บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 วิธีการคัดเลือกเพศในการผลิตโค

2.1.1 Flow Cytometry

มีการคัดเลือกสเปิร์มตามชนิดของโครโมโซมและประสบผลสำเร็จจำนวนมาก แต่มีเพียงวิธีเดียวที่ทำการคัดแยกสเปิร์มตามดีเอ็นเอที่อยู่ภายในสเปิร์ม ซึ่งสามารถวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่อยู่ภายในสเปิร์มได้อย่างแม่นยำโดยอาศัยเครื่อง Flow Cytometry เนื่องจากสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์และสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายมีองค์ประกอบของดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์จะมีดีเอ็นเอมากกว่าสเปิร์มที่มีโครโซมวาย เมื่อทำการย้อมสเปิร์มด้วยสีเรืองแสงที่จับกับดีเอ็นเอได้ สเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์จะเรืองแสงสว่างกว่าสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายทำให้เครื่อง Flow Cytometry สามารถแยกสเปิร์มทั้งสองชนิดออกจากกันได้ (Hendriksen *et al*., 1993) วิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างจำกัดจำนวนเซลล์ โดยทำได้เพียง 2 ล้านเซลล์/1 ชั่วโมง และนอกจากนี้เครื่องมือยังมีราคาแพง

การศึกษาการคัดสเปิร์มด้วยเครื่อง Flow Cytometry มีอย่างแพร่หลายและมีการพัฒนาจนถึงปัจจุบัน เช่น การศึกษาของ Hendriksen *et al*. (1993) ซึ่งศึกษาการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายเพื่อแยกสเปิร์มสุกรและโคตามโครโมโซมเอ็กซ์และโครโมโซมวาย โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวาย 7 ชนิด คือ anti-H-Y MCAs 5XI, 4 VII, 5 X, 15 XXI, 21 V, 13 XVIII และ 12-49 นำสเปิร์มมาแยกชนิดตามโครโมโซมด้วยเครื่อง Flow Cytometric-sorting ดูการจับของโปรตีนบนสเปิร์ม หลังจากนั้นดูเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายโดยการย้อมสี พบว่าการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายในสเปิร์มที่ไม่ได้ผ่านเครื่อง Flow Cytometric-sorting มี 2 แบบ คือ มีการเรืองแสงน้อย พบบริเวณส่วนหัวของสเปิร์ม กับมีการเรืองแสงมาก พบบริเวณส่วน postacrosomal จากการตรวจด้วย Immunofluorescence assay ร่วมกับการตายของสเปิร์ม พบว่าเมื่อยิ่งมีการจับที่ส่วน postacrosomal มากแสดงว่าเป็นสเปิร์มที่ตายแล้ว ไม่สามารถบอกได้ว่าสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีโครโมโซมวาย ส่วนการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายในสเปิร์มที่ผ่านเครื่อง Flow Cytometric-sorting พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์ในการจับกับเซลล์ระหว่างสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายและสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์ ซึ่งเนื่องมาจากความบริสุทธิ์ของโครโมโซมวายที่ผ่านเครื่อง Flow Cytometric-sorting มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าโครโมโซมเอ็กซ์ ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 Cytotoxicity

การทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ (Complement pathway) โดยเฉพาะ Classical pathway ที่ต้องมีแอนติบอดีร่วมด้วยในการทำงาน เป็นการทำงานที่มีการทำลายเซลล์ (Cytotoxicity) อย่างจำเพาะเจาะจง จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในระบบการผลิตสัตว์เพื่อช่วยตรวจเพศหรือเพิ่มสัดส่วนเพศของลูกที่ต้องการ

Cytotoxicity คือ ภาวะเริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ ตัวอย่างของสารที่ทำให้เกิดพิษ คือ สารเคมี หรือเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ภาวะการณ์เป็นพิษสามารถวัดได้ด้วย MTT assay คือการใช้ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) ในการตรวจวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์

Cytotoxicity ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันคือ Antibody-dependent Cell-mediated cytotoxicity (ADCC) ซึ่งอธิบายถึงความสามารถในการทำลายเซลล์ของเม็ดเลือดขาว Lymphocyte ซึ่งต้องมีแอนติบอดีไปจับกับเซลล์เป้าหมายจึงจะทำลาย หรือต้องมีคอมพลีเมนต์เป็นตัวทำงาน Complement-dependent cytotoxicity (CDC) ซึ่งผ่านระบบคอมพลีเมนต์

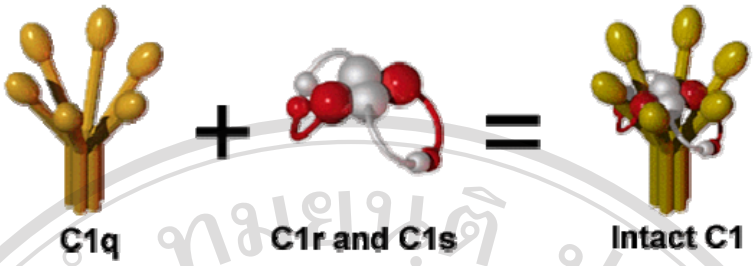
ระบบคอมพลีเมนต์เป็นขั้นตอนทางชีววิทยาของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งช่วยในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย ได้จากพลาสมาโปรตีนจำนวนมากทำงานร่วมกันในการกระทำต่อพลาสมาเมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการสลายของเซลล์ มีโปรตีนที่ละลายได้มากกว่า 35 ชนิด โดย 12 ชนิดจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับระบบคอมพลีเมนต์อีก 5 % อยู่ในส่วนโกลบูลินในซีรัม โดยโปรตีนจะหมุนเวียนในรูป Zymogen ซึ่งจะไม่ทำงานจนกว่าจะถูกย่อยบางส่วนของโครงสร้างออกไป โปรตีนหลัก ๆ ถูกสร้างที่ตับ อย่างไรก็ตามยังมีโปรตีนจำนวนมากที่ผลิตจากเม็ดเลือดขาว Monocyte, เม็ดเลือดขาว Macrophage, เยื่อบุระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย การทำงานของระบบคอมพลีเมนต์มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดและภูมิคุ้มกันที่สร้างเอง การทำงานจะทำให้เกิดการสลายของเซลล์ (Lysis), การหลั่งของสารเคมีทำให้มีการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ทำหน้าที่ทำลายแอนติเจนมายังบริเวณดังกล่าวทำให้เกิดการอักเสบ (Chemotaxis), กระบวนการทำลายแอนติเจน (Opsonization) ที่ถูกหุ้มด้วยแอนติบอดีและ/หรือองค์ประกอบของคอมพลีเมนต์โดยเซลล์ (Phagocytic cell) ที่ทำหน้าที่กิน (Ingest) แอนติเจน เช่น Macrophage และการอักเสบ (Anaphylaxis) ที่ทำให้เส้นเลือดขยายตัวและกล้ามเนื้อเรียบมีการบีบตัว ในขณะเดียวกันจะเป็นตัวบ่งว่าเชื้อโรคถูกทำลายด้วย Phagocytic cell ซึ่งจะล้อมรอบแอนติเจนแล้วทำการกินแอนติเจน (Phagocytosis)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบคอมพลีเมนต์ มี 3 วิถีทาง คือ Alternative, Lectin และ Classical (Austyn and Wood, 1993)

Classical pathway เป็นระบบคอมพลีเมนต์หลักที่จะถูกกระตุ้นในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ตัวที่ทำการกระตุ้นระบบ Classical pathway ได้แก่แอนติบอดีชนิด IgG หรือ IgM โดยระบบจะทำงานเมื่อมีการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน กระตุ้นให้มีการจับกันระหว่างส่วน Fc ของ IgG หรือ IgM กับ C1q ซึ่งเป็นองค์ประกอบโปรตีนคอมพลีเมนต์ตัวแรก โดยต้องมีบริเวณ Fc ให้จับอย่างน้อย 2 ส่วน สำหรับ IgG ต้องมีโมเลกุลของแอนติบอดี 100 - 1,000 โมเลกุล จึงจะมี Fc 2 ส่วนที่ใกล้กันพอที่จะให้มีการจับของ C1q ได้ C1 เป็นโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย C1q, C1r และ C1s ด้วยตัวของ C1q เองเป็นโมเลกุลซึ่งประกอบไปด้วย 6 unit (Hexameric molecule) มีส่วนที่เป็น Stalks และ Knobs ในส่วน Knobs ของ C1q จะเป็นส่วนที่มีการจับกับแอนติบอดีเกิด Antigen-antibody complex ส่วนโมเลกุล C1r และ C1s จะจับกันมีลักษณะเป็นเลขแปดซึ่งจะไปจับอยู่บน knobs ของ C1q ทำให้เป็นโมเลกุล C1 ที่สมบูรณ์ หลังจากนั้น C1r และ C1s จะมีการทำงานโดย C1s จะไปทำการแยก (Cleave) โปรตีนคอมพลีเมนต์ C4 และ C2 ต่อไปสามารถแยก C4 ได้ C4b และ C4a โมเลกุล C4b ที่มีขนาดใหญ่จะจับกับเมมเบรนของเซลล์เป้าหมายซึ่งได้แก่พื้นผิวของเชื้อโรค เช่น แบคทีเรีย รา หรือไวรัส ในขณะที่ C4a ที่มีขนาดเล็กจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง หลังจากนั้น C4b จะไปจับกับโปรตีนคอมพลีเมนต์ C2 แยกได้ C2a และ C2b ด้วย C1s โดย C2b ซึ่งมีขนาดเล็กจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้อง ส่วน C2a จะไปจับกับ C4b ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ เรียกว่า Classical C3 convertase (C4b2a) เนื่องจากไปทำให้โปรตีนคอมพลีเมนต์ C3 ทำงาน C3 convertase จะแยก C3 เป็น C3a และ C3b ซึ่ง C3 convertase สามารถแยกโมเลกุลของ C3 ได้หลายโมเลกุล ทำให้เกิดชิ้นส่วน C3a และ C3b โดย C3a จะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องในระบบแต่จะไปกระตุ้นให้มีการตอบสนองการอักเสบ ในขณะที่ C3b จับกับ C4b2a สร้าง Classical C5 convertase (C4b2a3b) เอนไซม์ C5 convertase จะทำงานคล้ายกับ C3 convertase ซึ่งแยกโมเลกุล C5 ได้ ทำให้เกิด C5a และ C5b ซึ่ง C5a จะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องแต่ทำให้มีการอักเสบเกิดขึ้น ในขณะที่ C5b จับกับพื้นผิวของแอนติเจนซึ่งทำให้มีการเริ่มกลไกในการสร้าง Membrane attack complex หรือ MAC (C5b-C9) ต่อไป โดยจะไปจับกับ C6 C7 C8 ซึ่ง C5b-C8 จะทำหน้าที่เหมือน Receptor สำหรับ C9 ผลจาก C5b-C8 กับ C9 หลายๆ ตัว จะเรียกว่า MAC ทำให้เกิดการย่อยสลายของเซลล์แปลกปลอมโดยทำให้เกิดรูขึ้นที่บริเวณเมมเบรนทำให้เซลล์แตกสลายได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2-1 แสดงรูปทรงของโปรตีนคอมพลีเมนต์ C1
(ที่มา http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/ies/how.html)

Alternative pathway ไม่ต้องการแอนติบอดีสำหรับกระตุ้นการทำงาน แอนติเจนจำนวนมาก ยกตัวอย่างเช่น Bacterial lipopolysaccharide ส่วนประกอบของไวรัสและเชื้อโรคอื่นๆ สามารถกระตุ้น Alternative pathway ระบบ Alternative มีการเกิดขึ้นก่อนระบบ Classical ซึ่งต้องอาศัยโมเลกุลของแอนติบอดีในการทำงาน ระบบ Alternative มีการผลิต C3 และ C5 convertase เช่นเดียวกับระบบ Classical ซึ่งทำให้มีการผลิต C5b ต่อไปทำให้มีการสะสมของ MAC แต่ภายในกระบวนการที่เกิดขึ้นจะใช้โมเลกุลที่แตกต่างกัน ส่วนประกอบของคอมพลีเมนต์ C3 สามารถแยกได้โดยธรรมชาติ ทำให้มีชิ้นส่วน C3a และ C3b ล่องลอยอยู่ในซีรัม ส่วนประกอบของ C3b สามารถจับกับพื้นผิวได้หลายชนิด ทั้งสารแปลกปลอมและสารที่คล้ายคลึงกับ Host สาร Sialic acid ที่พบบนผิวเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่ทำให้ C3b ไม่ทำงาน พวกจุลินทรีย์ซึ่งส่วนใหญ่ไม่มี Sialic acid จะเป็นบริเวณที่มีการสะสมของ C3b ชิ้นส่วนของ C3b สามารถจับกับพื้นผิวของเชื้อโรคโดยการจับกับแฟคเตอร์บี (BF) ซึ่งแยกด้วยแฟคเตอร์ดี (DF) ได้ Ba และ Bb ชิ้นส่วน Ba จะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการ ในขณะที่ชิ้นส่วน Bb จะจับกับ C3b ได้เอนไซม์ Alternative C3 convertase (C3bBb) ซึ่งไม่ค่อยสเถียร เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการแยกโมเลกุล C3 เอนไซม์ Alternative C3 convertase จึงต้องการการทำให้สเถียรด้วยสารอื่น เช่น Properdin ซึ่งจะจับกับโมเลกุล C3bBb ทำให้ยืดอายุในการทำงานออกไป Alternative C3 convertase จะทำหน้าที่คล้ายกับ Classical C3 convertase โดยแยกโมเลกุล C3 หลายร้อยโมเลกุลเป็น C3a และ C3b โมเลกุล C3b ที่เหลืออยู่จะไปทำให้เกิดสร้างเอนไซม์ Alternative C5 convertase (C3bBb3b) ที่แยกโมเลกุล C5 ให้เป็น C5a และ C5b โมเลกุล C5b ที่เหลืออยู่จะจับกับพื้นผิวและจับกับ C6-C9 เพื่อทำการสร้าง MAC ต่อไป

Lectin pathway ต้องอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง Lectin เช่น Mannose-binding lectin (MBL) และ Ficolin กับน้ำตาลบนพื้นผิวของเชื้อโรค เมื่อมีการจับกันระหว่าง Lectin กับน้ำตาลบนพื้นผิว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของเชื้อโรค เอนไซม์ MBL-associated serine protease (MASPs) จะถูกกระตุ้น โดยเอนไซม์นี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ C1r และ C1s ทำให้มีการทำงานต่อไปคล้ายคลึงกับ Classical pathway

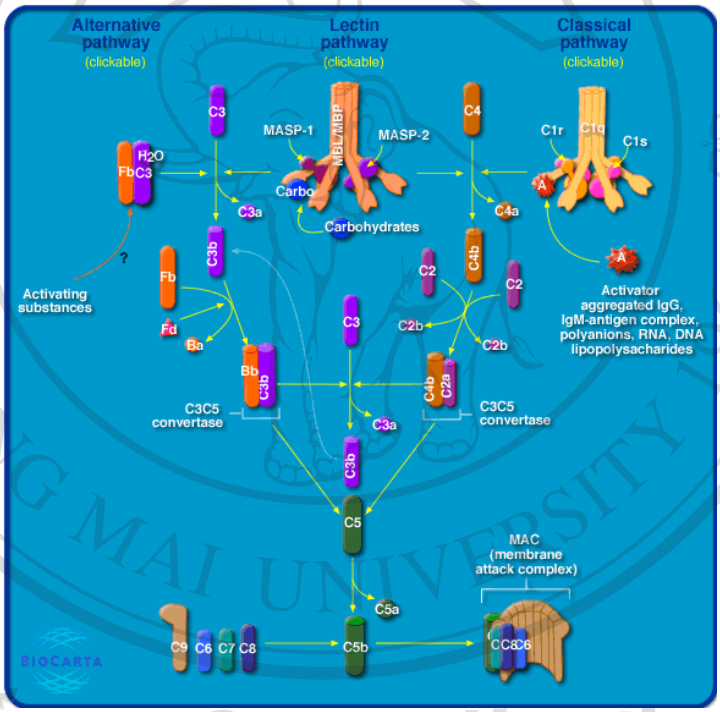
ตัวรับคอมพลีเมนต์ (Complement receptor)

ตัวรับคอมพลีเมนต์จับกับ C3 ประกอบไปด้วย

CR1 พบบน Monocyte และ Macrophages

CR2 พบบน B cells

CR3 พบบน Monocyte และ Macrophages



ภาพ 2-2 แสดงระบบคอมพลีเมนต์ (Complement pathway)
(ที่มา : http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_compPathway)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจาก Classical pathway เป็นการทำงานที่มีการทำลายเซลล์อย่างจำเพาะเจาะจงซึ่งต้องมีแอนติบอดีร่วมด้วยในการทำงาน จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในระบบการผลิตสัตว์เพื่อช่วยตรวจเพศหรือเพิ่มสัดส่วนเพศของลูกที่ต้องการซึ่งมีการศึกษาในสัตว์หลายชนิด การศึกษาในช่วงแรกเป็นการศึกษาในหนูเป็นส่วนใหญ่ เช่นงานของ Goldberg *et al* . (1971) ศึกษาเอชวายแอนติเจนบนผิวของสเปิร์ม โดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูเพศผู้ให้กับหนูเพศเมียแล้วนำไปศึกษาต่อ

ด้วยปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยนำน้ำเชื้อบ่มร่วมกับเอชวายแอนติซีรัมและคอมพลีเมนต์ของกระต่าย พบว่าสเปิร์มถูกทำลายด้วยเอชวายซีรัม 54 % เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wachtel *et al.* (1974) แต่นำสเปิร์มของหนูมาทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเอชวายแอนติบอดีและคอมพลีเมนต์จากม้า พบว่ากลุ่มสเปิร์มที่บ่มในเอชวายแอนติบอดีร่วมกับคอมพลีเมนต์มีการตายของสเปิร์มมากกว่ากลุ่มสเปิร์มที่บ่มในเอชวายแอนติบอดีซึ่งลดการทำงานของแอนติบอดีด้วยแอนติเจนจากเพศผู้ร่วมกับคอมพลีเมนต์ 31. 43 % และ Andonian *et al*. (2001) ตรวจเพศตัวอ่อนหนู โดยการนำเซลล์ม้ามและเซลล์อัณฑะของหนูเพศผู้มากระตุ้นหนูเพศเมีย โดยทำการฉีดเข้าช่องท้องแล้วจึงทำการตรวจแอนติบอดีในซีรัมด้วยวิธี Doublegel diffusion, Counter Immunoelectrophoresis, Plain electrophoresis, Immunofluorescence และ Cytotoxicity test พบว่า 2 วิธีแรกไม่แสดงผลว่าเกิดเอชวายแอนติบอดีในซีรัมของหนูเพศเมีย ในขณะที่ 3 วิธีหลังตรวจพบเอชวายแอนติบอดีในซีรัมของหนูเพศเมีย โดยวิธี Electrophoresis จะตรวจพบแกมมาโกลบูลินเพิ่มขึ้นในซีรัมของหนูที่ทำการฉีดเซลล์ม้ามและเซลล์อัณฑะ วิธี Immunofluorescence จะวิเคราะห์ด้วย Indirect immunofluorescence โดยใช้ Fluorescein isothiocyanate (FITC) เชื่อมกับอิมมูโนโกลบูลินหนู พบเอชวายแอนติเจนบริเวณที่มีเซลล์ม้ามและเซลล์อัณฑะ และ Cytotoxicity test ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด พบการแตกตัวของเซลล์ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเอชวายแอนติบอดี ต่อมามีการศึกษาพัฒนาเพิ่มขึ้นโดยดูสัดส่วนเพศที่เปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติเช่น Bennett *et al*. (1973) ที่ศึกษาอัตราส่วนเพศของลูกหนูที่ผสมเทียมด้วยสเปิร์มที่ได้รับเอชวายแอนติซีรัม โดยเตรียมเอชวายแอนติซีรัมจากการฉีดหนูเพศเมียพันธุ์ C57B1/6 (B6) ทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังการกระตุ้นของแต่ละตัวมาทำการตรวจสอบ Cytotoxicity activity ต่อสเปิร์ม ใช้เฉพาะซีรัมที่เจือจาง 1/8 ซึ่งทำให้เกิดการตายของสเปิร์มมากกว่ากลุ่มควบคุม 20-30 % โดยใช้ Horse complement นำหนูเพศเมียไปผสมเทียมกับสเปิร์มจากหนูเพศผู้พันธุ์ (B6xA)F1 ที่ผสมกับแอนติซีรัมและคอมพลีเมนต์ พบว่าครอกควบคุมที่ 1 สุ่มให้เพศเมียผสมพันธุ์กับเพศผู้ให้อัตราส่วนเพศของลูกปกติ ครอกควบคุมที่ 2 ผสมเทียมระหว่างเพศเมียกับเพศผู้ที่สเปิร์มได้รับแอนติ H-2^a หรือแอนติ H-2^b ผลคือกลุ่มของเพศเมียที่ผสมเทียมด้วยสเปิร์มที่ได้รับแอนติเอชวายมีลูกเพศผู้ 45.5 % เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้ผสมพันธุ์ตามปกติกับกลุ่มควบคุมที่ผสมเทียมมีลูกเพศผู้ 53.4 % ($P < 0.003$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.3 Histocompatibility-Y antigen (H-Y antigen)

การศึกษาแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในสัตว์เศรษฐกิจ โดยเฉพาะโค เนื่องมาจากเพศผู้มีโครโมโซมเอ็กซ์วาย (XY) ส่วนเพศเมียมีโครโมโซมเอ็กซ์เอ็กซ์ (XX) ดังนั้นจึงมีการศึกษาโปรตีนที่ผลิตจากเพศผู้ เพื่อช่วยในการคัดเพศหรือตรวจเพศตัวอ่อน

เอชวายแอนติเจน (Histocompatibility-Y antigen) หรือแอนติเจนที่จำเพาะต่อเพศผู้ เอชวายแอนติเจนมีบทบาทในการพัฒนาการทางเพศในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเอชวายแอนติเจนสามารถพบได้ในเซลล์เกือบทุกชนิดในเพศผู้พบมากในผนังของเซลล์สมอง เซลล์อัณฑะรวมไปถึงเซลล์สเปิร์ม เอชวายแอนติเจนพบที่ผนังเซลล์ของตัวอ่อนสัตว์ประเภทหนูตัวเล็ก (Mouse) หนูตัวใหญ่ (Rat) โคและแกะ (Hendriksen *et al.*,1993) ยีนที่ทำให้เกิดเอชวายแอนติเจนตั้งอยู่บนโครโมโซมวาย หลักฐานส่วนหนึ่งคือการศึกษาของ Robert *et al.* (1988) ที่ศึกษา Sex reversed (Sxr) region ที่อยู่บนโครโมโซมวายซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอชวายแอนติเจน โดยใช้โพรบที่จำเพาะต่อ Sxr region มาตรวจดีเอ็นเอของหนูเพศผู้และเพศเมียด้วยเทคนิค Southern blot analysis พบว่าในเพศผู้จะเกิดแถบดีเอ็นเอส่วนเพศเมียไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเอชวายแอนติเจนพบเฉพาะเพศผู้ แสดงว่าบริเวณ Sxr region เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอชวายแอนติเจน

มีการศึกษาเอชวายแอนติเจนมาอย่างยาวนาน โดยเริ่มการศึกษาจากหนูแล้วพัฒนามาศึกษาในสัตว์ชนิดอื่น เช่น โค นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์ปีกและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ การศึกษาในช่วงแรกเกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์และวิวัฒนาการของเอชวายแอนติเจน โดย Wachtel *et al.* (1975) ศึกษาการอนุรักษ์และวิวัฒนาการของเอชวายแอนติเจน โดยเตรียมเอชวายแอนติซีรัมในหนูตัวเล็กเพศเมียพันธุ์ C57BL/6 ด้วยการกระตุ้นด้วยเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้พันธุ์ C57BL/6 เช่นเดียวกัน หลังจากนั้นแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกดูดซับด้วยเซลล์เพศเมีย (Aliquot A) กลุ่มที่สองดูดซับด้วยเซลล์เพศผู้ (Aliquot B) กลุ่มที่สามไม่ดูดซับ หลังจากนั้นดูความสามารถในการเป็นพิษต่อเซลล์ที่เหลืออยู่ต่อสเปิร์มหนู (Cytotoxicity activity) ของ aliquot A หรือ B เป็นตัวบ่งชี้ว่าเอชวายแอนติบอดีจับกับเซลล์เพศเมีย (A) หรือเซลล์เพศผู้ (B) หลังจากนั้นนำเอชวายแอนติซีรัมแบ่งไปใช้เพื่อทำการทดสอบ Mixed haemadsorption-hybrid antibody (MHA.HA) โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม เหมือนกับ Cytotoxicity test เติม Rabbit hybrid antibody กับ specificity : anti-mouse Ig หรือ Anti-sheep red blood cell (SRBC) นำสเปิร์มไปทำปฏิกิริยากับ SRBC ในการวิเคราะห์เช่นนี้สเปิร์มจะได้รับเอชวายแอนติบอดีและไฮบริดแอนติบอดีแล้วจับกับ SRBC เพื่อสร้างรูปร่าง Rosettes การดูดซับเอชวายแอนติบอดีจาก Aliquot A หรือ B ใน MHA.HA test บ่งชี้ด้วยจำนวนที่ลดลงของ Rosettes เทียบกับ จำนวนของ Rosettes ของ Aliquot C พบว่าในลูกไก่มีเอชวาย (เอชดับบลิว) แอนติเจนที่มีความคล้ายคลึงหรือมีปฏิกิริยาข้ามต่อเอชวายของหนู และมีการแสดงออกในเพศเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเป็นพิษต่อเซลล์ลดลงเมื่อนำแอนติซีรัมไปดูดซับด้วยเซลล์เพศเมีย และจำนวน Rosettes ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อนำแอนติซีรัมไปดูดซับด้วยเซลล์เพศเมีย เนื่องจากนกและสัตว์เลือดอุ่นมีวิวัฒนาการมาจากสัตว์เลื้อยคลานจึงคาดว่าจะพบเอชวายแอนติเจนในสัตว์เลื้อยคลาน จึงศึกษาเพิ่มในพวกสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ คือ *Rana pipiens* และ *Xenopus laevis* พบว่าเซลล์จากสัตว์ 2 สปีชีส์มีองค์ประกอบของผิวเซลล์คล้ายคลึงหรือมีปฏิกิริยาข้ามต่อเอชวายของหนู ซึ่งแอนติเจนพบในเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ส่วนจำนวน rosettes ใน *X. laevis* ลดลงเมื่อนำแอนติซีรัมไปดูดซับด้วยเซลล์เพศเมีย ผลคล้ายกับการศึกษา Koo and Goldberg (1978) ที่ศึกษาการเกิด Rosettes เมื่อดูดซับด้วยเซลล์ม้ามหนูเพศผู้และเซลล์เนื่อเยื่อเกี่ยวพัน (Fibroblast) ของมนุษย์เพศชายทำให้ Rosettes ลดลง แสดงว่ามีเอชวายแอนติเจนในหนูเพศผู้และในมนุษย์เพศชาย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Booman *et al.* (1989) แต่ทำการตรวจการผลิตเอชวายแอนติบอดีด้วยเทคนิค Enzyme immunoassay โดยใช้แหล่งแอนติเจนคือเซลล์อัณฑะของหนู กระต่าย และวัว ซึ่งผลพบว่าสามารถตรวจพบเอชวายแอนติเจนในสัตว์ทั้ง 3 ชนิด เป็นหลักฐานยืนยันว่าเอชวายแอนติเจนอยู่บนผนังเซลล์อัณฑะของหนู กระต่ายและวัว

หลังจากนั้นมีการนำความรู้พื้นฐานด้านเอชวายแอนติเจนไปใช้ประโยชน์ในการตรวจเพศตัวอ่อนในสัตว์ เช่นการศึกษาในโค โดย Blecher *et al.* (1999) พบโปรตีนที่จำเพาะเจาะจงต่อสเปิร์มของโค โดยทำการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศเมียในกระต่าย ด้วยการกระตุ้นกระต่ายเพศผู้ด้วยเนื้อเยื่อของตัวอ่อนโคเพศเมีย เมื่อนำมาทดสอบกับสเปิร์มโคพบว่าสเปิร์มครึ่งหนึ่งมีการจับกันเป็นก้อน ส่วนสเปิร์มที่ไม่จับตัวกันนำมาผสมกับไข่เลี้ยงจนเป็นตัวอ่อนพบว่าเป็นเพศผู้ถึง 92 % แสดงว่าแอนติบอดีที่ผลิตทำให้สเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์จับกัน ดังนั้นตัวอ่อนที่เกิดจากสเปิร์มที่ไม่จับตัวกันจึงเป็นลูกโคเพศผู้ คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Ramalho *et al.* (2004) ซึ่งทำการตรวจเพศตัวอ่อนหนูและโค โดยการหยุดการพัฒนาตัวอ่อนด้วยเอชวายแอนติซีรัม โดยเตรียมเอชวายแอนติซีรัมด้วยการฉีดเซลล์เม็ดเลือดขาวม้ามจากหนูเพศผู้ให้หนู Nagaze analbuminemia เพศเมีย นำตัวอ่อนหนูและโคระยะมอรูล่าระยะสุดท้ายมาเลี้ยงร่วมกับเอชวายแอนติซีรัม แล้วทำการตรวจเพศโดยดูจากการพัฒนาของตัวอ่อนถ้าตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสจะเป็นตัวอ่อนเพศเมีย แต่ถ้าหยุดอยู่ที่ระยะมอรูล่าระยะสุดท้ายจะเป็นตัวอ่อนเพศผู้ พบว่าในหนูเมื่อมีการวิเคราะห์โครโมโซม หนูซึ่งไม่เกิด Blastocoele 51.3 % (สันนิษฐานว่าเป็นตัวผู้) จะเป็นตัวผู้ 83.3 % และตัวเมีย 16.7 % ส่วนในหนูที่เกิด Blastocoele 48.7 % (สันนิษฐานว่าเป็นตัวเมีย) จะเป็นตัวผู้ 15.8 % และตัวเมีย 84.2 % เมื่อวิเคราะห์ด้วย PCR ในหนูซึ่งไม่เกิด Blastocoele 33.3 % (สันนิษฐานว่าเป็นตัวผู้) พบว่าจะเป็นตัวผู้ 83.9 % และตัวเมีย 16.1 % ส่วนในหนูที่เกิด Blastocoele 66.7 % (สันนิษฐานว่าเป็นตัวเมีย) จะเป็นตัวผู้ 19.4 % และตัวเมีย 80.6 % ส่วนในโคซึ่งไม่เกิด Blastocoele

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

46.7 % (สันนิษฐานว่าเป็นตัวผู้) และที่เกิด Blastocoele 53.3 % (สันนิษฐานว่าเป็นตัวเมีย) เมื่อนำตัวอ่อนถ่ายฝากให้แม่โค แล้วทำการอัลตราซาวด์จะเป็นตัวผู้ 47.1 % และตัวเมีย 52.9 % ซึ่งมีความถูกต้องอย่างมาก

นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มสัดส่วนลูกเพศเมียในสัตว์ชนิดต่าง ๆ Shelton and Goldberg (1984) ศึกษาการเพิ่มสัดส่วนลูกหนูเพศเมียโดยอาศัยการแสดงออกของเอชวายแอนติเจนในตัวอ่อนของหนูระยะก่อนฝังตัว เริ่มจากเตรียมแอนติซีรัมต่อเอชวายแอนติเจนโดยใช้หนูตัวเล็ก C57BL/6 เพศเมียที่กระตุ้นด้วยเซลล์ม้ามเพศผู้ แล้วนำมาเลี้ยงเซลล์ระยะ 8 เซลล์ของหนู ตรวจสอบด้วยวิธี Cytotoxicity assay พบว่าเมื่อมีคอมพลีเมนต์อย่างเดียวตัวอ่อนเพศผู้จะรอดชีวิตมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีเอชวายแอนติซีรัมร่วมกับคอมพลีเมนต์ และการใช้เอชวายแอนติซีรัมร่วมกับคอมพลีเมนต์ทำให้มีลูกหนูเพศเมียถึง 82 % และ Gardon *et al.* (2004) ศึกษาในตัวอ่อนของโคที่ระยะพัฒนาต่างๆ กัน โดยใช้เอชวายแอนติซีรัมจากหนู โดยเตรียมเอชวายแอนติซีรัมจากหนู Wistar เพศเมียโดยการฉีดเซลล์ม้ามหนูเพศผู้เข้าสู่ช่องท้อง นำตัวอ่อนระยะ 4-8 เซลล์ ระยะน้อยกว่า 32 เซลล์และระยะมากกว่า 32 เซลล์ของโคมาเลี้ยง พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนของโคถัดจากระยะ 8 เซลล์ ด้วย เอชวายแอนติซีรัมกับคอมพลีเมนต์จะมีเปอร์เซ็นต์ระหว่างตัวอ่อนเพศผู้ซึ่งถูกยับยั้งการพัฒนากับตัวอ่อนเพศผู้ที่เจริญตามปกติ คือ 81.9:22.6 กับ 81.7:24.0 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในปัจจุบันนอกจากจะมีการตรวจเพศตัวอ่อนด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยาแล้วยังนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการตรวจเพศอีกด้วย เนื่องมาจากการทำงานทางชีวโมเลกุลเป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อยกว่าและมีความแม่นยำสูงจึงนิยมนำมาใช้ในการตรวจเพศตัวอ่อนควบคู่ไปกับงานทางภูมิคุ้มกันวิทยา ทำให้มีความน่าเชื่อถือสูงขึ้น มีการศึกษาเรื่องยีนของสัตว์เศรษฐกิจอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะยีนที่จำเพาะต่อเพศผู้ ยกตัวอย่างเช่น SRY gene, ZFY gene เป็นต้น หรือยีนที่จำเพาะต่อเพศเมีย ยกตัวอย่างเช่น Proteolipid protein gene (PLP) ช่วยให้สามารถตรวจเพศตัวอ่อนเพศผู้ได้

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เทคนิคนี้สามารถใช้ได้กระทั่งโมเลกุลของดีเอ็นเอจำนวนน้อยเพื่อทำการเพิ่มจำนวนหลายๆ ครั้ง ยิ่งมีดีเอ็นเอที่ใช้ได้มากยิ่งง่ายต่อการวิเคราะห์ มักใช้ทั่วไปในการวิจัยทางการแพทย์และชีววิทยา ยกตัวอย่างเช่นการตรวจโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม การจำแนก genetic fingerprint การวินิจฉัยโรคติดเชื้อ การทดสอบการสืบวงศ์ตระกูลและการคำนวณดีเอ็นเอ

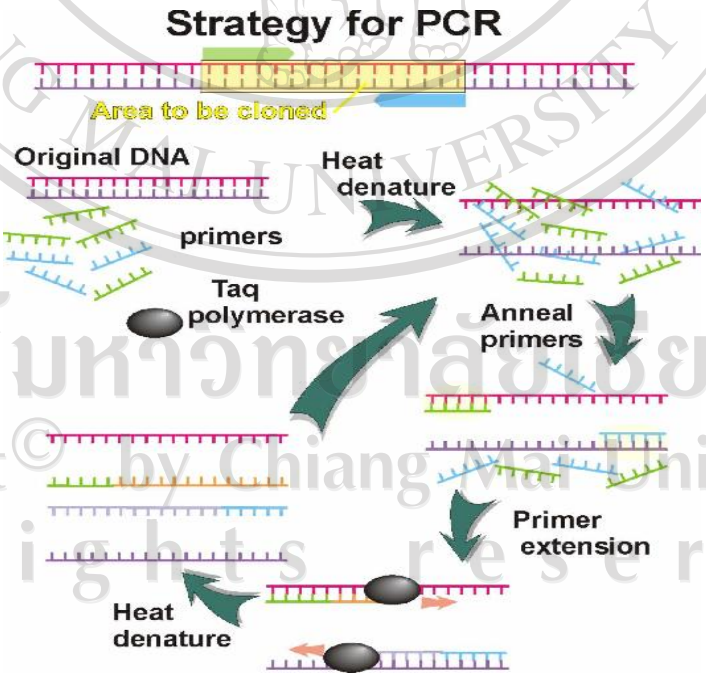
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระบวนการ PCR โดยปกติจะอยู่ที่ 20-35 รอบ ในแต่ละรอบจะมี 3 ขั้นตอน

1.ขั้นตอนการ Denature ดีเอ็นเอสายคู่จะถูกให้ความร้อนที่ 94-96 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสายของดีเอ็นเอ โดยการทำการแยกพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอ 2 สาย ก่อนการทำรอบแรก ดีเอ็นเอมักจะถูก Denatured เป็นเวลานานเพื่อให้แน่ใจว่าดีเอ็นเอแม่แบบและไพรเมอร์ได้แยกจากกันอย่างสมบูรณ์และเป็นสายเดี่ยวอย่างเดียวเท่านั้น เวลาที่ใช้คือ 1-2 นาที จนถึง 5 นาที ขั้นตอนนี้ Taq polymerase จะถูกกระตุ้นการทำงานด้วย

2.ขั้นตอนการ Anneal หลังจากแยกสายของดีเอ็นเอแล้ว อุณหภูมิจะลดลงทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ อุณหภูมิของขั้นนี้ขึ้นกับไพรเมอร์และโดยทั่วไปจะต่ำกว่า Tm 5 องศาเซลเซียส (45-60 องศาเซลเซียส) ใช้เวลา 1-2 นาที

3.ขั้นตอนการ Extension ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะคัดลอกสายดีเอ็นเอ จะเริ่มจาก Anneal ไพรเมอร์และทำงานไปตามสายดีเอ็นเอ อุณหภูมิขั้นตอนนี้ขึ้นกับดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เวลาขึ้นอยู่กับดีเอ็นเอโพลเมอเรสและความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะเพิ่มจำนวน 1 นาทีต่อ 1 กิโลเบสแพร์ ขั้นตอน Extension ครั้งสุดท้ายมักทำหลังจาก PCR รอบสุดท้าย เพื่อให้แน่ใจว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เหลือได้คัดลอกสมบูรณ์แล้ว ความต่างจาก Extension รอบอื่นๆ คือเวลา โดยทั่วไปคือ 10-15 นาที



ภาพ 2-3 แสดงกระบวนการลูกโซ่โพลีเมอเรส

(ที่มา http://www.ocf.berkeley.edu/~edy/intro/ intro2.html)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิคนี้ใช้ในสถานการณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequence) ที่ต้องการ โดยอาศัยดีเอ็นเอโพรบ (Probe) ที่จำเพาะเจาะจง และมีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ทำให้การตรวจเพศตัวอ่อนหลายชนิดประสบผลสำเร็จ โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) ในการศึกษาแตกต่างกันไป

การศึกษาในโคพบอย่างแพร่หลาย เช่น Pomp *et al*. (1995) ที่ทำการตรวจเพศของโคโดยใช้ตัวอ่อน มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบเพศ ใช้ Primer ชนิด ZFY-ZFX ร่วมกับ SRY สำหรับการตรวจสอบ ซึ่ง SRY ประกอบด้วย SRYA และ SRYB ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจะใช้เวลาทั้งหมด ประมาณ 101 นาที โดยมีรอบของ PCR ดังนี้ Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 นาที ต่อจากนั้นทำ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 นาที เป็นจำนวน 29 รอบ และในรอบสุดท้ายทำ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 9 นาที นำดีเอ็นเอมาทำ Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 3 % และย้อมด้วย Ethidium bromide หลังจากนั้นนำไปส่องใต้แสง UV ในโค ZFY-ZFX พบทั้งในเพศผู้และเพศเมีย และพบ SRYB เฉพาะเพศผู้เท่านั้น แสดงว่า SRYB มีความจำเพาะต่อโครโมโซมวาย Bredbacka *et al*. (1995) ใช้ Primer DYZ ซึ่งจะเป็นวิธีการตรวจเพศของตัวอ่อนโดยตรวจการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอที่จำเพาะของ Y โดยตรงจากหลอดทดลอง เมื่อนำไปส่องภายใต้แสง UV หลอดที่เกิดสีชมพูแสดงว่ามีโครโมโซมวาย เพื่อให้มีความสะดวกและรวดเร็วสามารถนำไปใช้ภายในฟาร์มได้จริง ในการเพิ่มปริมาณจำนวนดีเอ็นเอ ใช้เวลา 3 นาทีในการ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำ Denaturation ที่ 92 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 วินาที Annaeling ที่ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 80 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 วินาที เป็นจำนวน 10 รอบ จากนั้นทำ Denaturation ที่ 92 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 วินาที Annaeling ที่ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 40 วินาที และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เพิ่ม 1วินาที/รอบ อีก 40 รอบ และในรอบสุดท้าย Extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำไปส่องใต้แสง UV ถ้าตัวอย่างเป็นเพศผู้จะพบแถบสีชมพูของโครโมโซม Y ปรากฏขึ้นในหลอดทดลอง Chrenek *et al*. (2001) ใช้ Primer Sex (Y-locus) มาใช้ตรวจสอบเพศ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำ Initial denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 นาที หลังจากนั้นทำ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 40 วินาที Annealing 53 องศาเซลเซียส 40 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และในรอบสุดท้าย Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 2.5 % และย้อม Ethidium bromide และนำไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่องใต้แสง UV จะพบแถบเฉพาะเพศผู้ พบว่ามีความแม่นยำถึง 91 % ในการทดสอบเพศของตัวอ่อน และพบว่าจำนวนของตัวอ่อนที่พัฒนาไปถึงระยะมอรูล่าและบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ทำการผ่าและไม่ผ่าไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการผ่าแบ่งตัวอ่อนวิธีนี้ไม่รบกวนการพัฒนาการของตัวอ่อนตามปกติ Park *et al.* (2001) ใช้ Primer BOV97M จะใช้ตัวอ่อนของโครระยะ 8-16 เซลล์ โดยแบ่งกลุ่มออกเป็น 1, 2, 4 และ 8 บลาสโตเมียร์ (Blastomere)ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 33 รอบ และในรอบสุดท้าย Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 4 % และย้อม Ethidium bromide และนำไปส่องใต้แสง UV ถ้าพบแถบ 2 แถบบนเจลแสดงว่าเป็นตัวอ่อนเพศผู้ พบว่าประสิทธิภาพในการตรวจสอบเพศคือ 92.1, 94.3, 96.3 และ 100 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแม้ใช้เซลล์ตัวอ่อนเซลล์เดียวก็สามารถใช้ตรวจสอบเพศได้แต่จะมีความแม่นยำที่น้อยกว่าการใช้ที่จำนวน 8 Blastomere Alves *et al.* (2003) ได้มีการออกแบบ primer R-IV สำหรับตรวจสอบเพศของตัวอ่อนโค โดยใช้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นทำ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และในรอบสุดท้าย Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 นาที พบว่าจะเกิดแถบในเพศผู้และมีความแม่นยำ 100 % ซึ่งมีคุณค่าในทางการค้าเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถตรวจเพศของตัวอ่อนโคได้ทั้งโคยุโรป (*Bos Taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) Kageyama *et al.* (2004) ใช้ primer S4 ทั้งหมด 3 ชุด ได้แก่ S4AF, S4AR S4CF, S4CR และ S4BF, S4BR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำ Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing 52 องศาเซลเซียส 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที เป็นจำนวน 45 รอบ โดยพบว่าชุด S4BF, S4BR สามารถใช้แยกเพศผู้และเพศเมียได้ชัดเจนกว่า เนื่องจากเกิดแถบ 2 แถบในเพศผู้ และเกิดแถบเดียวในเพศเมีย นอกจากนี้ S4AF, S4AR S4CF,S4CR ในเพศเมียจะไม่เกิดแถบซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ พบว่าเมื่อใช้ชุด S4BF,S4BR มีความถูกต้องในการตรวจเพศถึง 91.6 % และ Lemos *et al.* (2005) ใช้ Primer TSPY ที่จำเพาะกับยีน TSPY (Testis-specific protein ,Y –encoded) ซึ่งจำเพาะกับยีนวาย มาทำการตรวจเพศโค โดยนำเลือดโคมาทดสอบ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นทำ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที Annealing 64 องศาเซลเซียส 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบและในรอบสุดท้าย Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ Gel electrophoresis ที่ Agarose gel 2 % ย้อมด้วย Ethidium bromide ซึ่ง ในเพศเมียจะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

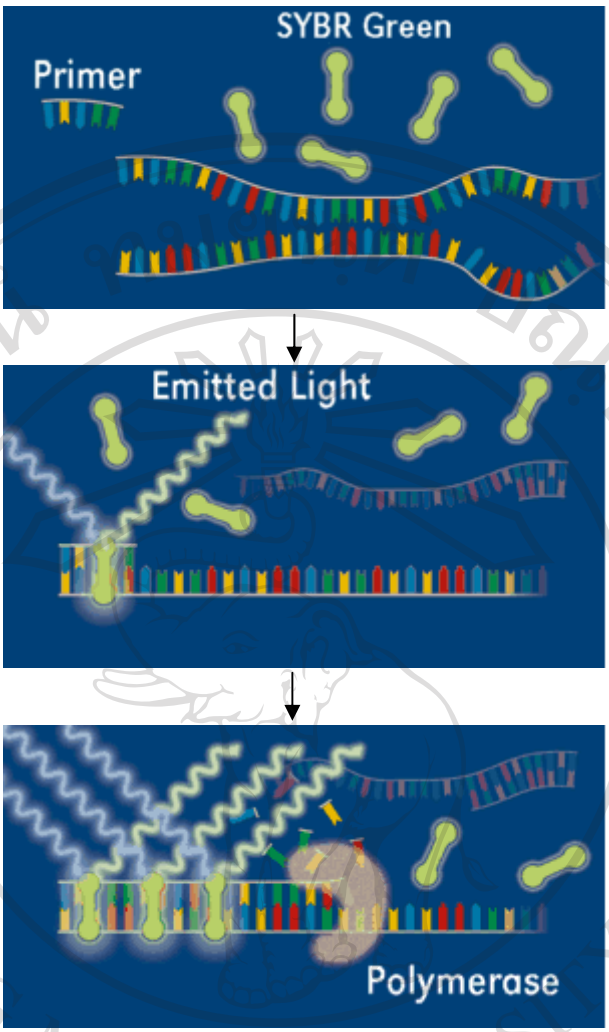
ไม่เกิดแถบ เกิดแถบเฉพาะเพศผู้ พบว่ามีความถูกต้องในทุกตัวอย่างของโคที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ส่วนเนื้อเยื่อหรือ Blastomere มาทำการทดสอบได้ จึงเป็นการทดลองครั้งแรกที่แสดงว่า TSPY มีประโยชน์ในการตรวจเพศของโคได้ และน่าจะสามารถแยกเพศของตัวอ่อนโคได้

ต่อมามีการพัฒนาใช้เทคนิค Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) ซึ่งมีพื้นฐานคล้ายกับ PCR โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถตรวจวัดและทราบปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย สามารถติดตามผลในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในแต่ละรอบ หลักการทั่วไปที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณมีอยู่ 2 วิธีคือการใช้สีย้อมเรืองแสง (Fluorescent dye) ที่จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างดีเอ็นเอเส้นคู่ และการใช้ดีเอ็นเอโพรบซึ่งพัฒนาให้มีการเรืองแสง (Fluorescent probe) เมื่อจับกับดีเอ็นเอคู่สม อุปกรณ์ Real-time ที่มีจำหน่ายในปัจจุบันโดยพื้นฐานจะใช้ตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสง การเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นเป็นผลโดยตรงจากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นระหว่างการทำ PCR

การทำ Real-time PCR โดยใช้ Fluorescent dye (Dorak, 2006.)

เมื่อสีย้อมจับกับดีเอ็นเอสายคู่จะทำให้มีการเรืองแสง (Fluorescence) เนื่องจากสีย้อม (Dye) ขึ้น การเพิ่มของดีเอ็นเอเป้าหมายระหว่างทำ PCR ส่งผลให้มีการเพิ่มความเข้มของสีและสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอในแต่ละรอบ ยกตัวอย่างเช่นการใช้ SYBR Green I Dye ซึ่งเป็นสาร Fluorochrome ประเภทหนึ่งสามารถเข้าจับกับ Minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่เมื่อถูกกระตุ้น (Excite) ด้วยแสง UV จะมีการคายพลังงาน (Emission) ออกมาในรูปของแสง Fluorescence ช่วงคลื่น (λ) ยาวขึ้น สามารถตรวจจับได้ด้วย Optical filter ที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง Real-time thermocycler ทั้งนี้เราสามารถแยก Fluorescence signal ที่เกิดจาก Primer-dimer ออกจาก Specific amplified DNA ได้อย่างง่ายดายด้วยการเปรียบเทียบค่า Tm, ค่า Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย แปรผันโดยตรงกับ % GC content สามารถคำนวณได้จาก Fluorescence signal ที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง, Unspecific products จะมีค่า Tm ต่ำเนื่องจากมีขนาดสั้น (15-30 bp) ต่างจาก Amplified DNA ซึ่งจะมีขนาดยาวกว่า (> 100 bp) และมีค่า Tm ที่สูงกว่า SYBR Green I เป็นที่นิยมมากเนื่องมาจาก มีราคาถูก ง่ายต่อการวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียว และสามารถใช้วิธีการตรวจวัดแบบเดียวกันได้ทุกการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2-4 การทำ Real-time PCR โดยใช้ Fluorescent dye

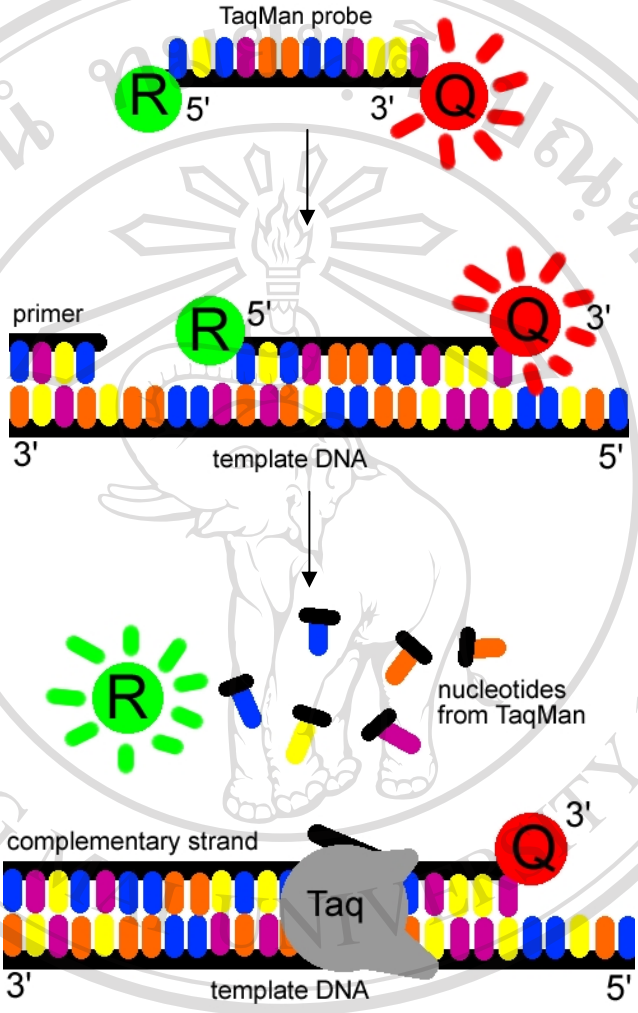
(ที่มา http://www.virusrama.org/real_time_pcr/real_time_PCR.htm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำ Real-time PCR โดยใช้ Fluorescent probe (Dorak, 2006.)

การใช้ Fluorescent probe เป็นวิธีที่มีความถูกต้องที่สุดและน่าเชื่อถือที่สุด แต่มีราคาแพง เป็นการใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโพรบที่จำเพาะเจาะจงเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้มีความจำเพาะเจาะจงเพิ่มขึ้นและมีการหาปริมาณ ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้หลายยีนในปฏิกิริยาเดียวกันโดยใช้โพรบที่จำเพาะเจาะจงซึ่งติดฉลากสีแตกต่างกัน ทำให้ทุกยีนสามารถเพิ่มจำนวนในประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน โพรบจะมี Reporter (R) อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งอีกด้านหนึ่งจะมี Quencher (Q) เมื่อมีการแยกโพรบด้วย 5’➔ 3’ exonuclease จาก Taq polymerase จะทำให้มีการปล่อยแสง

fluorescence ออกมาทำให้สามารถตรวจวัดได้ดังแสดงในภาพ 2-5 การเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอเป้าหมายในแต่ละรอบของ PCR จะทำให้มีการเรืองแสงเพิ่มขึ้น เช่น Taqman probe



ภาพ 2-5 การทำ Real-time PCR โดยใช้ Fluorescent probe

(ที่มา http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดปริมาณการแสดงออกของยีนเมื่อทำ Real-time PCR

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอขณะเกิดปฏิกิริยาช่วง Exponential phase สามารถตรวจวัดได้ด้วยการสร้างกราฟของการเรืองแสงเทียบกับจำนวนรอบ PCR บน Logarithmic scale ทำการวัด Threshold ของการเรืองแสงที่อยู่เหนือ Background การเรืองแสงของตัวอย่างในรอบที่มากกว่า Threshold เรียกว่า Cycle threshold (Ct) ปริมาณอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอสามารถหาได้โดยเทียบผลกับ Standard curve ซึ่งเกิดจากการทำ Serial dilution ซึ่งทราบจำนวนของอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ

เพื่อความถูกต้องในการวัดการแสดงออกของยีน ควรวัดปริมาณของอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอด้วย Housekeeping gene ร่วมกับยีนที่สนใจในตัวอย่างเดียวกัน ข้อดีของ Real-time PCR คือสามารถติดตามผลได้ในขณะที่เกิดขึ้นจริง, ไม่ต้องมีขั้นตอนหลัง PCR ได้ผลลัพธ์มากขึ้น ลดโอกาสการปนเปื้อน, การทำงานแต่ละรอบมักจะเร็วกว่าแบบธรรมดา, วัดได้มากขึ้นจนถึง 10^{10} เท่า (Wider dynamic range), สามารถตรวจวัดความแตกต่างได้ถึงขั้นที่ต่างกันเพียง 1 เท่า, สามารถตรวจยืนยัน product ที่ได้โดยการวิเคราะห์ Melting point, มีความจำเพาะสูงที่สุด ไวที่สุด และเพิ่มจำนวนได้สูงที่สุด, สำหรับงานทาง RNA จะใช้ปริมาณตั้งต้นของ RNA น้อยกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 1,000 เท่า และค่าใช้จ่ายไม่ได้แพงกว่าการทำ PCR วิธีเดิม (ยกเว้นค่าเครื่องมือ)

เนื่องจากความรวดเร็วและสะดวกต่อการทำงานพร้อมทั้งข้อดีดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้มีการนำเทคนิค Real-time PCR มาประยุกต์ใช้เพิ่มขึ้นในการทำการวิจัยต่างๆ เช่น Parati *et al.* (2006) ซึ่งทำการตรวจวัดสัดส่วนของสเปิร์มในน้ำเชื้อโคด้วยวิธี Real-time PCR ทำการตรวจสัดส่วนของสเปิร์มโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโครโมโซมเอ็กซ์และโครโมโซมวาย คือ ไพรเมอร์ PLP และ SRY ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการตรวจวัดในตัวอย่างน้ำเชื้อพบว่ามีความถูกต้องในการตรวจถึง 98.9 % โดยการเทียบกับค่า Mean ของความถี่โครโมโซมเอ็กซ์ที่ได้จากตัวอย่างขนของโค

2.2 น้ำเชื้อโค (Semen)

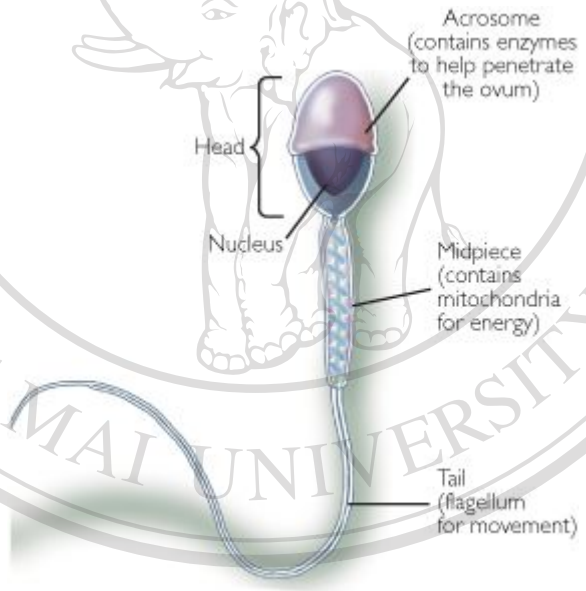
น้ำเชื้อโคเป็นของเหลวซึ่งมีสเปิร์ม (Spermatozoa) และของเหลวซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารของสเปิร์ม (Seminal plasma) เป็นองค์ประกอบ น้ำเชื้อหลั่งมาจากต่อมเพศ (Gonads) คุณภาพของน้ำเชื้อสามารถตรวจได้จากความสามารถในการสืบพันธุ์ของน้ำเชื้อ ซึ่งส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์คือสเปิร์ม ดังนั้นคุณภาพของน้ำเชื้อจึงเกี่ยวข้องกับปริมาณและคุณภาพของสเปิร์ม การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในสัตว์ (Spermatogenesis) คือการสร้างสเปิร์มในสัตว์เพศผู้ โดยเริ่มสร้างจากเซลล์เริ่มต้นที่เรียกว่า Primary spermatocyte (2n) ที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญในอัณฑะ เซลล์นี้เพิ่มจำนวนตัวเองโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) เมื่อเซลล์นี้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Miosis) จะได้เซลล์ที่เป็น Haploid (1n) เรียกว่า Secondary spermatocyte เมื่อเซลล์นี้แบ่งเซลล์ต่อจนเสร็จสิ้นไมโอซิส จะได้สเปิร์มเริ่มต้น (Developing sperm cell) ซึ่งจะพัฒนาต่อไปจนได้สเปิร์มที่สมบูรณ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์สเปิร์มประกอบไปด้วยส่วนหัว (Head) ส่วนตัว (Midpiece) และส่วนหาง (Tail) ส่วนหัวประกอบด้วยนิวเคลียสที่มีเส้นใยโครมาติน (Chromatin) ขดตัวแน่น ล้อมรอบส่วนหัวด้วย Acrosome ซึ่งมีเอนไซม์สำหรับการเจาะเข้าเซลล์ไข่ของเพศเมีย ส่วนตัวมี Filamentous เป็นแกนกลางซึ่งมีเส้นใย Mitochondria ล้อมรอบ สำหรับให้ Adenosine-5′-triphosphate (ATP) เพื่อ

เป็นพลังงานให้แก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่ในปากมดลูก มดลูก และท่อนำไข่ ส่วนหางใช้สำหรับการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

มีการศึกษาบางส่วนที่พยายามพิสูจน์ว่าเอชวายแอนอยู่บนผนังสเปิร์ม เช่นการศึกษาของ Koo *et al.* (1973) ที่ทำการศึกษาสเปิร์มของหนูตัวเล็ก โดยเตรียมแอนติซีรัมต่อเอชวายแอนติเจนจากการกระตุ้นหนูตัวเล็กสายพันธุ์ C57BL/6 เพศเมียด้วยผิวของหนูเพศผู้ แล้วนำสเปิร์มมาเติมแอนติซีรัม หลังจากนั้นเติม Rabbit hybrid antibody anti-mouse IgG และ Anti tobacco mosaic virus เพื่อเป็นตัว Marker บอกตำแหน่งของแอนติเจน แล้วนำไปตรวจด้วยกล้อง Immunoelectronmicroscopy พบว่าเอชวายแอนติเจนส่วนใหญ่อยู่บริเวณ Acrosome ส่วนบริเวณอื่นของหัวจะมีเอชวายแอนติเจนเล็กน้อย



ภาพ 2-6 องค์ประกอบของสเปิร์มโค
(ที่มา http://www. answers.com/topic/sperm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved