ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิ โคที่ผ่านการแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความแน่นชั้นของเพอร์คอลล์

FERTILITY EFFICIENCY OF BOVINE SPERMATOZOA AFTER SEXING BY PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

กรกนก ศรพงษ์ทร
KORAKANOK SRAPHONGSRI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ศูนย์เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-101-016

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิ โคที่ผ่านการแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

FERTILITY EFFICIENCY OF BOVINE SPERMATOZOA AFTER SEXING BY PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

T105150

กรกนก พรหมเทพ

KORNKANOK PROMTHEP

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105150
วัน.เดือน.ปี.....16 พ.ย. 2552

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ.2552

KMITL-2009-AG-M-101-016

FERTILITY EFFICIENCY OF BOVINE SPERMATOZOA AFTER SEXING BY PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

KORNKANOK PROMTHEP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2009-AG-M-101-016

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เ[illegible]นั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณี[illegible]ที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิโคที่ผ่านการแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

Fertility Efficiency of Bovine Spermatozoa after Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation

นักศึกษา นางสาวกรกนก พรหมเทพ

รหัสประจำตัว 49068905

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ดร.กนกรัตน์	ศิริกิจเกษมวัฒน์	
รศ.ดร.รณชัย	สิทธิไกรพงษ์	
ดร.กัญญา	จิระเจริญรัตน์	
ผศ.ดร.สมพร	ดวนใหญ่	
รศ.วิชัย	ศุภลักษณ์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 7 พฤษภาคม 2552 เวลา 13.00-16.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร 1 (ชั้น 1 อาคารบุนนาค L)

คณบดีรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 11 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิ โคหลังการแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์
นักศึกษา	นางสาวกรกนก พรหมเทพ
รหัสนักศึกษา	49068905
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ. ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิโค หลังการแยกเพศ โดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน จำนวน 2 ตัว นำมาปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ระดับความเข้มข้น 40, 50, 60, 65, 70, 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อและวิเคราะห์ สัดส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการย้อมด้วยสีเรืองแสง Quinacrine ผลการทดลองพบว่า น้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ น้ำเชื้อมีความเข้มข้น 852 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 92.50 เปอร์เซ็นต์ จำนวนอสุจิที่มีชีวิต 92.71 เปอร์เซ็นต์ รูปร่างของตัวอสุจิที่มีลักษณะปกติ 46.07เปอร์เซ็นต์ และปริมาณของอสุจิ X 50.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ภายหลังการปั่นเหวี่ยงอสุจิที่อยู่ในชั้นระดับความเข้มข้น 65-70 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายเพอร์คอลล์จะให้ลักษณะคุณภาพทั่วไปและจำนวนอสุจิ X ที่แยกได้มีปริมาณที่สูงกว่าอสุจิที่ได้จากชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ในระดับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 414 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร ลักษณะการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 95.86 เปอร์เซ็นต์ จำนวนอสุจิที่มีชีวิต 93.57 เปอร์เซ็นต์ รูปร่างของตัวอสุจิที่มีลักษณะปกติ 39.07 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณอสุจิ X 60.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อสุจิที่แยกได้นำไปแช่แข็งส่วนหนึ่งนำไปผสมเทียมกับแม่โคนมจำนวน 150 ตัวผสมติด 60 ตัวและปัจจุบันคลอดแล้ว 42 ตัว โดยเป็นเพศเมีย 30 (71.43 เปอร์เซ็นต์) ตัวเพศผู้ 12 (28.57 เปอร์เซ็นต์) ตัวอสุจิที่แช่แข็งอีกส่วนหนึ่งนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกายกับไข่ที่ได้จัดเก็บมาจาก 2 แหล่ง ไข่ที่ได้จากแม่โคนมจากโรงฆ่าสัตว์สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ 7.76 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไข่ที่ได้จากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ของแม่โคนมสามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ 35.42 เปอร์เซ็นต์ ผลการตั้งท้องหลังทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสพบว่าไข่ที่ได้จากการเก็บโดยอุลตราซาวด์จะมีการตั้งท้องได้สูงกว่า ($P<0.05$) บลาสโตซีสที่ได้จากไข่โคนมโรงฆ่าสัตว์ (47.05 เปอร์เซ็นต์ และ 22.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Fertility Efficiency of Bovine Spermatozoa after Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation
Student	Ms.Kornkanok Promthep
Student ID.	49068905
Degree	Master of Science
Programme	Agricultural Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assoc.Prof. Dr. Ronachai Sitthigripong
Thesis Co-Advisor	Dr. Kanya Jirajaroenrat

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the fertility efficiency of bovine spermatozoa after sexing by Percoll density gradient centrifugation. The fresh semen samples were collected from 2 Holstein-Friesian bulls. Semen quality were evaluated before and after sperm processing. Semen sample was overlayered discontinuous gradients of 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75% and 80% Percoll® solutions. After centrifugation, X-bearing spermatozoa were floated between 65% and 70% layers. After semen analysis, pre-sexing semen showed $852x10^6$ sperm cells/ml of concentration and 92.50% motility 92.71% live sperm rate, 46.07% normal spermatozoa and 50.25% X- bearing spermatozoa whereas post-sexing semen between 65 %and 70% layers showed higher ($P<0.01$) in quality and amount of X- bearing spermatozoa than those in other layers. The semen between 65% and 70% layers had 414 $x10^6$ sperm cells/ml, 95.86%, 93.57%, 39.07% and 60.75% in concentration, motility, live sperm rate, normal X- bearing spermatozoa, respectively. The separated frozen sperms were divided into 2 portions; the first portion was used for artificial insemination (AI) with 150 dairy cows and the second portion was used for *in vitro* fertilization (IVF). The results showed that, for AI portion, 60 cows were pregnant and persent 42 offsprings were gave birth with 30 of female and 12 male (71.43%:28.57%). For IVF portion, Oocyte collected from slaughter-house could develop to blastocyst 7.76% where as, oocyte from superovulation cows could develop to blastocyst 35.42%. After embryo transfering, blastocyst form superovulation cows was higher pregnancy rate ($P<0.05$) than those from slaughter-house cows (47.05% and 22.20%, respectively).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทั้งสองท่าน และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สมพร ดวนใหญ่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี รศ. วิชัย ศุภลักษณ์ และ ดร.กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณอาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวง ศึกษาธิการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรและสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆเรื่องทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กรกนก พรหมเทพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2, วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....2

1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ข้อมูลทั่วไปของน้ำเชื้อ.....4

2.2 การกำหนดเพศในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....5

2.3 การคัดเลือกเพศลูกสัตว์.....6

2.4 ความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และ อสุจิ Y.....7

2.5 วิธีการแยกอสุจิ X และ อสุจิ Y.....10

2.6 วิธีการตรวจสอบอสุจิ X และอสุจิ Y งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....14

2.7 คุณสมบัติของเพอร์คอลล์.....16

2.8 การแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์.....17

2.9 การเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์.....19

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....22

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....22

3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเชื้อ.....22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การวิเคราะห์อสุจิ Y ด้วยการย้อมสี Quinacrine.....23
3.4 การแยกเพศอสุจิโดยวิธีการปั่นหวี่ยงผ่านชั้นความต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 24
3.5 การแช่แข็งอสุจิ 25
3.6 การผสมเทียม.....25
3.7 การปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization) 25
3.8 การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer).....27
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ.....29

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....28
4.1.คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนม.....28
4.2 การวิเคราะห์อสุจิ X และอสุจิ Y ด้วยวิธีการ Quinacrine staining.....33
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่ผ่านการแยกตัวอสุจิ X และ อสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์.....34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ.....40
บรรณานุกรม.....42
ภาคผนวก.....53
ภาคผนวก ก ขั้นตอนการปฏิบัติงาน.....53
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....59
ประวัติผู้เขียน.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ปริมาตรของเพอร์คอลล์และปริมาตรของสารละลายทริส บัฟเพอร์ ที่ใช้ในการเจือจางเพอร์คอลล์ ที่มีจำนวนระดับความเข้มข้น 7 ระดับ..... 24
4.1 คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงแต่ละระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 34
4.2 แสดงคุณภาพของน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมก่อนและหลังการอุ่นเพื่อใช้ในการผสมเทียม 35
4.3 อัตราการผสมติดอุ้มท้องและเพศของลูกโคนมที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์.....36
4.4 การปฏิสนธิภายนอกร่ายกายสัตว์ระหว่างไข่อ่อนที่ได้จากโรงฆ่ากับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสม.....37
4.5 การปฏิสนธิภายนอกร่ายกายสัตว์ระหว่างไข่จากการเก็บด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงกับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสม.....38
4.6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการปฏิสนธิไข่จากโรงฆ่ากับไข่จากการเก็บด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อุลตราซาวด์ ชนิดเรียลไทม์ บี โมด) 39
4.7 การย้ายฝากตัวอ่อนที่มีการตั้งท้องจากตัวอ่อนทั้ง 2 แหล่ง.....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 อนุภาคเพอร์คอลล์ (A) เมื่อละลายอยู่ในน้ำที่มีขนาด 35 นาโนเมตร (B) เมื่อละลายในสารที่แตกตัวได้ไอออนสูง (higher ionic strength) จะมีขนาด 30 นาโนเมตร..... 16

4.1 สัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y ที่วิเคราะห์โดยวิธีการย้อมสี Quinacrine 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานคำย่อ

ตัวย่อ	
$CaCl_2.2H_2O$	calcium chloride
DNA	(Deoxyribonucleic acid) กรดนิวคลีอิกชนิดหนึ่ง มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็นเกลียวคู่คล้ายบันไดเวียน เป็นสารพันธุกรรมมีอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต
E_2	Estradiol
FSH	Follicle-stimulating hormone
FCS	Fetal Calf Serum FCS
HCG	Human chorionic gonadotropin
KH_2PO_4	Potassium dihydrogen phosphate
KCl	Potassium chloride
L	ลิตร
$MgCl_2.6H_2O$	Magnesium Chloride Hexahydrate
m DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ml	(milliliter) มิลลิลิตร
NaCl	Sodium chloride
Na_2HPO_4	Sodium Phosphate
$NaHCO_3$	Sodium bicarbonate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVP	polyvinylpyrrolidone
rpm	(revolutions per minute) รอบต่อนาที
ul	(mucrolitre) ไมโครลิตร
°C	(degree Celsius) องศาเซลเซียส
%	(percent) เปอร์เซ็นต์
$\times 10^6$/ml	ล้านต่อหนึ่งมิลลิลิตร
มล.	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เพศของสัตว์มีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากต่อการให้ผลผลิต ดังนั้นการกำหนดเพศของลูกสัตว์ได้จึงเป็นที่ต้องการของเกษตรกร โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมนั้นต้องการลูกโคเพศเมียมากกว่าเพศผู้เนื่องจากความต้องการด้านการผลิตน้ำนม ซึ่งการกำหนดเพศของลูกสัตว์สามารถกำหนดได้ 2 ระยะ คือ การกำหนดเพศก่อนการปฏิสนธิ และการกำหนดเพศหลังการปฏิสนธิ แต่การกำหนดเพศหลังการปฏิสนธิมีขั้นตอนการปฏิบัติยากกว่าเพราะมีหลายขั้นตอนและเป็นอันตรายต่อตัวอ่อน นอกจากนี้การย้ายฝากตัวอ่อนยังเสี่ยงต่อการติดเชื้อและมีค่าใช้จ่ายสูง ส่วนการกำหนดเพศก่อนการปฏิสนธิเป็นการคัดเลือกเซลล์อสุจิ โดยอาศัยความแตกต่างของอสุจิ X และอสุจิ Y (เอื้อมศักดิ์ เงินประดับและคณะ. 2548) เนื่องจากอสุจิเพศเมียมีน้ำหนักมากกว่าอสุจิเพศผู้ โดยดีเอ็นเอที่เป็นองค์ประกอบในส่วนหัวของอสุจิเพศเมียและอสุจิเพศผู้มีความแตกต่างกัน 2-4 เปอร์เซ็นต์ ในโคพบว่ามีความแตกต่างกัน 3.82-4.18 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างในด้านขนาดและน้ำหนัก รูปร่างของอสุจิ และความแตกต่างของความเร็วในการแยกส่วนการตกตะกอน (Moruzzi. 1979) ซึ่งการแยกอสุจิที่มีโครโมโซม X และ Y ออกจากกันก่อนที่จะนำไปผสมเทียมให้กับสัตว์เพศเมีย ถือได้ว่าเป็นวิธีการที่จะช่วยในการกำหนดเพศสัตว์ที่แท้จริงทั้งนี้เพราะหากสามารถแยกอสุจิที่มี X และ Y โครโมโซม ออกจากกันได้ เมื่อนำไปผสมให้กับแม่พันธุ์ก็จะได้ลูกสัตว์เพศเมียตามต้องการ (สมพร ดวนใหญ่. 2548) ที่ผ่านมาได้มีความพยายามแยกอสุจิมาแล้วหลายวิธี เช่น การใช้ Albumin gradients, Shepadex columns, Discontinuous percoll gradients และ Swim–up procedure เป็นต้น โดยอาศัยหลักการที่ว่าอสุจิ X หนักกว่าอสุจิ Y โดยแรงจากการปั่นเหวี่ยงจะทำให้อสุจิ X ซึ่งหนักกว่าจะตกลงสู่ก้นหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y ซึ่งเบากว่า ยิ่งเมื่อตกผ่านไปในสารละลายต่างระดับความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นทีละน้อย ประสิทธิภาพการแยกจะยิ่งเพิ่มขึ้น สารตัวกลาง (gradient material) ที่ใช้เพื่อการปั่นเหวี่ยงแยกอสุจิมีหลายชนิด เช่น เพอร์คอลล์ (Percoll) ซูโครส (Sucrose) ฟิคอลล์ (Ficoll) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ยังไม่มีการนำมาใช้ในทางการผลิตสัตว์ วิธีการแยกอสุจิในทางการผลิตสัตว์ ที่ได้ผลแม่นยำและมีการทำเป็นเชิงการค้าในขณะนี้ก็คือ การใช้ Flow cytometer แต่วิธีการดังกล่าวก็ยังมีข้อเสียในแง่ จำนวนอสุจิที่คัดแยกได้จะมีจำนวนต่ำมาก อนันต์ ศรีขาว (2535) รายงานว่าการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ (Discontinuous percoll gradients) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการนำมาใช้เพื่อแยกอสุจิ โดยสารเพอร์คอลล์

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... การค้า

(Percoll) เป็นอนุภาคซิลิกาที่อยู่ในลักษณะคอลลอยด์ (colloidal silica particle) ซึ่งถูกเคลือบด้วยสารโพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrollidone) (Iwaski *et al.* 1988) เพอร์คอลล์เป็นสารที่ใช้เป็นตัวกลางในการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และส่วนย่อยของเซลล์ (Avery and Grave. 1995) สารละลายเพอร์คอลล์เหมาะที่จะใช้ในการปั่นเหวี่ยงแยกอสุจิ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถเพิ่มความหนาแน่น โดยไม่มีการเพิ่มแรงดันออสโมซิส (osmolarity) ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์อสุจิ (Morhi *et al.* 1987) นอกจากนี้สารเพอร์คอลล์ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบในท่อสืบพันธุ์เพศเมียของหนู ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโพลีไวนิลไพโรลิโดนที่หุ้มอนุภาคซิลิกาเป็นสารป้องกันการอักเสบ (Pickering *et al.* 1989) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิโคหลังการแยกเพศ โดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาไปสู่การแยกเพศอสุจิเพื่อการทำผสมเทียมในกิจการการเลี้ยงโคนมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อโคนมและสัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y ก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการปฏิสนธินอกร่างกายของอสุจิโคหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านการสืบพันธุ์ทางสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ฟาร์มโคนมปักธงชัย อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา

1.3.3 ห้องปฏิบัติการการผลิตตัวอ่อนโค ฟาร์มโคนม อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคนม 2 ตัวจากฟาร์มโคนมปักธงชัย อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา ทำการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อ จากนั้นนำน้ำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ระดับความเข้มข้น 80, 75, 70, 65, 60, 50 และ40 เปอร์เซ็นต์ และนำอสุจิในชั้นต่างๆมาตรวจสอบคุณภาพอีกครั้ง นำน้ำเชื้อที่ได้จากชั้นที่มีอสุจิ X จำนวนมากที่สุดไปผ่านกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อทำการวิจัยต่อไป โดยแบ่งน้ำเชื้อส่วนหนึ่งไปผสมเทียมให้แก่แม่โคนมและทำการบันทึกการตั้งท้องและจำนวนลูกโคที่คลอดมาเป็นเพศเมีย นำน้ำเชื้ออีกส่วนหนึ่งไปทำการปฏิสนธิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกร่างกายโดยใช้ไข่ที่เก็บมาจากโรงฆ่าสัตว์และไข่ที่ได้รับการกระตุ้นและเก็บผ่านช่องคลอด และทำการตรวจสอบระยะการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังจากการปฏิสนธิ

1.5 ประโยชน์คาดว่าจะได้รับ

1.5.1. ทราบถึงระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมในการแยกตัวอสุจิ X และ อสุจิ Y ของน้ำเชื้อโคนมออกจากกัน

1.5.2. สามารถเพิ่มการผลิตลูกโคนมที่เป็นเพศเมียตามความต้องการของผู้ผลิต

1.5.3. ทราบถึงประสิทธิภาพการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของตัวอสุจิของโคนมหลังผ่านกระบวนปั่นเหวี่ยงการแยกตัวอสุจิ X และ อสุจิ Y ในสารละลายเพอร์คอลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อ (semen) มีลักษณะเป็นของเหลวข้นคล้ายวุ้น ซึ่งมีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gamete or spermatozoa) แขวนลอยอยู่ โดยน้ำเชื้อประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 2 ส่วน คือ ส่วนของตัวอสุจิ (spermatozoa) และส่วนน้ำกาม (seminal plasma) ตัวอสุจิในน้ำเชื้อสร้างมาจากท่อ seminiferous tubule ใน epididymis ส่วนน้ำกามสร้างมาจากต่อมร่วมสร้างน้ำกามต่างๆ (accessory gland) แล้วหลั่งออกมาพร้อมกับตัวอสุจิ เมื่อมีการผสมพันธุ์ของสัตว์ตามธรรมชาติ โดยทั่วไปแล้วอัตราส่วนองค์ประกอบระหว่างตัวอสุจิกับน้ำกามจะแปรผันตามชนิดของสัตว์ สมรรถภาพของสัตว์แต่ละตัว และจำนวนครั้งของการหลั่งน้ำเชื้อ (Nalbandov. 1976) โดยปกติโคจะหลั่งน้ำเชื้อครั้งละประมาณ 4 – 6 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น 1,000 – 1,200 ล้านตัว/มิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิมีชีวิตเคลื่อนที่ได้ 65 – 70 เปอร์เซ็นต์ มี pH ระหว่าง 6.5 – 7.0 และมีอสุจิที่มีลักษณะปกติประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ (Bearden and Fuquay. 2000)

เซลล์อสุจิ เป็นเซลล์ที่มีความพิเศษ แตกต่างจากเซลล์อื่นๆ ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมด เซลล์อสุจิประกอบด้วยออร์แกเนลล์ที่ซับซ้อน สามารถมีชีวิตอยู่ได้ แม้จะมีโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์ร่างกาย และมีปริมาณของไซโตพลาสซึมน้อยมาก (Andre. 1983) นอกจากนั้นอสุจิยังปราศจากคุณสมบัติของการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวต่อไปได้อีก (White. 1974) โดยเซลล์อสุจิถูกสร้างโดยกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) จากเซลล์สืบพันธุ์ดั้งเดิม (primordial sex cell) และเจริญเปลี่ยนแปลงเป็น spermatogonia จากนั้นเพิ่มจำนวนโดยการเซลล์แบ่งแบบ mitosis ที่บริเวณฐานของ seminiferous tubules

อรรณพ คุณาวงษ์กฤต. (2537) อธิบายว่ากระบวนการสร้างอสุจิสามารถแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1) ขั้นตอนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatocytogenesis) เป็นการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) เพื่อลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งเป็นผลให้ได้ spermatid

2) ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์สืบพันธุ์ (spermiogenesis) เป็นช่วงที่มีการปรับเปลี่ยนรูปร่างของ spermatid ไปเป็นตัวอสุจิที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

เซลล์อสุจิประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ คือ ส่วนหัว และส่วนหาง โดยทั้งสองส่วนจะถูกห่อหุ้มด้วย plasma membrane (Bedford and Hoskins. 1990) ซึ่งส่วนของหางจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน

คือ mid-piece, main-piece และ end-piece (White. 1974) โครงสร้างส่วนหัวและส่วนหางของอสุจิทำหน้าที่ต่างกัน โดยส่วนหางจะมีบทบาทเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ และเมตาบอลิซึม ในขณะที่ส่วนหัวมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิกับไข่ (Mann. 1969) ส่วนหัวของอสุจิประกอบด้วยส่วนของนิวเคลียสและอะโครโซม ซึ่งสารพันธุกรรมของเซลล์อสุจิจะมีเพียง n เดียว (haploid genome) ดังนั้นอสุจิเซลล์หนึ่งจึงมีโอกาสนำ X-chromosome หรือ Y- chromosome ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Garner and Hafes. 1980)

Gerner and Hafes (1993) กล่าวว่าน้ำกามมีความสำคัญต่ออสุจิอย่างมาก โดยมีหน้าที่หลักอยู่ 2 ประการ คือ

1) ทำหน้าที่แขวนลอย และกระตุ้นให้อสุจิเคลื่อนที่ เพื่อนำอสุจิจากระบบสืบพันธุ์เพศผู้ไปยังระบบสืบพันธุ์เพศเมีย

