

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. สัตว์ทดลอง

พ่อสุกรพันธุ์ดูรอก ที่ผ่านการทดสอบพันธุ์ และสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ อายุ 22 เดือน จำนวน 3 ตัว

#### 2. สารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมิน (BSA)

Bovine Serum Albumin (Fraction V powder; บริษัท Sigma Chemical)

#### 3. สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

สารละลายมาตรฐาน BTS (Beltsville Thawing Solution) เพื่อเจือจางน้ำเชื้อ และเจือจางสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินให้มีความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเตรียมจาก น้ำตาลกลูโคส (บริษัท Merck) 37 กรัม โซเดียมอีดีทีเอ ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 1.25 กรัม ไตรโซเดียมซิเตรท (Tri-Sodium citrate) 6 กรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{CO}_3$ ) 1.25 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.75 กรัม เติมน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

#### 4. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

ประกอบด้วย อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) กล้องจุลทรรศน์ กระจกวัดความเป็นกรด-ด่าง (Merk, 5.5-9.0) สไลด์นับเม็ดเลือด (hematocytometer) แบบ Neubauer dropper pasture pipette และกระจกแผ่นบางปิดสไลด์

## 5. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

ประกอบด้วยสีอีโอซิน (eosin, บริษัทSigma chemical) สีนิโกรซิน (nigrosin, บริษัท BDH Chemical) และโซเดียมซิเตรท (sodium citrate, บริษัท Merk) เพื่อตรวจสอบอสุจิมีชีวิต และอสุจิที่มีความผิดปกติ โดยสีย้อมมีส่วนประกอบ ดังนี้ สีอีโอซิน 1 กรัม สีนิโกรซิน 5 กรัม และโซเดียมซิเตรท 3 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร (ศรีสุวรรณ, 2531)

## 6. อุปกรณ์ที่ใช้รีดน้ำเชื้อ

ประกอบด้วยหุ่นหล่อ ถูมือยาง ปีกเกอร์พลาสติก ผ้ากรองน้ำเชื้อ กระบอกตวง และกระตักน้ำแข็งรักษาอุณหภูมิ

## 7. อุปกรณ์ที่ใช้ปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อ

ประกอบด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ และหลอดปั่นเหวี่ยง 15 มิลลิลิตร

## 8. อุปกรณ์ และสารเคมีในตรวจสอบจำเพาะของ **porcine male specific probe**

Nitrocellulose membrane, Hybridization buffer (50%formamide, 20xSSC (3M NaCl, 0.3M Na-Citrate), 50x Denhardt's solution, yeast tRNA, 1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10%Dextran sulfate), 2xSSC, 1xSSC, 0.5xSSC, Tris base solution (TBS), blocking solution (1%skim milk in 1xTBS), anti-DIG-AP (antibody digoxigenin alkaline phosphatase, บริษัท Roch) และ NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium 4-bromo-5-chloro-3-indoyl phosphage)

## 9. สารเคมีในการตรวจสอบชนิดอสุจิ

### 9.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอสุจิ และdecondensation

Phosphate buffer saline (PBS), Dithiothreitol (DTT; บริษัท Sigma chemical), fixative solution (methanol: acetic acid; 3:1)

9.2 สารเคมีสำหรับเตรียม porcine male specific probe โดยวิธี PCR

PCR DIG Labeling Mix (บริษัท Roch) และ 1U Tag polymerase (บริษัท Invitrogen)

## 10. สารเคมีสำหรับปฏิกิริยา Nonradioactive *in situ* hybridization

Proteinase K (Fermentus), 20%acetic acid, 70%, 90%, 100% Ethanol, Hybridization buffer (50%formamide, 20xSSC(3M NaCl, 0.3M Na-Citrate), 50x Denhardt's solution, yeast tRNA, 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10%Dextran sulfate), 2xSSC, 1xSSC, 0.5xSSC, Tris base solution (TBS), blocking solution (5%skim milk in 3%BSA), anti-DIG-AP (antibody digoxigenin alkaline phosphatase, บริษัท Roch) และ NBT/BCIP (nitroblue tetrazolum 4-bromo-5-chloro-3-indoyl phosphage)

## 11. โรงเรียนเลี้ยงพ่อสุกรทดลอง

ศูนย์ผสมเทียมสุกรของศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

## 12. อาหารเลี้ยงสุกรทดลอง

ใช้สูตรอาหารเลี้ยงพ่อสุกรพันธุ์ของศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม โดยมีส่วนประกอบแสดงในภาคผนวกที่ 1

## วิธีการ

### 1. ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกร หลังจากผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน

1.1 การรีดเก็บน้ำเชื้อทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกร 3 ตัวเพื่อทำการทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยการรีดเก็บน้ำเชื้อของพ่อสุกรทุกตัวพร้อมๆกัน เริ่มทำการรีดตั้งแต่วันที่ 6.00-07.00 น. โดยก่อนเข้าสู่การทดลองพ่อสุกรจะได้รับการปรับสภาพความถี่ของการรีดน้ำเชื้อด้วยการรีดน้ำเชื้อทิ้งที่ 4 วันต่อครั้งเป็นเวลา 2 สัปดาห์ใช้วิธีรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยมือสวมถุงยาง โดยปฏิบัติตามการศึกษาของศรีสุวรรณ (2542)

1.2 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อน และหลังผ่านความเข้มข้นโบวายซีรัมอัลบูมิน โดยปฏิบัติตามการศึกษาของศรีสุวรรณ (2542)

1.2.1 อสุจิมิชีวิต ตรวจสอบการนับจำนวนอสุจิตาย จากน้ำเชื้อที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีย้อมนิโกรซิน-อีโอซิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X ทำการนับจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว จากนั้นจึงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์มีชีวิต

1.2.2 การเคลื่อนไหวอสุจิหมู่ (mass movement) ตรวจสอบความแรงของคลื่น การเคลื่อนไหวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40-100X แล้วประเมินคะแนน แบ่งเป็น 6 ระดับ คือ

ระดับ 0	ตายอสุจิทั้งหมดตายไม่มีการเคลื่อนไหว
ระดับ 1 เลว	พบอสุจิพลิกตัวกลับไปมาอยู่กับที่ และมีแนวโน้มจะไม่เคลื่อนไหวเลย อัตราเคลื่อนไหวต่ำกว่าร้อยละ 10
ระดับ 2 พอใช้	ไม่มีเคลื่อนของการเคลื่อนไหวให้เห็น มีการเคลื่อนไหวของอสุจิไปข้างหน้าเล็กน้อย ในระดับนี้อสุจิเคลื่อนไหวร้อยละ 20-40
ระดับ 3 ดี	มองเห็นตัวอสุจิเกาะกันเป็นกลุ่มมากขึ้น แต่ยังมีอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้ามาก มีการเคลื่อนไหวให้เห็น

	เล็กน้อย สามารถสังเกตเห็นการเคลื่อนไหวของอสุจิรายตัว ได้ในระดับนี้ อสุจิมีการเคลื่อนไหวร้อยละ 45-65
ระดับ 4 ดีมาก	มีคลื่นของการเคลื่อนไหวให้เห็น แต่ไม่รุนแรงเหมือน ในระดับ 5 และมองเห็นตัวอสุจิที่เกาะกันเป็นกลุ่มๆ (ตัว อสุจิไม่เคลื่อนไหว) ได้บ้างในระดับนี้จะมีอสุจิ เคลื่อนไหวได้ร้อยละ 70-85
ระดับ 5 ดีเลิศ	น้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูง มีคลื่นการเคลื่อนไหวอย่าง รวดเร็วเห็นได้ชัด คลื่นที่มองเห็นคล้ายกลุ่มเมฆ การ เคลื่อนไหวของอสุจิรายตัว ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ ใน ระดับนี้ตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหวร้อยละ 90

1.2.3 เพอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเป็นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400X โดยดูอสุจิแต่ละตัวหลังจากปิดกระจกสไลด์ ค่าของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive movement)

1.2.4 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อพ่อสุกร ตรวจโดยใช้เครื่อง Haematocytometer แบบ Improved Neubauer (deep 1/10 mm) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ใช้ไมโครไปเปตดูน้ำเชื้อจำนวน 5  $\mu$ l ใส่ในหลอด micro tube ขนาด 1 มิลลิเมตรที่มีกรดไฮโดรคลอริก (1 M HCl) จำนวน 1,000  $\mu$ l ซึ่งจะได้อัตราเจือจาง 1 ต่อ 200 เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยดลงบนสไลด์เม็ดเลือดแดง ปิดกระจกสไลด์นับจำนวนอสุจิผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X

1.2.5 ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ ตรวจสอบด้วยการนับจำนวนของอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ จากน้ำเชื้อที่ผ่านการย้อมสีนิโกรซิน-อีโอซิน ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400X โดยนับจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว จากนั้นจึงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ

1.3 การเตรียมความเข้มข้นสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมิน และการปล่อน้ำเชื้อผ่านความเข้มข้นของสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมิน

การเตรียมความเข้มข้นโบวายซีรัมอัลบูมิน โดยผงโบวายซีรัมอัลบูมินจะถูกเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ BTS เพื่อให้มีความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมินตามความต้องการ จากนั้นนำสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินที่มีความเข้มข้นเหล่านั้น ทำการบรรจุสารละลายลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 6 มิลลิลิตร โดยใช้ไปเปิดค่อๆ ปล่อยให้สารละลายโบวายซีรัมอัลบูมิน ตามลำดับความเข้มข้นที่กำหนด (ตารางที่ 1) แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ตามจำนวนระดับความเข้มข้นโบวายซีรัมอัลบูมิน และกลุ่มควบคุม คือ

กลุ่มน้ำเชื้อสุกรเจือจางสารละลาย BTS ก่อนปล่อยลงบนโบวายซีรัมอัลบูมิน

กลุ่มที่ 1 .น้ำเชื้อสุกรเจือจางสารละลาย BTS หลังปล่อยลงบนโบวายซีรัมอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้นคือ 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 .น้ำเชื้อสุกรเจือจางสารละลาย BTS หลังปล่อยลงบนโบวายซีรัมอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้นคือ 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 .น้ำเชื้อสุกรเจือจางสารละลาย BTS หลังปล่อยลงบนโบวายซีรัมอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้นคือ 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 .น้ำเชื้อสุกรเจือจางสารละลาย BTS หลังปล่อยลงบนโบวายซีรัมอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้นคือ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

น้ำเชื้อพ่อสุกรที่ทำการรีดเก็บมาได้ในแต่ละครั้งของพ่อสุกรแต่ละตัว โดยนำน้ำเชื้อสดมาที่เจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ BTS ให้มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อประมาณ  $200 \times 10^6$  ตัวต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดมาปริมาตร 2 มิลลิลิตรแล้วมาปล่อยผ่านสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้เตรียมไว้ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงดูดน้ำเชื้อส่วนบนทิ้ง 2 มิลลิลิตรและดูดสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินส่วนบนใส่ออกอีก 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่เหลือ 3 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/วินาที ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังปั่นเหวี่ยง ดูดสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินออก จนเหลือแต่ตะกอนอนุจุติที่ส่วนล่างของหลอด แล้วเจือจางด้วยสารละลาย PBS 1 มิลลิลิตร ทำการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อลักษณะต่างๆตามการศึกษาของศรีสุวรรณ (2542)

**ตารางที่ 1** ผงโบวายซีรัมอัลบูมิน และปริมาตรของสารละลาย BTS ที่ใช้ละลายโบวายซีรัมอัลบูมิน เพื่อให้มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมิน(BSA) (เปอร์เซ็นต์)	ผงBSA (กรัม)	สารละลาย (มล.)
4	0.24	6
6	0.36	6
8	0.48	6
10	0.60	6
ปริมาตรรวม(มล.)	-	24

## 2. การวิเคราะห์ตัดส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y โดยเทคนิค *nonradioactive in situ hybridization*

### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือด และน้ำเชื้อถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation (ดัดแปลงมาจาก Sambrook and Russell, 2001) โดยมีขั้นตอนโดยสังเขป ดังนี้ เลือด หรือน้ำเชื้อ 100  $\mu$ l เติมสารละลาย D-solution (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.1M 2- mercaptonethanol, 5% N-laurylsarcosine) 500  $\mu$ l เขย่า 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที และแยกโปรตีนด้วย สารละลาย Phenol และ Chloroform (150  $\mu$ l : 150  $\mu$ l) เขย่า 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน 600  $\mu$ l เติมสารละลาย Phenol : Chloroform (150  $\mu$ l : 150  $\mu$ l) เขย่า 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน 400  $\mu$ l นำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย Isopropanol 550  $\mu$ l นำมา incubate ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนด้วย TE 20  $\mu$ l

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ porcine male specific primers (Kawarasaki *et al.*, 1995) ซึ่งมีความจำเพาะต่อสุกรเพศผู้ (porcine male-specific DNA sequence) ได้มาจากรายงานของ Mc Graw *et al.* (1988) โดยมีลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ดังนี้

Forward primer: 5'-AAGTGGTCAGCGTGTCCATA-3'

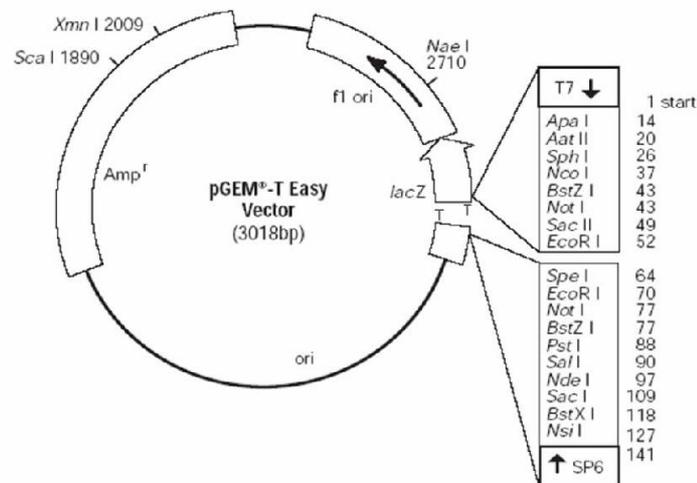
Reverse primer: 5'-TTTCTCCTGTATCCTCCTGC-3'

ในกระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย DNA Template 2  $\mu$ l และ PCR mixture 18  $\mu$ l (Distilled water, 1X PCR Buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP, 1 pmol Forward และ 1 pmol Reverse porcine male specific primers, 1U Tag polymerase บริษัท Invitrogen) ปฏิกริยา PCR เกิดในเครื่อง Thermal cycle (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer, USA.) ภายใต้ขั้นตอนของปฏิกริยา PCR ดังนี้ predenaturation 94 °C, 5 นาที; denaturation 94 °C, 1 นาที; annealing 55 °C, 30 วินาที; extension 72 °C, 30 วินาที ทำปฏิกริยาใน 3 ขั้นตอนนี้ทั้งสิ้น 35 รอบ และเพิ่มขั้นตอนในรอบสุดท้าย final extension 72 °C, 5 นาที ทำการวิเคราะห์ผลของ PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, 100 Volt, 30 นาที และย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (1  $\mu$ l/ml) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

## 2.3 Sequencing and Alignments

การโคลนดีเอ็นเอของ porcine male specific gene เริ่มจากเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากคู่ porcine male-specific primers โดยวิธี PCR (Kawarasaki *et al.*, 1995) จากนั้นทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอจาก gel purification โดยใช้ GIA quick gel extraction kit (บริษัท GIAGEN®) แล้วทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ (Ligation) เข้ากับเวกเตอร์ Promega's pGEM®-T easy (บริษัท Promega) ดังภาพที่ 1 ซึ่งจะได้เวกเตอร์ลูกผสม แล้วทรานส์ฟอร์มเมชัน (Transformation) เข้าไปในแบคทีเรีย *E. Coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  นำไปเลี้ยงบนอาหาร LB-broth เพื่อคัดแยก *E. Coli* ที่มีชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ blue-white colonies screening ที่เจริญบน LB-broth ที่มี antibiotic (ampicillin) จากนั้นนำเล็อกเฉพาะ white colonies มาตรวจสอบเพื่อยืนยันว่ามีชิ้นดีเอ็นเอ porcine male specific gene โดยวิธี PCR อีกครั้ง แล้วจึงเพิ่มจำนวน positive clone และนำมาสกัด plasmid โดยใช้ Pure Link Quick

Plasmid Miniprep kit (บริษัท Invitrogen) และส่งตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์วิจัยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีน pig DNA for male-specific repeat-1-gene บนตำแหน่งโครโมโซม Y ของสุกรจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST))



**ภาพที่ 1** โครงสร้างของ pGEM<sup>®</sup>-T easy cricle map

#### 2.4 การผลิต porcine male-specific probe

การผลิต porcine male-specific probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin โดยวิธี PCR

#### 2.5 ตรวจสอบความจำเพาะของ porcine male-specific probe

คัดแปลงมาจาก Keller and Manak (1989) ดังนี้ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดพ่อสุกร แม่สุกร และน้ำเชื้อ ที่ยืนยันผลการบ่งชี้เพศด้วยเทคนิคพีซีอาร์แน่นชัดแล้ว มาต้มนาน 5 นาที และนำไปวางบนน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นหยดดีเอ็นเอ 3  $\mu$ l ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน รองนแห้ง เติมสารละลาย 50 % hybridization buffer ให้ท่วมเมมเบรน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลาย 50 % hybridization buffer แล้วเติมสารละลายเจือจาง Porcine male-specific probe กับสารละลาย 50 % hybridization buffer (Probe : Hybridization buffer ; 1 :

200 ) ให้ท่วมเมมเบรนทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง ที่ 37 °C ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย SSC ที่มีความเข้มข้น 2X SSC (pH=7), 1X SSC(pH=7) และ 0.5X SSC (pH=7) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที, 5 นาที และ 1 ชั่วโมงตามลำดับ นำแผ่นเมมเบรนแช่ในสารละลาย 1% skim milk in 1xTBS นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วยสารละลาย TBS (pH=8) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 นาที นำแผ่นเมมเบรนแช่ในสารละลาย anti-Dig-AP solution (anti-dig Alkaline Phosphatase : 3%Bovine serum albumin; 1:300) นาน 60 นาที ล้างด้วยสารละลาย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเติมสารละลายยับยั้ง NBT/BCIP ท่วมแผ่นเมมเบรนและ incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 1 ชั่วโมงผลการเกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ ตรวจสอบได้จากการเกิดสีม่วง บนแผ่นเมมเบรน

## 2.6 การเตรียมอสุจิ และ decondensation อสุจิ (ดัดแปลงมาจาก เอ็มศักดิ์ และคณะ, 2548)

2.6.1 นำตัวอย่างน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตรในสารละลาย PBS มาปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาาที นาน 2 นาที

2.6.2 ใส่น้ำล้างละลายตะกอนอสุจิด้วย 1 มิลลิลิตร PBS contain 6mM EDTA ปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาาที นาน 2 นาที

2.6.3 ใส่น้ำล้างละลายตะกอนอสุจิด้วย 1 มิลลิลิตร PBS contain 2mM DTT เขย่านาน 45 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาาที นาน 2 นาที

2.6.4 ใส่น้ำล้างละลายตะกอนด้วย 1 มิลลิลิตร PBS และปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบ/นาาที นาน 2 นาที

2.6.5 ใส่น้ำล้างแล้วหยดสารละลาย fixative ที่เย็น (methanol : acetic acid; 3:1) 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนอสุจิทิ้งไว้ นาน 45 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบ/นาาที นาน 2 นาที

2.6.6 ใส่น้ำล้างแล้วหยดสารละลาย fixative 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนอสุจิ

2.6.7 หยดอสุจิลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วย 2% xylene ให้กระจายตัวแล้วปล่อยให้แห้ง จับเก็บที่ตู้ทำความเย็น -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

## 2.7 ปฏิกิริยา nonradioactive *in situ* hybridization (ดัดแปลงมาจาก เอ็มศักดิ์ และคณะ, 2548)

2.7.1 ล้างสไลด์ตัวอย่างด้วย PBS 5 นาที

2.7.2 ใช้น้ำล้างละลาย proteinase K (50 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที

- 2.7.3 หยด proteinase K ลงบนสไลด์ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 15 นาที
- 2.7.4 ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- 2.7.5 หยดสารละลาย 20% acetic acid ที่เย็น ลงบนสไลด์ นาน 20 วินาที
- 2.7.6 ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- 2.7.7 นำสไลด์แช่ 70%, 90% และ 100% ethanol ตามลำดับ นาน 2 นาที ปล่อยให้แห้ง
- 2.7.8 หยด 50% Hybridization buffer 100  $\mu$ l บนสไลด์ ปิดด้วย cover well นำไปวางบน hot plate 90 °C นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที
- 2.7.9 เตรียมสารละลาย porcine male-specific probe ใน Hybridization buffer (1 : 10) ต้ม นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที
- 2.7.10 หยดสารละลาย porcine male-specific probe 50  $\mu$ l บนตัวอย่าง ปิดด้วยกระดาษกรองสไลด์
- 2.7.11 Incubate ที่ 37 °C ในกล่องความชื้น (moisture chamber) นาน 16 ชั่วโมง
- 2.7.12 นำสไลด์ล้างด้วย 2xSSC (pH=7) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
- 2.7.13 นำสไลด์ล้างด้วย 2xSSC (pH=7) ที่ 37 °C นาน 5 นาที
- 2.7.14 นำสไลด์ล้างด้วย 1xSSC (pH=7) ที่ 37 °C นาน 5 นาที
- 2.7.15 นำสไลด์ล้างด้วย 0.5xSSC (pH=7) ที่ 37 °C นาน 60 นาที
- 2.7.16 ล้างสไลด์ด้วย TBS (pH=8) ที่ 37 °C นาน 5 นาที
- 2.7.17 หยดสารละลาย blocking solution (5% skim milk in 2xSSC) ที่ 37 °C นาน 45 นาที ในกล่องความชื้น
- 2.7.18 ล้างด้วย TBS เชย่านาน 5 นาที
- 2.7.19 หยด anti-DIG-AP in 3% BSA (1:200) 120  $\mu$ l บนสไลด์ และปิดด้วยกระดาษกรองสไลด์ บรรจุในกล่องความชื้น นาน 60 นาที ในที่มืด
- 2.7.20 ล้างสไลด์ด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- 2.7.21 หยดสับสเตรต NBT/BCIP 500  $\mu$ l บนสไลด์ นำไปจัดเก็บในที่มืด 20 นาที
- 2.7.22 ล้างสไลด์ด้วย TBS นาน 5 นาที รอแห้ง
- 2.7.23 หยดสีย้อม nuclear fast red 100  $\mu$ l ทิ้งไว้ นาน 3 นาที
- 2.7.24 ล้างสีย้อมด้วยน้ำไหล นาน 30 วินาที ปล่อยให้แห้ง
- 2.7.25 หยด mounting media ปิดด้วยกระดาษกรองสไลด์ รอแห้ง ตรวจสอบผลด้วยกล้องกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X จำนวน 1,000 เซลล์ ต่อสไลด์

### 3. แผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

#### 3.1 แผนการทดลอง

##### การทดลองที่ 1

เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวายซีรัมอัลบูมิน โดยการศึกษาลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้ คือความเข้มข้นของน้ำเชื้อ การเคลื่อนไหวหางของอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น เปอร์เซ็นต์อสุจิก่อนที่ไปข้างหน้า ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ โดยใช้แผนการทดลอง Split plot in Randomized Complete block design (RCBD) โดยให้ความแตกต่างของพ่อสุกรแต่ละตัวเป็นบล็อก จำนวน 3 บล็อก ความแตกต่างของน้ำเชื้อในแต่ละสัปดาห์ เป็น main plot ใช้เวลา 3 สัปดาห์ โดยมีสิ่งทดลองคือ น้ำเชื้อที่ไม่ผ่าน และผ่านการแยกด้วยสารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็น sub plot มีหุ่นจำลองทางสถิติดังนี้

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + W_j + \varepsilon_{ij} + C_k + W_j \times C_k + \varepsilon_{ijk}$$

$y_{ijk}$  : ค่าสังเกตที่ได้จากพ่อสุกรตัวที่  $i$ , และสัปดาห์ที่  $j$ , ความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมินที่  $k$

$\mu$  : ค่าเฉลี่ยในการทดลอง

$\beta_i$  : อิทธิพลของบล็อกพ่อพันธุ์ โดยที่  $i = 1, 2$  และ  $3$

$W_j$  : อิทธิพลของสัปดาห์ที่  $j$  โดยที่  $j = 1, 2,$  และ  $3$

$\varepsilon_{ij}$  : ความคลาดเคลื่อนสำหรับทดสอบ main treatment

$C_k$  : อิทธิพลของความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบูมินที่  $k$  โดยที่  $k = 0, 4, 6, 8$  และ  $10\%$

$\varepsilon_{ijk}$  : ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง โดย  $\varepsilon_{ijk} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$ .

##### การทดลองที่ 2

การวิเคราะห์สัดส่วนของอสุจิ  $Y$  และอสุจิ  $X$  ในน้ำเชื้อสุกรก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของโบวายซีรัมอัลบู 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบสัดส่วนของอสุจิ  $Y$  ด้วย

เทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization โดยใช้ porcine male-specific probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin

### 3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

#### การศึกษาที่ 1

ข้อมูลจากการทดลองนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองดังกล่าว และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Tukey's studentized range test ตาม Sokal and Rohlf (1973) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 6 (SAS, 1998)

#### การศึกษาที่ 2

การเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นโบวาชีร์มอัลบูมินแล้ววิเคราะห์ Chi-square test (จริญ, 2535) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 6

## 4. การบันทึกข้อมูล

### 4.1 คุณภาพน้ำเชื้อ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของสารละลายโบวาชีร์ม คือ ที่ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ น้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์คูรอก จำนวน 3 ตัว ทำการบันทึกข้อมูล ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ การเคลื่อนไหวหางของอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า และลักษณะความผิดปกติของอสุจิ

### 4.2 สัดส่วนทางเพศ (Sex Ratio)

การตรวจสอบสัดส่วนระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ในน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของสารละลายโบวาชีร์ม คือ ที่ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยบันทึกปริมาณ

อสุจิ Y ในน้ำเชื้อก่อน และหลังปล่อยผ่านความเข้มข้นของสารละลายโบวายซีรัม หลังจากวิเคราะห์ โดยเทคนิค nonradioactive *in situ* hybridization ด้วย porcine male-specific probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin

#### 5. สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จ.นครปฐม

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ หน่วยชั้นสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

#### 6. ระยะเวลาในการทดลอง

ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 9 เดือน (มกราคม 2549 – ตุลาคม 2549)

#### 7. แหล่งงบประมาณ

ศูนย์วิจัย และฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน