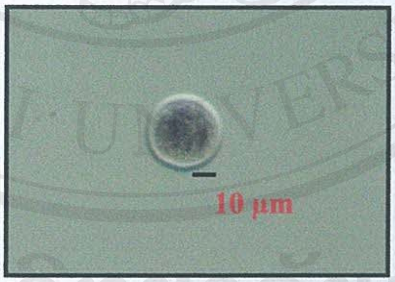
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. ตัวอ่อนและการพัฒนาของตัวอ่อน

ลักษณะทางกายวิภาคของตัวอ่อนโค มีลักษณะทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100–150 ไมครอน (ภาพที่ 2-1) จากระยะไซโกต (zygote, ระยะหนึ่งเซลล์) จนถึงตัวอ่อนระยะมอรูล่า (morula) และจะเริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นระยะบลาสโตซิส (blastocyte) ตัวอ่อนประกอบไปด้วยเปลือกชั้นนอกที่เรียกว่า โซน่าเพลลูซิด้า (zona pellucida, ZP) หนาประมาณ 20 ไมครอน ถัดมาเป็นช่องว่างที่เรียกว่า perivitelline space อยู่ระหว่างชั้นเปลือกและตัวอ่อน ถัดมาเป็นเซลล์ตัวอ่อนที่เรียกว่า บลาสโตเมียร์ (blastomere) จำนวนเซลล์จะแตกต่างกันตามระยะของตัวอ่อน (Seidel, 1981) การพัฒนาของตัวอ่อนระยะต่างๆ มีความสัมพันธ์กับวงจรการเป็นสัด ซึ่งการแบ่งตัวรอบแรกระยะ 2 เซลล์ เกิดขึ้นประมาณ 46 – 56 ชั่วโมงหลังโคแสดงการเป็นสัดและได้รับการผสม การแบ่งตัวระยะ 4 เซลล์ ประมาณ 10 –12 ชั่งโมง ต่อมาระยะ 16 – 32 เซลล์ หลังเป็นสัดประมาณ 4 วัน ระยะข้างต้นนี้ตัวอ่อนจะอยู่ภายในท่อนำไข่ สามารถชะล้างออกมาได้ ซึ่งเซลล์แต่ละเซลล์จะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นตัวอ่อนใหม่ได้เรียกว่า totipotent cell

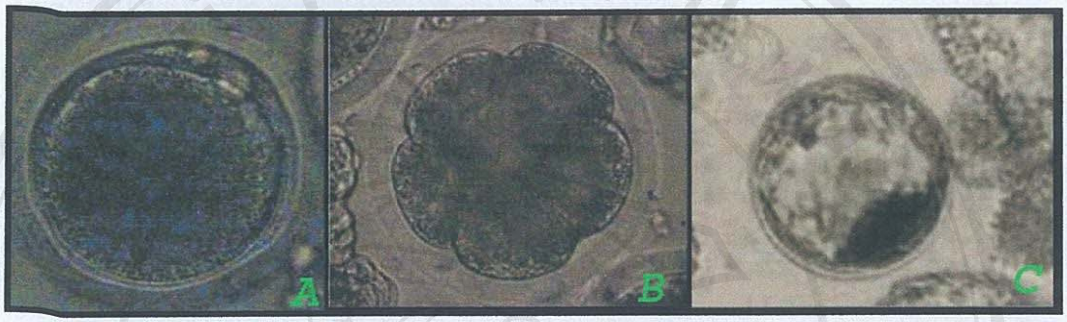


ภาพที่ 2-1. แสดงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส (blastocyst) ของโคลูกผสมพื้นเมือง-ฟรีเชี่ยน (Friesian) ที่เก็บจากการกระตุ้นการตกไข่ ณ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่.

ระยะที่ตัวอ่อนสามารถเริ่มเก็บจากการชะล้างมดลูกนั้นต้องเป็นระยะมอรูล่า ซึ่งพบหลังโคเป็นสัดและได้รับการผสมไปแล้วประมาณ 5 วัน ซึ่งเป็นระยะที่มี 16 - 32 เซลล์ ตัวอ่อนบลาสโตซีส ระยะแรก จะพบประมาณวันที่ 7 หลังโคเป็นสัดและได้รับการผสม โดยจะเริ่มมีของเหลวเข้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาสะสมและเซลล์บลาสโตเมียร์ จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นอินเนอร์เซลล์แมส (inner cell mass) และเซลล์โทรโฟบลาส (trophoblast) ในวันที่ 8 – 9 หลังวันเป็นสัดตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจะขยายตัวเต็มที่ ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมและมีความทนทานในการแช่แข็งที่ –196 องศาเซลเซียส (Barros and Nagueira, 2001) ในวันที่ 10 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจะหลุดออกจากเปลือกโซน่า และมีการยืดตัวของเซลล์โทรโฟบลาสต์เพื่อพร้อมสำหรับการฝังตัว (ภาพที่ 2-2)



ภาพที่ 2-2. แสดงตัวอ่อนโคที่ระยะต่างๆ A.) ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ B.) ตัวอ่อนระยะมอรูล่า และ C.) ตัวอ่อนระยะบาสโตซีส ที่มา: www.vetmed.auburn.edu/ art/student_ivf_overvie.

2. การผลิตตัวอ่อน

การผลิตตัวอ่อนให้ได้ระยะก่อนการฝังตัว ในปัจจุบันสามารถผลิตได้จากภายในร่างกาย (*in vivo* production) จากการชะล้างตัวอ่อนโคที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ และการปฏิสนธิ และจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (*in vitro* production) จากการเลี้ยงเซลล์ไข่ให้อยู่ในระยะที่สมบูรณ์พร้อมรับการผสม (*in vitro* maturation, IVM) จากนั้นทำการปฏิสนธิ (*in vitro* fertilization, IVF) กับอสุจิที่ผ่านกระบวนการ capacitation และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง (*in vitro* culture, IVC) จนถึงระยะที่ต้องการสำหรับการนำไปใช้ต่อไป

การผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย

มีขั้นตอนดังนี้

ก) **การคัดเลือกแม่พันธุ์ตัวให้** (donor)

การคัดเลือกแม่โคสำหรับผลิตตัวอ่อนภายในร่างกายนับว่ามีความสำคัญ เนื่องจากแม่โคที่ดีจะให้ตัวอ่อนคุณภาพดี มีจำนวนมาก และมีพันธุกรรมดี สิ่งสำคัญในการคัดเลือก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แม่โคตัวให้คือ ความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ มีอวัยวะสืบพันธุ์ไม่ผิดปกติในที่นี้รวมถึงอวัยวะต่างที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ และปราศจากโรค มีความเป็นเลิศทางพันธุกรรม เช่น ให้ผลผลิตในปริมาณสูงและมีคุณภาพ นอกจากนี้แม่โคตัวให้ ต้องมีสภาพร่างกายที่สมบูรณ์ ไม่อ้วนหรือผอมจนเกินไป มีรอบการเป็นสัดที่ปกติและไม่ตั้งท้อง (รังสรรค์, 2530)

ข) การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

Gordon (1994) ได้อธิบายขั้นตอนการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (Superovulation)ในการย้ายฝากตัวอ่อน โดยหลักการคือ พยายามให้แม่โคตัวให้สามารถตกไข่ได้หลายๆ ใบ แทนที่จะตกไข่เพียงใบเดียวในรอบการเป็นสัดหนึ่ง จากจำนวนฟอลลิเคิลที่มีอยู่บนรังไข่จำนวนมาก แต่สามารถตกไข่ได้เพียงไม่กี่ใบในช่วงชีวิตของโคตัวหนึ่งๆ ซึ่งส่วนหนึ่งมาจากปริมาณของฮอร์โมนโกนาโดรโทรปิน-รีลีสซิ่งฮอร์โมน (gonadotrophin-releasing hormone, GnRH) ที่กระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิล (follicle) นั้นไม่เพียงพอ ดังนั้นหากมีการเพิ่มระดับของฮอร์โมนโกนาโดรโทรปิน จากภายนอกเข้าไปช่วยป้องกันโอโอไซต์ (oocyte) ที่อยู่ภายในฟอลลิเคิลไม่ให้เกิดการเสื่อมสลาย ทำให้เกิดการตกไข่หลายใบ เมื่อทำการผสมจะได้ตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝากมากขึ้น ฮอร์โมนโกนาโดรโทรปินที่ใช้ในการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่นั้นมีอยู่ 2 ชนิด คือ:

(1) แพรกแนนท์ แมร์ ซีรัม โกนาโดรโทรปิน หรือพีเอ็มเอสจี (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) ฉีดเพียงครั้งเดียว แต่ผลการตอบสนองของรังไข่ไม่แน่นอนและต่ำกว่าฮอร์โมนโกนาโดรโทรปิน ชนิดเอฟเอสเอช (Follicle stimulating hormone, FSH) มักพบปัญหาของฟอลลิเคิลไม่ตกไข่ (anovulatory follicles) และได้ตัวอ่อนคุณภาพต่ำ สาเหตุดังกล่าวเนื่องจาก พีเอ็มเอสจี มีฤทธิ์ของฮอร์โมนแอลเอช (luteinizing hormone, LH) อยู่จึงทำให้ฟอลลิเคิลเป็นเซลล์ลูทีน (lutein cell) เร็วเกินไป จึงทำให้เกิดถุงน้ำที่คอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum, CL) และยังทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) อยู่ในระดับสูง ส่งผลให้การเคลื่อนตัวของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในท่อผิดปกติไป ทำให้ได้คุณภาพตัวอ่อนที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้พีเอ็มเอสจีมีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายผลิตแอนติบอดีได้ ทำให้ผลการตอบสนองในการกระตุ้นครั้งต่อไปลดลง

(2)ฮอร์โมนเอฟเอสเอช (follicle stimulating hormone, FSH) ให้หลายครั้ง เช่น 4 – 5 วันติดต่อกัน และให้วันละ 2 ครั้ง (เช้า/เย็น) เป็นโปรตีนฮอร์โมน มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน การตอบสนองค่อนข้างแน่นอนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี การใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช กระตุ้นจะทำให้ได้ฟอลลิเคิลที่เกิดการตกไข่มากว่าการใช้ฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี อีกทั้งตัวอ่อนที่ได้มีคุณภาพดีกว่า ฮอร์โมนเอฟเอสเอช จะช่วยให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและช่วยป้องกันการฝ่อตัวของฟอลลิเคิลขนาด 1.7 มิลลิลิตร ช่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้เกิดการตกไข่และแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) ของโอโอไซต์ แต่ฮอร์โมนเอฟเอสเอชชนิดที่มีแอลเอชปนอยู่มากจะส่งผลต่อการปฏิสนธิของตัวอ่อนทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลง

จากรายงานการวิจัยของ Seidel (1981) ที่บ่งบอกถึงความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนในประเทศสหรัฐอเมริกา และ แคนาดา ทำให้เกิดการจัดการระบบสืบพันธุ์ในรูปแบบการค้า โดยมีการส่งออกตัวอ่อนแช่แข็งออกสู่ทวีปยุโรป มากกว่า 10,000 ตัวต่อปี ทำให้เริ่มมีการศึกษาเพิ่มเติมในการทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ มากขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการค้า และการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ Odde (1990) ได้รายงานเกี่ยวการกระตุ้นเพื่อเพิ่มการตกไข่ ของโคหลังคลอด โดยอาศัยความสัมพันธ์ของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์คือ โปรเจสเตอร์โรน (progesterone) พรอสต้าแกลนดิน เอฟทูเอลฟ่า (prostaglandin $F_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) โปรเจสเตอร์โรนร่วมกับเอสโตรเจน (estrogen) และโปรเจสเตอร์โรน ร่วมกับ พรอสต้าแกลนดิน ซึ่งความสมบูรณ์ในการทำขึ้นกับโปรแกรมการเหนี่ยวนำโดยใช้ฮอร์โมนร่วมกันให้เกิดความเหมาะสมต่อการกระตุ้น อย่างไรก็ตาม การทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ มีผลทำให้ความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน (developmental competence) ลดลงดังรายงานของ Blondin *et al.* (1995 ที่ทดลองใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ร่วมกับโปรเจสเตอร์โรนและพรอสต้าแกลนดิน กระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ในโคสาวโดยวัดความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนในขบวนการ *In vitro* fertilization (IVF) และ *In vitro* culture (IVC) พบว่าการทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ทำให้ความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Enright *et al.* (2000) ที่รายงานไว้ว่าตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการจะมีความแข็งแรงและความสมบูรณ์ต่ำกว่าตัวอ่อนที่เก็บจากการชะล้าง เช่นเดียวกัน De Loos *et al.* (1990) ที่ศึกษาถึงความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ ในโคที่มีการทำ การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ด้วยฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี ร่วมกับพรอสต้าแกลนดิน เอฟทูเอลฟ่า แทนการใช้ ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ภายหลังการกระตุ้นโอโอไซต์ ที่ได้จะเข้าสู่ระยะเมตาเฟส ที่สอง (Metaphase II) ถึง 72.4 % แต่ฟอลลิเคิลประมาณ 53.6 % ไม่สามารถเจริญเป็นฟอลลิเคิลได้ทั้งหมด เนื่องมาจากผลของพีเอ็มเอสจี

Krininger *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบการกระตุ้นการตกไข่จากการให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช กับโคสองสายพันธุ์คือ Holstein และ Brahman พบว่าโคทั้งสองสายพันธุ์ให้การตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ไม่แตกต่างกันทั้งในด้านจำนวนคอร์ปัสลูเทียม ที่เกิดขึ้นและจำนวนตัวอ่อนที่ตรวจพบ อีกทั้งผลที่ได้มีความใกล้เคียงกับงานทดลองของ Sartori *et al.* (2003) ที่ใช้ฮอร์โมน FSH กระตุ้นโค Holstein แต่จำนวนตัวอ่อนที่ตรวจพบมีจำนวนน้อยกว่า และเมื่อนำฮอร์โมนเอฟเอสเอชมากระตุ้นเพิ่มการตกไข่ของโค Zebu พบว่ามีการตอบสนองที่ดีโดยดูได้จากจำนวนตัวอ่อนที่ตรวจพบจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (Barrod and Nagueira, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-1. แสดงผลการใช้ฮอร์โมนในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ต่อจำนวนไข่ที่ตกและตัวอ่อนที่เก็บได้จากการกระตุ้นการตกไข่

ชนิดฮอร์โมน	ระดับฮอร์โมน	พันธุ์โค	จำนวนคอร์ปัสลูเทียม	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้	แหล่งที่มา
PMSG	1500 i.u.	Angus	14.0	4.0	Zeitoun *et al.* (1991)
	3000 i.u.	Angus	21.5	5.8	
	6000 i.u.	Hereford	29.2	4.0	
FSH	400 mg	Holstein	17	5	Sartori *et al.* (2003)
FSH	400 mg	Holstein	16.6	10.9	Krininger *et al.* (2003)
	400 mg	Brahman	15.2	9.3	
FSH	400 mg	Zebu	-	10.89	Barrod and Nagueira (2001)
FSH	400 mg	Holstein	-	20	Shea (1999)

3.การคัดเพศตัวอ่อน

3.1 การคัดเพศตัวอ่อนโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน

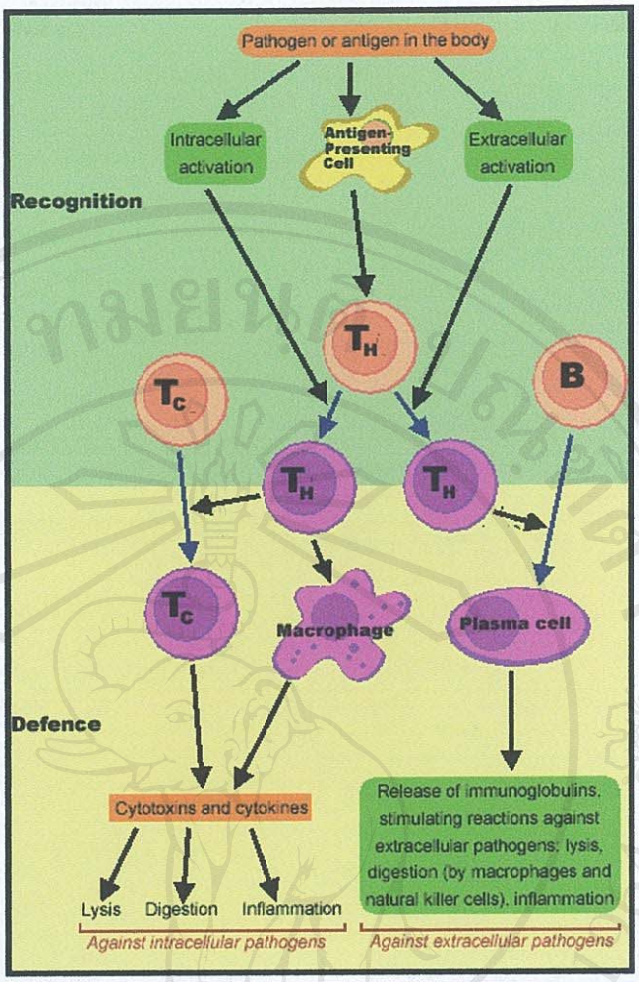
แอนติเจนเมื่อเข้าสู่ในร่างกายของสัตว์ (immunization) จะเกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า immune response แบ่งออกได้ 2 วิธี (ภาพที่2-3) (Abbas *et al.*, 1994) คือวิธีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific or native response) เป็นการตอบสนองแบบง่าย ๆ เกิดขึ้นเมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมเป็นครั้งแรกหรือทำงานร่วมกับระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และวิธีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immune response) เกิดขึ้นเมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้โดยวิธีไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งแบ่งการตอบสนองเป็นสองส่วน คือ humoral immunity (HMI) โดยใช้แอนติบอดีเป็นตัวกำจัดแอนติเจนแปลกปลอม มี B cells ที่พัฒนาไปเป็น plasma cell ทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดี และ cell

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mediated immunity (CMI) เป็นการทำงานของ T cells ในรูปแบบต่างๆ เช่น cytolytic T lymphocytes, natural killer cells และ phagocytosis

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ (Abbas *et al.*, 1994) ดังนี้: ระยะที่หนึ่ง (cognitive phase) มีการจับกันระหว่างแอนติเจนกับตัวรับที่มีความจำเพาะของลิมโฟซัยท์ที่เจริญเต็มที่ โดยที่ B lymphocytes จะปล่อยแอนติเจนออกมาสู่ผิวของเซลล์และสามารถจับกับอนุภาคแปลกปลอม โพลีแซคคาไรด์ หรือไขมันในรูปที่ละลายน้ำได้ ส่วน T lymphocytes ที่มีคุณสมบัติในการยอมรับและตอบสนองต่อแอนติเจนที่เป็นเปปไทด์จะไปแสดงบนผิวของเซลล์อื่น ๆ ด้วย ระยะที่สอง (activation phase) เป็นลำดับของเหตุการณ์ต่อมาของการเกิดการเหนี่ยวนำลิมโฟซัยท์ด้วยแอนติเจนที่จำเพาะเจาะจง ลิมโฟซัยท์จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญสองประการ คือ เกิดการแบ่งตัว (proliferation) มีการเพิ่มจำนวน (expansion) ของลิมโฟซัยท์ที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจน และขยายการป้องกัน (amplification) ให้มากขึ้น และลิมโฟซัยท์จะพัฒนาจากเซลล์ที่มีหน้าที่รับรู้ (recognition) ไปสู่เซลล์ที่มีหน้าที่กำจัดแอนติเจน จากนั้น B lymphocytes เปลี่ยนแปลงจาก antigen- regcognizing B lymphocytes เป็น antibody-secreting cells และหลั่งแอนติบอดีเพื่อกำจัดแอนติเจนที่ละลายน้ำ (soluble or extracellular antigen) ออกไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2-3. แสดงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย

Tc, Cytotoxic T cells; Th, Helper T cells; B, B cells

(ที่มา www.mcld.co.uk/hiv/ ?q=The%20human%20immune%20).

T lymphocytes เซลล์พัฒนาเป็นเซลล์ที่กระตุ้นกลไกล phagocytosis เพื่อกำจัดจุลชีพที่อยู่ระหว่างเซลล์ (extracellular mocrobes) และ T lymphocytes บางตัวทำหน้าที่โดยตรงโดยการทำให้เซลล์แตก (lysis) เช่น ไวรัส ในขบวนการ activation ของลิมโฟซัยท์มีสัญญาณมากระตุ้นอยู่สองชนิดคือ แอนติเจน และ helper cells ระยะสุดท้าย (effector phase) เป็นระยะที่ลิมโฟซัยท์ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ทำหน้าที่กำจัดแอนติเจนโดย effector cells การทำงานต้องมี non-lymphoids cells และกลไกการป้องกันอื่นร่วมด้วยเป็นการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เมื่อแอนติเจนจับกับแอนติบอดีเกิด phagocytosis โดยการทำงานของ neutrophils และ mononeuclear

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phagocytes มีโปรตีนในเลือดที่เรียกว่า complement ช่วยทำให้เซลล์แตก และ phagocytosis ของเชื้อจุลชีพแอนติบอดีชนิดอื่นๆ กระตุ้น mast cell ให้เกิด degranulation แล้วปล่อย mediator เพื่อต่อสู้กับการติดเชื้อและตอบสนองต่อการอักเสบอย่างเฉียบพลัน (acute inflammation) T lymphocytes หลั่งสาร cytokines ซึ่งเป็นโปรตีนฮอร์โมนกระตุ้น phagocytosis และการอักเสบอย่างเฉียบพลัน phagocytes, complement, mast cells, cytokines และ leukocytes ที่ทำให้เกิดการอักเสบ ทุกตัวล้วนเป็นการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้งสิ้น

3.1.1 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

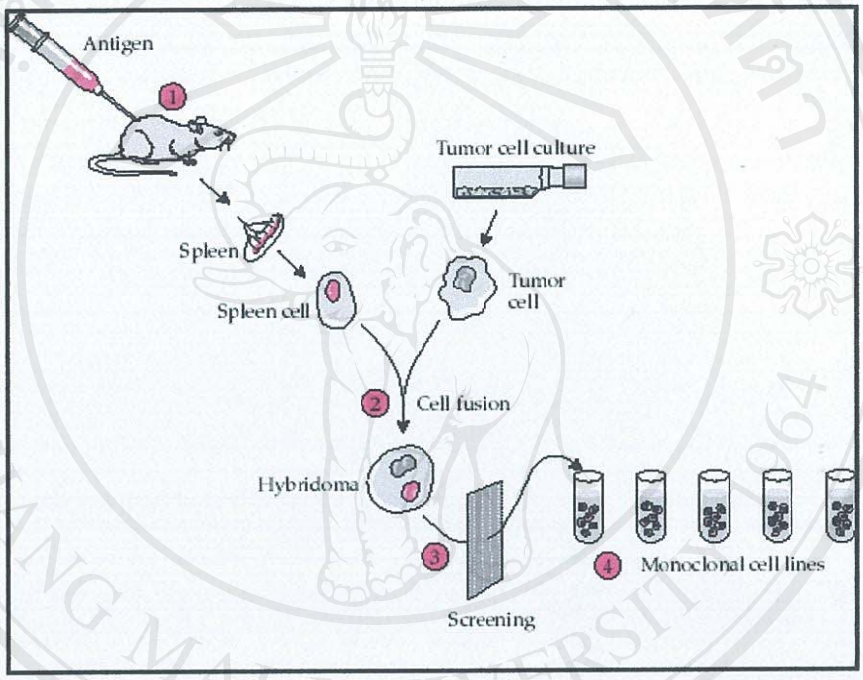
วิธีการเตรียมเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่กำหนดความจำเพาะเจาะจงได้ และสามารถสร้างได้เป็นจำนวนมากโดยอาศัยหลักการของการเชื่อมระหว่างบีลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนให้สร้างแอนติบอดีกับเซลล์ไมอิโลมาซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเซลล์มะเร็ง ผลจากการเชื่อมเซลล์ทั้งสองชนิดทำให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridomas) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงได้ตามต้องการและมีอายุยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์ไมอิโลมา แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody, MAb) เนื่องจากสร้างมาจากเซลล์โคลน (clone) เดียวกัน และมีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนสูง (อรวดี, 2539)

ความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลนั้นอยู่ที่การเตรียมเซลล์ไมอิโลมาให้เติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน selective media เพราะขาด functional gene ในการสร้างดีเอ็นเอ โดย selective media ทั่วไปคือสารละลาย HAT ซึ่งประกอบไปด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine โดย aminopterin จะขัดขวางการสร้างเบส purine โดยวิธีปกติ (de nuvo pathway) ทำให้เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์นี้ต้องเปลี่ยนมาสร้าง nucleotide โดยทางอ้อมด้วยการใช้ hypoxanthine ในการสร้างเบส purine โดยใช้เอนไซม์ hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) และสร้าง thymidylate จาก thymidine โดยอาศัยเอนไซม์ thymidine kinase (TK) แต่เนื่องจากเซลล์ไมอิโลมาที่ใช้นั้นไม่มีเอนไซม์ HGPRT และ/หรือ TK ทำให้ไม่สามารถสร้าง nucleotide จาก salvage pathway ได้จึงตายใน HAT media ในขณะที่ hybridomas cell นั้น อาศัยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจากเซลล์ปกติซึ่งก็คือ B-lymphocyte ทำให้สามารถสร้างดีเอ็นเอและเจริญเติบโตได้ (Harlow and Lane, 1988)

วิธีการในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเริ่มต้นจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลองซึ่งอาจใช้หนูถีบจักร (mouse) หรือ หนู (rat) ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ หลังจากตรวจพบการสร้างแอนติบอดีขึ้นมาตอบสนอง หลังจากนั้นตัดเอาม้าม spleen) ออกมาทำ cell suspension

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งจะได้ B cell เป็นจำนวนมาก ทำการเชื่อม (fusion) B cell และ ไมอิโลมาเซลล์ เข้าด้วยกันเป็น hybridomas หลังจากนั้นแยก hybridomas cell ออกจากเซลล์อื่นโดยเลี้ยงใน HAT media 7 -10 วัน เซลล์ที่เหลือรอดจาก selective media นี้คือ hybridomas ที่ได้จากการเชื่อมเซลล์ ตรวจดูการสร้างแอนติบอดีและทำการ โคลนเซลล์เพื่อให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีเพียงเซลล์เดียว เมื่อได้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่ต้องการแล้วก็เพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้น โดยนำเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ hybridomas ปริมาณมากๆ ที่ได้สามารถเก็บในสภาพเยือกแข็งที่ -196 °C ในไนโตรเจนเหลวเพื่อนำมาใช้ในภายหลังต่อไป (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-4. ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

(ที่มา www.emory.edu/.../justice/ seminar/antibodies.htm).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 เอช-วายแอนติเจน (H-Y antigen)

เอช-วาย แอนติเจน (histocompatibility-Y antigen ; H-Y antigen) เป็นกลุ่มของแอนติเจนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ของเพศผู้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสายพันธุ์สัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Shapiro and Erickson, 1981) มีความสำคัญต่อการแสดงออกของเพศผู้โดยมีผลมาจากโครโมโซม Y ที่สังเคราะห์โปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์เพศผู้พบได้ในอัณฑะแต่ไม่มีผลต่อ

ฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) (Selden, 1982) พบครั้งแรกจากการศึกษาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูเพศผู้สู่เพศเมียที่ไม่สามารถเข้ากันได้ เนื่องจากผลของ H-Y แอนติเจน ต่อการปลูกถ่ายข้ามเพศเอช-วายแอนติเจนที่พบจากการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า serologically – defined male antigen (SDMA) (Reilly and Goldberg, 1991) จากการศึกษาของ Goodfellow and Andrews (1982) พบว่าการปลูกถ่ายผิวหนังของหนูต่างเพศและต่างสายพันธุ์ ผลการตอบสนองต่อแอนติเจนมีผลมาจากโครโมโซม Y ในเพศผู้ เกิดการกระตุ้นการแบ่งตัวและการตอบสนองของทีเซลล์ (T cell) (Elizabeth *et al.*, 1984)

สมมุติฐานหลักเกี่ยวกับแหล่งของพันธุกรรมสำหรับเอช-วายเอนติเจน เป็นส่วนของโครโมโซมเพศ แบ่งได้ 2 แบบ คือ allele ที่ชื่อว่า Hye (Shapiro and Erickson, 1981) โดยยีนของโครโมโซมวาย และ allele Hya ที่สามารถควบคุมการเกิดเอช-วายแอนติเจนได้เช่นเดียวกัน (McLaren, 1988) เอช-วายแอนติเจนของหนูในเซลล์ epididymis, spermatozoa, thymocytes และ spleenocytes สามารถนำมาตรวจวัดปริมาณของแอนติเจนโดยอาศัยคุณสมบัติความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีได้ การวัดด้วยวิธีเทคนิค เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme-Link Immunosorbent Assay, ELISA) (Iyer *et al.*, 1989) RIA และ microcytotoxicity รวมถึงเทคนิค Immunofluorescent ตรวจหาเอช-วายแอนติเจนที่บริเวณ acrosomal membrane ของ spermatozoa ของหนูและมนุษย์และจำแนกชนิดแอนติบอดีที่ได้จากการผลิตแอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน (Bradley and Heslop, 1988) ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวัดค่าเอช-วายแอนติเจนจากเซลล์ที่ต้องการตรวจสอบนั้น ค่าของปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นจะแปรผันตามแหล่งของแอนติเจน และจำนวนเซลล์ที่ใช้ตรวจ จากบริเวณผิวเซลล์เอช-วายแอนติเจน

3.1.3 การคัดเพศด้วยเอช-วายแอนติเจน

Goldberg *et al.* (1971) ผลิตแอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน เพื่อใช้ในการตรวจหาเอช-วายแอนติเจนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเอช-วายแอนติเจนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์และหนูจะเกิดปฏิกิริยาร่วม (cross reaction) ของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น และพบความแตกต่างจากการใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน ในการตรวจน้ำเชื้อหนูจากปฏิกิริยา cytolysis เป็นผลมาจากการย้อมสีตัวอสุจิที่จับกับแอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน และการใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน ที่เป็นในลักษณะโพลีโคลนอลทำให้เกิด polymorphism ส่งผลให้ความจำเพาะต่อแอนติเจนต่ำลงไป เพราะฉะนั้นการใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจนในการตรวจเซลล์เพศผู้ที่แสดงแหล่งของเอช-วายแอนติเจน ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะได้ผลประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

55 – 86% ได้มีการนำเทคนิค ELISA มาใช้การตรวจปฏิกิริยา ระหว่างแอนติบอดีกับเอช-วาย แอนติเจนในน้ำเชื้อม้า พบว่าเทคนิค ELISA มีความใกล้เคียงกับเทคนิค cytotoxicity ซึ่งเทคนิค cytotoxicity จะมีผลต่อการแตกของเซลล์ แต่ ELISA จะรวดเร็วและมีความแม่นยำมากกว่า และได้เสนอแนะให้มีการทำ RIA เทียบกับ ELISA เพื่อเพิ่มความแม่นยำของแอนติบอดีที่ได้มา Wachtel *et. al.* (1988) ใช้เทคนิค ELISA ตรวจหาเอช-วาย แอนติเจน โดยเชื่อมติดไบโอตินกับโมโนโคลนอล เอช-วาย แอนติบอดี และใช้สารแขวนลอยในอัณฑะเป็นสิ่งตรวจสอบ นอกจากนี้ Meck and Goldberg (1984) ได้นำเทคนิค radioimmunobinding มาตรวจสอบเอช-วายแอนติเจน กับเนื้อเยื่อ fibroblasts ของมนุษย์ โดยใช้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นพบว่าเนื้อเยื่อของเพศผู้สามารถจับกับเอช-วายแอนติเจนได้

Brunner *et al.* (1984) พบว่าในการทำ ELISA จากปฏิกิริยาของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงตามปริมาณแอนติเจนโดยเฉพาะการใช้ testis supernatant เป็นแหล่งของเอช-วายแอนติเจนในการตรวจสอบโมโนโคลนนอลแอนติบอดีในปี 1988 Wachtel *et al.* ได้นำความสามารถของหนูเพศเมียที่ไวต่อการกระตุ้นจากเซลล์เพศผู้ มาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ H-Y แอนติเจน พบว่าผนังเซลล์ตัวอ่อนของหนูแพะ แกะ และโคจับกับแอนติบอดีต่อ H-Y แอนติเจนได้ประมาณ 73 - 82 % โดยแอนติบอดีนั้น ได้จากการฉีดเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้เข้าในหนูเพศเมียเพื่อกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีต่อ H-Y แอนติเจน และแอนติบอดีที่ได้นำมาทดสอบกับตัวอ่อนที่ระยะ 8 เซลล์ของหนูเมาส์โดยวิธี cytotoxicity พบว่าการแสดงออกของ H-Y แอนติเจนสามารถการจำแนกเพศของเพศผู้ ได้ถึง 65-78 % (Christopher and Goldberg ,1976)

Booman *et al.* (1989) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนและการตรวจหาชนิดของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้น พบว่าการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนโดยใช้เอช-วายแอนติเจนนั้น แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นนั้นโดยทั่วไปนิยมใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจากการกระตุ้นหนูเพศเมียด้วยเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้และใช้เทคนิค ELISAในการตรวจสอบแอนติบอดี ซึ่งใช้สารแขวนลอยที่ได้จากการสกัดเนื้อเยื่ออัณฑะเป็นแหล่งของแอนติเจนในการตรวจสอบ ทำให้ผลที่เกิดความไม่แม่นยำ และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนเป็นชนิด IgM เนื่องจากเอช-วายแอนติเจนเป็นกลุ่มของ Glycoprotein ที่ส่งผลต่อการกระตุ้น IgM หรือการทำ Hyperimmunization ก็เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิด IgM ได้เช่นกัน Zaborski (1979) ได้ตรวจสอบหาเอช-วายแอนติเจนในน้ำเชื้อของหนู ที่บริเวณ acrosomal ของอสุจิโดยดูจากระดับการเรืองแสงฟลูออเลสเซนต์ เช่นเดียวกับ Dorothea and Edward (1973) ที่นำน้ำเชื้อของหนูก่อนที่จะนำไปผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทียมมาทำการตรวจสอบเพศด้วย เอช-วายแอนติซีรัม โดยวิธี cytotoxicity พบสัดส่วนของอสุจิเพศผู้และเพศเมียประกอบอยู่ประมาณ 53.3 : 46.7

Hoppe and Koo (1984) ได้ศึกษาการยับยั้งตัวอสุจิวายจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจนเพื่อผลิตตัวอ่อนหนูเพศเมียในห้องปฏิบัติการ(*in vitro* production of embryo) พบว่าการตอบสนองของอสุจิหนูต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน ไม่มีอิทธิผลต่อสัดส่วนเพศของไข่ที่ปฏิสนธิแบบ *in vitro* และจากการใช้เทคนิค immuno selection ในการจับอสุจิวายโดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอช-วายแอนติเจน สามารถเพิ่มจำนวนลูกเพศเมียได้ประมาณ 6 – 8 % และพบว่าการแสดงออกของเอช-วายแอนติเจนจะมีสูงในช่วงที่อสุจิอยู่ใน testicular และจะลดลงระหว่างการเคลื่อนที่ลงสู่ epididymis มีความเป็นไปได้ว่าที่เวลาจะชักนำการแสดงออกของเอช-วายแอนติเจน อย่างไรตาม เอช-วายแอนติเจนสามารถตรวจพบได้บริเวณ acrosomol membrane และเมื่อนำโพลีโคลนอลต่อเอช-วายแอนติเจนมาใช้วิเคราะห์เพศอสุจิโดยเทคนิค complement – dependent cytotoxicity ได้ความน่าเชื่อถือ 71-85 % (Reilly and Goldberg, 1991)

Ali *et al.* (1990) รายงานการเชื่อมฟลูออเลสเซนต์ เข้ากับ Goat anti - mouse สำหรับตรวจสอบน้ำเชื้อของโค ที่ติดฉลากด้วยโมโนโคลนอลเอช-วายแอนติบอดี เพื่อตรวจหาเอช-วายแอนติเจนจากการเรืองแสงที่หัวของอสุจิ พบว่าสัดส่วนที่เกิดการเรืองแสงและไม่เรืองแสง (โครโมโซม Y และ X) เท่ากับ 76 : 24 และจากรายงานของ Veerhuis *et al.* (1994) ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ เอช-วายแอนติเจนที่ผลิตได้ มาใช้ในการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนโค สามารถใช้ตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ระยะ 7-8 วันหลังการปฏิสนธิ มีช่วงความแม่นยำของการบ่งบอกเพศว่าเป็นเพศผู้อยู่ในระหว่าง 58-71 % จากรายงานของ White *et al.* (1987) ที่ใช้เอช-วายแอนติเจนสำหรับจำแนกเพศตัวอ่อนแกะในช่วงของการฝังตัวซึ่งตัวอ่อนที่นำมาศึกษาได้ตรวจสอบโครโมโซมเพศแล้ว (ตารางที่ 2-2) สามารถตรวจสอบการแสดงออกของเพศผู้ได้ประมาณ 88 % โดยอาศัยเทคนิค immunofluoresecn ซึ่งเอช-วายแอนติเจนสามารถตรวจสอบได้จากเซลล์ของสัตว์ทุกสายพันธุ์ ที่เอช-วายแอนติเจนแสดงออกมาที่ผิวเซลล์ตัวอ่อนเพศผู้ในช่วงการฝังตัวของ หนู แพะ และ โค จากการวิเคราะห์และแสดงออกของ protein histocompatibility (HC) ในช่วงของการฝังตัว จะแสดงออกมาในรูป $H\text{-}2^K$ และ H-2 protein histocompatibility บนผิวเซลล์ตัวอ่อน เป็นช่วงการสังเคราะห์โปรตีนที่เริ่มจะปรากฏในช่วงการแบ่งตัวจนถึงระยะบลาสโตซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-2. แสดงการตรวจพบเอช-วายแอนติเจนจากการใช้เอช-วายแอนติบอดีโดยวิธี indirect immunofluorescence ในระยะต่างๆ ของตัวอ่อนแกะที่ทราบเพศจากตรวจโครโมโซมเพศ

ระยะตัวอ่อน	ตัวอ่อนเพศผู้มีการเรืองแสง (%)	ตัวอ่อนเพสเมียไม่มีการเรืองแสง(%)
8 เซลล์	83	100
16 เซลล์	91	82
มอรูล่า	86	100
บลาสโตซีสระยะต้น	80	83
บลาสโตซีสระยะปลาย	100	50

ที่มา : ดัดแปลงจาก White *et al.* (1987)

Gardon *et al.* (2004) ได้จำแนกเพศตัวอ่อนโครระยะต่างๆ ที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจน พบว่าระยะของตัวอ่อน (4 ถึง 8 เซลล์, 16 – 32 เซลล์ และระยะบลาสโตซีส) ไม่มีความแตกต่างกันในส่วนสัดส่วนเพศผู้และเมียที่เกิดขึ้นจากการใช้แอนติซีรัมต่อเอช-วายแอนติเจนในการตรวจสอบ 85.8:14.2

แนวทางหนึ่งในการเพิ่มสัดส่วนเพศของตัวอ่อนก่อนการย้ายฝาก คือการทำให้ตัวอ่อนเพศผู้ตายไปด้วยปฏิกิริยา cytotoxicity Ramalho *et al.* (2004) ได้กระตุ้นปฏิกิริยา cytotoxicity กับตัวอ่อนโคและม้าจากการบ่มด้วยโพลิโคลนอลแอนติบอดีต่อ เอช-วาย แอนติเจนเพื่อให้ตัวอ่อนเพศผู้ตายไปโดยดูจากการพัฒนาของตัวอ่อนว่ามีการพัฒนาถึงระยะใด พบว่าตัวอ่อนโค 46.7 % เป็นเพศผู้เนื่องจากพัฒนาถึงระยะมอรูล่า ส่วนตัวอ่อนเพศเมีย 53.3 % พัฒนาถึงระยะบลาสโตซีส ส่วนตัวอ่อนม้าให้ผลในการคัดเพศด้วยวิธีการดังกล่าว 84 % เป็นเพศผู้เมื่อตรวจเพศตัวอ่อนด้วยเทคนิค PCR และ karyotype

3.2.การคัดเพศตัวอ่อนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

3.2.1 หลักการเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จะอาศัยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยขั้นตอนแรกจะใช้อุณหภูมิสูงเพื่อแยกสาย DNA คู่สมออกจากกัน เรียกขั้นตอนนี้ว่า denaturation จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

primer ที่เป็นเบสคู่สมมาจับคู่กับ DNA ที่ต้องการอย่างถูกต้องเรียกขั้นตอนนี้ว่า annealing จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase จะเกิดการสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่เรียกขั้นตอนนี้ว่า extension ผ่านรอบที่ 1 แล้วจึงเริ่มรอบที่ 2 ต่อไป ทำเช่นนี้ 20 ~ 40 รอบ ปริมาณ DNA ที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (Sambrook and Russell,2001)

3.2.2 การคัดเพศด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

ปัจจุบันได้มีการคัดเพศตัวอ่อนโดยนำตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นเพื่อเพิ่มการตกไข่ ผสม และชะล้างจากมดลูกอายุประมาณ 6–8 วัน ซึ่งเป็นระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซีสมาตรวจดูโครโมโซมวาย (chromosome Y) สามารถทำได้หลายวิธี อาทิเช่น การตรวจด้วยวิธีคาริโอไทป์ จากการย้อมสีโครโมโซมเพื่อหาโครโมโซมวายโดยตัดเซลล์ตัวอ่อน ซึ่งต้องตัดเป็นจำนวนมากทำให้ส่งผลต่อเซลล์ที่เหลือในการย้ายฝาก และใช้เวลานาน ได้มีการพัฒนาการคัดเพศด้วยดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) โดยผลิตไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซมวายในโค (ตารางที่ 2-3) โดยใช้ร่วมกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อเพิ่มสายดีเอ็นเอให้เพียงพอกับการตรวจสอบเพศซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ประมาณ 95–100 % รายงานของ Bredbacka *et al.* (1995) ได้ศึกษาการคัดเลือกเพศของโคจากตัวอ่อนโดยวิธี PCR โดยใช้ primer DYZ ที่มีความจำเพาะกับโครโมโซม Y ในการทำเพิ่มจำนวน DNA ใช้เวลา 3 นาทีในการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annaeling ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีและในรอบสุดท้ายตัวอย่างจะถูกทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ DNA ที่ได้มาทำ gel eletrophoresis โดยใช้เจล 3 % และย้อมด้วย 5 % ethidium bromide และนำไปส่องใต้แสง UV ถ้าตัวอย่างเป็นเพศผู้จะพบแถบสีชมพูของโครโมโซม Y ปรากฏขึ้น ได้มีการนำไปใช้กับฟาร์มของเกษตรกร ในฝรั่งเศสพบว่าเป็นวิธีการลงทุนที่คุ้มค่าในเทคโนโลยี (Thibier and Nibart, 1995) จึงเริ่มมีการพัฒนา primer ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศ Hochman *et al.* (1995)ใช้ primer 3 ชนิดในการตรวจหาเพศผู้ของโค คือ BRY.1, Bov97M และ ZFX / ZFY พบว่าความแม่นยำในการตรวจสอบเพศของ primer ทั้ง 3 คือ BRY.1 เท่ากับ 87 %, ZFX / ZFY เท่ากับ 97 % และ Bov97M เท่ากับ 100 %

Park *et al.* (2000) ได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเพศโดยใช้ primer ชนิด BOV97M แต่มีการประยุกต์ใช้โดยตรวจสอบกับตัวอ่อนระยะต่างคือ บลาสโตซีส ระยะ 8 เซลล์ ระยะ 4 เซลล์ และระยะ 2 เซลล์ ในการตรวจสอบเพศพบว่าความแม่นยำของเพศจากการแบ่ง ตัวอ่อนออกเป็นระยะต่างๆ คือ 100, 96.3, 94.3 และ 92.1 % ตามลำดับ ถ้าต้องการให้มีความแม่นยำถึง 100 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำเป็นต้องใช้ตัวอ่อนที่มีจำนวนเซลล์ที่มากเพื่อเพิ่มความแม่นยำของ primer จึงได้มีการนำเทคนิคต่างๆ เข้ามามีส่วนร่วมกับวิธี PCR ในการตรวจสอบเพศ

Virta *et al.* (2002) ได้ทำการติดสารเรืองแสงเข้ากับ primer ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อลดขั้นตอน gel electrophoresis ในการตรวจสอบผลของ PCR โดยดูการเรืองแสงของชิ้นส่วนโครโมโซมวายที่เพิ่มขึ้นจากการเทคนิค PCR ทำให้ทราบเพศตัวอ่อนที่เป็นเพศผู้จะเกิดการเรืองแสงขึ้น โดยมีความแม่นยำถึง 96 % Hasler *et al.* (2002) ที่นำชุด PCR ตรวจสอบเพศทางการค้าที่ดูการเรืองแสง โดยตัวอย่างที่ศึกษากับชุดตรวจสอบต้องมีการผ่าแบ่ง (biopsy) ก่อนทำการตรวจเพศ ทำให้มีการศึกษาถึงอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนแบบสด ของตัวอ่อนที่ได้มาจากการชะล้างและจากห้องปฏิบัติการพบว่าตัวอ่อนจากการชะล้างมีอัตราการตั้งท้องที่ดีกว่าตัวอ่อนห้องปฏิบัติการและยังพบว่าตัวอ่อนที่ทำการผ่าแบ่งมีอัตราการตั้งท้องต่ำกว่าตัวอ่อนที่ไม่ได้ทำการผ่าทั้งในการย้ายฝากแบบสดและการย้ายฝากตัวอ่อนจากการแช่แข็ง ซึ่งชุดตรวจสอบเพศทางการค้าที่ใช้มีความแม่นยำในการบ่งบอกเพศผู้ 98.7 % และเพศเมีย 94.4 % แต่จากรายงานของ Enright (2000) ที่ศึกษาถึงอัตราการตั้งท้องต่อการตัดตัวอ่อน พบว่าอัตราการท้องของตัวอ่อนที่ทำการตัดและไม่ทำการตัดมีอัตราการตั้งท้องที่ใกล้เคียงกัน

Hasler *et al.* (2003) จึงได้มีการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ต่างๆ เช่น k-casein ที่บ่งบอกโปรตีนในนม ร่วมกับการตรวจสอบเพศ ด้วย primer BOVM97 ทำให้มีความแม่นยำถึง 100 % ทำให้เริ่มมีการออกแบบ Primer ที่จำเพาะต่อโครโมโซมวายต่างๆ กันออกมาใช้ตรวจสอบเพศ

Alves *et al.* (2003)ออกแบบ Primer R-IV ที่เหมาะกับเพศผู้ โดยมีขนาด 655 คู่เบส และมีความแม่นยำ 100 % ซึ่งวิธีการตรวจด้วยดีเอ็นเอโพลบ (probe) ประกอบด้วย:

(1) การตัดเอาตัวอ่อนมาจำนวนหนึ่ง โดยเป็นเซลล์จากระยะมอลลูล่าประมาณ 4 - 5 เซลล์ หรือเซลล์โทรโฟบลาสต์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส การตัดตัวอ่อนจะทำใต้กล้องจุลทัศน์และใช้ใบมีขนาดเล็กที่มีความคมมาก

(2) ทำการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วย primer ร่วมกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เมื่อได้ปริมาณที่ต้องการแล้ว จึงนำไปแยกด้วยการทำ gel electrophoresis

(3) ทำการย้อมแผ่นวุ้น เพื่อตรวจหาแถบโครโมโซมวาย ซึ่งจะเทียบกับแถบควบคุมของโครโมโซมวาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2-3. แสดง primer ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศของโค

ชื่อ Primer	ลำดับเบส	เอกสารอ้างอิง
R-IV	5'-GTT TTA TTA TCC CAG CAA G -3'	Alves *et al.* (2003)
U-IV	5'-TAT TCC TTT GGG GAG CA -3'	
BTANRP-1	5'- CCA ACT TTC CCT TCT TTC CC-3'	Alves *et al.* (2003)
BTANRP-2	5' -ATG GCC CAA AAG AAC ATT CA-3'	
Sex-Y1	5'- CCT CAG CTG CTT GAA AGT TC -3'	Chrenek *et al.* (2000)
Sex-Y2	5' -GAT CTG TAA CTG CAA ACC TGG-3'	
ZFY	5'- AAA ACT AAG CAT AGT AAA GAA ATG TCT TTC AAG TGT GA-3'	Virta *et al.* (2002)
ZFX	5'-AGC ATA GTA AAG AGA TGC CAT TCA AGT GTC A-3'	
Y-specific-F	5'-CCC TTC CAG CTG CAG TGT CA-3'	Zeleny *et al.* (2002)
Y-specific-R	5'- GAT CTG TAA CTG CAA ACC TGG C-3'	
BOVM97-F	5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3'	Park *et al.* (2000)
BOVM97-R	5'-GCT ATG CTA ACA CAA GCA CAC TG-3'	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved