข้นของสารละลาย ให้มีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับ ใช้ระยะทางในการคัดแยก (ความหนาของสารละลาย) เวลาในการคัดแยก และความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้แยกอสุจิ การใช้สารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อ และคัดแยกเพศในคน โดยสามารถแยกอสุจิ X และอสุจิที่ผิดปกติให้คงค้างอยู่ที่ชั้นบนของสารละลาย ส่วนอสุจิ Y สามารถว่ายผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินได้ดีกว่าเนื่องมาจากขนาดที่ใหญ่กว่าของอสุจิ X ทำให้ความสามารถในการว่ายผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินลดลง การปล่อยน้ำเชื้อให้ผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อ ทำให้ได้อสุจิที่มีรูปร่างปกติ และมีลักษณะการเคลื่อนที่สูงภายหลังจากผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่สูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันความเข้มข้นของอสุจิจะลดลง (Ericsson *et al.,* 1973)

Ericsson *et al.* (1973) รายงานว่าอสุจิคนที่ผ่านการแยกด้วยความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 1 ชั้น คือ 3, 5, 6, 7, 10, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถแยกอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนไหวหมู่สูงขึ้นตามความเข้มข้นของความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่เพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของอสุจิจะลดลง จากเริ่มต้นเฉลี่ย 64.75 เป็น 28.25 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การคัดแยกอสุจิ Y สามารถแยกได้สูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้จากการย้อมสีอสุจิด้วย Quinacrine hydrochloride (F-body) ที่เรืองแสงเฉพาะอสุจิ Y นอกจากนี้ความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินยังสามารถแยกอสุจิที่ไม่เคลื่อนไหว และมีรูปร่างผิดปกติ สอดคล้องกับ Beernink and Ericsson (1982) พบว่าน้ำเชื้อหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 2 ชั้นคือชั้นบนที่มีความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่างที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มาผสมเทียมให้กับหญิง 46 คนในศูนย์ปฏิบัติการคัดแยกเพศ 2 แห่ง พบว่าได้ทารกเพศชาย (38 คน) มากกว่าทารกเพศหญิง (9 คน) โดยมีแฝดเพศหญิง 1 คู่ จึงคิดเป็นเพศชาย 73.5 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการศึกษาของ Evan *et al.* (1975) และ Ross *et al*. (1975) พบว่าหลังนำอสุจิของชายที่มีปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ผ่านการคัดแยกความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินพบว่าสามารถแยกอสุจิที่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิต่ำ และอสุจิมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน ทำให้อสุจิที่ส่วนล่างของหลอดมีรูปร่างของอสุจิที่มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นจากก่อนแยก 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น 70 เปอร์เซ็นต์

แต่ค่าสัดส่วนทางเพศจากการตรวจด้วยการย้อมสี F-body มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้ผลการทดลองที่แตกต่างออกไปจากการทดลองของ Ericsson *et al.* (1973); Beernink and Ericsson. (1982) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากอสุจิของคนที่นำมาใช้ในการทดลองมีคุณภาพต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (David *et al*., 1977)

นอกจากนี้พบว่าน้ำเชื้อที่มีปัญหาในเรื่องความสมบูรณ์พันธุ์ และกลุ่มชายปกติมาผ่านซีรั่มอัลบูมินชนิด human serum albumin 2 ชั้นคือ ชั้นบนที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่างที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจอสุจิ Y พบว่าในกลุ่มชายปกติอสุจิที่เก็บได้ในชั้นล่างจะมีเปอร์เซ็นต์การพบอสุจิ Y เพิ่มขึ้นจาก 49 เป็น 72 เปอร์เซ็นต์ และการเคลื่อนไหวสูงจาก 59 เป็น 86 เปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติของอสุจิลดลงจาก 29 เป็น 13 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของอสุจิลดลงจาก 258×10^{6} ตัว เป็น 15×10^{6} ตัว ส่วนกลุ่มชาย ที่มีปัญหาในเรื่องความสมบูรณ์พันธุ์ อสุจิที่เก็บได้ในชั้นล่างจะมีเปอร์เซ็นต์การพบอสุจิ Y เพิ่มขึ้นจาก 43 เป็น 65 เปอร์เซ็นต์ และการเคลื่อนไหวสูงจาก 47 เป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติของอสุจิลดลงจาก 32 เป็น 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองของอสุจิชายทั้ง 2 กลุ่มมีสอดคล้องกัน คือเปอร์เซ็นต์การพบอสุจิ Y เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวพบสูงขึ้น ความผิดปกติของอสุจิ และความเข้มข้นของอสุจิที่พบจะลดลง ทั้งนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการคัดแยกด้วยความเข้มข้นของซีรั่มอัลบูมิน และเมื่ออสุจิ Y ที่คัดแยกมาผสมเทียมให้ฝ่ายหญิง 10 คนที่ต้องการได้ลูกชาย พบมีว่าจำนวนทารกแรกคลอดเพศชาย 8 คน หญิง 3 คน โดยได้แฝดชาย 1 คู่ คิดเป็นลูกเพศชาย 72.72 เปอร์เซ็นต์ (Dmowski *et al.,* 1979) สอดคล้องผลการปล่อยน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นของ human serum albumin ที่ระดับ 7.5 เปอร์เซ็นต์สามารถให้ลูกเพศชาย 108 คน (60 เปอร์เซ็นต์) และเพศหญิง 72 คน (40 เปอร์เซ็นต์) ตรวจสอบจากการผสมเทียม (Beernink *et al.,* 1993) นอกจากนี้ Pyrzak and Garrison (1990) และ Glover *et al.*(1990) พบว่าหลังจากนำอสุจิคนที่ผ่านความเข้มข้นซีรั่มอัลบูมินชนิด human serum albumin สามารถแยกอสุจิ Y ได้ถึง 55-71 เปอร์เซ็นต์ โดยตรวจสอบโครโมโซม Y ของอสุจิจาก DNA probe แต่รายงานของ Classen *et al.* (1995) พบว่าการแยกด้วยความเข้มข้นซีรั่มอัลบูมินชนิด human serum albumin 2 ชั้นโดยชั้นบนมีความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่างมีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ส่วนล่างของก้นหลอดจะสามารถเพิ่มอสุจิ Y ได้มากกว่าเดิมเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบด้วย DNA probe

ความพยายามที่จะคัดแยกเพศจากอสุจิ และปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อในสัตว์เลี้ยง เริ่มต้นจาก Ericsson (1980) ความพยายามในการนำความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินมาใช้ในการคัดแยก

อสุจิ Y ในสัตว์เลี้ยง หลังจากที่ประสบผลสำเร็จในการแยกอสุจิ Y ของคนโดยพบว่านำน้ำเชื้อโค พันธุ์ ชาโลเล่ มาปล่อยผ่านการแยกด้วยความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน สามารถเพิ่มจำนวนลูกเพศ ผู้ และอัตราการแท้งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม สอดคล้องกับ White and Mendoza (1984) นำน้ำเชื้อ แกะมาผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน พบว่าให้จำนวนแกะเพศผู้มากกว่าเพศเมียถึง 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อนำน้ำเชื้อกระต่าย และโค เมื่อผ่านการแยกด้วยความเข้มข้น โบวายซีรั่มอัลบูมิน สามารถแยกอสุจิที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ ได้ (Wall *et al.,* 1980) แต่จากผลการ ทดลองของ Beal *et al.* (1984); รพีพรรณ และคณะ (2539) พบว่าเมื่อทดลองปล่อยน้ำเชื้อโคผ่าน ความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 1 ชั้นที่ความเข้นข้นชั้นล่าง 10 เปอร์เซ็นต์ และทดลองปล่อยน้ำเชื้อ โคผ่านความเข้มข้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน 2 ชั้น คือความเข้นข้นชั้นบน 4 เปอร์เซ็นต์ และความเข้น ข้นชั้นล่าง 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตะกอนส่วนล่างของแต่ละหลอดไปเจือจาง และแช่แข็งเพื่อรอ การผสมเทียมให้กับแม่โค พบว่าค่าสัดส่วนเพศในลูกแรกคลอดของทั้ง 2 เพศแตกต่างอย่างไม่มี นัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนผลการทดลองด้านคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าสามารถแยกอสุจิที่มีการ เคลื่อนไหวดี คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 90 เมื่อเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการคัดแยกในคอลัมน์ และมีความ เข้มข้นของอสุจิที่คัดแยกได้จะมีจำนวนลดลงจากเดิมประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

จากรายงานผลการทดลองของ White and Mendoza (1984) พบว่าสามารถเพิ่มสัดส่วนส่วน เพศของลูกแกะเพศผู้มากกว่าเพศเมียถึง 75 เปอร์เซ็นต์ โดยนำน้ำเชื้อแกะมาเจือจางด้วยสารละลาย น้ำเชื้อให้มีความเข้มข้น 200×10^{6} ตัวต่อมิลลิลิตร นำน้ำเชื้อเจือจางมา 2 มิลลิลิตรปล่อยผ่านความ เข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาในปล่อยผ่าน ความเข้มข้นสารละลาย 2 ชั่วโมงแล้วดูดน้ำเชื้อส่วนบนทิ้ง ทำการปั่นล้าง และเจือจางตะกอนน้ำเชื้อ ที่เก็บได้จากส่วนล่างของหลอด แล้วทำการแช่แข็งรอผสมให้กับแม่แกะ 87 ตัว พบว่าแม่แกะที่ ได้รับการผสมเทียมจากน้ำเชื้อที่ผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์ ให้ ลูกแกะที่เป็นเพศผู้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้ จึงดัดแปลงวิธีการตามการทดลอง ของ White and Mendoza (1984) เพราะความแตกต่างของ DNA content (X-Y) ระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ของอสุจิสุกร และอสุจิแกะใกล้เคียงกัน คือ 3.7 และ 3.9 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งเมื่อเทียบ น้ำหนักอสุจิสุกรและแกะพบว่ามีค่าเท่ากับ 2.60 และ2.93 Pg DNA ต่อ sperm nucleus (Garner *et al.,* 1983) ซึ่งมีความใกล้เคียงกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ และแนวโน้มของ การคัดแยกอสุจิ Y หลังจากผ่านสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินที่ระดับ 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization

<u>การตรวจสอบชนิดของอสุจิด้วยเทคนิค *In Situ* Hybridization</u>

In situ hybridization เป็นเทคนิคที่ถูกใช้เพื่อตรวจหากรดนิวคลิอิกไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอภายในเซลล์ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (cell suspension) หรือเป็นชิ้นเนื้อ (tissue) ซึ่งเซลล์เหล่านี้ยังคงรูปร่างที่สมบูรณ์เหมือนเดิมอยู่ โดยเทคนิคนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1. การเตรียมผนังเซลล์ให้เป็นรูพอเหมาะให้สายนิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่าดีเอ็นเอติดตามเข้าไปจับได้ ซึ่งจะใช้ proteolytic enzyme เข้าไปช่วยย่อยผนังเซลล์ 2. การทำลายสภาพของดีเอ็นเอติดตาม (denature) และชักนำให้ดีเอ็นเอติดตามเข้าไปจับกับกรดนิวคลิอิกเป้าหมายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับดีเอ็นเอติดตามภายในเซลล์ได้ 3. ตรวจตามผลที่ได้โดยดูจากสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสายติดฉลากที่เกาะบนดีเอ็นเอติดตาม (วสันต์ และคณะ, 2539)

การตรวจสอบชนิดของอสุจิ อาศัยลำดับจำเพาะของดีเอ็นเอช่วงหนึ่งบนโครโมโซมในอสุจิ โดยมีรายงานการตรวจหาโครโมโซม Y จากเนื้อเยื่อที่สนใจด้วยเทคนิค *in situ* hybridization (Lo *et al.,* 1990) เช่น การตรวจแยกเพศจากอสุจิโคแบบ radioactive *in situ* hybridization (Schwerin *et al.,* 1991), แบบ fluorescence *in situ* hybridization (เอื้อมศักดิ์ และคณะ, 2548; Kobayashi *et al.,* 1999) การตรวจแยกเพศจากอสุจิสุกร แบบ nonradioactive *in situ* hybridization (Kawarasaki *et al.,* 1995) และแบบ fluorescence *in situ* hybridization (Kawarasaki *et al.,* 1995; 1996; 1998; 2000) ซึ่งการตรวจสอบโครโมโซม Y ของอสุจิสุกรในครั้งนี้ใช้ porcine male specific primers (Kawarasaki *et al.,* 1995) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสุกรเพศผู้ (porcine male-specific DNA sequence) ได้มาจากรายงานของ Mc Graw *et al* .(1988) มาเตรียมเป็นดีเอ็นเอติดตาม (porcine male-specific probe) ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin จากปฏิกิริยา PCR และนำ porcine male-specific probe ไปใช้ในการตรวจเพศของสุกร ด้วยเทคนิค *in situ* hybridization ต่อไป