2) เป็นแหล่งของอาหารและพลังงานเพื่อหล่อเลี้ยงตัวอสุจิ

Bearden and Fuquay (1992) กล่าวว่าสารที่เป็นส่วนประกอบของน้ำกามมีบทบาทและหน้าที่ต่างกันไป โดยสารดังกล่าวได้แก่

1) inorganic ions ประกอบด้วย โซเดียมและคลอไรด์เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีแคลเซียม แมกนีเซียม และโปแทสเซียม สารเหล่านี้จะมีหน้าที่ในการรักษาแรงดันออสโมติกที่เหมาะสม เพื่อให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้

2) สารที่รักษาสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเชื้อเพื่อให้ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ สารเหล่านี้ได้แก่ inorganic ions และ organic ions ซึ่งตัวที่สำคัญได้แก่ ไบคาร์บอเนต

3) สารที่เป็นแหล่งพลังงานของตัวอสุจิ ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตส ซอบิทอล และ glyceryl phosphogleceryl choline (GPC)

4) สารอินทรีย์อื่นๆ เช่น inositol citric acid และ ergothionine เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบสารป้องกันอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ด้วย และยังมี immunoglobulin คือ IgA เชื่อกันว่าส่วนประกอบของน้ำกามสามารถเพิ่มระดับของฮอร์โมน androgens, estrogens, prostaglandins, FSH, LH และฮอร์โมนอื่นๆ ได้ และจากการทดลองของ Amann and Lutwak (1981) พบว่าอสุจิที่ได้จากส่วนของ cauda epididymis ที่ไม่มีน้ำกามผสมอยู่ก็สามารถผสมกับไข่ได้ เช่นกัน

2.2 การกำหนดเพศในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เพศเมียมีโครโมโซมเป็น XX (homogametic sex) ส่วนเพศผู้มีโครโมโซมเป็น XY (heterogametic sex) ซึ่งการกำหนดเพศของตัวอ่อนนั้น ขึ้นอยู่กับโครโมโซม

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพศที่เซลล์อสุจิ การกำหนดเพศจะเกิดขึ้นทันทีเมื่อมีการปฏิสนธิระหว่างอสุจิกับไข่ โดยอาศัยโครโมโซมที่ได้มาจากอสุจิและไข่เพื่อกำหนดเพศลูก (Graves and Short. 1990) เมื่อไข่ได้รับการปฏิสนธิกับอสุจิ X ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาไปเป็นตัวเมีย และหากได้รับการปฏิสนธิกับอสุจิ Y ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาเป็นตัวผู้ (Hunter. 1995)

เนื่องจากโครโมโซม Y จะมียีน Testis-determining factor (TDF) ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดลักษณะการเกิดอัณฑะ และเริ่มกระบวนการหลั่งฮอร์โมนซึ่งจะทำให้เกิดกระบวนการพัฒนาลักษณะเพศผู้ (Hunter, 1995) โดย TDF จะเปลี่ยน undifferentiate stroma ให้กลายเป็น sertori cell (somatic differentiation) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของ germ cell ให้กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell differentiation) จะอาศัยยีนที่อยู่บนโครโมโซม X และโครโมโซม Y เป็นตัวควบคุม (Graves and Short. 1990) (Sinclair *et al.* 1990) รายงานว่า TDF คือยีน SRY (sex determining region Y chromosome) ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม Y และอยู่ในส่วนของ pseudo-autosomal เท่านั้น โดยมีจำนวนคู่เบสประมาณ 35 กิโลเบส ซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นกำหนดเพศของตัวอ่อน (primary sex determination)

2.3 การคัดเลือกเพศลูกสัตว์

การคัดเลือกเพศลูกสัตว์ เป็นการกำหนดเพศลูกสัตว์ที่จะเกิด เพื่อให้ได้ลูกเพศผู้หรือเพศเมียตามที่ต้องการ เพื่อการผลิตที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงสุด การคัดเลือกเพศลูกสัตว์สามารถทำได้ 2 ระยะ คือ

2.3.1. การคัดเลือกเพศก่อนการปฏิสนธิ

ทำได้โดยคัดเลือกอสุจิตามต้องการ เพื่อให้ได้อสุจิ X หรืออสุจิ Y หลังจากนั้นนำอสุจิที่ได้ไปผสมเทียม ซึ่งถ้าใช้อสุจิเพศผู้ X ก็จะได้ลูกเพศเมีย และถ้าใช้อสุจิ Y ก็จะได้ลูกเพศผู้

2.3.2. การคัดเลือกเพศหลังการปฏิสนธิ

เป็นการคัดเลือกเพศตัวอ่อน (embryo) ก่อนที่จะมีการฝังตัวเข้ากับผนังมดลูก (implantation) ในโคมีการคัดเลือกตัวอ่อนที่มีอายุ 7 – 7.5 วันหลังการปฏิสนธิ โดยการล้างตัวอ่อนออกจากมดลูก (Shea. 1999) หรือตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* fertilization) ในระยะ morula อายุ 5 – 6 วันหลังการปฏิสนธิ หรือ blastocyst อายุ 7 – 8 วัน (Hochman *et al.* 1996) ทำการตัดเซลล์ตัวอ่อน (embryo biopsy) นำไปตรวจเพศตัวอ่อน ซึ่งอาศัยหลักการตรวจหาแอนติเจนเฉพาะเพศ เช่น H-Y antigen การตรวจวิเคราะห์ cytogenic analysis ในระยะเมตาเฟสของโครโมโซมตัวอ่อน หรือการตรวจหา Y-Specific sequence ที่จำเพาะต่อตัวผู้ (Bredbacka *et al.* 1995) ตัวอย่างวิธีการคัดเลือกตัวอ่อน เช่น polymerase chain reaction (PCR) (Shea. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) (Kobayashi *et al.* 1998) หลังจากรู้เพศตัวอ่อนแล้ว ก็ทำการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) ที่ต้องการกลับไปฝากให้ตัวรับ (Bearden and Fuquay. 2000)

2.4 ความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y

เซลล์อสุจิ X และอสุจิ Y มีความแตกต่างกันคือ อสุจิ X มี X chromosome DNA ในนิวเคลียส ส่วนอสุจิ Y มี Y-chromosome DNA ในนิวเคลียสน้อยมาก นอกจากนั้นเป็นข้อแตกต่างในระดับที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (อนันต์ ศรีขาว. 2535) ข้อแตกต่างอื่นๆ มีดังนี้

2.4.1. ความแตกต่างของรูปร่าง

รูปร่างของอสุจิโดยทั่วไปจะแบนคล้ายใบพาย อสุจิ X ของคน เมื่อมองจากด้านบนเส้นรอบข้างจะมีลักษณะเหมือนลิ่ม ส่วนอสุจิ Y มีลักษณะเป็นท่อนกลมยอดแหลม ถ้ามองด้านหน้า อสุจิทั้งสองจะเป็นรูปไข่เหมือนกัน แต่อสุจิ X มีขนาดใหญ่กว่าและหางสั้นกว่าอสุจิ Y Shettles. 1990; Watkins *et al.* (1996) สัดส่วนความยาว หารด้วยความกว้างส่วนหัวของอสุจิ X และอสุจิ Y มีค่าประมาณ 1.6 และ 1.7 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Morhi *et al.* 1987) อสุจิ X มีพื้นที่ผิวมากกว่าอสุจิ Y ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาอสุจิของคน โดย Cui and Matthews. (1993) ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) พบว่าอสุจิ X มีขนาดใหญ่กว่าอสุจิ Y ในด้านความยาว เส้นรอบวงและพื้นที่ส่วนหัว ความยาวส่วนคอ (Chi. 1997) แต่ส่วนหางของอสุจิ X สั้นกว่าอสุจิ Y 1.6 เปอร์เซ็นต์ (Watkins *et al.* 1996)

2.4.2. ความแตกต่างของน้ำหนักและความถ่วงจำเพาะ

อสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y โดย DNA ที่เป็นองค์ประกอบบนส่วนหัวของอสุจิ X และอสุจิ Y มีความแตกต่างกัน 2 – 4 เปอร์เซ็นต์ (Moruzzi. 1979) ในโคแตกต่างกัน 3.8 เปอร์เซ็นต์ (Van Munster *et al.* 1999; Johnson and Welch. 1999; Johnson. 2000) ในคนแตกต่างกัน 2.8 – 3 เปอร์เซ็นต์ (Sumner *et al.* 1971; Johnson and Welch. 1999) สอดคล้องกับรายงานของ Morhi *et al.* (1987) ที่รายงานว่าอสุจิ X ของคนและโคมีขนาดใหญ่กว่าอสุจิ Y ประมาณ 3 – 4 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณ DNA โครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y ทำให้อสุจิ X มีความแตกต่างกับอสุจิ Y ในด้านขนาดและน้ำหนัก รูปร่างของอสุจิ และความแตกต่างของความเร็วของการแยกส่วนในการตกตะกอน แต่ความแตกต่างของน้ำหนักโครโมโซม X และ โครโมโซม Y นั้นมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับน้ำหนักทั้งหมดของอสุจิ

เอกสารนี้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

จากน้ำหนักที่แตกต่างกัน ทำให้ความถ่วงจำเพาะของอสุจิทั้งสองแตกต่างกันด้วย โดยความถ่วงจำเพาะอสุจิของสัตว์เลี้ยงทั่วไปจะอยู่ในช่วง 1.0376 – 1.1000 g/cm^3 (Bahr. 1971) และพบว่าใน

โคมีความถ่วงจำเพาะของอสุจิ X และอสุจิ Y แตกต่างกันประมาณ 0.007 g/cm^3 คงจะเนื่องจากจำนวนอสุจิที่แตกต่างกันในน้ำเชื้อที่หลั่งออกมานั่นเอง (Gledhill. 1985)

2.4.3. ความแตกต่างในการเคลื่อนที่

ความแตกต่างในการเคลื่อนที่ของอสุจิ X และอสุจิ Y พบว่าอสุจิ Y เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอสุจิ X (Keiser *et al.* 1974) เพราะว่าอสุจิ Y มีปริมาณ DNA น้อยกว่าอสุจิ X (Dineen *et al.* 1997) ซึ่งสอดคล้องกับ Schilling (1971) ที่รายงานว่าอสุจิ X เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าอสุจิ Y ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากขนาดของส่วนหัวที่แตกต่างกัน และมีส่วนที่ใช้ในการเคลื่อนที่เท่ากัน หรืออาจเป็นเพราะอสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y (Ericsson *et al.* 1973) โดยพบว่าอสุจิ X ของโคเคลื่อนที่ช้ากว่าอสุจิ Y 20 เปอร์เซ็นต์ และในแกะ 30 เปอร์เซ็นต์ (Schilling. 1971)Sarker *et al.* (1984) รายงานถึง ส่วนลักษณะการว่ายในน้ำนิ่งของอสุจิ X และอสุจิ Y จะมีลักษณะการว่ายเป็นคลื่นเหมือนกัน และมีทิศทางตรงไปข้างหน้า แต่เมื่อว่ายในน้ำไหล อสุจิ Y จะว่ายในแบบที่ตรงกว่า อย่างไรก็ตาม Han. *et al* (1993) รายงานว่าไม่พบความแตกต่างของการว่าย (Swim-up) ระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y

2.4.4. ความแตกต่างของประจุที่ผนังเซลล์

ผนังเซลล์อสุจิ X เป็นประจุลบมากกว่าอสุจิ Y ทั้งนี้เนื่องจากเยื่อหุ้มอสุจิ X มีส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนพวก sialic acid และ sulfate มากกว่าอสุจิ Y จึงทำให้อสุจิ X วิ่งเข้าหาขั้วบวก (anode) ส่วนอสุจิ Y วิ่งเข้าหาขั้วลบ (cathode) การทดลองที่สนับสนุนการมีประจุที่แตกต่างกันของอสุจิ X และอสุจิ Y คือเมื่อย่อยสลาย sialic acid ด้วย sialidase จะทำให้อสุจิ X วิ่งช้าลง และใช้เวลานานกว่าที่จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเทียบกับอสุจิ Y (อนันต์ ศรีขาว. 2535) การที่อสุจิทั้งสองมีประจุต่างกันนี้เอง จึงทำให้อสุจิ X มีประจุลบมากกว่าอสุจิ Y (Ishijima *et al.* 1992)

เนื่องจากอสุจิทั้งสองมีประจุที่แตกต่างกันนี้เอง อสุจิ X และอสุจิ Y น่าจะมี isoelectric points (pI) ที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นเมื่อให้อสุจิไหลผ่านสารละลายที่มีความต่างระดับของความเป็นกรด – ด่าง (pH gradients) เมื่อถึง pI ของกลุ่มอสุจิใด อสุจิกลุ่มนั้นจะหยุดการเคลื่อนที่ จึงทำให้สามารถแยกอสุจิ ได้เป็นกลุ่มอสุจิ X และกลุ่มของอสุจิ Y (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

2.4.5. การปรากฏของจุดเรืองแสง (F-body)

ความแตกต่างทางกายวิภาคระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ที่ชัดเจนคือ เฉพาะอสุจิ Y เท่านั้นที่ปรากฏจุดเรืองแสงขนาด 0.25 ไมโครเมตร เรียกจุดเรืองแสงนี้ว่า Q หรือ Y หรือ F-body (Fluorescent body) เมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสง quinacrine ส่วนอสุจิ X จะไม่ปรากฏจุดกลมเรืองแสงนี้ สารเรืองแสง quinacrine ใช้ได้ดีเฉพาะอสุจิคน (Barlow and Vosa. 1970) อสุจิของกอลิล่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Pearson *et al.* 1971) และอสุจิแพะ (Chaterjee and Majumdar. 2000) อย่างไรก็ตามเชื่อว่าถ้ามีการดัดแปลงวิธีการย้อมให้เหมาะสมกับสัตว์แต่ละชนิดแล้ว สี quinacrine อาจจะมีศักยภาพย้อมติดจำเพาะโครโมโซม Y ในสัตว์อื่นๆ ด้วยก็ได้ (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

Beatty (1997)รายงานว่า อสุจิที่แสดง F-body ทั้งหมดมีบางส่วนไม่ใช่อสุจิ Y และอสุจิ Y บางส่วนก็ไม่แสดงลักษณะ F-body นอกจากนี้ Van Kooji and Van Oost (1992) รายงานว่า วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของอสุจิได้จากการทดลองย้อมสี quinacrine ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่า อสุจิจะแสดงลักษณะ F-body ในช่วงตั้งแต่ 5 – 40 เปอร์เซ็นต์แต่อย่างไรก็ตามการทดลองย้อมสี quinacrine ในโคจะต้องมีขั้นตอนการทดลองแตกต่างกับอสุจิของคนในวิธีการ (Ogawa *et al.*1988)

2.4.6. จำนวนของอสุจิ X และอสุจิ Y ที่ปรากฏในน้ำเชื้อที่หลั่ง

ความแตกต่างในเรื่องจำนวนอสุจิ X และอสุจิ Y มีจำนวนตั้งต้นตั้งแต่ 50 : 50 จากกระบวนการไมโอซิส (meiosis) ในกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) แต่เมื่อผ่านกระบวนการสร้างและเจริญวัยแล้วหลั่งออกจากอัณฑะ อัตราส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y จะเปลี่ยนไป (อนันต์ ศรีขาว. 2535) ในคน พบว่าอัตราส่วนของอสุจิ X ต่ออสุจิ Y (X:Y) เท่ากับ 1 : 0.83 หรือ 54.5 : 45.5 เปอร์เซ็นต์ (Bibin *et a.*,1988) ในโคเท่ากับ 1 : 1.14 หรือ 46.7 : 53.3 เปอร์เซ็นต์ (Ali *et al.* 1990) และในสุกรมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49 : 51 เปอร์เซ็นต์ (Kawarasaki *et al.* 1996) สำหรับอัตราส่วนเพศลูกที่เกิดนั้น ในโคจากการผสมเทียมในสภาพภายนอกตัวสัตว์ จะได้ลูกเพศเมีย 36.1 เปอร์เซ็นต์ และลูกโคเพศผู้ 63.9 เปอร์เซ็นต์ (Iwasaki *et al.* 1988) ในสุกรพบว่าจำนวนลูกเพศผู้ที่เกิดจากการผสมตามธรรมชาติจะอยู่ในช่วง 48.8 – 52.8 เปอร์เซ็นต์ (Nalbandov. 1976)

2.4.7. ความทนทานต่อกรดหรือด่าง

อสุจิ X จะทนทานต่อสภาพความเป็นกรดได้ดีกว่าอสุจิ Y ในขณะที่อสุจิ Y จะทนทานต่อสภาพความเป็นด่างได้ดีกว่าอสุจิ X ซึ่งคงจะเนื่องจากการถือประจุที่ต่างกันของอสุจิ X ที่ถือประจุลบมากกว่า และอสุจิ Y ที่ถือประจุบวกมากกว่า (สุวรรณ ช่างกลึงดี. 2534; Keneto *et al.* 1987)

Schilling (1971) รายงานความทนทานต่อสภาพความเป็นกรด – ด่างของอสุจิ ว่าสารละลายกรดซิตริก และกรดแลกติก จะยับยั้งการเคลื่อนไหวอสุจิ Y แต่ทั้งอสุจิ X และ อสุจิ Y จะไม่ทนทานต่อสารละลายกรดมาลิก กรดแอสคอบิก และกรดไฮโดรคลอริก อสุจิทั้งสองชนิดจะทนทานต่อสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต และกรดแลกติก ได้ดีเท่าๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.8. H – Y Antigen

บริเวณ ผิว (plasma membrane) ของอสุจิ Y พบว่ามีส่วนของ Y-linked histocompatibility (H-Y) Antigen กระจายอยู่ทั่วไป ในขณะที่อสุจิ X จะไม่พบหรือพบน้อยกว่าอสุจิ Y มาก (Bennett and Boyse. 1973) H-Y Antigen เป็นโปรตีนที่สร้างจากรหัสของ DNA ลำดับช่วงหนึ่งบน Y-chromosome ของอสุจิ Y ซึ่งจะเป็นการแสดงออกของ haploid expression (Ali *et al.* 1990)

ความแตกต่างของการมีหรือไม่มี H-Y antigen นี้พบว่าไม่สามารถนำมาใช้ในการคัดแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ออกจากกันได้ (Windsor *et al.* 1993)

2.5 วิธีการแยกอสุจิ X และอสุจิ Y

การแยกอสุจิ X และ อสุจิ Y สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งมีรายงานดังนี้

2.5.1. Density gradient centrifugation

อาศัยหลักการที่ว่าอสุจิ X หนักกว่าอสุจิ Y โดยแรงจากการปั่นเหวี่ยงจะทำให้อสุจิ X ซึ่งหนักกว่าตกลงสู่ก้นหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y ซึ่งเบากว่า ยิ่งเมื่อตกผ่านไปในสารละลายต่างระดับความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นทีละน้อย ประสิทธิภาพการแยกยิ่งเพิ่มขึ้น (อนันต์ ศรีขาว. 2535) สารตัวกลาง (Gradient material) ที่ใช้เพื่อปั่นแยกอสุจิมีหลายชนิด เช่น เพอร์คอลล์ (Percoll) ซูโครส (Sucrose) ฟิคอลล์ (Ficoll) เป็นต้น Rhode *et. al.* (1975) ได้ทดลองใช้สารละลายต่างระดับความเข้มข้นของซูโครส ในการปั่นแยกอสุจิของผู้ชาย พบว่าอสุจิ X จะตกตะกอนได้เร็วกว่าอสุจิ Y สัดส่วนของอสุจิ X ต่ออสุจิ Y ยิ่งเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายซูโครสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะอยู่ในส่วนล่างของหลอด แต่ในการใช้ Ficoll-sodium metrizoate ต่างระดับความเข้มข้น (density gradient) ในการปั่นแยกอสุจิของคนกลับพบว่า อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดจะเป็นอสุจิ Y มากกว่าอสุจิ X โดยเฉลี่ย

2.5.2. Albumin centrifugation

การใช้สารละลาย BSA (bovine serum albumin) ในการแยกอสุจิ X และสอุจิ Y ด้วยวิธี albumin gradient มีรายงานครั้งแรกโดย Ericsson *et al.*(1973) ซึ่งพบว่าอสุจิ Y จะเคลื่อนที่ลงสู่ชั้น albumin และพบอสุจิ X ลอยอยู่ชั้นบน อสุจิส่วนล่างของชั้น BSA จะแสดงลักษณะของ F-body 85 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิที่เคลื่อนไหวได้อัตราสูง สอดคล้องกับรายงานของ Dmowski *et al.*(1979) ที่รายงานว่า สามารถแยกอสุจิของคนโดยวิธีนี้ทำให้ได้ลูกชาย 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Beernink

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณี ...

and Ericsson (1982) ทำการผสมเทียมในผู้หญิงโดยใช้อสุจิที่ผ่านการแยกโดย BSA โดยใช้อสุจิจากส่วนล่างของหลอด พบว่าได้ลูกชาย 66 คน จากลูกทั้งหมด 84 คน คิดเป็น 79 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม Brandriff *et al* (1985) พบว่าอสุจิที่ผ่านการแยกโดยวิธีนี้ อสุจิ Y ลดลงจาก 49.8 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 42.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Ueda and Yanagimachi (1987) รายงานว่าอสุจิหลังการแยกมีเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 43.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 47.3 เปอร์เซ็นต์ และจากการตรวจสอบชนิดของอสุจิโดยการตรวจสอบชนิดของอสุจิโดยการตรวจสอบ DNA (DNA probe) พบว่า การแยกอสุจิโดยการปั่นเหวี่ยงผ่าน albumin ไม่สามารถแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ออกจากกันได้ (Wang *et al.* 1994) แต่สำหรับการแยกอสุจิโดยวิธี BSA gradient นี้ พบว่ายังไม่ได้ผลในการแยกอสุจิของโคและแกะ Beal *et al.* (1984) รายงานถึงการใช้อสุจิที่แยกโดยวิธี BSA gradient ในโคพบว่า ลูกโคที่เกิดเป็นลูกโคตัวผู้ 54 ตัวต่อตัวเมีย 65 ตัวจากลูกที่เกิดทั้งหมด 119 ตัว และจากการตรวจสอบปริมาณ DNA โดยวิธี Flow cytometry พบว่า สัดส่วนของอสุจิ X ต่ออสุจิ Y จะเท่ากับ 51 : 49 ในขณะที่ Evans *et al.* (1987) ทำการผสมเทียมในแกะด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกโดยวิธีนี้พบว่า เมื่อใช้อสุจิส่วนล่างผสม จะได้เพศผู้ 58 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแม่แกะ 196 ตัว และเมื่อใช้อสุจิส่วนบนผสมเทียมแม่แกะ 199 ตัว พบว่าได้ลูกเพศผู้ 55 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Human serum albumin (HSA) สามารถใช้ในการแยกอสุจิของคนให้ผลเช่นเดียวกับ BSA โดย Beernink *et al.* (1993) พบว่า เมื่อใช้อสุจิที่ผ่านการแยกโดย HAS gradient ทำการผสมเทียมในผู้หญิง พบว่าจะได้ลูกผู้ชายคิดเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ และได้ลูกผู้หญิง 28 เปอร์เซ็นต์ (749 : 285)

การแยกอสุจิโดยวิธี albumin gradient นี้ อาศัยความแตกต่างที่ว่าอสุจิ Y สามารถว่ายได้เร็วกว่าอสุจิ X ทำให้อสุจิ Y ตกตะกอนลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่านั่นเอง(Ericsson *et al.*1973; Beernink *et al.* 1993)

2.5.3. Lamina flow

การแยกอสุจิวิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่าอสุจิ X และอสุจิ Y ว่ายด้วยรูปแบบที่แตกต่างกันในของเหลวที่กำลังไหล โดยให้อสุจิว่ายในของเหลวที่มีอัตราการไหลเปลี่ยนไปทีละน้อยแบบพาราโบลา โดยที่รูปแบบการว่ายของอสุจิ X จะมีรูปแบบการว่ายที่ตรงกว่าอสุจิ Y เมื่ออยู่ในของเหลวที่กำลังไหล จึงสามารถแยกส่วน (fraction) กลุ่มที่ว่ายตรงออกมาได้ (อนันต์ ศรีขาว. 2535) มีรายงานว่าวิธีนี้สามารถแยกอสุจิ X ได้ถึง 75-80 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิ Y เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ (Sarkar *et al.* 1984)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4. Sephadex gel fitration

การแยกอสุจิวิธีนี้อาศัยขนาดของอสุจิ X และอสุจิ Y ที่แตกต่างกัน จึงสามารถใช้หลักการแยกโมเลกุลโปรตีนใหญ่ออกจากโมเลกุลเล็กตามวิธี gel filtration chromatography ซึ่งโมเลกุลเล็กสามารถผ่านรูเม็ดวุ้นเข้าไปจึงถูกจับไว้ในคอลัมน์ ส่วนโมเลกุลใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านรูเม็ดวุ้นได้ จึงแทรกตัวผ่านระหว่างตาข่ายของวุ้นลงไปก่อน (อนันต์ ศรีขาว. 2535) วิธีนี้สามารถแยกอสุจิ X ได้ 95 เปอร์เซ็นต์ หลังผ่านคอลัมน์ sephadex gel G-50 (Adimoelja. 1987)

2.5.5. Flow cytometry/ Cell sorter

การแยกอสุจิวิธีการนี้มีหลักการ คือปริมาณ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y จะทำให้แสงเลเซอร์หักเหด้วยมุมกระเจิงที่ต่างกัน วิธีทำให้เครื่อง Flow cytometry/Cell sorter ที่ดัดแปลงใช้คอมพิวเตอร์วัดมุมกระเจิงที่ต่างกันของแสงเลเซอร์ ขณะฉายผ่านเข้าไปในกระแสของตะกอนแขวนอสุจิ จะแยกอสุจิได้เป็น 2 กลุ่ม ทำให้ได้กลุ่มของอสุจิ X และอสุจิ Y (อนันต์ ศรีขาว. 2535) Johnson and Clarke (1988) พบว่าความแตกต่างของ DNA ที่เป็นองค์ประกอบของอสุจิ X และอสุจิ Y ในสัตว์เลี้ยงจะอยู่ในช่วง 3.5 – 4.5 เปอร์เซ็นต์ จากการแยกอสุจิ X ได้เฉลี่ย 92.7 $\pm$1.6 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิ Y เฉลี่ย 91.2 $\pm$ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ในสุกรจากการผ่าตัดเพื่อทำการผสมเทียม โดยอสุจิที่ผ่านการแยกโดยวิธีนี้ พบว่าเมื่อใช้กลุ่มของอสุจิ X ทำการผสมเทียม ลูกสุกรที่เกิดเป็นเพศเมีย 74 เปอร์เซ็นต์ และเป็นเพศผู้ 26 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ใช้กลุ่มอสุจิ Y ทำการผสมเทียม ลูกสุกรที่เกิดเป็นเพศผู้ 68 เปอร์เซ็นต์ และเป็นเพศเมีย 32 เปอร์เซ็นต์ (Johnson. 1991) อสุจิของกระต่าย เมื่อผ่านการแยกโดยวิธีนี้ จากนั้นนำไปผสมเทียม พบว่า เมื่อใช้กลุ่มของอสุจิ X จะได้ลูกเพศเมีย 94 เปอร์เซ็นต์ ลูกเพศผู้ 6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้กลุ่มของอสุจิ Y ได้ลูกเพศผู้ 81 เปอร์เซ็นต์ ลูกเพศเมีย 19 เปอร์เซ็นต์ (Johnson *et al.* 1989)เนื่องจากการแยกอสุจิโดยวิธีนี้ อสุจิต้องผ่านแสงเลเซอร์และผ่านการย้อมด้วยสารเคมี อาจทำให้เกิดความผิดปกติของ DNA (mutation) ของอสุจิและทำให้มีอัตราการผสมติดต่ำลงด้วย (McEvoy. 1992)

Bearden and Fuquay (1992) กล่าวว่าวิธีการแยกอสุจิวิธีนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์เลี้ยงได้เนื่องจาก

1) เป็นวิธีที่เสียเวลามาก โดยจะได้อสุจิประมาณ 350,000 ตัวต่อชั่วโมง

2) มีอัตราการตายของตัวอ่อนสูง อาจเนื่องมาจาก fluorochrome ที่ยังติดอยู่ที่ DNA ของอสุจิ

3) เครื่อง Flow Cytometer/Cell Sorter ยังมีราคาแพงมาก โดยมีราคาประมาณ 250,000 เหรียญสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามหากมีการใช้วิธีการแยกอสุจิโดยวิธีนี้ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) และการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เชื่อว่าจะให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าอย่างแน่นอน

Johnson (1995) ได้มีรายงานการทดลองในสุกรพบว่าลูกสุกรที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนแล้วใช้กลุ่มอสุจิ X ปฏิสนธิกับไข่ จะให้ลูกเพศเมียถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Cran *et al.* (1995) และ Seidel *et al.* (1999) รายงานว่าการผสมเทียมโคนมด้วย liquid semen และ frozen semen ที่ผ่านการแยกอสุจิด้วยเครื่อง Flow Cytometer/Cell Sorter พบว่า ลูกโคที่เกิดเป็นเพศเมีย 100 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.5.6. Free-flow electrophoresis

การแยกอสุจิวิธีนี้อาศัยหลักความแตกต่างของประจุบนเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ โดยอสุจิ X ที่มีประจุลบมากกว่าจะเข้าหาขั้วบวก (anode) และสำหรับอสุจิ Y ที่มีประจุบวกมากกว่าจะเข้าหาขั้วลบ (cathode) นอกจากนั้นน้ำหนักของอสุจิ X ที่มากกว่ามีส่วนช่วยให้ตกลงเร็วกว่าอสุจิ Y ที่น้ำหนักน้อยกว่าด้วย ทั้งนี้เมื่อปล่อยให้ไหลผ่านลงตามแนวดิ่ง พร้อมกับสารละลายบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วไฟฟ้าบวกและลบ (อนันต์ ศรีขาว. 2535) สำหรับในโค เมื่อผสมเทียมด้วยอสุจิจากส่วนแรกๆ ได้ลูกเพศเมีย 21 ตัว และเพศผู้ 12 ตัว จากลูกทั้งหมด 33 ตัว แสดงว่าการแยกเพศอสุจิวิธีนี้จะได้อสุจิ X บริสุทธิ์ ประมาณ 64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคิดจากจำนวนเพศลูกที่คลอด (Morhi *et. al.* 1987) Engelmann *et al.* (1988) พบว่าทั้งอสุจิ X และอสุจิ Y จะวิ่งไปที่ขั้วบวก แต่อสุจิ Y จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า และการถูกยับยั้งการเคลื่อนที่จะน้อยกว่าอสุจิ X ทั้งนี้เชื่อว่าเป็นผลมาจาก sialic acid บนอสุจิ X นอกจากนี้ Ishijima *et al.* (1992a) รายงานถึงผลสำเร็จของการแยกอสุจิด้วยวิธีนี้ในน้ำเชื้อของหนู (murine) แล้วตรวจสอบชนิดของอสุจิโดยเทคนิค analysis of the chromosome specific sequence by Polymerase Chain Reaction

2.5.7. Autofocusing technique

วิธีนี้มีหลักการเหมือนวิธี isoelectric focusing ของการแยกโปรตีน แต่ไม่ต้องใช้ แอมโฟไลท์ตัวนำ ซึ่งอสุจิจะทำตัวเป็นทั้งแอมโฟไลท์พวกน้ำหนักโมเลกุลมาก ทำให้เกิดความต่างระดับของความเป็นกรด-ด่าง (pH gradient) และเป็นทั้งตัวอย่างที่จะแยกด้วย โดยเชื่อว่าอสุจิ X และอสุจิ Y มีความแตกต่างของ isoelectric point (pI) เพราะประจุลบของอสุจิ X มากกว่าอสุจิ Y นั่นเอง ดังนั้นถ้าผ่านอสุจิเข้าไปในคอลัมน์ต่างระดับของความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ pH 5.5 – 8.5 เมื่อถึง pI ของอสุจิกลุ่มใด อสุจิกลุ่มนั้นจะหยุดว่าย จึงได้น้ำเชื้อที่มีอสุจิ X มาก และกลุ่มที่มีอสุจิ Y มากแยก

ออกจากกัน อสุจิแกะและโคแยกได้เป็น 3 และ 6 กลุ่ม (peak) ตามลำดับโดยวิธีนี้ แต่ยังไม่มีการยืนยันว่ากลุ่มใดเป็นของอสุจิ X หรืออสุจิ Y วิธีนี้ยังไม่ก้าวหน้านัก แต่เชื่อว่าวิธีนี้อาจใช้แยกอสุจิในน้ำเชื้อจำนวนมากขึ้นอุตสาหกรรมได้ หากมีการพัฒนามากขึ้น (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

2.5.8. Aqueous two-phase partition หรือ Thin couterunent distivation

เป็นวิธีที่ใช้เรียกกลุ่มเซลล์โดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติ hydrophobicity ของผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกเซลล์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีคุณสมบัติ hydrophobicity สูง และกลุ่มที่มี hydrophobicity ต่ำ ระบบนี้จะประกอบไปด้วยของเหลวสองส่วน (two-phase) ที่แยกส่วนกัน โดยจะเป็นสารละลาย polyethylene glycol (PEG) เป็นส่วนที่อยู่ช่วงบน และสารละลาย dextran อยู่ช่วงล่าง ดังนั้นระบบนี้จึงประกอบด้วยส่วน charge insensitive และส่วนของ charge sensitive (Cartwrith *et al.*1991)เมื่อให้อสุจิของโคเคลื่อนที่ผ่านระบบนี้ พบว่าจะได้กลุ่ม (peak) ของอสุจิ 2 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มแรกจะเป็นกลุ่มที่มี hydrophobicity ต่ำกว่ากลุ่มที่ 2 และพบว่าอสุจิในกลุ่มที่ 1 นี้จะเป็นอสุจิ Y 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการตรวจด้วย Y-chromosome specific DNA อย่างไรก็ตามอสุจิที่แยกได้โดยวิธีนี้ อาจจะไม่ได้ขึ้นอยู่กับสมบัติพิเศษเฉพาะที่ผิวเซลล์ของอสุจิ เนื่องจากพบว่าอสุจิที่พบในกลุ่มที่ 1 จะไม่สามารถมีปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosome reaction) โดยเฉพาะอสุจิ Y ทั้งหมดที่แยกได้ ไม่สามารถมีปฏิกิริยาอะโครโซม ในขณะที่อสุจิ X ทั้งหมดในกลุ่มที่ 1 พบว่ายังคงมีปฏิกิริยาอะโครโซมได้ตามปกติ ดังนั้นวิธีการแยกอสุจิวิธีนี้จึงยังใช้ไม่ได้ผล (Cartwright *et al.* 1993)

2.6 วิธีการตรวจสอบอสุจิ X และอสุจิ Y

การตรวจสอบเพื่อที่จะยืนยันผลว่าอสุจิที่แยกได้จากวิธีต่างๆ นั้น เป็นอสุจิ X หรืออสุจิ Y มากน้อยเพียงใด ได้สัดส่วนระหว่างอสุจิ X ต่ออสุจิ Y เป็นเท่าไร หรือประสบผลสำเร็จหรือไม่ ซึ่งวิธีการตรวจสอบมีดังนี้

2.6.1. การนับจำนวนลูกที่เกิด

เป็นการตรวจนับจำนวนของเพศลูกที่เกิด ว่ามีสัดส่วนเพศผู้ : เพศเมีย (XY : XX) เป็นเท่าไร วิธีนี้เป็นการตรวจสอบที่ไม่มีขั้นตอนอะไรที่ยุ่งยากซับซ้อน เป็นการตรวจสอบสัดส่วน Y : X ทางอ้อม โดยต้องนำอสุจิที่แยกได้ไปผสมเทียม เพื่อดูเพศของลูกที่เกิด แต่การที่อสุจิที่แยกได้จะผสมกับไข่ทุกตัวเป็นไปไม่ได้ ซึ่งนับเป็นข้อเสีย ส่วนข้อเสียอีกประการ คือต้องใช้เวลานาน เพื่อรอให้สัตว์ตั้งท้องหรือคลอด และต้องใช้หลักสถิติในการคำนวณสัดส่วนที่ถูกต้อง จึงต้องใช้ข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนมาก ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย แต่ยังมีข้อดี คือสามารถตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิที่ผ่านการคัดแยกได้ (Windsor *et al.* 1993)

2.6.2. ย้อมด้วยสี Quinacrine

เมื่อย้อมอสุจิด้วยสารเรืองแสง quinacrine พบว่า เฉพาะอสุจิ Y เท่านั้นที่แสดงลักษณะของจุดเรืองแสง หรือ F-body ซึ่งใช้ได้ดีกับอสุจิของคน และลิงกอริลา (Morhi *et al.* 1987) และอสุจิแพะ (Chatlejee and Majumdan. 2000) แต่ก็มีรายงานว่าไม่เฉพาะอสุจิ Y เท่านั้นที่แสดงลักษณะ F-body (Beatty. 1977; Goodall and Roberts. 1976) Van Kooij and Van Oost (1992) พบว่าวิธีการย้อมสี quinacrine นั้น ไม่สามารถใช้จำแนกชนิดของอสุจิที่ได้จากการแยกอสุจิโดยวิธีต่างๆ ซึ่งถ้าหากมีวิธีการพัฒนาเพิ่มขึ้น วิธีนี้เชื่อว่าจะนำไปใช้กับอสุจิของสัตว์เลี้ยงอื่นๆ ได้ (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

2.6.3. การตรวจสอบโครโมโซมของอสุจิ (Sperm karyotype analysis)

เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำมาก เป็นการวิเคราะห์รูปแบบการจัดเรียงตัวของโครโมโซมโดยการให้อสุจิเจาะผ่าน zona hamster egg หลังจากเจาะผ่านแล้วโครโมโซมจะเริ่มคลายตัว และเข้าสู่การแบ่งเซลล์ระยะ metaphase จากนั้นนำรูปแบบโครโมโซมเพศระยะ metaphase มาวิเคราะห์ว่าเป็นโครโมโซม X หรือโครโมโซม Y การตรวจสอบอสุจิด้วยวิธีนี้มีความแม่นยำสูง และเป็นวิธีที่มีความซับซ้อนจึงต้องการความละเอียดในการปฏิบัติ (Ueda and Yanagimachi. 1987) ในการตรวจสอบตัวอย่างที่มีจำนวนมากๆ (มากกว่า 250 ตัวอย่าง) ต้องกำจัดความคลาดเคลื่อนที่อาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากการสุ่มปฏิสนธิของอสุจิ X และอสุจิ Y (Amann. 1989) แม้วิธีการตรวจสอบอสุจิวิธีนี้จะใช้เวลามากกว่าและมีข้อจำกัดของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลน้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธีการย้อมสี Quinacrine เพื่อดู F-body แต่ก็มีความแม่นยำสูงกว่า (Windsor *et al.* 1993)

2.6.4. Flow cytometry

วิธีการตรวจสอบอสุจิวิธีนี้ อสุจิจะถูกย้อมด้วย DNA-specific fluorescence เช่นสีย้อม Hoechst 33342 ซึ่งเป็นสาร bisbenzimide จะจับกับบริเวณที่มีเบส adenine-thymine ที่อยู่ในสาย DNA อสุจิที่ถูกย้อมด้วยสี เมื่อผ่านเครื่อง Flow cytometer จะถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้การแสดงออกของสารเรืองแสงดีที่สุด และเนื่องจากปริมาณ DNA ในอสุจิทั้งสองชนิดต่างกัน ทำให้การแสดงออกของสารเรืองแสงต่างกัน เราจึงสามารถที่จะแยกจำนวนอสุจิทั้งสองชนิดออกจากกันได้ (Johnson *et al.* 1987) วิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วในเวลาเป็นนาที

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณี ...

และมีความแม่นยำสูงมาก (Johnson *et al.*1995) เสียเวลาและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าตรวจชนิดของอสุจิโดยรอดูสัดส่วนทางเพศของลูกเมื่อเกิด (White. 1989)

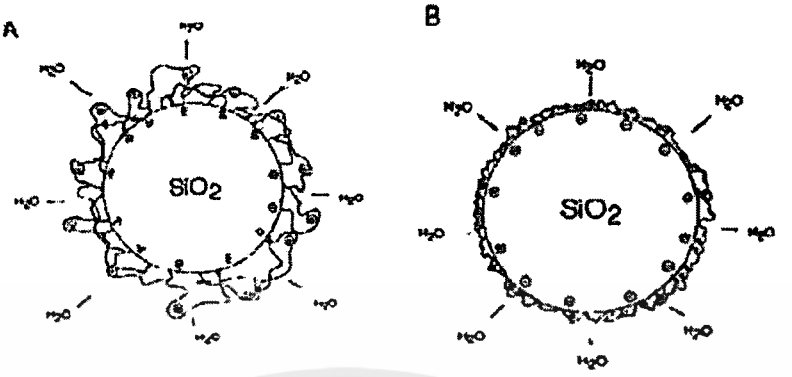
2.6.5. H-Y Antibodies or Dual labeling technique

วิธีนี้ใช้ตรวจสอบอสุจิ โดยการตรวจสอบ DNA ที่ทราบลำดับเบสบางส่วนบนโครโมโซม Y ของการตรวจสอบจะใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) (Ishijima *et al.* 1992b) หรือ Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) หรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน ซึ่งมีรายงานการตรวจสอบชนิดของอสุจิในคน (Kawarasaki *et al.* 1995; Kawarasaki. (1996) วิธีนี้เป็นวิธีตรวจสอบของอสุจิที่ความแม่นยำสูง และใช้เวลาน้อย (McEvoy. 1992)

2.7 คุณสมบัติของเพอร์คอลล์

Iwasaki *et al.* (1988) และ Wilson and Walker (1994) รายงานว่าเพอร์คอลล์ (Percoll) เป็นอนุภาคซิลิกาที่อยู่ในลักษณะคอลลอยด์ (colloidal silica particle) ซึ่งถูกเคลือบด้วยสารโพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrollidone) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 – 34 นาโนเมตร โดยเฉลี่ยมีขนาด 22 นาโนเมตร (Pickering *et al.* 1989) ถ้าละลายอยู่ในน้ำมีขนาด 35 นาโนเมตร แต่ถ้าละลายในสารละลายที่แตกตัวได้ไอออนสูงมีขนาด 30 นาโนเมตร (ภาพที่ 1) เพอร์คอลล์เป็นสารที่ใช้เป็นตัวกลาง (gradient materials) ในการปั่นแยกเซลล์และส่วนย่อยของเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีประจุ (nonionic) มีความหนาแน่นสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.30 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีแรงดันออสโมซิส (osmolality) เท่ากับ 275 – 285 มิลลิออสโมล ต่อกิโลกรัม (mOsm/kg) ความหนาแน่น 1.123±0.003 และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ pH ร่างกาย (Avery and Grave. 1995) สารละลายเพอร์คอลล์เหมาะที่จะใช้ปั่นแยกอสุจิ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถเพิ่มความหนาแน่น โดยไม่มีการเพิ่มแรงดันออสโมซิส ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์อสุจิ (Morhi *et al.* 1987) ผลของเพอร์คอลล์ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบของในท่อสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งจากการทดลองในหนู (mice) พบว่าเพอร์คอลล์ไม่ทำให้เกิดการอักเสบ ทั้งนี้เนื่องมาจากโพลีไวนิล ไพโรลิโดน ที่หุ้มอนุภาคซิลิกา เป็นตัวป้องกันการอักเสบ (Pickering *et al.* 1989) การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์มีจุดประสงค์คือ เพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อ หรือเพื่อแยกอสุจิ X และอสุจิ Y

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 อนุภาคเพอร์คอลล์ (A) เมื่อละลายอยู่ในน้ำที่มีขนาด 35 นาโนเมตร (B) เมื่อละลายในสารที่ แตกตัวได้ไอออนสูง (higher ionic strength) จะมีขนาด 30 นาโนเมตร (Pertoft. 2000)

2.8 การแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

อาศัยหลักการของแรงจากการปั่นเหวี่ยงที่ทำให้อสุจิ X ที่หนักกว่าตกลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y ที่เบากว่า ยิ่งเมื่อให้ตกผ่านไปที่สารละลายต่างระดับความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นทีละน้อยจะทำให้ ประสิทธิภาพการแยกจะเพิ่มขึ้น (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

Kaneko *et al.* (1983) ทดลองใช้สารละลายเพอร์คอลล์ต่างระดับความเข้มข้น 5 ระดับ โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 43 – 84 เปอร์เซ็นต์ ปั่นแยกอสุจิของคน โดยปั่นที่ 250 Xg นาน 20 นาที พบว่าอสุจิที่ส่วนล่างของหลอด แสดงลักษณะ F-body 27.4±3.4 เปอร์เซ็นต์ และมีอสุจิเคลื่อนที่ได้ลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้ Kaneko *et al.* (1984) รายงานการทดลองใช้จำนวนชั้นต่างระดับเพอร์คอลล์ตั้งแต่ 6 8 10 และ 12 ระดับความเข้มข้น พบว่ายิ่งจำนวนชั้นต่างระดับความเข้มข้นมากขึ้น การแยกอสุจิ X ยิ่งสามารถทำได้ดีขึ้น ปริมาณอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดจะมีปริมาณมากน้อยเพียงใดจะขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการปั่นเหวี่ยง และระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยง โดยในการทดลองพบว่าสภาพที่ดีที่สุดในการแยกอสุจิ X คือ มีจำนวนชั้นต่างระดับความเข้มข้น12 ระดับ มีความเข้มข้นตั้งแต่ 80 - 85 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 250 Xg นาน 30 นาที จะได้อสุจิส่วนล่างของหลอดประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่แสดงลักษณะ F-body อสุจิที่ได้สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 96 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงาของ Morhi *et al.* (1987) ที่รายงานการแยกอสุจิของคน โดนการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 12 ระดับ ตั้งแต่ 80 – 25 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละระดับมีความเข้มข้นต่างกัน 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความหนา 0.7 มิลลิเมตรต่อระดับ โดยอสุจิจะใส่ไว้ส่วนบนของหลอด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงโดย swing out rotor ที่ 250 Xg นาน 30 นาที หลังจากการปั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

105150

เหวี่ยงอสุจิจะกระจายตามผิวหน้าของชั้นความเข้มข้นต่างๆ และอสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอด จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอสุจิ Y โดยการย้อมสี quinacrine พบว่าอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดจะมีปริมาตร 23.3±6.3 เปอร์เซ็นต์ของอสุจิเริ่มต้น และพบอสุจิ Y 6.4±1.8 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นอสุจิ X ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิที่ได้มีความแข็งแรงและมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีขึ้น จากการทดลองพบว่ายิ่งเพิ่มจำนวนชั้นมากขึ้น การแยกอสุจิ X ยิ่งสามารถทำได้ดียิ่งขึ้น ปริมาณอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดจะมีปริมาณมากน้อยเพียงใดนั้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการปั่นเหวี่ยงและระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยง

Kaneko *et al.* (1984) อสุจิ X ที่ส่วนล่างของหลอดมากกว่าอสุจิ Y แสดงว่าอสุจิ X มีการตกตะกอน และมีความสามารถในการผ่านความตึงผิว (density interfaces) ได้ดีกว่าอสุจิ Y ทั้งนี้เนื่องมาจากความแตกต่างของรูปร่าง (morphological) ที่ส่วนหัวของอสุจิ อันเนื่องมาจากความแตกต่างของน้ำหนักโครโมโซม ซึ่งอาจทำให้แรงโน้มถ่วงที่กระทำต่ออสุจิทั้งสองชนิดแตกต่างกันไป ทำให้มีผลต่อความต้านทานในการเคลื่อนที่ผ่านแรงตึงผิวของเพอร์คอลล์ในระหว่างการตกตะกอนของอสุจิ

Van Kooji and Van Oost (1992) ทำการแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองของ Morhi *et al.* (1987) และใช้วิธีการตรวจสอบชนิดของอสุจิโดยวิธีการตรวจ DNA พบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิ X ของน้ำเชื้อที่ได้จากส่วนล่างของหลอดไม่แตกต่างไปจากน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงและน้ำเชื้อที่อยู่ส่วนบนของหลอด

Kobayashi *et al.* (2004) รายงานว่า การปั่นเหวี่ยงอสุจิโคผ่านชั้นระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ ที่ 7 ระดับ และความแตกต่างของสัดส่วนของอสุจิ X และ อสุจิ Y พบว่าชั้นล่างสุดในระดับความเข้มข้น 80% มีสัดส่วนของอสุจิ X อยู่ที่ 55.7 % และมีสัดส่วนของอสุจิ Y ที่ 44.3% มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.001$)

Lin *et al.* (1998) รายงานว่า น้ำเชื้อของคนหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 12 ระดับ (80 – 25 เปอร์เซ็นต์) ด้วยแรงปั่นเหวียง 250 Xg นาน 20 นาที เมื่อนำอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดไปตรวจสัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y ด้วยเทคนิค double-label fluorescent *in situ* hybridization พบว่าอสุจิ X มีค่าเฉลี่ย 52.2 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า น้ำเชื้อก่อนปั่นเหวี่ยงที่มีอสุจิ X 49.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.02$) สอดคล้องกับ Wang *et al.* (1994) ที่รายงานว่าสัดส่วนอสุจิ X : Y ของน้ำเชื้อคนหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 12 ระดับ มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง หลังจากตรวจด้วยเทคนิค indirect double label FISH and multistep immunofluorescen มีค่า 55.1 : 44.1 และ 49.0 : 48.2 ตามลำดับ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... การนำไปใช้

ในสัตว์เลี้ยงได้มีการทดลองปั่นแยกอสุจิของสุกรผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 7 ระดับ ทำการตรวจสอบโดยดูลักษณะ F-body จากอสุจิที่แยกชั้นตามส่วนต่างๆของหลอด พบว่า อสุจิที่ส่วนกลางของหลอดแสดงลักษณะ F-body ในช่วง 39.7 ถึง 55.1 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 48.98±5.6 เปอร์เซ็นต์) อสุจิส่วนล่างของหลอดแสดงลักษณะ F-body เพียง 7.6 ถึง 13.7 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 10.1 ±2.1 เปอร์เซ็นต์) โดยลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างจากอสุจิปกติ แสดงว่าอสุจิ X ในส่วนล่างของหลอดมากกว่าอสุจิ Y (Othani *et al.*1988) นอกจากนี้ (Totsukawa *et al.* 1988) รายงานว่าพบอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดแสดงลักษณะ F-body มากกว่าส่วนบน โดยที่ส่วนล่างแสดงลักษณะ F-body 43 ถึง 44 เปอร์เซ็นต์ แต่ประมวล แซ่โค้ว. (2542) รายงานว่าสัดส่วนเพศลูกสุกรที่ได้รับจากการผสมเทียมแม่สุกรด้วยน้ำเชื้อจากส่วนล่างของหลอดที่ผ่านการปั่นแยกผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 5 และ 8 ระดับความเข้มข้นที่ 1000 รอบต่อนาที (122 Xg) นาน 10 นาที ได้สัดส่วนลูกเพศผู้ : เพศเมีย เป็น 63.50 : 36.50 และ 66.10 : 33.90 ตามลำดับ

ส่วนในโค Iwasaki *et al.* (1988) รายงานการทดลองปั่นแยกอสุจิพ่อโคผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ เพื่อแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยใช้จำนวนชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ที่แตกต่างกันไป ตั้งแต่ 7 8 และ 11 ระดับ ใช้ความเร็วในการปั่นที่จำนวนรอบและอุณหภูมิต่างๆ กัน หลังจากปั่น นำอสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมาผสมกับไข่ในสภาพภายนอกตัวสัตว์ จากนั้นทำการตรวจเพศของตัวอ่อนในระยะ morula หรือ blastocyst โดยการวิเคราะห์โครโมโซม (chromosome analysis) พบว่า สัดส่วนของลูกเพศผู้ต่อเพศเมีย ของอสุจิที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับการใช้อสุจิที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Upreti *et al.* (1988) ที่สามารถแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ของโคได้ ทั้งนี้จากการตรวจสอบสัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y ด้วยวิธี flow cytometry ในขณะที่ ธานี วสวานนท์และคณะ (2542) รายงานการทดลองแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 3 ระดับได้แก่ 90 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ทำการปั่นด้วยแรงขนาด 300 Xg เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำอสุจิส่วนล่างของหลอดไปทำการผสมเทียมกับแม่โค ได้ลูกเพศเมีย 77.12 เปอร์เซ็นต์ (474/520) และเมื่อนำไปวิเคราะห์เพศอสุจิโดยการตรวจสอบเพศตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*in vitro* Fertilization) หลังผสมกับไข่ของหนูแฮมสเตอร์ ได้ผลเป็นเพศเมีย 69 เปอร์เซ็นต์

2.9 การเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ เป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อของผู้ชายที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ เช่น การมีน้ำเชื้อที่ตัวอสุจิเคลื่อนที่ต่ำ

(asthenozoospermic) หรือน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นของเชื้ออสุจิต่ำ (oligozoospermic) โดยพบว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของเพอร์คอลล์ จะมีตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้เพิ่มขึ้น ตัวอสุจิผิดปกติลดลง ประสิทธิภาพการผสมกับไข่เพิ่มขึ้น McClure *et al.* (1989) ทำการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 2 ระดับ โดยชั้นบนมีความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 47.5 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่างมีความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 300 Xg นาน 20 นาที พบว่าอสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นต่ำ เพิ่มขึ้นจาก 58.1 เปอร์เซ็นต์เป็น 74.7 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเชื้อที่อสุจิเคลื่อนที่ต่ำ เพิ่มจาก 33.4 เปอร์เซ็นต์เป็น 64.6 เปอร์เซ็นต์ และ Hyne *et al.* (1986) รายงานการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ ตั้งแต่ 35 – 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็ว 400 Xg นาน 15 นาที พบว่า น้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยงมีตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้จาก 35 เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วของการเคลื่อนที่จาก 32 ไมโครเมตรต่อวินาที เพิ่มเป็น 49 ไมโครเมตรต่อวินาที ตัวผิดปกติของอสุจิลดลงจาก 81 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 76 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผสมติดเพิ่มขึ้นจาก 6 เปอร์เซ็นต์เป็น 27 เปอร์เซ็นต์ การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อของผู้ชายที่ประสบปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ เมื่อปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ จะได้อสุจิส่วนล่างของหลอดที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้น (Kaneko *et al.* 1986; Morhi *et al.* 1987; Gellert *et al.* 1988; Pichering *et al.* 1989; McClure *et al.* 1989; Watkin *et al.*1996; Kovanci *et al.* 2001)

เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงเป็นการขจัดสิ่งปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollerdort *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเนื้อที่ตายแล้ว และคัดเลือกเอาอสุจิออกจากน้ำเชื้อโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และลักษณะสัณฐาน (morphology) ซึ่งจะทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติลดลง อสุจิปกติสูงขึ้น (Arcidicono *et al.* 1983; Kameko *et al.* 1986; Pickering *et al.* 1989)

ในสัตว์เลี้ยง Grant *et al.* (1994) รายงานการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อของสุกร โดยปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 2 ระดับ ที่ 40 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 300 Xg นาน 35 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ 80.0±3.7 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอสุจิที่ปั่นเหวี่ยงโดยไม่มีชั้นของเพอร์คอลล์ ที่ปั่นที่ 250 Xg นาน 4 นาที ซึ่งมีค่าเป็น 77.5±3.2 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว (rapid motility) มีค่าเฉลี่ย 77.7± 3.5 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการปั่นเหวี่ยงธรรมดาที่มีค่าเฉลี่ย 39.5±4.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) และมีความเร็วในการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามีค่าเฉลี่ย 83.3±5.7 ไมโครเมตรต่อวินาที (μm/s) สูงกว่าการปั่นเหวี่ยงธรรมดา ที่มีค่าเฉลี่ย 27.5±0.6 ไมโครเมตรต่อวินาที (μm/s) ($P<0.001$) และยังพบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่วัดด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ Hamilton throne motility analyzer version 7 จากการผสม

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณี ...

ภายนอกตัวสัตว์พบว่า อสุจิที่ผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ มีอัตราการผสมติด (cleavage rate) เฉลี่ย 63.0 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าอสุจิที่ไม่ผ่านชั้นของเพอร์คอลล์ที่มีอัตราการผสมติดเฉลี่ย 11.6 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) การที่อัตราการผสมติดดีขึ้นอาจเนื่องจากการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น ทำให้มีอสุจิที่ไปถึงไข่ได้มีมาก และมีการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ส่วนอะโครโซมได้มากขึ้น ทำให้โอกาสในการผสมติดสูงขึ้น รวมถึงความแข็งแรงของการเคลื่อนที่ที่ส่วนหัวของอสุจิมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การผสมของอสุจิมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

Avery and Greve. (1995) ศึกษาอัตราการเกิดตัวอ่อนในระยะเริ่มต้น จากการผสมนอกตัวสัตว์ ของน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ทำให้อุ่นขึ้น โดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 2 ระดับที่ 55 และ 90 เปอร์เซ็นต์ กับน้ำเชื้อที่ผ่านการล้าง (wash) โดยไม่ผ่านเพอร์คอลล์ พบว่าตัวอ่อนระยะ cleavage (อายุ 2 วัน) ของน้ำเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์มีอัตราการเกิด เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำเชื้อที่ผ่านการล้างโดยไม่ผ่านเพอร์คอลล์ มีอัตราการเกิด 73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวอ่อนระยะ blastocyte (อายุ 8 วัน) ของน้ำเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์มีอัตราการเกิด เท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่น้ำเชื้อที่ผ่านการล้างโดยไม่ผ่านเพอร์คอลล์ มีอัตราการเกิด 26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.0001$)อัตราการเจาะไข่ที่ลดลงนั้นไม่ได้มีสาเหตุมาจากสารละลายเพอร์คอลล์ เนื่องจากการทดลองมีการเติมสารละลายเพอร์คอลล์ลงใน fertilization medium ที่ระดับต่าง ๆ กัน พบว่าไม่ได้ทำให้อัตราการเจาะไข่ของอสุจิลดลงแต่อาจเกิดจากสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนที่ไม่ได้เคลือบอนุภาคของซิลิกาในสารละลายเพอร์คอลล์ซึ่งพบว่ามากกว่า1-2 เปอร์เซ็นต์ของสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนที่เคลือบอสุจิ ซึ่งไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่มีผลต่อความสามารถของอสุจิ ในการเจาะไข่ลดลง นักวิจัยสรุปว่าหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ต้องทำการปั่นล้างอีกครั้งเพื่อล้างสารละลายเพอร์คอลล์และสารโพลีไวนิลไพโรลิโดนออกจากอสุจิจะทำให้อัตราการเจาะไข่ของอสุจิเพิ่มขึ้น (Parrish *et al.* 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

ดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่

1) ศึกษาระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์หลังการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมในการแยกตัวอสุจิ X และ อสุจิ Y แยกออกจากกันเพื่อใช้ในการแช่แข็งในการผสมเทียม

2) ศึกษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของอสุจิที่ผ่านการแยกตัวอสุจิ X และ อสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสม โดยแบ่งออกเป็น 2 วิธีการ คือ

2.1) การผสมเทียมกับแม่โคที่เป็นสัด

2.2) การผสมกับไข่เพื่อให้เกิดการปฏิสนธินอกร่างกาย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคนมพันธุ์ Holstein-Friesian จำนวน 2 ตัว โดยวิธี ใช้เครื่องมือในการรีดเก็บเรียกว่า ช่องคลอดเทียม(Artifcial Vagina) จากฟาร์มโคนมปักธงชัย อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา นำน้ำเชื้อที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพในห้องปฏิบัติการ

3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อที่ได้ภายหลังจากการรีดเก็บจากพ่อโคนมก่อนและหลังผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงจะทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ ตามวิธีของสมบูรณ์ คุณาธิคม (2545) ดังนี้

3.2.1 การนับจำนวนอสุจิ

นับจำนวนอสุจิด้วยอุปกรณ์การนับคือ Makler counting chamber ของ Sefi-Medical Instruments โดยดูดน้ำเชื้อมา 5 ไมโครลิตรหยดลงบนกึ่งกลางของตัวเครื่องปิดด้วยแผ่นแก้วของตัวเครื่องเอง โดยจุดเครื่องหมายของแผ่นแก้วจะตรงกับเครื่องหมายของตัวเครื่องจะสังเกตเห็นเป็นสีรุ้ง แสดงว่ามีการกระจายของอสุจิในความลึก 10 ไมครอน (ระวังอย่าให้มีอากาศ) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์นับจำนวนอสุจิทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20 เท่า ใน10 ช่องของตัวเครื่อง จำนวนที่นับได้ จะเท่ากับความเข้มข้นเป็นจำนวนล้านต่อหนึ่งมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility)

เป็นการตรวจคุณภาพของอสุจิในน้ำเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า โดยหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์ 1 หยดและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นับผ่านกล้องให้เป็นร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า

3.2.3 จำนวนอสุจิมีชีวิตอสุจิ

ทำการย้อมตัวอสุจิโดยหยดสี 1% Eosin 1 หยด บนสไลด์ คนเบาๆให้เข้ากัน 30 วินาที จากนั้นหยดสี Nigrosin คนเบาๆให้เข้ากัน 30 วินาที ใช้สไลด์ อีกหนึ่งแผ่นแตะปลายนำไป smear บนสไลด์อีกแผ่น ปล่อยให้แห้งนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับการมีชีวิตของอสุจิด้วยกำลังขยาย 40 เท่า

3.2.4 การวิเคราะห์รูปร่างของอสุจิ

ทำการย้อมตัวอสุจิโดยหยดสี 1% Eosin 1 หยด บนสไลด์ คนเบาๆให้เข้ากัน 30 วินาที จากนั้นหยดสี Nigrosin คนเบาๆให้เข้ากัน 30 วินาที ใช้สไลด์ อีกหนึ่งแผ่นแตะปลายนำไป smear บนสไลด์อีกแผ่น ปล่อยให้แห้งนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิเคราะห์รูปร่างของอสุจิด้วยกำลังขยาย 100 เท่า

3.3 การวิเคราะห์อสุจิ Y ด้วยการย้อมสี Quinacrine

ใช้ปิเปตดูดอสุจิแต่ละชั้นใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรเจือจางด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยง 2000 รอบ เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายทิ้งไปทำการปั่นล้าง 2 ครั้งใช้ปิเปตดูดสารละลายทิ้งไปให้เหลือตะกอนใช้ปิเปตดูดตะกอนโดยหยดตะกอน 1 หยด บนสไลด์กระจายตะกอนบนสไลด์ให้สม่ำเสมอทิ้งสไลด์ให้แห้งสนิทโดยทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์ที่แห้งไปล้างด้วย cranoy's fixative โดยวิธีจุ่มและทิ้งไว้ให้แห้งหลังจากนั้นนำสไลด์ที่แห้งใส่ในสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ Trypin + DPBS ใน coplin jar ที่อุณหภูมิ 37 °C ทำการย้อมสไลด์ที่แห้งโดยการใส่ลงใน coplin jar ที่มีสี Quinacrine mustard เป็นเวลา 20 นาที โดยจุ่มยกขึ้นลงเพื่อไล่ฟองอากาศออกก่อน นำสไลด์มาจุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้งสไลด์ให้แห้ง แล้วหยด buffer 1 หยด ปิดด้วย กระจกพร้อมขับ buffer ส่วนเกินออกแล้วใช้ยาทาเล็บทากันระเหยนำสไลด์ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

เอกสารนี้ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น รวมทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การแยกเพศอสุจิโดยวิธีการปั่นหวี่ยงผ่านชั้นความต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

เตรียมน้ำยา เพอร์คอลล์ โดยใช้สารละลายทริส บัฟเฟอร์เพื่อเจือจาง ตามระดับความเข้มข้น คือ 80 เปอร์เซ็นต์,75 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์, 65 เปอร์เซ็นต์,60 เปอร์เซ็นต์, 50 เปอร์เซ็นต์,และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามกำหนด (ตารางที่ 3.1) วางชั้นน้ำยา เพอร์คอลล์ ที่เตรียมไว้ เป็นชั้นๆชั้นละปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับความเข้มข้น ลงในหลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตรหนึ่งหลอด วางน้ำเชื้อในปริมาตร 1 มิลลิลิตร บนชั้นบน ของน้ำยาเพอร์คอลล์นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยง 2500 รอบ เป็นเวลา 20 นาทีหลังจากนั้นใช้ ไปเปตดูดน้ำยาส่วนบน ทิ้งไป นำเอาสารละลายเพอร์คอลล์แต่ละชั้นส่วนความเข้มข้นของหลอดทดลอง มาปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ใช้ไปเปตดูดน้ำยาส่วนบนทิ้งไป จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนใส่ในหลอดทดลองใหม่นำไปทำการวิเคราะห์อสุจิ Y ด้วยวิธี Quinacrine' staining เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีอัตราส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y ตามต้องการ นำน้ำเชื้อที่อยู่ในเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมใส่น้ำยาสารละลายทริสบัฟเฟอร์ผสมไข่แดงที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นนำอสุจิที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพอีกครั้ง ก่อนนำไปทำการแช่แข็ง เพื่อเก็บไว้ทำการผสมเทียมและการปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป

ตารางที่ 3.1 การเจือจางสารละลายเพอร์คอลล์ให้มีจำนวนระดับความเข้มข้น 7 ระดับ

ความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ (เปอร์เซ็นต์)	เพอร์คอลล์ (มล.)	สารละลาย (มล.)	ปริมาตรรวม (มล.)
80	0.8	0.2	1.0
75	0.75	0.25	1.0
70	0.7	0.3	1.0
65	0.65	0.35	1.0
60	0.6	0.4	1.0
50	0.5	0.5	1.0
40	0.4	0.4	1.0
ปริมาตรรวม(มล.)			7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การแช่แข็งอสุจิ

นำอสุจิใส่ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ผสมไข่แดงได้ ที่เตรียมใส่ในบิกเกอร์ไว้นำมาแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บรรจุใส่หลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตรทำการปิดผนึกหลอด นำหลอดพลาสติกที่บรรจุอสุจิแล้วมาแช่แข็งโดยวางบนไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ–120°C นาน 10 นาทีจากนั้นย้ายหลอดลงในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °C เพื่อเก็บรักษาอสุจิต่อไป

3.6 การผสมเทียม

โดยฟาร์มโคนมปักธงชัย อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา ทำการเตรียมแม่พันธุ์ที่แสดงการเป็นสัตว์ ทำการผสมเทียมในฟาร์ม โดยใช้อสุจิแช่แข็งจากข้อ1.4 จากนั้นรอตรวจการตั้งท้องของแม่โคนมและรอผลการคลอดว่ามีอัตราส่วนเพศเมียและเพศผู้เป็นเท่าใด

3.7 การปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization)

3.7.1 การเก็บไข่

การเก็บไข่มีความสำคัญต่อการเจริญของตัวอ่อนในการปฏิสนธิเป็นอย่างมากโดยเฉพาะเทคโนโลยีการปฏิสนธินอกร่างกายในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเก็บไข่จาก 2 แหล่ง ดังนี้

3.7.1.1 การเก็บไข่จากโรงฆ่าสัตว์

นำรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์โดยแช่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ที่อุณหภูมิ 25-30 °C และนำกลับมาห้องปฏิบัติการภายใน 2-3 ชั่วโมง ห้องปฏิบัติการทำการล้างรังไข่ด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้งเพื่อลดการปนเปื้อน จากนั้นดูดไข่ (immature oocyte) ด้วยเข็มเบอร์ 18 จากฟอลลิเคิล (follicle) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 มล ไข่อ่อนที่ดูดได้จะเก็บในสารละลาย PCS+10 % fetal calf serum เพื่อการคัดเลือกคุณภาพไข่อ่อนด้วยกล้อง Stereoscope โดยเลือกเฉพาะไข่อ่อนที่มี Cumulus cells ล้อมหลายๆชั้น ที่เรียกว่า cumulus oocyte complexes (COCs)

3.7.1.2 การเก็บไข่ผ่านทางช่องคลอด

เจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มโคนมเตรียมความพร้อมของแม่โคโดยการกระตุ้นฮอร์โมนเพื่อกำหนดให้มีการตกไข่ที่เป็นระยะที่มีความพร้อมในการปฏิสนธิทำความสะอาดช่องคลอดของแม่โคเก็บด้วยเข็มเจาะดูดร่วมกับการใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์ ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียลไทม์ บี โมด) เพื่อเจาะถุงไข่พร้อมดูดไข่ออกใส่หลอดที่อยู่ภายนอกแล้วนำไปเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ

3.7.2 การเตรียมความพร้อมของไข่ *(in vitro* maturation)

ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้นขึ้นไปที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาเลี้ยงให้มีความพร้อมในการปฏิสนธิด้วยน้ำยา TCM199ที่เติมด้วย 100 µl HCG, 50 µl FSH, 10 µl ß-estradiol และ 10% fetal calf serumเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/500 µl นำไข่ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 ในอากาศ (in air) เป็นเวลา 23 ชั่วโมง

3.7.3 การเตรียมความพร้อมของอสุจิ (sperm capacitation)

น้ำเชื้อแช่แข็งจะถูกละลายในอากาศ 10 วินาที จากนั้นนำไปใส่ไว้ในน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 1นาที ตัดหลอดน้ำเชื้อใส่ในน้ำยา TCM199 + 10% FCS และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1800 rpm 10 นาที จากนั้นดูดน้ำยาด้านบนทิ้ง แล้วใส่น้ำยาสำหรับปฏิสนธิ น้ำยา TCM199 + 10% FBS ลงไป 1 ml เอียงหลอดทดลองในตู้เลี้ยงตัวอ่อนนาน 3 นาที เพื่อแยกอสุจิที่ยังมีชีวิตออกจากอสุจิตาย จากนั้นนำน้ำยาส่วนบนมาตรวจวัดความเข้มข้นจากนั้นปรับความเข้มข้นของอสุจิให้มีความเข้มข้น $5x10^6$ ตัว/ml นำไปใส่ตู้ที่อุณหภูมิ 37°C 2 ชั่วโมง

3.7.4 การปฏิสนธิในหลอดทดลอง

ทำการคัดเลือกไข่ทีมีความพร้อมการปฏิสนธิ จากไข่ทั้ง 2 แหล่ง นำไข่ที่ได้ไปใส่ในน้ำยา TCM 199 ที่เติมด้วย 5 % FBS และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน จีและสเตรปโตมัยซินนำอสุจิจากข้อ 3.7.3หยดลงในไข่ที่ทำการคัดเลือกไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ CO_2 ในอากาศ (in air) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.5 การเลี้ยงตัวอ่อน

หลังจากเสร็จสิ้นเวลาในการเลี้ยงรวมกันแล้ว นำตัวอ่อนออกจากคิวมูลัสออกโดยใช้ไปเปตปลายเล็กขนาดประมาณกับตัวอ่อนทำการดูดเข้าออกหลายครั้งให้คิวมูลัสแยกออกและนำไปดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ inverted ตรวจสอบการแบ่งตัวของตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์ นำตัวอ่อนย้ายลงในน้ำยา mSOF medium ที่เติมด้วย 10 % FCS ในสัดส่วน 10 ฟอง ต่อ 100 µl ปิดด้วย mineral oil ไปเลี้ยงในตู้ที่อุณหภูมิ 38 °C ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในอากาศ เป็นเวลา 5 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมง และบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุกวันจนถึงระยะบลาสโตซีสทำการบันทึกผลที่ได้จากการทดลอง

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer)

เจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มโคนมทำการเตรียมแม่พันธุ์โคนมตัวรับที่พร้อมจะรับการฝังตัวของตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเลี้ยงจากข้อ3.7.5 กลับเข้าสู่แม่โคตัวรับโดยวิธีการสอดเข้าทางด้านช่องคลอดจากนั้นรอการตั้งท้องของแม่โคต่อไป

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อ ใช้วิธีการ Student' s *t*-test ปริมาณความเข้มข้นของอสุจิ การมีชีวิตของอสุจิ ปริมาณอสุจิ Y และตัวอสุจิ โดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ระหว่างทรีทเมนต์ เปรียบเทียบคุณภาพตัวอ่อนตามแหล่งที่มาใช้วิธีการ Student' s *t*-test และเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องจากการผสมเทียมโดย การทดสอบไค สแควร์ (Chi-square test) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนม

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 ตัว จากฟาร์มโคนมปักธงชัย อ.ปักธงชัย จ. นครราชสีมา เมื่อนำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปวิเคราะห์คุณภาพในห้องปฏิบัติการและทำการแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ที่ความเข้มข้น 7 ระดับพบว่าอสุจิที่อยู่ชั้นบนสุด (ความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 40 %) ปรากฏมีตัวอสุจิน้อยมาก และไม่มีการเคลื่อนไหวและมีการรวมกันระหว่างน้ำกามกับสารละลายเพอร์คอลล์ จึงไม่สามารถนำมาทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อได้ ส่วนชั้นระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ที่ 65, 70, 75 และ 80 % ทำการรวมชั้นต่างระดับที่ 65-70 % ชั้นต่างระดับที่ 75-80 % เข้าด้วยกันในการนำมาวิเคราะห์หาคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโคนมภายหลังการปั่นเหวี่ยง ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนม ทั้งก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ในแต่ละระดับชั้นความเข้มข้นแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.1 ปริมาณความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงมีปริมาณความเข้มข้นหรือจำนวนตัวอสุจิ 852.93×10^6 เซลล์/มล. มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงในทุกระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) แสดงว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้น สารละลายเพอร์คอลล์จะมีปริมาณความเข้มข้นตัวอสุจิลดลงอาจเนื่องมาจากการปั่นเหวี่ยง จะทำให้ตัวอสุจิต้องตกตะกอนผ่านหลายชั้นตามระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์มีผล ทำให้ตัวอสุจิที่มีน้ำหนักแตกต่างกันตามหลักของลักษณะทางสรีระของตัวอสุจิระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ตลอดจนความสมบูรณ์และการมีชีวิตของตัวอสุจิเองทำให้ตัวอสุจิที่มีน้ำหนักมากและมีความสมบูรณ์พอจะตกลงสู่ด้านล่างของความเข้มข้น ทำให้มีปริมาณของตัวอสุจิลดลงภายหลังผ่านการปั่นเหวี่ยง สอดคล้องกับรายงานของ Iwasaki *et al.* (1988) ที่กล่าวว่าน้ำเชื้อโคภายหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์จะมีความหนาแน่นของจำนวนตัวอสุจิลดลง

น้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์จะสังเกตได้ว่าน้ำเชื้อโคที่อยู่ในระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% มีปริมาณตัวอสุจิ 414.93×10^6 เซลล์/มล. สูงกว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อในระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 50%,

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... ไม่ว่ากรณี ...

60% และ 75-80% อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ในขณะที่น้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 75-80% ที่มีปริมาณตัวอสุจิน้อยที่สุด (35.29×10^6 เซลล์/มล.) ที่สอดคล้องกับลักษณะการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และจำนวนอสุจิมีชีวิตของน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์นี้มีค่าต่ำที่สุดด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากการปั่นเหวี่ยงจะมีผลทำให้ตัวอสุจิที่มีน้ำหนักแตกต่างกันตามหลักสรีระความสมบูรณ์ของตัวอสุจิต้องตกตะกอนลงไปด้านล่างของหลอดแก้วทดลอง แต่ในขณะเดียวกันตัวอสุจิที่ตายแล้วก็จะตกตะกอนลงไปในชั้นล่างของความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ด้วยแสดงในตารางที่4.1

4.1.2 การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

จากการศึกษาพบว่า % การเคลื่อนไปข้างหน้าของตัวอสุจิก่อนปั่นเหวี่ยงของพ่อพันธุ์โคนมมีค่าเฉลี่ยอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ 92.50 % ทั้งนี้เนื่องจากพ่อพันธุ์โคนมที่นำมาศึกษาเป็นพ่อพันธุ์โคนมที่ได้รับคัดเลือกมาเป็นอย่างดี ใช้เป็นพ่อพันธุ์โคนมรีดน้ำเชื้อเพื่อใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการผสมเทียมของฟาร์มโคนมปักธงชัย และมีโปรแกรมการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่แน่นอนมีระยะเวลาพักการรีดน้ำเชื้อพอสมควร มีประสบการณ์ในการถูกรีดน้ำเชื้อมาแล้วทำให้ขณะรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมไม่เกิดอาการเครียดสอดคล้องกับรายงานของ ฉัตรชัย จันทร์สมบูรณ์. (2538) ที่รายงานว่าน้ำเชื้อโคจะมีมาตรฐานการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่า 90% เมื่อนำน้ำเชื้อไปทำการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์แล้ว พบว่าน้ำเชื้อที่ได้จากความเข้มข้นระดับชั้นเพอร์คอลล์ 65-70 %ภายหลังการปั่นเหวี่ยงจะมีตัวอสุจิที่มีความสามารถเคลื่อนไปข้างหน้าสูงกว่าน้ำเชื้อที่ได้จากก่อนการปั่นเหวี่ยงและหลังการปั่นเหวี่ยงทุกระดับชั้น ความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P< 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อที่ได้ภายหลังการปั่นเหวี่ยงจากทุกระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์แล้วจะเห็นว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70 % จะมีความสามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้สูงสุด (95.86 %) แสดงว่าน้ำเชื้อที่อยู่ในความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ระดับนี้จะมีตัวอสุจิที่มีความแข็งแรง ตื่นตัวและเคลื่อนที่ได้สูงสอดคล้องกับจำนวนอสุจิมีชีวิตความเข้มข้นและอสุจิที่มีรูปร่างปกติมีค่าสูงที่สุดด้วย น้ำเชื้อที่ได้จากชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 75-80 % จะมีความสามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ต่ำที่สุด (22.57%) สอดคล้องกับจำนวนอสุจิมีชีวิต ความเข้มข้นน้ำเชื้อและอสุจิที่มีรูปร่างปกติที่มีค่าต่ำสุดด้วย น้ำเชื้อที่ได้จากชั้นนี้ตัวอสุจิมีปริมาณน้อยมีการเคลื่อนไหวต่ำมากส่วนใหญ่จะเป็นชั้นที่มีตัวอสุจิที่ตายแล้วตกตะกอนมายังชั้นความเข้มข้นชั้นล่างสุดภายหลังการปั่นเหวี่ยงดังแสดงในตารางที่4.1

เอกสารนี้ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 จำนวนอสุจิที่มีชีวิต

น้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงมีตัวอสุจิมีชีวิต 92.71% ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ใกล้เคียงกับรายงานของ Kobayashi.*et, al,* (1999) ซึ่งให้น้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงมีตัวอสุจิที่มีชีวิต 92.71 % แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ได้จากชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 50% 60% และ 65-70% (91.36%, 93.43% และ 93.57% ตามลำดับ) ภายหลังการปั่นเหวี่ยงจะเห็นว่าน้ำเชื้อที่อยู่ในชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70 % มีปริมาณตัวอสุจิมีชีวิตสูงกว่าน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 50% และ 75-80 % อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) แต่ให้ความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อที่ระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 60 % แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% จะมีตัวอสุจิที่สมบูรณ์พันธุ์พร้อมที่จะเข้าผสมพันธุ์กับไข่เป็นจำนวนมาก สอดคล้องกับการที่มีตัวอสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในระดับสูงที่สุด มีปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิสูงที่สุด ตลอดจนมีตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ได้จากระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ระดับอื่นๆภายหลังการปั่นเหวี่ยงแล้ว ในขณะเดียวกันตัวอสุจิที่อยู่ในชั้นความเข้มข้น 75-80% ของสารละลายเพอร์คอลล์มีปริมาณอสุจิมีชีวิตต่ำที่สุด (78.50%) สอดคล้องกับลักษณะการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและปริมาณความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ได้จากชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ในชั้นนี้มีค่าต่ำที่สุดด้วยดังแสดงในตารางที่ 4.1

จากการศึกษาการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที ไม่มีผลทำให้อสุจิตาย การปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ เป็นวิธีการล้างน้ำเชื้อ และสามารถคัดเลือกอสุจิมีชีวิตและอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ โดยอสุจิจะถูกกรองเอาส่วนของเศษเซลล์ อสุจิที่ตาย อสุจิที่ไม่สมบูรณ์ เชื้อแบคทีเรีย เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ปนเปื้อนออกจากน้ำเชื้อในขณะที่ผ่านการตกตะกอนความต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ (Arcidiacono *et al.* 1983, Kaneko *et al.* 1986, Saad and Guerin. 1992, Yao *et al.* 1996) มีหลายการทดลองที่รายงานว่า อสุจิที่ส่วนล่างของหลอด หลังการปั่นเหวี่ยงผ่านต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ มีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเพิ่มขึ้นทั้งในอสุจิคน Kaneko *et al.* 1986, Mohri *et al.* 1987, McClure *et al.* 1989. สุกร (Grant *et.. al.* 1994) และโค Somfai *et al.* 2002, Suzuki *et al.* 2003)

4.1.4 รูปร่างของตัวอสุจิที่มีลักษณะปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้ง[illegible]

จากการศึกษาจะเห็นว่าน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงมีรูปร่างของตัวอสุจิที่ปกติ (46.07%) สูงกว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงทุกระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์อย่างมีนัยสำคัญ

ยิ่งทางสถิติ (P<0.01) ดังแสดงในตารางที่4.1ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงจะมีปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าน้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยงในทุกระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ (P<0.01) ทำให้มีโอกาสที่จะมีตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติได้มากกว่าด้วย ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ตัวอสุจิมีรูปร่างผิดปกตินั้นมีอยู่หลายสาเหตุ อาจเกิดจากสาเหตุภายในตัวพ่อพันธุ์เองหรืออาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมก่อนการปั่นเหวี่ยงมีตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติ 46.07% คือว่ามีค่าตัวอสุจิผิดปกติค่อนข้างสูง (53.93%) มากเกินกว่าที่ยอมรับได้ว่าไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์โดโดย Gromes (1977) ; Noakes *et al.* (2001) รายงานปริมาณตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติที่ยอมรับได้ว่าไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์โคอยู่ที่ระดับ 20-25%

น้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์จะเห็นว่าน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่อยู่ในชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% จะมีปริมาณตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิปกติสูงกว่าน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับชั้นความเข้มข้น 50% 60% 75-80% อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) ในขณะที่น้ำเชื้อที่อยู่ในระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 75-80% จะมีรูปร่างตัวอสุจิที่ปกติน้อยที่สุด (33.57%) โดยน้อยกว่าน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 50% อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) แต่มีปริมาณไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) กับน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 60% (33.64%) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 75-80% มีปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิต่ำที่สุด (35.29×10^6 เซลล์/มล.) มีปริมาณการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำที่สุด (22.57%) และมีปริมาณตัวอสุจิที่มีชีวิตต่ำที่สุดด้วย (78.50%) (ตารางที่4.1)โดยทั่วไปความผิดปกติของตัวอสุจิแบ่งออกได้ 2 ลักษณะตามช่วงเวลาของการเกิดความผิดปกติ คือ ความผิดปกติขั้นปฐมภูมิ (Primary abnormalities) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากในอัณฑะระหว่างกระบวนการสร้างอสุจิและในระหว่างการเคลื่อนที่ผ่านระบบท่อของอัณฑะ และความผิดปกติในขั้นทุติยภูมิ (secondary abnormalities) ความผิดปกตินี้เกิดภายในระบบท่อหลังจากที่ตัวอสุจิหลุดออกจากท่อขดฝอย (seminiferous tubules) (Noakes *et al.* 2001) ความผิดปกติของอสุจิแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะได้แก่ ความผิดปกติส่วนหัว (abnormalities of the sperm head) ความผิดปกติที่ชั้นกลางและส่วนหาง (abnormalities of the midpiece and the tail) และอสุจิเป็นหยดน้ำที่ส่วนหาง (cytoplasmic droplet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงแต่ละระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์

การวิเคราะห์	ก่อนการปั่นเหวี่ยง	หลังการปั่นเหวี่ยงที่ระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ต่างๆ				
		50%	60%	65-70%	75-80%	P-value
ความเข้มข้นของอสุจิ ($\times 10^6$/ml)	852.93±30.22^{a}	138.86±6.51^{c}	144.14±5.04^{c}	414.93±30.32^{b}	35.29±1.05^{d}	0.0001
เคลื่อนที่ไปข้างหน้า(%)	92.5±0.69^{b}	84.00±0.55^{d}	90.29±0.62^{c}	95.86±0.46^{a}	22.57±0.59^{e}	0.0001
อสุจิมีชีวิต(%)	92.71±0.51^{ab}	91.36±0.95^{c}	93.43±0.44^{a}	93.57±0.57^{a}	78.5±0.58^{c}	0.0001
รูปร่างปกติของอสุจิ (%)	46.07±0.64^{a}	35.57±0.55^{c}	33.64±0.43^{d}	39.07±0.44^{b}	33.57±0.40^{d}	0.0001

ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SE

^{a,b,c,d,e} ค่าความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังหลังการปั่นเหวี่ยงที่ระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์

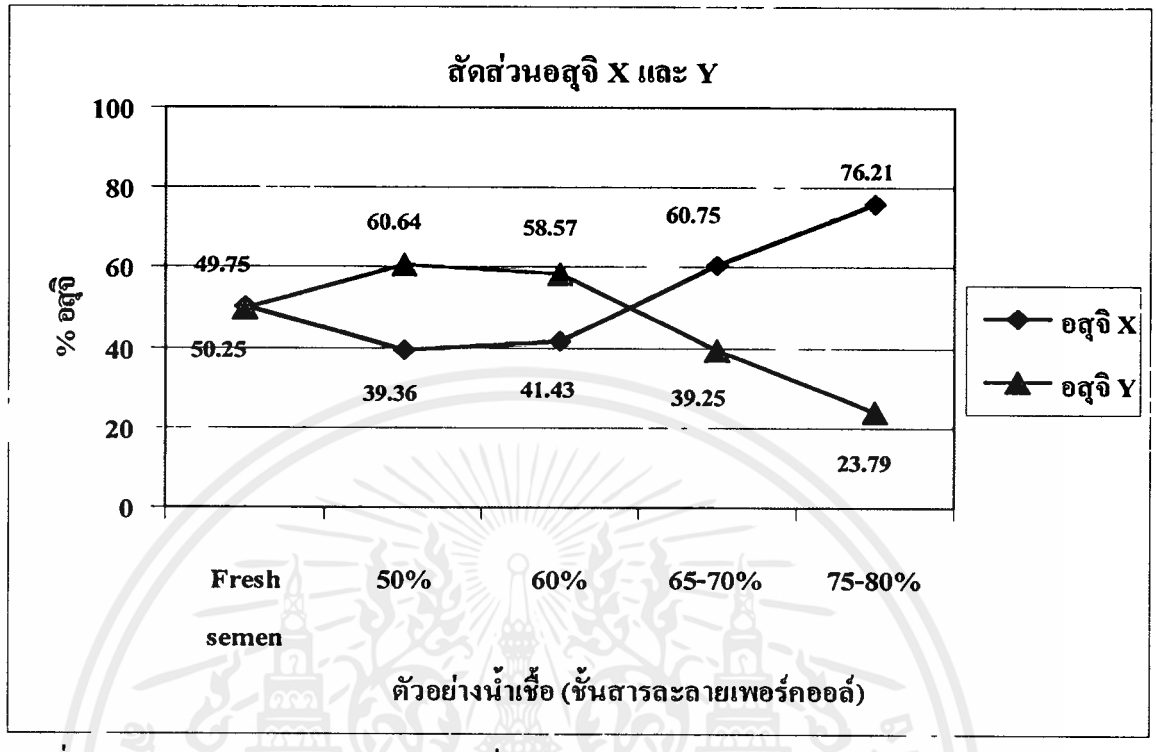
4.2 ผลการวิเคราะห์สัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y

น้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงเมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณอสุจิ Y โดยวิธีการ Quinacrine staining พบว่าน้ำเชื้อจะแสดงลักษณะ F-body ของอสุจิ Y (49.75%) ต่ำกว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 50% และ 60% อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) และมีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% และ 75-80% อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) เช่นกัน ส่วนน้ำเชื้อภายหลังจากปั่นเหวี่ยงผ่านระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ทุกระดับชั้นจะมีการแสดงลักษณะ F-body ของอสุจิ Y แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยน้ำเชื้อที่อยู่ในระดับชั้นความเข้มข้น 50% จะมีจำนวนอสุจิ Y สูงที่สุด รองลงมาคือน้ำเชื้อในระดับชั้น 60%, 65-70% และ 75-80% ตามลำดับ (60.64%,58.57%,39.25%และ 23.79% ตามลำดับ) จะเห็นว่าการแสดงลักษณะ F-body ของอสุจิ Y ภายหลังการปั่นเหวี่ยงจะมีปริมาณอสุจิ Y ลดลง ($P<0.01$) ตามลำดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เพิ่มขึ้นหรืออาจกล่าวอีกนัยว่าจะมีปริมาณอสุจิ X มากขึ้น ($P<0.01$) ตามลำดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เพิ่มขึ้นนั่นเองดังแสดงกราฟ ที่ 1

Andersen and Byskov (1997) รายงานว่าประสิทธิภาพของการแยกอสุจิ X และ อสุจิ Y ด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ ขึ้นอยู่กับแรงของการปั่นเหวี่ยง (g-value) ความหนาแน่นของตัวกลางและระดับชั้นความเข้มข้นของสารตัวกลาง

ความเร็วของการตกตะกอนในการปั่นเหวี่ยงขึ้นกับ น้ำหนัก (mass) ขนาด (size) รูปร่าง (shape) ความหนาแน่น (density) การเคลื่อนไหว (activity) ของอนุภาคที่ต้องการจะปั่นแยก รวมถึงความหนืดของสารตัวกลางที่ใช้ในการปั่นแยก (Wilson *et al.* 1994) เนื่องจากอสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y โดยพบว่า ดีเอ็นเอ ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนหัวของอสุจิ X และ อสุจิ Y มีความแตกต่างกัน 2-4 เปอร์เซ็นต์ (Moruzzi. 1979) ด้วยหลักการเหล่านี้ทำให้การศึกษาครั้งนี้ สังเกตุจากผลการศึกษา อสุจิ X จะตกลงสู่ด้านล่างของหลอดหลังจากการปั่นเหวี่ยง ผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 สัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y ที่วิเคราะห์โดยวิธีการย้อมสี Quinacrine

4.3 ประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่ผ่านการแยกเพศโดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์

4.3.1 การผสมเทียม

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสม (ระดับชั้นความเข้มข้น 65-70%) ไปทำการเจือจางให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิ 8×10^6-10×10^6 เซลล์/มล. เพื่อนำไปทำการแช่แข็งเก็บไว้ใช้ในการผสมเทียมแม่โคนมที่เป็นสัด คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมทดลองภายหลังการปั่นเหวี่ยงในระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% ก่อนและหลังการอุ่น (Thaw) เพื่อใช้ในการผสมเทียมแม่โคนมที่เป็นสัด น้ำเชื้อแช่แข็งมีคุณภาพลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) แต่ยังสามารถนำไปผสมเทียมได้ แสดงในตารางที่ 4.2

น้ำเชื้อโคภายหลังผ่านกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีคุณภาพตัวอสุจิที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งมีการใส่สารละลายเจือจางน้ำเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิความต้องการและได้ปริมาณน้ำเชื้อที่เพิ่มขึ้น เมื่อบรรจุลงในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25/มิลลิลิตร แล้วผ่านกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้กล่าวคือทำให้มีคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งลดน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับ รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุลและคณะ (2544) ที่กล่าวว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังจากการแช่แข็งลดลงแต่ไม่มีผลต่อการผสมเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณภาพของน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมก่อนและหลังการอุ่นเพื่อใช้ในการผสมเทียม

ลักษณะศึกษา	น้ำเชื้อในระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70 %	
	ก่อนทำน้ำเชื้อแช่เข็ง	หลังการอุ่นเพื่อผสมเทียม
ความเข้มข้นของอสุจิ($x10^6$/มล.)	414.92[a]	8.00[b]
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	94.29[a]	65.86[b]
อสุจิมีชีวิต (%)	94.57[a]	69.14[b]

a,b ตัวอักษรแสดงข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)

ผลการนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทำการผสมเทียมกับแม่โคนมที่เป็นสัด (ทั้งแม่โคสาวและแม่โคนาง) จำนวน 150 ตัวแสดงผลการผสมติด อุ้มท้อง และเพศของลูกที่คลอดออกมาจนถึงปัจจุบัน (ตารางที่ 4.3) จะเห็นว่าจากการผสมเทียมให้แม่โคนมทั้งหมด 150 มีการผสมติดและอุ้มท้อง 60 ตัว คิดเป็นอัตราการผสมติด 40% สอดคล้องกับรายงานบทความของ กลุ่มวิจัยและวิจัยโค (2551) ที่รายงานว่าในประเทศไทยมีอัตราการผสมติดของโคนมโดยการผสมเทียมเฉลี่ยประมาณ 30-40% โดยการผสมเทียมให้มีประสิทธิภาพในการผสมติดสูงนั้น ไม่ได้ขึ้นอยู่กับอสุจิอย่างเดียวจะขึ้นกับการควบคุมการเป็นสัดของแม่โค ระยะห่างของการฉีดน้ำเชื้อ และตัวแม่โคเองจะต้องไม่อยู่ในสภาวะความเครียดกับสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น สภาวะอากาศ เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการปฏิสนธิของตัวอสุจิกับไข่ในโคนม

จากจำนวนแม่โคที่อุ้มท้องทั้งหมด 60 ตัว ปัจจุบัน (31 ต.ค. 51) ทำการคลอดแล้ว 42 ตัวเป็นลูกเพศเมีย 30 ตัว (71.43%) และเป็นลูกเพศผู้ 12 ตัว (28.57%) ซึ่งมีค่าแตกต่างจากการศึกษาการแสดงออกลักษณะ F-body ของอสุจิ Y ด้วยวิธีการ Quinaerine staining ในชั้นระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 65-70% ภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่แสดงไว้ในภาพที่ 4.1 จะมีอสุจิ X และอสุจิ Y คิดเป็นปริมาณ 60.75% และ 39.25% ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุจากสภาพแวดล้อมภายในระบบสืบพันธุ์ของแม่โคนมที่เป็นสัด ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมตลอดจนประสบการณ์ของผู้ทำการผสมเทียมแม่โคนม และประสิทธิภาพของตัวอสุจิ X ในน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ 65-70% ที่มีการตรวจพบว่ามีอสุจิ X มากกว่าอสุจิ Y นั่นเอง โดยทั่วไปในการผสมเทียมโคนมจะให้ลูกที่เป็นเพศเมีย 50 % และเพศผู้ 50 % (Johnson. 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 อัตราการผสมติดและอุ้มท้อง และเพศของลูกโคที่เกิดจากการผสมเทียม

แม่โคที่ผสม(ตัว)	แม่โคที่อุ้มท้อง (ตัว)	แม่โคที่คลอดลูก (ตัว)	เพศของลูกโคที่คลอดแล้ว	
			เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
150	60 (40%)*	42 (70%)**	12 (28.57%)	30 (71.43%)

* อัตราการผสมติดคำนวณจากร้อยละของแม่โคทั้งหมดที่ทำการผสมเทียม

** เปอร์เซ็นต์แม่โคที่คลอดลูกแล้ว คำนวณจากร้อยละของแม่โคที่อุ้มท้อง (เก็บข้อมูลถึง 31 ตุลาคม 2551)

4.3.2 การปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์ *(In vitro* fertilization)

การปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์หรือการปฏิสนธิในหลอดแก้ว คือการนำตัวอสุจิ (sperm) มาปฏิสนธิกับไข่ (oocyte) ภายนอกท่อนำไข่ โดยต้องจัดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการปฏิสนธิให้ใกล้เคียงกับสภาวะในธรรมชาติมากที่สุดหลังจากเกิดการปฏิสนธิแล้วนำตัวอ่อน (embryo) ที่ได้รับมาเลี้ยงไว้ภายนอกระยะหนึ่งที่เหมาะสมแล้วค่อยนำกลับสู่ตัวแม่เพื่อการตั้งท้องต่อไป

4.3.2.1 การปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์จากไข่ที่ได้จากแม่โคในโรงฆ่าสัตว์

การเก็บไข่อ่อน จากรังไข่ของแม่โคนมที่โรงฆ่าสัตว์ซึ่งส่วนใหญ่จะไม่ทราบประวัติของแม่โคทั้งด้านสายพันธุ์และประวัติด้านสุขภาพทางระบบสืบพันธุ์ อาจเป็นรังไข่ของแม่โคที่มีปัญหาในด้านการเป็นหมัน ถุงน้ำในรังไข่ แม่โคอายุมาก แม่โคคัดทิ้ง หรือแม่โคที่เป็นเต้านมอักเสบ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทำการศึกษาต้องการไข่จากแม่โคนมเท่านั้น เพื่อต้องการย้ายฝากตัวอ่อนกลับเข้าสู่แม่โคตัวรับ โดยวิธีการถ่ายฝากตัวอ่อน ผลการปฏิสนธิภายนอกร่างกายระหว่างไข่ที่ได้รับจากการเก็บที่โรงฆ่าสัตว์กับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% จากการทำการเก็บไข่จากรังไข่แม่โคนมที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 3 ครั้งได้รังไข่มาจำนวน 100 รังไข่ทำการเก็บไข่ได้ทั้งหมด 530 ฟองมีไข่ที่สมบูรณ์ (mature oocyte) พร้อมการปฏิสนธิจำนวน 299 ฟอง คิดเป็น 56.42% เมื่อนำไข่ที่ได้มาทำการปฏิสนธิภายในหลอดทดลองกับน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมแล้ว ปรากฏว่าไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิกับตัวอสุจิมีจำนวน 116 ฟอง คิดเป็นอัตราการปฏิสนธิ 38.80% ภายหลังทำการเลี้ยงตัวอ่อนนาน 7 วัน ได้ตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีสจำนวน 9 ตัวคิดเป็น 7.76% ของตัวอ่อนทั้งหมดที่ได้รับการปฏิสนธิ แสดงในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหากำไรค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากเจ้าของลิขสิทธิ์ก่อน และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การปฏิสนธิภายนอกร่ายกายสัตว์ระหว่างไข่ที่ได้จากโรงฆ่ากับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสม

ครั้งที่เก็บ	จำนวนไข่ที่เก็บได้ (ใบ)	จำนวนไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ (ใบ)	ระยะของตัวอ่อน			ไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ* (ใบ)
			6-8 เซลล์** (ตัว)	8-16 เซลล์** (ตัว)	บลาสโตซีส*** (ตัว)	
1	147	93	38	20	3	55
		(100%)	(40.86%)	(52.63%)	(7.89%)	(59.14%)
2	144	86	26	13	2	60
		(100%)	(30.23%)	(50%)	(7.69%)	(69.77%)
3	239	120	52	29	4	68
		(100%)	(43.33%)	(55.77%)	(7.69%)	(56.67%)
รวม	530	299	116	62	9	183
		(100%)	(38.80%)	(53.45%)	(7.76%)	(61.20%)

* ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ

** ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์

*** ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์

4.3.2.2 การปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์จากการเก็บไข่จากแม่โคที่ทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (Superovulation)

ทำการเก็บไข่จากแม่โคที่ทราบพันธุ์ประวัติจำนวน 11 ตัว ด้วย เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์ ชนิดเรียลไทม์ บี โมด) เป็นการเก็บไข่โดยเตรียมความพร้อมของแม่โคด้วยการกระตุ้นฮอร์โมนเพื่อกำหนดให้มีการตกไข่ในระยะที่มีความพร้อมสำหรับการปฏิสนธิ จากนั้นทำความสะอาดช่องคลอดของแม่โคแล้วใช้โปรบเครื่องอัลตราซาวด์ สอดใส่ผ่านช่องคลอดพร้อมกับไกด์ และเข็มเพื่อเจาะถุงไข่พร้อมดูดไข่ออกใส่หลอดที่อยู่ภายนอก (Ovum pick up) (มงคล เตชะกำพุ. 2543) ซึ่งสามารถเก็บไข่ได้ทั้งหมด 123 ฟอง ได้ไข่ที่สมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ 85 ฟอง คิดเป็น 69.11% เมื่อนำไข่ที่ได้มาทำการปฏิสนธิภายในหลอดทดลองกับน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมแล้ว จะเห็นว่าไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิกับตัวอสุจิมีจำนวน 48 ฟอง คิดเป็นอัตราการปฏิสนธิ 56.47% ภายหลังทำการเลี้ยงตัวอ่อนนาน 7 วัน พบตัวอ่อนที่เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสจำนวน 17 ตัว คิดเป็น 35.42% (ตารางที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์ระหว่างไข่จากการเก็บด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงกับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสม

ครั้งที่เก็บ	จำนวนแม่โค	ไข่ที่เก็บได้ (ใบ)	ไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ (ใบ)	ระยะของตัวอ่อน			%ไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ (ใบ)
				6-8 เซลล์*	8-16 เซลล์**	บลาสโตซีส***	
1	2	19	12	4	3	1	8
			(100%)	(33.33%)	(75.00%)	(25.00%)	(36.67%)
2	4	56	41	23	12	9	18
			(100%)	(56.10%)	(52.17%)	(39.13%)	(43.90%)
3	5	48	32	21	10	7	11
			(100%)	(65.63%)	(47.62%)	(33.33%)	(40.53%)
รวม	11	123	85	48	25	17	37
			(100%)	(56.47%)	(52.08%)	(35.42%)	(43.53%)

* ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ

** ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์

*** ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์

การเปรียบเทียบการปฏิสนธินอกร่างกายของไข่ทั้ง 2 แหล่งกับอสุจิที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ ในระดับชั้น 65-70% พบว่าระยะการแบ่งตัวของตัวอ่อนมีความแตกต่างกันซึ่งเป็นไปตามเหตุผลที่ว่า ไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์เป็นไข่ที่ไม่สามารถกำหนดสภาวะแวดล้อมได้ เช่นอายุของสัตว์เป็นต้น ซึ่งต่างจากการเก็บไข่จากอุลตราซาวด์ที่ว่าสามารถกำหนดอายุของแม่พันธุ์พร้อมทั้งกำหนดทางกรรมพันธุ์และความสมบูรณ์ของไข่ที่จะได้เพื่อการปฏิสนธินอกร่างกายฉะนั้นการทดลองครั้งนี้พบว่า ตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสมีปริมาณ 7.76% และ35.42% ของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิทั้งหมดตามลำดับ ตารางที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพการปฏิสนธิระหว่างไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์และไข่ที่ได้จากอุลตราซาวด์มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของไข่จากโรงฆ่าสัตว์กับไข่ที่เก็บด้วยวิธีอุลตราซาวด์

แหล่งที่มาของไข่	จำนวนไข่	ไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ	ระยะของตัวอ่อน		
			6-8 เซลล์*	8-16 เซลล์**	บลาสโตซีส***
โรงฆ่าสัตว์	530	299	116 (38.80%)	62 (53.45%)	9 (7.76%)
อุลตราซาวด์	123	85	48 (56.47%)	25 (52.08%)	17 (35.42%)

* ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ

** ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์

*** ค่าร้อยละคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์

จากตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีสทั้งหมด 26 ตัวที่ได้จากไข่ทั้ง 2 แหล่ง ได้แก่ ไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์และไข่ที่เก็บโดยวิธีอุลตร้าซาวนด์ หลังจากทำการย้ายฝากไปยังแม่โคนมตัวรับโดยวิธี Transcervical ขณะนี้แม่โคตัวรับมีการอุ้มท้องคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 22.2% และ 47.05% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ซึ่งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($P<0.05$) และมีกำหนดคลอดราวเดือนสิงหาคม และ กันยายน 2552

ตารางที่ 4.7 การย้ายฝากตัวอ่อนที่มีการตั้งท้องจากตัวอ่อนทั้ง2 แหล่ง

แหล่งที่มาของไข่	ตัวอ่อนที่ย้ายฝาก (ตัว)	การตั้งท้อง	อัตราการตั้งท้อง
โรงฆ่าสัตว์	9	2	22.2%[a]
อุลตราซาวด์	17	8	47.05%[b]

a,b ตัวอักษรแสดงข้อมูลมีความแตกต่างกันในแนวตั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อโคที่ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ความเข้มข้น 7 ระดับ โดยทำการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ วิเคราะห์อสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการ Quinacrine staining การผสมเทียมและการปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. น้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคก่อนการปั่นเหวี่ยงมีปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิ ปริมาณอสุจิรูปร่างปกติ และสัดส่วนของตัวอสุจิ Y สูงกว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ ($P<0.01$)

2. น้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% จะมีคุณภาพในด้านการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ปริมาณอสุจิมีชีวิต ความเข้มข้นของตัวอสุจิและรูปร่างตัวอสุจิที่ปกติสูงกว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% และ 75-80% ($P<0.01$)

3. น้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมสำหรับนำไปทำน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อใช้ในการผสมเทียมผลิตลูกโคนมเพศเมียคือน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% โดยน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นนี้จะมีคุณภาพของน้ำเชื้อและจำนวนตัวอสุจิ X ในปริมาณที่สูงกว่าน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ ถึงแม้ว่าน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 75-80% จะมีตัวอสุจิ X ในปริมาณสูงที่สุดก็ตามแต่เนื่องจากมีคุณภาพด้านอื่นๆในการที่จะเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ในระดับที่ต่ำมากจึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม

4. น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ 65-70% สามารถนำไปใช้ผสมเทียมกับแม่โคนมที่เป็นสัดได้ให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อแช่แข็งโดยทั่วไปแต่ให้ลูกที่มีอัตราส่วนของเพศเมีย:เพศผู้สูงกว่า กล่าวคือสามารถให้ลูกเพศเมียได้สูงถึง 71.43% ในขณะที่ให้ลูกเพศผู้ 28.57%

5. น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% มีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิกับไข่ภายนอกร่างกายสัตว์ได้และภายหลังการปฏิสนธิตัวอ่อนสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้ ตลอดจนสามารถฝังตัวกับมดลูกแม่โคตัวรับจนเกิดการอุ้มท้องได้ไม่ว่าไข่ที่นำมาทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายสัตว์จะมีแหล่งที่มา

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกันคือมาจากไข่ของโคนมเพศเมียที่โรงฆ่าสัตว์ หรือมาจากไข่ที่ทำการเจาะเก็บจากโคนมเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นให้เพิ่มการตกไข่(Superovulation)

6. การปฏิสนธินอกร่างกายจากไข่ทั้ง 2 แหล่ง พบว่าไข่จากการเจาะเก็บจากโคนมเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นให้เพิ่มการตกไข่มีอัตราการปฏิสนธิ การพัฒนาของตัวอ่อนได้ดีกว่าไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์รวมทั้งอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนก็มีอัตราสูงกว่าเช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อและวิเคราะห์จำนวนอสุจิ Y ในน้ำเชื้อทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ภายหลังการปั่นเหวี่ยง

2. ควรทำการศึกษาประวัติการให้ลูกของพ่อพันธุ์โคนมที่นำมารีดน้ำเชื้อทดลองก่อนใช้ทำการทดลอง

3. ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนการวางระดับของชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์เพื่อให้ได้ชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมที่สุดและได้เพศของตัวอสุจิที่ต้องการปริมาณมากที่สุด

4. ควรใช้เทคนิคที่มีความแม่นยำยิ่งขึ้นในการตรวจสอบเพศของอสุจิ เช่น การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (Fluorescence *In Situ* Hybridization: FISH) หรือเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น พีซีอาร์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กลุ่มวิจัยและวิจัยโค. 2551. http://www.dld.go.th/dairy/dairy_note/goalminute/goalminute.html **วารสารข่าวปศุสัตว์** ปีที่ 29 ฉบับที่ 264. 25 มีนาคม 2552

ฉัตรชัย จันทร์สมบูรณ์. 2538. "การศึกษาการกำหนดเพศในสุกร โดยใช้น้ำเชื้อจากการปั่นเหวี่ยง". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ธานี วสวานนท์, สมพร ชินสมบูรณ์ และสุวิชา จิตรปฏิมา. 2542. " การศึกษา และวิจัยการแยกเพศอสุจิโคด้วยวิธีการปั่นแยกเพื่อผลิตลูกโคเพศเมีย ". หน้า 211-216. ใน **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.

ประมวล แซ่โคว้. 2542. " คุณภาพและศักยภาพการกำหนดเพศลูกสุกรของน้ำเชื้อหลังการแยกอสุจิเอ็กซ์-วายโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มของเพอร์คอลล์". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

มงคล เตชะกำพุ. 2543. **เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์.** กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, สุรจิต ทองสอดแสง, ชาลี ลีละศิริ และสินชัย วิโรจน์วุฒิกุล. 2544. ."การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคด้วยน้ำยาเจือจางและวิธีการต่างกัน" **สัตวแพทยสาร** ปีที่ 52 หน้า 47-55.

สุวรรณ ช่างกลึงดี. 2534. "ผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสภาพ พี เอช ของมดลูก ต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่สุกรและสัดส่วนทางเพศลูก". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สมบูรณ์ คุณาธิคม. 2545. **ภาวะผู้มีบุตรยากและเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์.** กรุงเทพมหานคร: พี.เอ.ลีฟวิ่ง.

สมพร ดวนใหญ่. 2548. "การกำหนดเพศด้วยการแยกอสุจิ". **วารสารการเกษตรราชภัฏ.** 4: 1-11.

เอื้อมศักดิ์ เงินประดับ, กัญจนะ มากวิจิตร์, ศรีสุวรรณ ชมชัย, อนันต์ ศรีขาว และอรุรี อิงคากุล. 2548. "การเตรียมสัญญาณติดตามสำหรับโครโมโซมวายในโคเนื้อด้วยเทคนิค พีซีอาร์" . หน้า 61. ใน **การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ ครั้งที่ 7.** มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนันต์ ศรีขาว. 2535. "วิธีแยกอสุจิ X และ Y ในปศุสัตว์ ก้าวหน้าไปถึงไหน". หน้า 1-25. ใน **การประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง X and Y – chromosome Bearing Sperm Separation Prospective** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.

อรรณพ คุณาวงษ์กฤต. 2537. **วิทยาการสืบพันธุ์สุกร.** กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Adimoelja, A. 1987. " Sephadex gel for sex preselection ". pp. 491-499. In Mohri, H. **New Herizon in Sperrm Cell Research.** Gordon and Breach Sci. Publ, New York.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. 1988. "Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques". **J. Androl.** 9: 367-376.

Akerlof, E., Fredricson, B., Gustafsson, O., Lundin, A., Lunell, N.O.,Nylund, L., Rosenborg, L. and Pousette, A. 1997. "Comparison Between a swim-up and a percoll technique for the separation of human spermatozoa". **Int. J. Androl.** 10: 663-669.

Ali, J.I., Eldridge, F.E., Koo, G.C. and Schanbacher, B.D. 1990. "Enrichment of bovine X- and Y- chromosome bearing sperm with monoclonal H-Y antibody fluorescence activated cell sorter". **Arch. Androl.** 24: 235-245.

Amann, R.P. 1989. "Treatment of sperm to predetermine sex". **Theriogenology.** 31: 49-60.

Amann, T. and Lutwak-mann, C. 1981. "Male Reproductive Function and Semen. Springer-

Andersen, C.Y. and Byskov, A.G. 1997. "Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome". **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.** 76: 131-134.

Andre, J. 1983. **The Sperm Cell: Fertilizing Power, Surface Properties, Motility, Nucleus Acrosome, Evoluationary Aspects.** Boston: Martimus Nijhoff.

Anonymous. 2000. **Applied animal reproduction.** Newjersey: Prentice-Hall.

Avery, B. and Greve, T. 1995. "Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination". **Theriogenology.** 44: 871-878.

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

Bahr, G.F. 1971. "Separation of X-and Y-bearing spermatozoa by gravity: A reconsideration". pp. 28-37. In A symposium: sex ratio at birth-pros-pects for control. **American Society of Animal Science.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beal, W.E., White, L.E. and Garner, D.L. 1984. "Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient". **J. Anim. Sci.** 58: 1432-1436.

Bearden, H.J. and Fuquay, J.W. 1992. **Applied animal reproduction.** Newjersey: Prentice-Hall

Bearden, H.J. and Fuquay. J.W. 2000. **Applied animal reproduction.** 5th ed. New jersey: Prentice-Hall, Inc.

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

Bedford, J.M. and Hoskins, D.D. 1990. "The mammalian spermatozoa: morphology, biochemistry and physiology". pp. 379-568. In Lamming G.E. **Marshall' Physiology of Reproduction.** London: Churchill living Stone

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

Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. 1993. "Sex preselection through albumin separation of sperm". **Fertil. Steril.** 59: 382-388.

Bennett, D. and Boyse, E.A. 1973. "Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum". **Nature.** 246: 308. -309.

Bibin, P.E., Lipshultz, L.T., Ward, W.B. and Legator, M.S. 1988. "Fluorescent body distribution in spermatozoa in the male with exclusively female offspring". **Fertil. Steril.** 49: 670-675.

Bollendorf, A., Check, J.H., Katsoff, D. and Lurie, D. 1994. "Comparision of direct swim-up, mini-percoll, and sephadex G 10 separation procedures". **Arch. Androl.** 32: 157-162.

Brandriff, B.F., Gordon, L.A., Haendel, S., Singer, S., Moore, D.H. and Gledhill, B.L. 1986. "Sex chromosome ratios determined by karyotypic analysis in albumin-isolated human sperm". **Fertil. Steril.** 46: 678-690.

Bredbacka,P., Kankaanpaa, A. and Peippo, J. 1995. "PCR-Sexing of embryos:A simplified protocol". **Theriogenology.** 44: 167-176.

Cartwright, R.J., Cowin, A. and Sharpe, P.T. 1991. "Surface heterogeneity of bovine sperm revealed by aqueous two-phase partition". **Biosci. Rep.** 11: 265-273.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cartwright, R.J., Harrington, P.M., Cowin, A. and Sharpe, P.T. 1993. "Separation of bovine X and Y sperm base on surface differences". **Mol. Reprod. Dev.** 34: 323-328.

Chaterjee, R.N. and Majumdar, A.C. 2000. "Enrichment of Y-bearing sperm using bovine serum aibumin column". **Indian J. Anim. Sci.** 70: 688-690.

Cran, D.G., Johnson, L.A. and Polge, C. 1995. "Sex preselection in cattle:a filed trial". **Vet. Rec.** 136: 495-496.

Cui, K.H. 1997. "Size difference between human X and y spermatozoa and prefertilization diagnosis: past, present and future". **Arch. Androl.** 40: 3-14.

Cui, KH. and Matthews, C.D. 1993. "X larger than Y". **Nature.** 366: 117-118.

De Vos, A., Nagy, Z.P., Van de Velde, H., Joris, H., Bocken, G. and Van Steirteghem, A. 1997. "Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection". **Hum. Reprod.** 12: 1980-1984.

Dineen, T., Nolan, A., Harrington, J., Greer, A., Kennedy, R. and Houghton, J.A. 1997. "Fluorescence in situ hybridization studies on the sex chromosome constitution of human sperm". **Arch. Androl.** 39: 217-222.

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

Engelmann, U., Rassrigg, F., Schatz, H. and Schill, W.B. 1988. "Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis". **Gamete Res.** 19: 151-159.

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

Ericsson, R.J. 1994. "Sex selection via albumin columns: 20 years of results". **Hum. Reprod.** 9: 1787-1788.

Evans, G., Jabbour, H.N., Windsor, D.P. and Wite, I.G. 1987. "Predetermination of sex lambs by segregation of X and Y spermatozoa on protein columns". **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.** 19: 12. -19.

Garner, D.L. and Hafes, E.S.E. 1980. "Spermatozoa". In Hasfes E.S.E. **Reproduction in Farm Animals.** Philadelphia: Lea and Eebiger.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Garner, D.L.and Hafes E.S.E. 1993. "Spermatozoa Seminal plasma". In Hasfes E.S.E. **Reproduction in Farm Animals.** Philadelphia: Lea and Eebiger.

Gellert, S.T., Clarke, G.N., Barker, H.G., Hyne, R.V. and Johnson, I.H. 1988. "Evaluation of nycodenz and percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa". **Fertil. Steril.** 42: 335-341.

Gledhill, B.L. 1985. "Selection and separation of X-and Y-chromosome-bearing mammalian sperm". **Gam. Res.** 20: 377-395.

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

Gordon, I. 1994. **Laboratory production of cattle embryo.** Singapore: Cab Internation.

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

Gramt. S.A., Long, S.E. and Parkinson, T.J. 1994. "Fertilizability and structural properties of spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation". **J. Reprod. Fertil.** 100: 477-483

Han, T.L., Ford, J.H., Webb, G.C., Flaherty, S.P., Correl, A. and Matthews, C.D. 1993a. "Simultaneous detection of X-and Y-bearing human sperm by double fluorescence *in situ* hybridization". **Mol. Reprod. Dev.** 34: 308-313.

Han, T.L., Ftaherty, S.P., Ford, J.H and Matthews, C.D. 1993b. "Detection of X and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up". **Fertil. Steril.** 60: 1046-1051.

Hochman, D., Zaron, Y., Dekel, I., Feldmesser, E., Meddrano, J.F., Shani, M. and Ron, M. 1996. "Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos". **Theriogenology.** 46: 1063-1075.

Hunter, R.H.F. 1995. Sex determination, differentiation and intersexuality in placenta mammals. London: Cambridge University.

Ishijima, S.A., Okuno, M., Odagiri, H., Mohri, T. and Mohri, H. 1992. "Separation of X- and y-chromosome-bearing Murine sperm by free-flow electophoresis: Evaluation of separation using PCR". **Zoological. Sci.** 9: 601-606.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น... ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishijima, S.E., Okuno, M., Nahori, Y., Seki, S., Kaneko, S. and Mohri, H. 1992. "Identification of X-and Y-chromosome bearing sperm separated by free-flow electrophoresis using Y-specific polymerase chain reaction". **Biomed. Res.** 13: 221-224.

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

Johnson, L.A. 1991. "Sex preselection in swine : altered sex ratio in offspring following surgical insemination of flow sorted X-and Y-bearing sperm". **Reprod. Dom. Anim.** 26: 309-314.

Johnson, L.A. 1992. "Recent progress in preselection of swine for sex". **Pig news and Information.** 13: 63-65.

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

Johnson, L.A. 2000. "Sexing mammalian sperm for production of offspring: The state of the art". **Anim. Reprod. Sci.** 60-61:93-107.

Johnson, LA. and Clarke, R.N. 1988. "Flow sorting of X and Y chromosome bearing mammalian sperm: ativatte and pronuclear development of sorted bull, boar and ram sperm microinjected into hamster oocytes". **Gamete Res.** 21:335-343.

Johnson, LA and Welch, G.R. 1999. " Sex preselection : High speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for mazimum efficiency ". **Theriogenology.** 52: 1323-1341.

Johnson, LA., and Hawk, H.W. 1989. "Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting". **Biol. Reprod.** 41: 199-203.

Johnson, LA and Look M.V. 1987. "Flow cytometry of X and y chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 333420". **Gamete. Res.** 17: 203-212.

Johnson, LA Oshio, S., Kobayashi, K., Mohri, H. and Lizuka, R. 1986. "Purification of human sperm by a discontrinuous percoll density gradient with an innercolum". **Bio. Reprod.** 35: 1059-1063.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ทั้งนี้ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Johnson, LA. Kobayashi, T., Morhi, H. and Iizuka, R. 1984. "Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in percoll density gradient". **Biomed. Res.** 5: 197-194.

Kaiser, R., Broer, K.H., Citoler, P. and Leister, B. 1974. "Penetration of spermatozoa with Y chromosome in cervical mucus by an *in vitro* test". **Geburtshife Frauenheilkd.** 34: 426-430.

Kawarasaki, T., Sone, M., Yoshida, M. and Bamba, K. 1996. "Repid and simultaneous detection of chromosome Y-and X -bearing procrine spermatozoa by fluorescence in situ hybridization". **Mol. Reprod. Dev.** 43: 548-553.

Kawarasaki, T. Kohsaka, T., Some, M., Yoshida, M. and Bamba. K. 1995. "Detection of Y-bearing procrine sperrmatozoa by *in situ* hybridization using digoxigenin-lacled, procrine male specific DNA probe produced by polymerase chain reaction". **Mol. Reprod. Dev.** 40: 455-459.

Kaneko, S., Sato, H., Kobanawa, K., Oshio, S., Kobayashi, T. and Iizuka, R. 1987. "Continuous step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen". **Arch. Androl.** 19: 75-84.

Kaneko, S. Yamaguchi, J., Kobayashi, T. and Izuka, R. 1983. "Separation of human X-and Y-bearing sperm using percoll density gradient centrifugation". **Fertil. Steril.** 40: 661-669.

Kaneko. J., Oshio, S., Kobayashi, K., Mohri, H. and Lizuka, R. 1986. "Purification of human sperm by a discontrinuous percoll density gradient with an innercolum". **Bio. Reprod.** 35: 1059-1063.

Kobayashi,O. J., Uchida, H.H., Kohsaka, T., Sasada, H. and Sato, E. 2004. "Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization." **J. Reprod** . 50(4):463-9.

Kovanci, E., Kovacs, T., Moretti, E., Vigue, L., Bray-Ward, P., Ward, D.C. and Huszar, G. 2001. "FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention". **Human Reprod.** 16: 1209-1271.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin, S-P., Lee, R.K-K., Tsai, Y.-J., Hwu, Y.-M. and Lin, M.-H. 1998. "Separating X-bearing human spermatozoa through a discotinous percoll density gradient proved to be inefficient

by double-label fluorescent in situ hybridization". **J. Assist. Reprod. Genet.** 15: 565-569.

Mann, T. 1969. "Physiology of semen and of the male reproduction tract". pp. 277-312. In Cole, H.H. and Cupps, P.T. **Reproductive in Domestic Animals.** New York: Acad. Press Ltd.

Mc Clure, R.D., Nunes, L. and Tom, R. 1989. "Semen manipultion : improved sperm recovery and function with a two layer percoll gradient". **Fertil. Steril.** 51: 874-877.

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

Mitchell, J.R. and Doak, G.A. 2004. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle.** New jersey: Upper Saddle River.

Morhi, H., Oshio, S., Kaneko, S., Kobayashi, T. and Iizuka, R. 1987. "Separation characterization of mammalian X-and Y-bearing sperm". pp. 469-481. In Mohri, H. **New horizon in sperm cell research.** Boston: Gordon and Breach Sci Publ.

Moruzzi, J.F. 1979. "Selection and mammalian species for the separation of X and Y chromosome-bearing spermatozoa". **J. Reprod. Fertil.** 57: 319-328.

Nalbandov, A.V. 1976. **Reproductive Physiology of Mammal and Birds.** San Francisco: W.H. Freeman and company.

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

Othani, S., Yamagawa, H., Nishida, S., Matsumoto, T., Nagashima, H., Konou, Y. and Ogawa, S. 1988. "Application of F- body test and percoll density gradient centrifugation in separation boar X- and Y-bearing spermatozoa". **Jap. J. Anim. Reprod.** 25: 147-152.

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

Pertoft, H. 2000. "Fraction of cells and subcellular particles with Percoll". **J. Biochem. Biophys. Methods.** 44: 1-30.

Pickering, S.J., Braude, T.P., Bolton, V.N. and Gresham, G.A.G. 1989. "Are human spermatozoa separated on a percoll density gradient safe for therapeutic use". **Fertil. Steril.** 51: 1024-1029.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Saad, A. and Guerin, J.F. 1992. "Movement characteristics of human spermatozoa collected from different layers of a discontinuous Percoll gradient". **Andrologia.** 24: 149-153.

Sarker, S., Jolly, D.J., Firedman, T. and Jones, O.W. 1984. "Phisiology of X and Y human sperm". **Differentiation.** 27: 120-125.

Salisbury, G.W., van Demark, N.L. and Lodge, J.R. 1978. **Phisiology of reproduction and artificial insemination of cattle.** San Francisco: Freeman and Company.

Schilling, E. 1971. "Sedimentation and approach to the problem of separation X- and Y-chromosome bearing spermatozoa". pp. 76-84. In A symposium: sex ratio at birth prospect for control. **Amer. Soc. Anim. Sci.**

Shea, B.F. 1999. "Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction resuls : A six-year retrospective study". **Theriogenology.** 51: 841-854.

Shau-Ping Lin, Robert Kuo-Kuang Lee,Yuan-Jang Tsai,Yuh-Ming Hwu, and Ming-Huei Lin. 1994. "Discontinuous percoll gradient enrich X-beaaring human spermatozoa : a study using double-label fluorescence in situ hybridization". **Hum. Reprod.** 9: 1265-1270.

Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N. 1990. "A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif". **Nature.** 364: 240-244.

Sumner, A.T., Robinson, J.A. and Evans, H.J. 1971. "Distinguishing between X,Y and YY bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content". Nature. 229: 231-233.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้

Van Kooji, R.J. and Van Oost, B.A. 1992. "Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining: a comparison". **Fertil. Steril.** 58: 384-386.

Van munster, E.B., Stap, J., Hoebe, R.A., Te Meerman, G.J. and Aten, J.A. 1999. "Difference in sperm head volume as a thepretical basis for sorting X-and Y-Bearing spermatozoa: potential and limitations". **Theriogcnology.** 52: 1281-1293.

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

Watkins, A.M., Chan, P.J., Patton, W.C., Jacobson, J.D. and King, A. 1996. "Sperm kinetics and morphology before and after fractionation on discontinuous percoll gradient for sex preselection : computerized analyses". **Arch. Androl.** 37: 1-5.

Welch, G.R. and Johnson, L.A. 1999. "Sex preselection : laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X-and Y-sperm by sort reanalysis for DNA". **Theriogenology.** 52: 1343-1352.

White, I.G. 1974. "Mammalian semen" pp. 101-122. In Hafes, E.S.E. **Reproductive in farm animals.** Philadelphia: Lea and Eebiger.

White, K.L. 1989. "Embryo and gamete sex selection". In Babiuk, L.A. and Phillips, J.B. **Animal Biotechnology.** Oxford: Pergamon Press.

Wilson, K. and Walker, J.M. 1994. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry.** London: Cambridgge University.

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

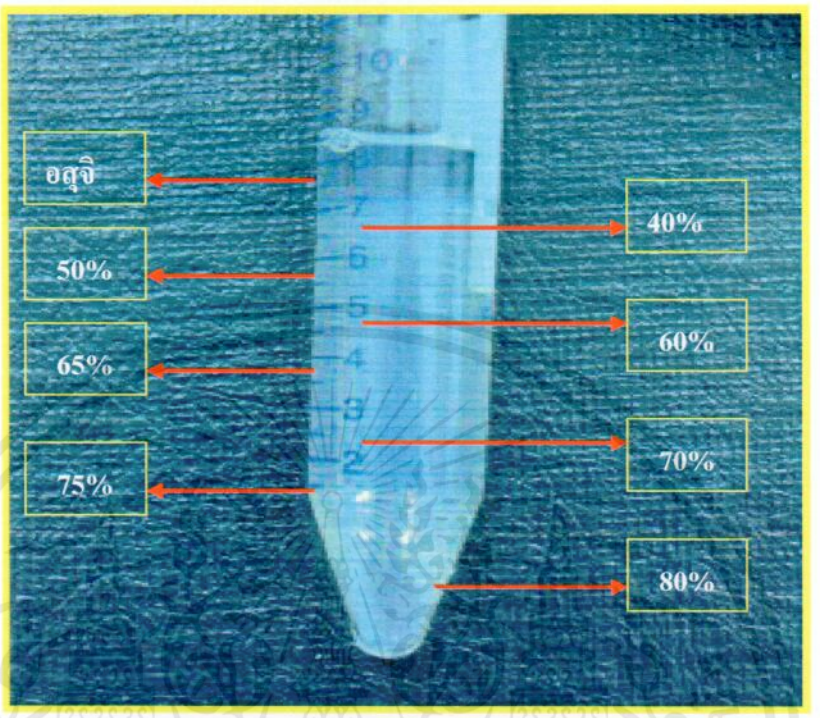
Yao, Y.Q., Ng, V., Yueng, W.S.B. and Ho, P,C. 1996. "Profiles of sperm morphology and motility after discontinuous multiple-step Percoll density gradient centrifugation". **Andrologia.** 28: 127-131.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

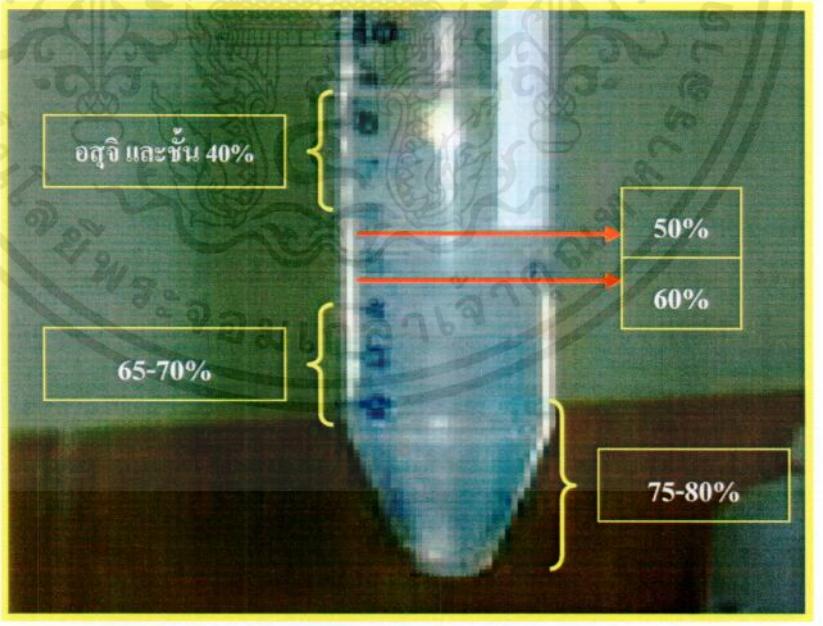
ภาคผนวก ก
ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ระดับชั้นของความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์



ภาพผนวกที่ ก1 ก่อนการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อ

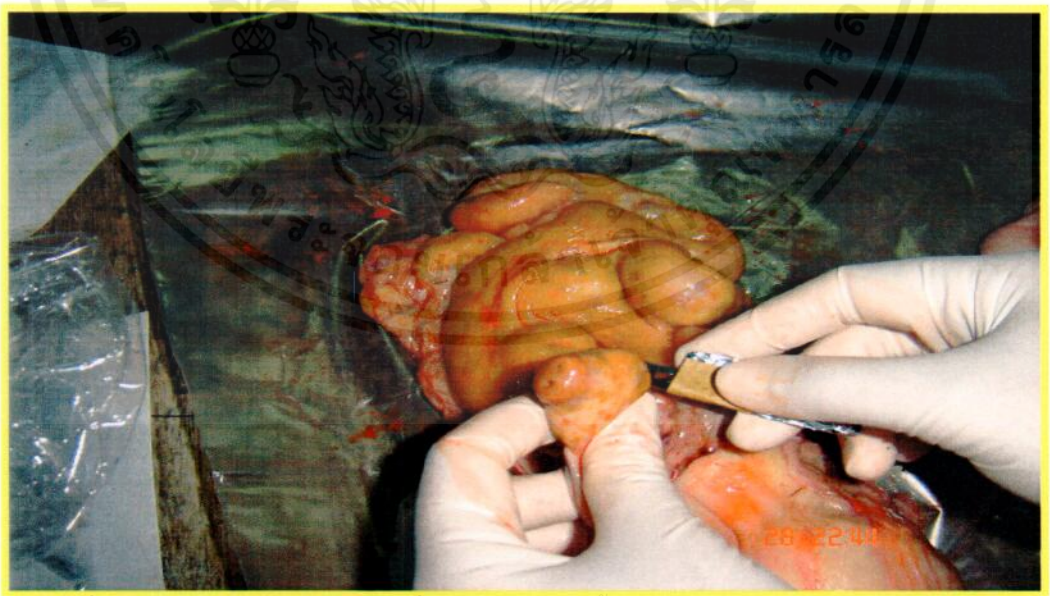


ภาพผนวกที่ ก 2 หลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

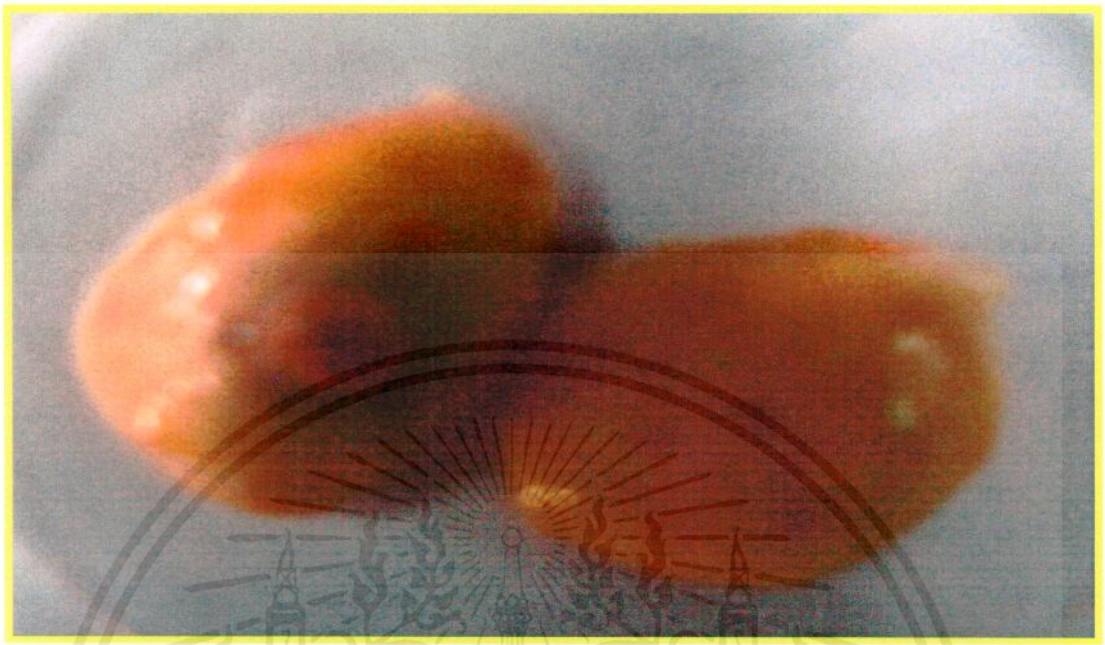
2. การเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์

ภาพผนวกที่ ก 3 อวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศเมียที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์



ภาพผนวกที่ ก 4 ขั้นตอนการเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

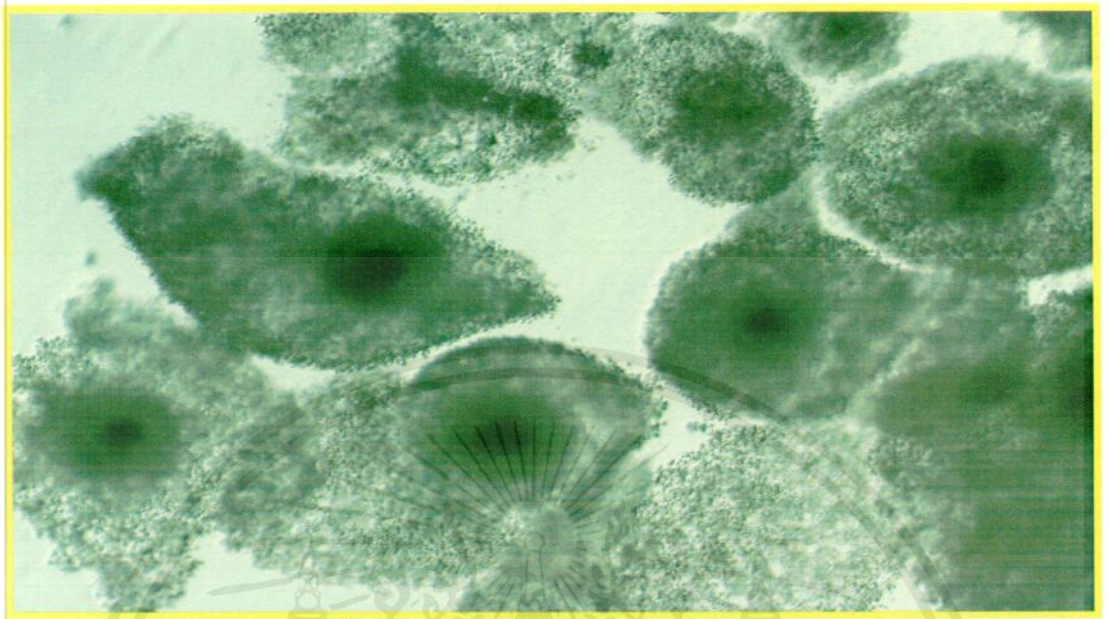


ภาพผนวกที่ ก 5 รังไข่ของโคที่ห้องปฏิบัติการ

3. ลักษณะของเซลล์ไข่

ภาพผนวกที่ ก 6 เซลล์ไข่ที่ได้ทำการคัดเลือกคุณภาพแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

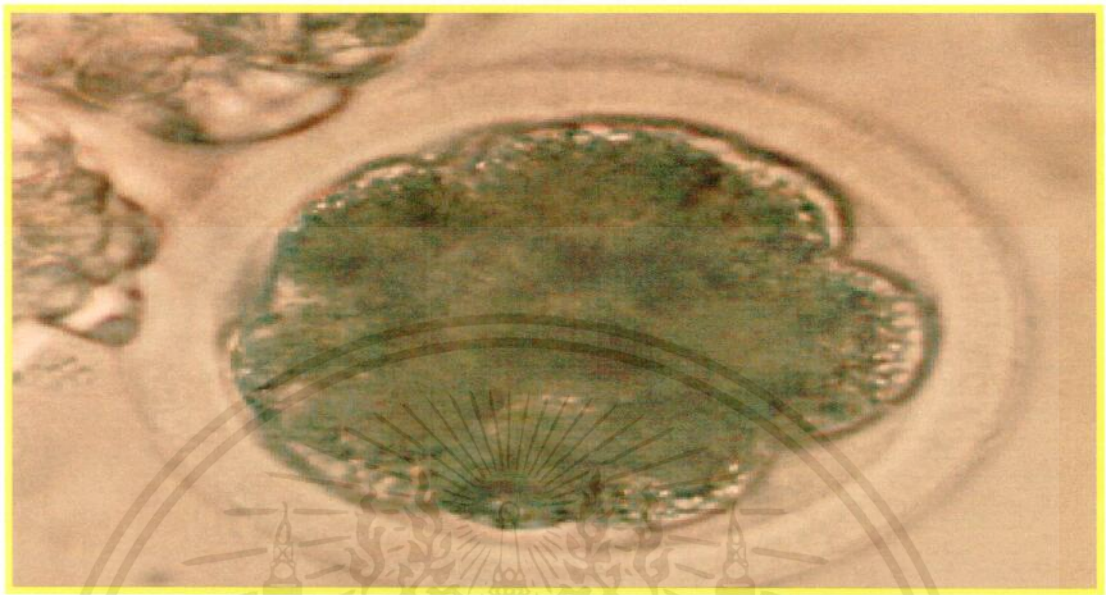


ภาพผนวกที่ ก 7 เซลล์ไข่ที่มีความสมบูรณ์พร้อมในการปฏิสนธิ

4. ระยะของตัวอ่อน

ภาพผนวกที่ ก 8 ตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์ (cleavage stage)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ก 9 ตัวอ่อนระยะ 16 เซลล์

ภาพผนวกที่ ก 10 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) Pasteur pipette
2) กล้อง stereo microscope
3) กล้อง inverted
4) ตู้ Laminar flow
5) ตู้เลี้ยงเซลล์ CO_2
6) เครื่องปั่นเหวี่ยง
7) 4-well dish
8) จานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 mm
9) จานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 mm
10) Conical tube ขนาด 15 ml
11) Conical tube ขนาด 5 ml
12) Conical tube ขนาด 50 ml
13) Stirrer
14) เข็มขนาด 21G และ 18G และกระบอกฉีดยาขนาด 20 ml และ 50 ml
15) กระบอกฉีดยาอินซูลินขนาด 1 ml พร้อมเข็ม
16) Water bath
17) แผ่นกรองที่มีขนาด Pore size เท่ากับ 0.2 μm
18) Makler counting chamber
19) สไลด์ และ coverglass
20) ยาทาเล็บ
21) หลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตร
22) ถังไนโตรเจนเหลว
23) บิกเกอร์
24) ตู้ เย็น 4°C
25) ตู้ เย็น -20°C
26) mineral oil สำเร็จรูป sigma
27) สี Eosin 1 %
28) Nigrosin 10 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารเคมีที่ใช้ในการแยกเพศอสุจิ

Percoll®

คุณสมบัติทางกายภาพ:

Composition	silica sol with nondialyzable polyvinyl lpyrrolidone (PVP) coaxing
Density	1.130±0.005 g/ml
Conductivity	1.0 mS/cm

ทริส บัฟเพอร์

1)	Tris	38.28 g
2)	Citric Acid	17.00 g
3)	Fructose	12.50 g
4)	น้ำกลั่น	920 ml
5)	Glycerol	30 cc
6)	ไข่แดง	250 ml
7)	Penicillin G	0.8 g
8)	Streptomycin	4.0 g

วิธีการเตรียม

1. นำสารไปต้มอุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง pH 6.5-6.7 (Adjust with Citric Acid)
2. คนให้เข้ากันเก็บในตู้เย็นได้ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C
3. ข้อ 6,7,8, ให้ผสมในวันทำเชื้อเท่านั้น

Quinacrine staining

1)	Quinacrine mustard	2.5 mg
2)	Macllvaine's buffer	50 ml

Macllvaine's buffer เตรียมจาก ทำเป็น 2 Solution

1. Solution A 0.1 M Citric Acid (Citric Acid 21.015 g / น้ำกลั่น 1000 ml)
2. Solution B 0.2 M disodium phosphate (Na_2HPO_4 14..196g / น้ำกลั่น 500 ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ตวง Solution B 453.7 ml ลงในขวดขนาด 1L
4. ตวง Solution A 86.3 ml ลงในขวดข้อที่ 3
5. จากนั้นปรับให้เป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Quinacrine mustard ตามปริมาณที่กำหนดใส่ใน coplin jar
2. ตวง McIlvaine's buffer 50 ml ลงใน coplin jar ในข้อ1
3. เก็บในที่มืดและอุณหภูมิ 37 °C(ต้องใช้วันต่อวัน)

Trypsin (sigma)

1. แบ่งใส่ตู้เย็นลบ -20°C
2. ก่อนใช้ให้นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C

cranoy's fixative

1) Absolute methanol
2) Acetic acid

วิธีการเตรียม

1. ตวง Absolute methanol ลงในกระบอกตวง 30 ml
2. ตวง Acetic acid ลงในกระบอกตวงข้อที่ 1 10 ml
3. จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากัน เทใส่ coplin jar ปิดฝาแล้วแช่ตู้เย็น 4 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารที่ใช้ในการทำการปฏิสนธินอกร่างกายของโค

PBS (-)

1)	NaCl	10 g
2)	KCl	0.2500 g
3)	Na_2HPO_4	1.4400 g
4)	KH_2PO_4	0.2500 g
5)	Ultra pure water	1 L

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนด แล้วเทใส่ใน volumetric flask
2. เติม ultra pure water ให้ครบปริมาตรที่ต้องการ แล้วกวนให้เข้ากันด้วย stirrer
3. แบ่งใส่ขวดขนาด 100 ml. แล้วนำไป autoclave
4. เก็บที่อุณหภูมิห้อง ได้นาน 6 เดือน

(m DPBS)

1)	NaCl	4 g
2)	KCl	0.1000 g
3)	KH_2PO_4	0.1000 g
4)	Na_2HPO_4	0.5750 g
5)	Glucose	0.5000 g
6)	Pyruvic acid	0.0180 g
7)	$CaCl_2.2H_2O$	0.0687 g
8)	$MgCl_2.6H_2O$	0.0500 g
9)	P/S (stock 100x)	500 µl
10)	Ultra pure water	500 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-6 เทใส่ volumetric flask แล้วเติม ultra pure water ลงไปใน volumetric flaskประมาณ 200 ml แล้วแกว่ง volumetric flask ให้สารเข้ากัน
2. ชั่งสารในข้อ 7-8 เทใส่บีคเกอร์ขนาด 200 ml แล้วเติม ultra pure water ประมาณ 50 ml แกว่งบีคเกอร์ให้สารละลายเข้ากันดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เทสารในข้อ 2 ใส่ลงใน volumetric flask ในข้อ 1 ควรรินช้าๆ โดยรินผ่านแท่งแก้วใส่ลงใน volumetric flask ถ้ารินเร็วเกินไป สารจะตกตะกอน ใช้ไม่ได้ จากนั้นเติม ultra pure water ให้ได้ 500 ml
4. นำไปกวนด้วย stirrer ด้วยความเร็วปานกลาง ให้สารใสเป็นเนื้อเดียวกัน
5. ปิเปต P/S stock 500 µl เติมไปใน volumetric flask ในข้อ 4 จากนั้น กวนให้เข้ากัน
6. เก็บที่ 4°C ได้นาน 3 เดือน

P-S (Stock 100x)

1.	Penicillin G	0.6000g
2.	Streptomycin	1 g
3.	PBS(-)	10 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Penicillin G และ Streptomycin ตามปริมาณที่กำหนด
2. นำมาผสมกับ PBS (-) ในกระบอกตวง ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำ – หงาย กระบอกตวงช้าๆ
3. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm แล้วปิเปตใส่ หลอด eppendorf 100 µl/ หลอดและ 500 µl/ หลอด
4. เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 6 เดือน

M -TCM199

1)	TCM199 powder	0.9990 g
2)	Na pyruvate	0.0056 g
3)	$NaHCO_3$	0.2200 g
4)	Ultra pure water	100 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสาร 199 และ Na pyruvate ตามปริมาณที่กำหนด
2. เท Ultra pure water ใส่ลงในกระบอกตวงเล็กน้อยเพื่อกันมิให้ผง 199 จับกันเป็นก้อน
3. เทสารที่ชั่งทั้งสองชนิดลงในกระบอกตวงแล้วฉีดน้ำบนกระดาษล้างมิให้สารตกค้าง
4. ชั่ง $NaHCO_3$ ตามปริมาณที่กำหนดแล้วเทลงในกระบอกตวงและปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วย Ultra pure water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น รวมทั้งห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปเผยแพร่ต่อ ไม่ว่าในรูปแบบใดๆ

5. ใส่แท่งแม่เหล็กแล้วนำไปกวนให้เข้ากันด้วย Stirrer
6. เก็บที่ 4 องศา ได้นาน 1 สัปดาห์
7.

0.2 Hyaluronidase

1) Hyaluronidase	0.1000 g
2) PVP	0.0500 g
3) m DPBS	50 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Hyaluronidase และ PVP ตามปริมาณที่กำหนด
2. เทสารทั้งสองชนิดลงในกระบอกตวงที่มี m DPBS อยู่ 30 ml กวนให้เข้ากันด้วย stirrer
3. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm
4. แล้วปิเปตใส่ หลอด eppendorf 1000 μl
5. เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 3 เดือน

HCG Stock

1) HCG	5,000 i.u
2) 199 working	1 ml

วิธีการเตรียม

1. เปิดฝาขวด HCG 1 ml ออก ระวังอย่าให้สารกระเด็นออกมา
2. ปิเปตน้ำยา 199 ใส่ในขวด HCG ในข้อ 1แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลงช้าๆ หลายๆ ครั้ง แล้วแบ่งใส่ หลอด eppendorf หลอดละ 100 μl
3. เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 6 เดือน

FSH Stock

1) FSH	10 AU.
2) 199 working	2.5 ml

วิธีการเตรียม

1. เปิดฝาขวด FSH ปิเปตน้ำยา 199 ใส่ในขวดแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้น-ลงช้าๆ หลายๆ ครั้ง
2. แบ่งใส่ หลอด eppendorf หลอดละ 50 μl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบข้อความนี้ออก และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 6 เดือน

E2 Stock

1) E2 Powder	0.0050 g
2) AB-Et-OH	5 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสาร E2 Powder ตามปริมาณที่กำหนดเทใส่ conical tube
2. ปิเปต AB-Et-OH 5 ml ใส่ conical tube ในข้อ 1
3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex แล้วแบ่งใส่ หลอด eppendorf หลอดละ 1 ml
4. เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 6 เดือน

IVM medium สำหรับโค

1) TCM199	8.8400 ml
2) FBS	1 ml
3) HCG Stock	100 µl
4) FSH Stock	50 µl
5) E2 Stock	10 µl
6) P-S (Stock)	10 µl

วิธีการเตรียม

1. ผสมสารในข้อ 1-6 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm
3. เก็บไว้ที่ 4°C ได้นาน 1 สัปดาห์

mSOF (stock 10X)

1) NaCl	6.2940 g
2) KCl	0.5340 g
3) KH_2PO_4	0.1620 g
4) $CaCl_2.2H_2O$	0.2514 g
5) $MgCl_2.6H_2O$	0.0996 g
6) Phennol red	500 µl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) Ultra pure water 500 ml

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง NaCl, KCl, KH_2PO_4 ตามปริมาณที่กำหนด แล้วเทใส่กระบอกตวง ขนาด100 ml
2. เติม Ultra pure water ประมาณ 50 ml
3. เติม Phennol red แล้วคนให้เข้ากัน
4. ชั่ง $CaCl_2.2H_2O$, $MgCl_2.6H_2O$ ใส่ในบิกเกอร์ขนาด 50 ml ต่างหากเติม Ultra pure water ประมาณ 20 ml แล้วคนให้เข้ากัน
5. นำสารที่เตรียมในข้อ 4 มาค่อยๆ รินใส่กระบอกตวงในข้อ 1 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วย Ultra pure water
6. เก็บไว้ที่ 4°C ได้นาน 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกรกนก พรหมเทพ
สถานที่เกิด	จังหวัด ชุมพร
ที่อยู่ปัจจุบัน	53 ซ. โรงไหม ถ.เจ้าฟ้า บางลำพู พระนคร กรุงเทพฯ 10200 โทร.087-773-5332 Email: koongkanok@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	2543 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขามลพิษสิ่งแวดล้อม จากภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต 2552 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิจัย	ตีพิมพ์งานวิจัย "ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิ โดหลังการแยกเพศโดยการ ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์" .ในงาน **(The 13th AAAP Animal Science Congress, Hanoi Vietnam 2008)** และงานประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้