

การพัฒนาเทคนิคมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ที่มีความแม่นยำสูง สำหรับประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคนม

Development of High Accuracy Multiplex Real-time PCR Technique for Determining Sperm Sex Ratio in Dairy Bull Semen

ทฤษฎี คำหล่อ^{1*} กรวรรณ ศรีงาม¹ ศุภมิตร เมฆฉาย¹
วัชรพงศ์ นรพัลลภ¹ และ นิภา ไชคส์จจะวาที²
Trisadee Khamlor^{1*}, Korawan Sringam¹, Supamit Mekchay¹,
Watcharapong Naraballoh¹ and Nipa Chokesajjawatee²

¹ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จ. ปทุมธานี 12120

²National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency,
Pathum Thani 12120, Thailand

*Corresponding author: Email: trisadee.kha@gmail.com

(Received: 29 September 2020; Accepted: 17 December 2020)

Abstract: Sperm sex ratio determination using PCR - based technique is widely validated on precise of X - and Y - chromosome purity in sex - sorted bovine semen. The aim of this study was to develop a technique for estimating sperm sex ratio by using a multiplex polymerase chain reaction (multiplex real - time PCR). The X and Y chromosome - specific markers, bovine proteolipid protein (*PLP*) gene and sex - determining region Y (*SRY*), were simultaneously quantified in a single tube. To quantify DNA products, Taqman probe - labeled fluorescence was used in the reaction i.e., *PLP* probe labeled HEX dye, and *SRY* probe labeled FAM dye. The reference DNA of male peripheral white blood cell (WBC) was used as a template for constructing the standard curve, which contained an equal ratio between X - chromosome and Y - chromosome. The standard curve of both *PLP* and *SRY* genes showed two linear equations for calculating the proportion of X - and Y - sperm ratio. The WBC standard curve indicated an average straight - line slope as -3.330, representing high - efficiency (99.66 %) of the reaction to synthesize new DNA amplicons. Nine samples of bull semen, Y - sorted semen (Y = 90 %), semen samples with Y ratio in 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, and X - sorted semen (Y = 10 %), were prepared and quantified by using the multiplex real - time PCR technique. Two standard techniques (singleplex real - time PCR technique and multiplex droplet digital PCR technique (ddPCR)) were amplified X - and Y - chromosome specific genes and compared with the developed technique. Each sample was run in triplicate and calculated in percentage of Y

sperm ratio. Results obtained from those three assays were not significantly different. Therefore, the multiplex real - time PCR assay in this study was cost - effective, reduce time - consuming, and providing an accurate estimation method.

Keywords: Dairy bull semen, sperm sex ratio, sex - sorted sperm, multiplex real - time PCR

บทคัดย่อ: การประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิด้วยเทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการประเมินความบริสุทธิ์ของสัดส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y ในน้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการประมาณอัตราส่วนเพศของอสุจิ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์ (multiplex real - time PCR) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจพร้อมกันในหลอดเดียวด้วยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน proteolipid protein (PLP) บนโครโมโซม X และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน sex - determining region Y (SRY) บนโครโมโซม Y แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์เส้นใหม่ด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ติดที่โพรบ (Taqman) โดยโพรบของยีน PLP ติดสี HEX และโพรบของยีน SRY ติดสี FAM และใช้ดีเอ็นเออ้างอิงจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ ซึ่งมีอัตราส่วนของโครโมโซม X และโครโมโซม Y ที่เท่ากัน สร้างเป็นกราฟเส้นตรงมาตรฐาน จากการศึกษาได้กราฟเส้นตรงมาตรฐานของยีน PLP และ ยีน SRY แสดงสมการเชิงเส้นสองสมการสำหรับคำนวณอัตราส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y โดยมีค่าความชันเฉลี่ยของกราฟเส้นตรงทั้งสองเท่ากับ -3.330 แสดงถึงปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ (ร้อยละ 99.66) ทดสอบความแม่นยำของการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR ในตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคนมจำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำเชื้อคัดเพศผู้มีอสุจิ Y ร้อยละ 90 ตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีอสุจิ Y สัดส่วนร้อยละ 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 และตัวอย่างน้ำเชื้อคัดเพศเมียมีอสุจิ Y ร้อยละ 10 ตามลำดับ เปรียบเทียบผลการคำนวณสัดส่วนอสุจิด้วยเทคนิคมาตรฐานสองเทคนิคคือ ซิงเกิลเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์แบบแยกหลอด (singleplex real - time PCR) และเทคนิคมัลติเพล็กซ์ดรอปเล็ตดิจิทัลพีซีอาร์ (multiplex droplet digital PCR) ซึ่งแต่ละตัวอย่างถูกทดสอบจำนวนสามซ้ำ แสดงผลการคำนวณเป็นร้อยละของอสุจิ Y จากการเปรียบเทียบผลการประมาณอัตราส่วนเพศอสุจิ พบว่า ทั้งสามเทคนิคสามารถคำนวณสัดส่วนเพศได้ถูกต้องใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ทราบค่าที่เตรียมไว้และได้ผลการคำนวณสัดส่วนของอสุจิ Y ใกล้เคียงกันทั้งหมด โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังนั้น เทคนิค multiplex real - time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้จึงคุ้มค่า ประหยัดเวลา และให้ผลการประเมินสัดส่วนเพศที่แม่นยำ

คำสำคัญ: น้ำเชื้อโคนม สัดส่วนเพศอสุจิ การคัดแยกเพศอสุจิ มัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์

คำนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมหรือธุรกิจฟาร์มโคนมต้องการลูกโคเพศเมีย เพื่อเลี้ยงเป็นโคสาวทดแทนฝูงและเป็นแม่โคสำหรับผลิตน้ำนม หากสามารถเพิ่มสัดส่วนลูกโคนมเพศเมียให้มีจำนวนมากกว่าลูกโคเพศผู้ได้ ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพการผลิตและมีโอกาสผลิตน้ำนมดิบในฟาร์มได้มากขึ้นตามลำดับ น้ำเชื้อจากพ่อโคเป็นตัวกำหนดเพศของลูกสัตว์

เนื่องจากอสุจิ X (เพศเมีย) และอสุจิ Y (เพศผู้) รวมกันในสัดส่วนร้อยละ 50 : 50 ปัจจุบันการผลิตลูกโคเพศเมียสามารถทำได้ด้วยการใช้น้ำเชื้อคัดแยกเพศผสมเทียมในแม่โคนม น้ำเชื้อที่ผ่านการแยกเพศดังกล่าวสามารถเพิ่มโอกาสได้ลูกโคเพศเมียมากกว่าร้อยละ 90 ขณะที่น้ำเชื้อปกติไม่ผ่านการคัดแยกเพศให้สัดส่วนลูกโคเพศเมียต่อเพศผู้ในสัดส่วนเท่ากัน งานวิจัยหลายงานที่ผ่านมาศึกษาวิธีการแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ออกจากกัน เช่น การคัดแยกเพศอสุจิโดยใช้ความแตกต่าง

ของแอนติเจนบนผิวเซลล์เพศผู้ (H - Y antigen) ใช้การทำงานของปฏิกิริยาไซโตทอกซิก (cytotoxic reaction) ทำลายเซลล์อสุจิ Y (Goldberg *et al.*, 1971) การเกาะกลุ่มกันตกตะกอนของเซลล์อสุจิ โดยอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์ (agglutination) (Blecher *et al.*, 1999) การใช้สารละลายโปรตีนอัลบูมิน (Ericsson *et al.*, 1973) และสาร percoll ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (Iwasaki *et al.*, 1988) การแยกเพศอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักอสุจิทั้งสอง ซึ่งอสุจิ X มีน้ำหนักของดีเอ็นเอมากกว่าร้อยละ 3.8 ทำให้มีการเคลื่อนที่แตกต่างกัน สามารถแยกชั้นอสุจิที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าออกมาได้ (swim - up technique) (Claassens *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 2009; Madrid-Bury *et al.*, 2003) รวมถึงการใช้เทคนิคโฟลไซโต-เมทรี (flow cytometry) เป็นเทคนิคการแยกอสุจิด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่ต่างกัน ได้ความบริสุทธิ์ของเพศอสุจิสูงถึงร้อยละ 90 (Garner *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1989; Maxwell *et al.*, 2004)

อย่างไรก็ตาม น้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านกระบวนการคัดเพศ มักถูกนำมาประเมินสัดส่วนเพศอสุจิที่เปลี่ยนไป การประเมินสัดส่วนเพศเป็นขั้นตอนที่สำคัญสามารถช่วยยืนยันความสำเร็จของการคัดแยกเพศก่อนนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมในภาคสนาม โดยการศึกษาที่ผ่านมาได้พัฒนานิ่ววิธีการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อคัดเพศด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การย้อมสีโครโมโซมเพศด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ หรือ fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นวิธีการตรวจวัดที่มีความแม่นยำสูงสำหรับการระบุเพศของตัวอสุจิตัวเดียว (single spermatozoa) โดยอสุจิถูกย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ และนำไปตรวจทดสอบสัญญาณสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Habermann *et al.*, 2005; Piume *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2006) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำในการระบุเพศสูงมากกว่าร้อยละ 99 เมื่อใช้จำนวนอสุจิหลายหมื่นตัวในการทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลาทดสอบนาน สิ้นเปลืองสารเคมีและแรงงาน จึงเป็นข้อจำกัดหากมีตัวอย่างในการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก

การประเมินสัดส่วนเพศด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคการตรวจดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศของอสุจิ โดยแยกอสุจิเป็นตัวเดี่ยวเพียง 1 ตัว (single sperm) นำอสุจิแต่ละตัวมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเพศเมียที่อยู่บนโครโมโซม X และยีนที่จำเพาะต่อเพศผู้ที่อยู่บนโครโมโซม Y (Colley *et al.*, 2008, Welch *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม การประเมินสัดส่วนเพศด้วยวิธีการดังกล่าวต้องแยกอสุจิเดี่ยวเป็นจำนวนมากเพื่อเพิ่มความแม่นยำ และวิธีนี้ใช้เวลาทดสอบนาน 3 - 5 ชั่วโมง จึงทราบผล ทำให้เป็นข้อจำกัดของเทคนิค PCR หากมีตัวอย่างทดสอบจำนวนมาก

เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเรียลไทม์ (real - time PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ขยายปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบและอ่านผลในเวลาเดียวกัน ใช้ทดสอบตัวอย่างในเชิงปริมาณ การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบจะใช้สัญญาณสีฟลูออเรสเซนต์ในการส่งสัญญาณออกมา ตัวส่งสัญญาณสีที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ (1) สีเรืองแสงที่ไม่เฉพาะเจาะจง เช่น สีเขียวของสาร SYBR green ที่จับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ และ (2) โพรบติดสีที่จำเพาะต่อลำดับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยโพรบถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเรืองแสงและส่งสัญญาณแสงไปยังเครื่องรับสัญญาณที่สามารถจับสัญญาณดังกล่าวในแต่ละรอบได้ Joerg *et al.* (2004) ศึกษาการประเมินสัดส่วนเพศน้ำเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อยีน sex - determining region Y (SRY) ในเพศผู้และยีนควบคุมปฏิกิริยา (MSHR) และการศึกษาของ Parati *et al.* (2006) ใช้ไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อเพศเมีย ซึ่งอยู่บนโปรตีน proteolipid (PLP) และยีนที่จำเพาะต่อเพศผู้คือ ยีน SRY ในการศึกษาทั้งสองแบ่งดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการสกัดอสุจิออกเป็นสองส่วนเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้ 1 หลอด และเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอควบคุมเพื่อระบุความสำเร็จของปฏิกิริยา (หรือยีนที่จำเพาะต่อเพศเมีย) อีก 1 หลอด (singleplex real - time PCR) และใช้โพรบติดสีชนิดเดียวกันในการตรวจจับสัญญาณแสง ค่าที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้พลาสมิดเป็น

ค่าอ้างอิงมาตรฐาน ผลการทดสอบจากเทคนิค real-time PCR ไม่แตกต่างจากการตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometry วิธีการประเมินสัดส่วนเพศด้วยวิธีนี้มีความแม่นยำและให้ผลน่าเชื่อถือ และง่ายต่อการปฏิบัติ อย่างไรก็ตามการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิด้วยวิธีดังกล่าวยังมีความเสี่ยงจากข้อผิดพลาดได้ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอสุจิมิมีปริมาณน้อย และตัวควบคุมไม่ได้อยู่ในปฏิกิริยาที่สนใจในหลอดเดียวกัน ดังนั้น เพื่อลดความผิดพลาด ลดความซับซ้อนของการทดสอบและลดค่าใช้จ่ายของสารเคมี ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคนมที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศ โดยใช้เทคนิคมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์ (multiplex real-time PCR) รวมไพรเมอร์และโพรบของยีน *PLP* และยีน *SRY* อยู่ในหลอดเดียวกัน รวมถึงการใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้สร้างเป็นกราฟมาตรฐานทดแทนการใช้พลาสมิด

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้

เซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ 50 มิลลิกรัม ถูกล้างด้วยสารละลาย 1xPBS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของชุดสกัด wizard® genomic DNA purification kit (Promega, USA) โดยเติม 5 % (w/v) Chelex® 100 (Biorad, USA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร, proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Inc., USA) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 14 -16 ชั่วโมง จากนั้นเติม protein precipitation solution จากชุดสกัดดีเอ็นเอปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำหลอดตัวอย่างแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีน ใช้ปิเปตดูดเก็บเฉพาะ

สารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ จนเริ่มเห็นตะกอนดีเอ็นเอเป็นสายสีขาวคล้ายวุ้น นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ล้างด้วยเอทานอล (70 %) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นเอทานอลทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปผึ่งให้แห้ง แล้วเติมสารละลาย TE buffer (pH 8.0, Sigma-Aldrich, Inc., USA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และแช่เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR

การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PLP* บนโครโมโซม X และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *SRY* บนโครโมโซม Y ในโคนม (Parati *et al.*, 2006) โดยลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบแสดงใน Table 1 สารเคมีในการทำปฏิกิริยา (PCR mixture) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1) SensiFAST™ Probe (Bioline, UK) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 2) ไพรเมอร์จำเพาะต่อเพศเมีย (*PLP* - forward, *PLP* - reverse) อย่างละ 400 นาโนโมลาร์ และ โพรบ (*PLP* - probe) 200 นาโนโมลาร์ ติดสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดสี HEX, 3) ไพรเมอร์จำเพาะต่อเพศผู้ (*SRY*-forward, *SRY*-reverse) อย่างละ 400 นาโนโมลาร์ และ โพรบ (*SRY* - probe) 200 นาโนโมลาร์ ติดสีฟลูออเรสเซนต์ชนิดสี FAM (Integrated DNA Technologies, Inc., USA), 4) ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร และ 5) น้ำเปล่าเติมให้ครบปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง real-time PCR (MJ PTC-200 Chromo4, Bio-Rad, USA) ใช้โปรแกรม opticon monitor 3 ควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยา โดยมีรายละเอียดการทำปฏิกิริยาดังนี้: ขั้นที่ 1 denaturation: 95 °C 5 นาที ขั้นที่ 2 denaturation: 95 °C 15 วินาที annealing: 60 °C 45 วินาที extension: 72 °C 30 วินาที วนซ้ำจำนวน 40 รอบ โดยตั้งค่าให้อ่านผลจากสัญญาณแสงทุกรอบ ขั้นที่ 3 final extension: 72 °C 5 นาที

Table 1. Primer and probe sequences used in this experiment

Primer / Probe	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)
X chromosome - specific		96
PLP - forward	GTTGTGTTAGTTTCTGCTGTACAATAAAGTG	
PLP - reverse	GATGGCAGGTGAGGGTAGGA	
PLP - probe	HEX - TGTATACACATAGCCCCTCCCTCTTGGGA CC	
Y chromosome - specific		66
SRY - forward	CCACGTCAAGCGACCCAT	
SRY - reverse	AGAGCCACCTTTCGTCTTCG	
SRY - probe	FAM - AACGCCTTCATTGTGTGGTCTCGTGA	

การสร้างกราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้

ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอในการทดลองข้างต้น ถูกวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop1000 spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) เตรียมดีเอ็นเอเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มีความเข้มข้น 1,000, 200, 40, 8, 1.6 และ 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่างด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR รวมไพรเมอร์และไพร์มที่จำเพาะต่อยีน *PLP* และยีน *SRY* ในหลอดเดียว การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลลัพธ์เส้นใหม่ในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะแสดงผลด้วยการวัดค่าจากสัญญาณสี HEX และ FAM เมื่อลากเส้นตรง threshold line ตัดกราฟสัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ ได้ค่าคงที่ของรอบการเกิดปฏิกิริยา (cycle threshold; CT) ต่อค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอซึ่งเปลี่ยนเป็นค่าลอการิทึมฐาน 10 (log C) นำค่าคู่อันดับของ CT และ log C มากำหนดจุดได้ 6 จุดเรียงกันอยู่แนวเส้นตรง สร้างเป็นสมการเชิงเส้นสองตัวแปรคือ $Y = a + bX$ (เมื่อ Y คือค่า cycle threshold; CT, a คือค่าคงที่ของสมการเส้นตรง, b คือค่าความชันของกราฟเส้นตรง (slope), และ X คือค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอแสดงเป็นค่าลอการิทึมฐาน 10; log C) โดยสมการที่ได้จากยีน *PLP* ใช้สำหรับคำนวณสัดส่วนอสุจิ X และสมการที่ได้จากยีน *SRY* ใช้คำนวณสัดส่วน

อสุจิ Y ในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ยังไม่ทราบค่าในการทดลองต่อไป

การประเมินสัดส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อโคนมด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR

ตัวอย่างน้ำเชื้อที่นำมาทดสอบในการศึกษานี้เป็นน้ำเชื้อพ่อโคนมที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศอสุจิด้วยเทคนิค flow cytometry (Accelerated Genetics, Inc., WI, USA) โดยบริษัทผู้ผลิตระบุน้ำเชื้อคัดเพศเมีย (X - sorted semen) มีสัดส่วนของอสุจิ X มากกว่าร้อยละ 90 และน้ำเชื้อคัดเพศผู้ (Y - sorted semen) มีสัดส่วนของอสุจิ Y มากกว่าร้อยละ 90 ทำการสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อคัดเพศเมียและน้ำเชื้อคัดเพศผู้ โดยละลายน้ำเชื้อใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์อสุจิ นับจำนวนอสุจิของน้ำเชื้อคัดเพศเมีย และน้ำเชื้อคัดเพศผู้ให้มีจำนวนอสุจิ 250,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยเติม 5 % (w/v) Chelex[®] 100 (Biorad, USA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร, proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE, USA) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ dithiothreitol (DTT; Sigma - Aldrich, Inc., USA) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 14 -16 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนานประมาณ 10 นาที และปั่นเหวี่ยง 5 วินาที ดูดีเอ็นเอส่วนใสด้านบนมาวัด

ความเข้มข้นและปรับความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร และเตรียมให้มีสัดส่วน Y เท่ากับร้อยละ 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 และ 10 ตามลำดับ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR โดยแต่ละตัวอย่างถูกนำมาทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ค่า CT ที่ได้จากรอบสัญญาณสี ฟลูออเรสเซนซ์ของยีน *PLP* และยีน *SRY* นำมาแทนค่า Y ในสมการที่สร้างจากกราฟมาตรฐาน ได้ค่าความเข้มข้น $\log C$ ของอสุจิ X จากยีน *PLP* และความเข้มข้นอสุจิ Y จากยีน *SRY* ซึ่งเป็นค่าลอการิทึมฐาน 10 เมื่อคำนวณถอดค่าลอการิทึมฐาน 10 ได้ค่าคงที่ของความเข้มข้นยีน *PLP* (X) ค่าความเข้มข้นยีน *SRY* (Y) และผลรวมความเข้มข้นของทั้งสองยีน (X + Y) โดยในการศึกษานี้แสดงผลการคำนวณเป็นสัดส่วนวาย (% Y) จากสมการ $\%Y = \frac{Y}{(X+Y)} \times 100$ เมื่อ $\%X + \%Y = 100\%$ ทั้งนี้ ดีเอ็นเอจาก 9 ตัวอย่างข้างต้นถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ คือเทคนิค singleplex real - time PCR (ทดลอง 3 ซ้ำ) ตามวิธีการของ Parati *et al.* (2006) โดยการสร้างกราฟมาตรฐานจากพลาสมิด และเทคนิค multiplex droplet digital PCR (multiplex ddPCR) (ทดลอง 3 ซ้ำ) ดัดแปลงจากวิธีการของ Cray *et al.* (2020) เป็นวิธีการตรวจนับปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยตรงของแต่ละยีนโดยไม่ใช้กราฟมาตรฐาน จากนั้นนำผลที่คำนวณได้จาก 3 เทคนิค มาเปรียบเทียบความแม่นยำของสัดส่วนวาย (% Y)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนจากวิธีการประเมินสัดส่วนเพศทั้ง 3 วิธีการ ตามแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; Gomez and Gomez, 1984) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เปรียบเทียบความน่าเชื่อถือของแต่ละวิธีการที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิ

กราฟมาตรฐานหรือค่าอ้างอิงมาตรฐานในเทคนิค real - time PCR เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับใช้เปรียบเทียบและคำนวณค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่สนใจในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ในการศึกษานี้สร้างกราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ ซึ่งมียีน *PLP* และยีน *SRY* รวมกันอยู่ในสัดส่วนที่เท่ากันคือ 1 : 1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR (Figure 1A) และกราฟเส้นตรงมาตรฐานจากพลาสมิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR (Figure 1B) ตามการศึกษาของ Parati *et al.* (2006)

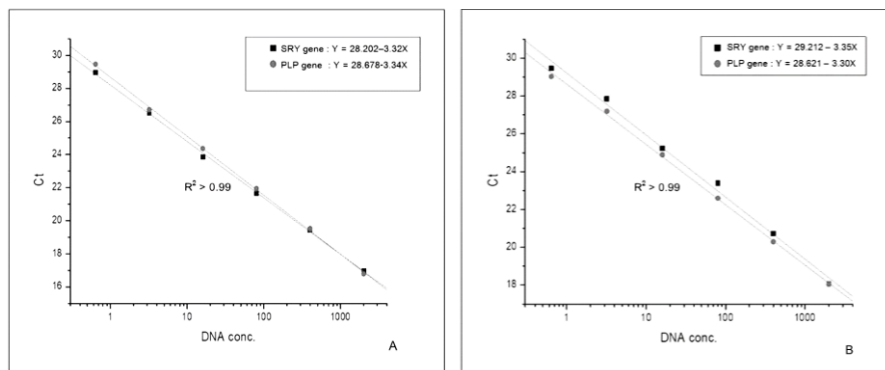


Figure 1. Standard curves and linear equations of *SRY* gene (■) and *PLP* gene (●) obtained from the multiplex real - time polymerase chain reaction assay (A) and the singleplex real - time polymerase chain reaction assay (B) showing relationship between cycle threshold (CT) and DNA copy number ($\log C$)

Figure 1A เป็นกราฟมาตรฐานเส้นตรง สร้างจากดีเอ็นเอของเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้ โดยใช้ความเข้มข้นตั้งต้นที่เตรียมไว้ทั้งหมด 6 ความเข้มข้น คือ 1,000, 200, 40, 8, 1.6 และ 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี multiplex real - time PCR ได้ค่า CT และค่าความเข้มข้น log C สร้างกราฟเส้นตรงได้จำนวน 2 เส้น คือกราฟเส้นตรงของ ยีน SRY ในเพศผู้ (■) และ ยีน PLP ในเพศเมีย (●) จากการทดลองนี้ พบว่า ดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้นสูงสุดคือ 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และลดความเข้มข้นลง 5 เท่าไปถึงความเข้มข้น 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงการเกิดปฏิกิริยาของตัวอย่างดีเอ็นเอน้ำเชื้อคัดเพศที่นำมาทดสอบ (เกิดปฏิกิริยาช่วง CT = 15 - 30 รอบ) กราฟเส้นตรงของยีน SRY มีค่าความชัน เท่ากับ -3.32 และกราฟเส้นตรงของยีน PLP มีค่าความชัน เท่ากับ -3.34 (ได้ค่าความชันเฉลี่ยเท่ากับ -3.33) และเส้นตรงทั้งสองมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างค่า CT และ log C คือ $R^2 > 0.99$

Figure 1B เป็นกราฟเส้นตรงที่สร้างจากพลาสมิด โดยผสมพลาสมิดที่มียีน PLP และยีน SRY แทรกอยู่ในอัตราส่วน 1 : 1 ใช้ความเข้มข้นของพลาสมิดจาก 1,000 ถึง 0.32 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR ในการศึกษานี้พบว่าเส้นตรงของยีน SRY มีค่าความชันเท่ากับ -3.35 ยีน PLP มีค่าความชันเท่ากับ -3.30 ได้ค่าความชันเฉลี่ยทั้งสองเส้นเท่ากับ -3.325 และเส้นตรงทั้งสองมีค่า $R^2 > 0.99$

ค่าความลาดชันเฉลี่ยของกราฟเส้นตรงจากเทคนิค multiplex real - time PCR มีค่าใกล้เคียงกับเทคนิค singleplex real - time PCR ซึ่งทั้ง 2 เทคนิคนี้มีค่าความชันใกล้เคียงกับค่าอุดมคติคือ -3.320 เป็นค่าบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการเพิ่มดีเอ็นเอผลลัพธ์เส้นใหม่ 2 เส้นในแต่ละรอบปฏิกิริยา หรือมีประสิทธิภาพเท่ากับร้อยละ 100 สามารถคำนวณได้จากสมการ $E = (10^{(-\frac{1}{\text{slope}})} - 1) \times 100$ (Svec et al., 2015) เมื่อคำนวณด้วยสมการดังกล่าว พบว่า ค่าประสิทธิภาพเฉลี่ยของกราฟมาตรฐานจากเทคนิค multiplex real -

time PCR และ singleplex real - time PCR เท่ากับร้อยละ 99.66 และ 99.87 ตามลำดับ ค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นค่าที่บ่งชี้ว่ากราฟมาตรฐานจากดีเอ็นเอเซลล์เม็ดเลือดขาวโคนมเพศผู้ที่ได้พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ มีความน่าเชื่อถือ สามารถใช้สมการจากกราฟเส้นตรงดังกล่าวคำนวณหาสัดส่วนเพศอสุจิได้อย่างแม่นยำ

การประเมินสัดส่วนเพศอสุจิจากตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคที่ ต้องการทราบค่าด้วยเทคนิค real - time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายไปพร้อม ๆ กับการอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาจากแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ส่งสัญญาณออกมาถูกรอบปฏิกิริยา ใช้ตรวจสอบตัวอย่างในเชิงปริมาณ การศึกษาก่อนหน้านี้ประเมินสัดส่วนเพศน้ำเชื้อโคขาวลำพูน ด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR ใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน SRY สำหรับระบุเพศผู้ และไพรเมอร์ต่อยีน GAPDH เป็นยีนควบคุมระบุความสำเร็จของปฏิกิริยา คำนวณหาปริมาณของยีนเป้าหมายโดยนำค่า CT ของตัวอย่างที่ทดสอบลบออกด้วยค่า CT ของยีนควบคุมหรือยีนมาตรฐาน (delta - delta CT method; $2^{-\Delta\Delta CT}$) ไม่ใช้การคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงสัดส่วนเพศของอสุจิ Y เป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือค่าที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อปกติ ไม่สามารถระบุแยกเป็นสัดส่วนร้อยละของอสุจิ X และอสุจิ Y ในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบได้ (Dumrong Sri et al., 2016)

ดังนั้น เพื่อให้การประมาณสัดส่วนเพศอสุจิ มีความละเอียดชัดเจน แยกเป็นร้อยละของอสุจิ X และอสุจิ Y ได้ การศึกษาของ Parati et al. (2006) ประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิ X และอสุจิ Y โดยใช้กราฟมาตรฐานจากพลาสมิดที่มียีนเป้าหมาย PLP และยีน SRY แทรกอยู่ ผสมรวมกันในอัตรา 1 : 1 และใช้ไพรเมอร์ที่ติดสี FAM ชนิดเดียวกัน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR (สำหรับยีน PLP 1 หลอด และยีน SRY 1 หลอด) ได้สมการเส้นตรงสำหรับคำนวณหาสัดส่วนเพศของอสุจิ อย่างไรก็ตาม อาจเกิดความผิดพลาดได้ง่ายหากผสมพลาสมิดในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ทำให้กราฟเส้นตรงไม่ได้มาตรฐานและไม่เหมาะสมสำหรับใช้ประเมิน

สัดส่วนเพศ และการศึกษาของ Amadesi *et al.* (2015) ประเมินสัดส่วนเพศสุจิ X และสุจิ Y ในน้ำเชื้อพ่อโค ด้วยเทคนิค singleplex real - time PCR แบบแยกหลอดโดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ทดแทนการใช้พลาสมิด ทั้งนี้ วิธีการประเมินจากทั้งสองการศึกษาข้างต้นอาจเกิดความเสี่ยงจากข้อผิดพลาด เนื่องจากทำปฏิกิริยาแบบแยกหลอด และควบคุมไม่ได้อยู่ในปฏิกิริยาที่สนใจในหลอดเดียวกัน หากสูญเสียดีเอ็นเอตั้งแต่ต้นหรือการทำปฏิกิริยาล้มเหลวในหลอดใดหลอดหนึ่ง อาจทำให้การประเมินสัดส่วนเพศผิดพลาดได้

การประเมินสัดส่วนเพศสุจิด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR

การศึกษานี้ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค multiplex real - time PCR ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *PLP* และยีน *SRY* รวมถึงตัวอย่างที่ต้องการทดสอบรวมอยู่ภายในหลอดเดียว เทคนิคนี้ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมน้ำยาทำปฏิกิริยา ประหยัดสารเคมี ลดความผิดพลาดในขั้นตอนการกระจายสารเคมีและไม่ต้องแบ่งดีเอ็นเอตั้งต้นซึ่งมีปริมาณน้อยเพื่อแยกทำปฏิกิริยาหลายหลอด โดยใน Figure 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก

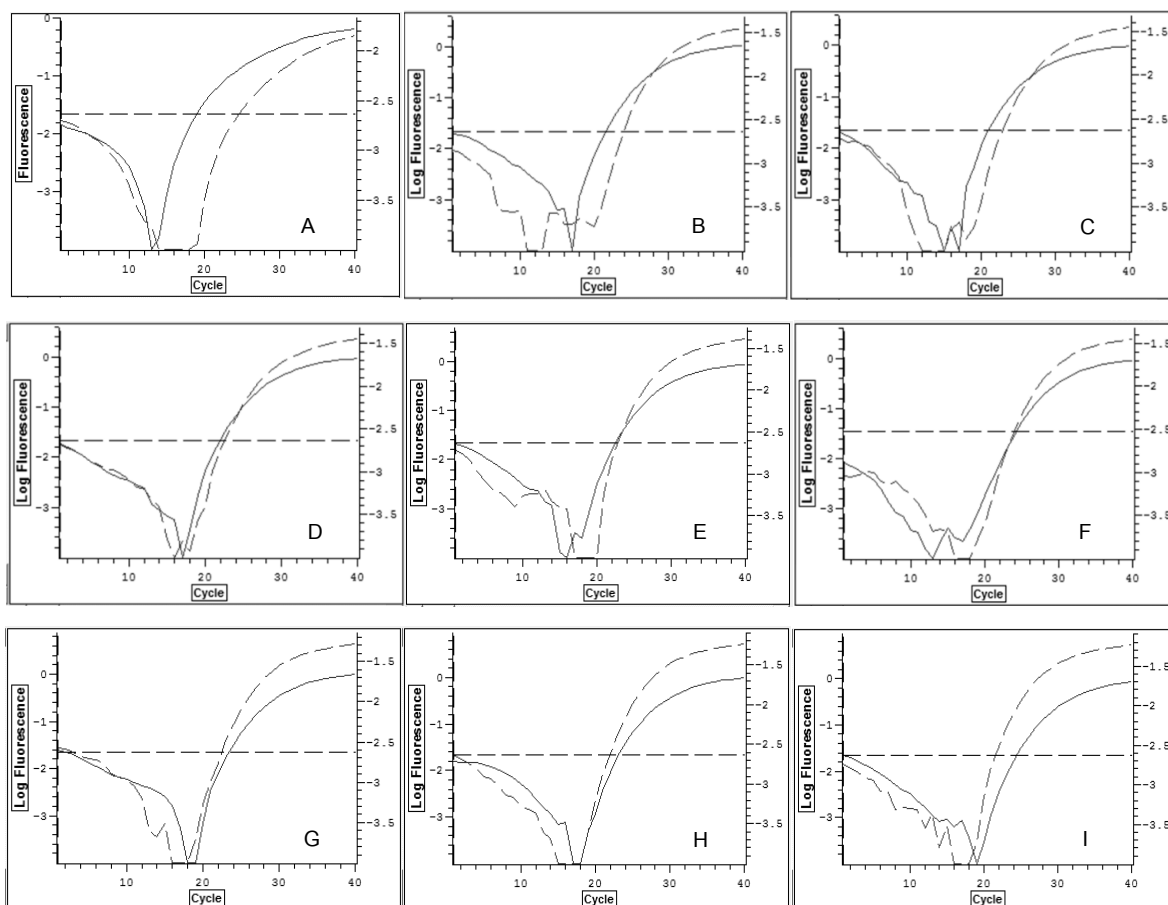


Figure 2. Log curve plot for both *SRY* and *PLP* genes expression in sex-sorted bovine semen samples quantified by multiplex real-time PCR technique. Taqman probe labeled FAM fluorophore (—) represent for *SRY* - specific gene in Y sperm and HEX fluorophore (- -) represent for *PLP*-specific gene in X sperm. A; Y = 90 %, B; Y = 80 %, C; Y = 70 %, D; Y = 60 %, E; Y = 50 %, F; Y = 40 %, G; Y = 30 %, H; Y = 20 %, and I; Y = 10 %, respectively.

น้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านการคัดแยกเพศ มีสัดส่วนของอสุจิ Y ตั้งแต่ร้อยละ 90 ลดลงถึงร้อยละ 10 (A = ร้อยละ 90, B = ร้อยละ 80, C = ร้อยละ 70, D = ร้อยละ 60, E = ร้อยละ 50, F = ร้อยละ 40, G = ร้อยละ 30, H = ร้อยละ 20, และ I = ร้อยละ 10) แต่ละตัวอย่างแสดงรอบการเกิดปฏิกิริยาจากสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดกับไพรเมอร์ โดยสัญญาณสี FAM (เส้นทึบ) แสดงการเพิ่มปริมาณยีน SRY ในเพศผู้ (มีค่าการดูดกลืนแสง 494 นาโนเมตร) และสัญญาณสี HEX (เส้นประ) แสดงการเพิ่มปริมาณยีน PLP ในเพศเมีย (ค่าการดูดกลืนแสง 535 นาโนเมตร) และเส้นตรงมาตรฐาน (threshold line) ที่ลากขนานกับแกน X ตัดกับเส้นสัญญาณสีทั้งสองในช่วงชัน (linear) ของกราฟ ที่ระดับ -1.5 ถึง -1.7 ได้ค่าคงที่ CT ของแต่ละยีนเพื่อนำไปแทนค่าในสมการ โดยช่วงสัญญาณแสงจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบ เริ่มแสดงสัญญาณสีในรอบที่ 15 - 30 ซึ่งเป็นช่วงที่กราฟมาตรฐานครอบคลุมการเกิดปฏิกิริยาทั้งหมด

สัญญาณแสงใน Figure 2 แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นอสุจิ Y ร้อยละ 90 - 60 (Figure 2; A - D) มีสัดส่วนของยีน SRY มากกว่ายีน PLP จึงเกิดเส้นสัญญาณสี FAM (เส้นทึบ) แสดงขึ้นมาก่อนเส้นสัญญาณสี HEX และเมื่อสัดส่วนอสุจิ Y น้อยลงหรือลดลง เส้นสัญญาณสี FAM เพิ่มจำนวนรอบมากขึ้นตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นที่น้อยลง ขณะที่ตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีสัดส่วนอสุจิ X และอสุจิ Y มีปริมาณเท่ากันร้อยละ 50 (Figure 2; E) เส้นสัญญาณของทั้งสองสีแสดงสัญญาณสีขึ้นพร้อม ๆ กัน ในทางตรงกันข้ามสำหรับตัวอย่างที่มีสัดส่วนอสุจิ Y ร้อยละ 40 - 10 (Figure 2; F - I) แสดงเส้นสัญญาณสี HEX ขึ้นมาก่อนสี FAM เนื่องจากมีดีเอ็นเอของอสุจิ X มากกว่าอสุจิ Y

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในระบบ multiplex ซึ่งมียีนเป้าหมาย 2 ชนิดในหลอดเดียว ใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ต่างชนิด สามารถช่วยระบุยีนที่สนใจและทำปฏิกิริยาไปพร้อม ๆ กับการแสดงสัญญาณสี นำค่า CT เปรียบกับกราฟมาตรฐานจากพลาสมิด เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในขั้นตอนเดียว (Khamlor *et al.*, 2014) แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้า

นี้ของ Husna *et al.* (2017) และ Maleki *et al.* (2013) ศึกษาวิธีการประเมินสัดส่วนเพศของอสุจิในโคและกระบือ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเพศผู้และเพศเมียทำปฏิกิริยาแบบ singleplex real - time PCR และใช้สารเรืองแสงชนิด SYBR green สำหรับแสดงสัญญาณการเพิ่มดีเอ็นเอผลลัพท์เส้นใหม่ การใช้สาร SYBR green อาจเกิดความผิดพลาดได้ หากสารเรืองแสงเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเกลียวคู่ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย (non - specific gene) จึงอาจเป็นข้อจำกัดของการใช้สารดังกล่าว ทั้งนี้การศึกษาของ Parati *et al.* (2006) ได้ปรับปรุงการใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการระบุยีนเป้าหมาย ลดความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ได้

ผลการประมาณอัตราส่วนร้อยละอสุจิ Y (% Y) ใน Table 2 จากเทคนิค multiplex real - time PCR ใช้การคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานจากเซลล์เม็ดขาวเพศผู้ และเทคนิค singleplex real - time PCR ประเมินสัดส่วนอสุจิ Y ด้วยการนำค่า CT ไปแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานจากพลาสมิด ได้ค่าความเข้มข้นของยีนที่สนใจ คำนวณเป็นสัดส่วน % Y ส่วนเทคนิค multiplex ddPCR เป็นเทคนิคการนับจำนวนของดีเอ็นเอผลลัพท์เส้นใหม่ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยตรง ไม่ใช้กราฟมาตรฐานหรือค่าอ้างอิงมาตรฐาน (Cray *et al.*, 2020, Roti Roti *et al.*, 2017) ซึ่งใน Table 2 แสดงผลการวิเคราะห์เป็นค่าเฉลี่ย (% Y) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่านัยสำคัญทางสถิติ (*P*-value) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน CV (%) จากการประเมินสัดส่วนร้อยละอสุจิ Y จากทั้ง 3 วิธีการ พบว่า ผลการวิเคราะห์สัดส่วนเพศไม่มีความแตกต่างกัน (*P* > 0.05) มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำกว่าร้อยละ 10 มีสัดส่วนเพศอสุจิที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เตรียมไว้ (ร้อยละ 90 - 10) ซึ่งผลจากเทคนิค multiplex real - time PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นใหม่นี้ ให้ค่าประมาณในช่วงร้อยละ 93.55 - 10.28 มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่น้อยกว่า 3 เมื่อคิดเป็นช่วงความเชื่อมั่นของข้อมูล เป็นค่าประมาณร้อยละ 95 confidence interval (95 % CI) ค่าที่คำนวณได้มีความเบี่ยงเบนจากค่ากำหนดไม่เกินร้อยละ 5 ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับได้ ทั้งนี้ ตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทราบค่าหรือ

Table 2. Results of %Y quantified by the multiplex real - time PCR assay, the singleplex real - time PCR assay and the multiplex droplet digital PCR assay

no	sample	Estimates		Calculated Values						P - value
		% Y	Multiplex real - time PCR assay		Singleplex real - time PCR assay		Multiplex droplet digital PCR assay			
			Mean (% Y) ± SD	CV (%)	Mean (% Y) ± SD	CV (%)	Mean (% Y) ± SD	CV (%)		
1	Y - sorted sperm	90	93.55 ± 0.64	1.68	93.39 ± 0.72	1.60	92.99 ± 0.97	1.04	0.468	
2	Y - sorted sperm	80	78.57 ± 1.41	1.79	79.85 ± 1.18	1.47	79.94 ± 1.24	1.55	0.149	
3	Y - sorted sperm	70	73.60 ± 0.69	4.07	72.95 ± 1.40	1.92	72.04 ± 1.70	2.69	0.159	
4	Y - sorted sperm	60	59.16 ± 2.20	3.72	60.57 ± 1.47	2.42	60.10 ± 1.07	1.79	0.344	
5	Normal sperm	50	52.65 ± 2.24	4.25	52.50 ± 3.44	6.55	50.80 ± 1.76	3.47	0.409	
6	X - sorted sperm	40	40.07 ± 2.21	5.51	40.59 ± 1.27	3.14	39.90 ± 1.18	2.95	0.747	
7	X - sorted sperm	30	32.45 ± 0.78	5.31	31.53 ± 0.87	2.77	31.72 ± 1.59	5.03	0.366	
8	X - sorted sperm	20	21.26 ± 2.53	6.38	22.73 ± 1.36	5.98	22.48 ± 1.02	4.17	0.204	
9	X - sorted sperm	10	10.28 ± 1.44	8.81	9.91 ± 0.39	7.30	10.59 ± 0.46	4.38	0.450	

PCR = polymerase chain reaction, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation.

ค่า estimates (% Y) ใน Table 2 อาจมีความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากตัวอย่างน้ำเชื้อ X-sorted semen และ Y-sorted semen จากบริษัททางการค้าผ่านกระบวนการผลิตคัดแยกเพศด้วยวิธี flow cytometry ระบุสัดส่วนอสุจิ X หรือ อสุจิ Y มีค่ามากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งหมายถึงอาจมีร้อยละของอสุจิ X หรือ Y ในช่วงประมาณร้อยละ 90 - 99 ฉะนั้น ตัวอย่างดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ในสัดส่วนต่าง ๆ ทั้งหมดอาจจะมีค่าเบี่ยงเบนจากค่าประมาณแต่อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์จากทั้ง 3 เทคนิค พบว่าให้ค่าการคำนวณที่ใกล้เคียงกัน มีประสิทธิภาพการวัดค่าหรือการประมาณสัดส่วนเพศอสุจิเทียบเท่ากัน

สรุป

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอวิธีการประมาณอัตราส่วนเพศอสุจิแบบ multiplex real - time PCR ซึ่งสามารถทำได้สะดวก ประหยัดสารเคมี และรวมถึงที่ต้องการตรวจสอบอยู่ในหลอดเดียว โดยมีไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน PLP บนโครโมโซม X (โพรบติดสี HEX) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน SRY บนโครโมโซม Y (โพรบติดสี FAM) คำนวณสัดส่วนอสุจิจากกราฟมาตรฐานเซลล์เม็ดเลือดขาวโคเพศผู้ ที่มีโครโมโซม X และโครโมโซม Y ในสัดส่วน 1 : 1 ทดแทนการใช้พลาสมิดได้ อย่างไรก็ตามการสร้างสมการด้วยดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจากโคเพศผู้ ควรเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์สูง เพื่อลดความผิดพลาดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผลลัพธ์ รวมถึงการประเมินสัดส่วนเพศอสุจิแบบแยกหลอดเดียว singleplex real - time PCR ให้ผลการคำนวณที่แม่นยำ ใช้โพรบติดสีฟลูออเรสเซนต์เพียงชนิดเดียว ช่วยลดต้นทุนการทำปฏิกิริยา และเทคนิค multiplex droplet digital PCR เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ใช้สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือที่มีราคาแพง เทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าวทั้งหมดนี้ ผู้ปฏิบัติงานสามารถพิจารณาเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงาน เวลา และงบประมาณ สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการประมาณอัตราส่วนเพศอสุจิในน้ำเชื้อพ่อโคที่ผ่านกระบวนการคัดเพศในห้องปฏิบัติการ ก่อนนำน้ำเชื้อคัดเพศไปผสมเทียมกับแม่โคนมในภาคสนามได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และองค์การส่งเสริมกิจกรรมการเลี้ยงโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเชื้อพ่อโคและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่สนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์และสถานที่ดำเนินงานทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Amadesi, A., A. Frana, L.M. Gandini, V. Bornaghi, K. Parati, G. Bongioni, R. Puglisi and A. Galli. 2015. Comparison between primary sex ratio in spermatozoa of bulls and secondary sex ratio in the deriving offspring. *Theriogenology* 83(2): 199-205.
- Blecher, S.R., R. Howie, S. Li, J. Detmar and L.M. Blahut. 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52(8): 1309-1321.
- Claassens, O.E., C.J.J. Oosthuizen, J. Brusnick, D.R. Franken and T.F. Kruger. 1995. Fluorescent in situ hybridization evaluation of human Y-bearing spermatozoa separated by albumin density gradients. *Fertility and Sterility* 63(2): 417-418.
- Colley, A., M. Buhr and S.P. Golovan. 2008. Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology* 70(6): 978-983.
- Cray, N., M. Wagner, J. Hauer and E. Roti Roti. 2020. Technical note: Droplet digital PCR precisely and accurately quantifies sex skew in bovine semen. *Journal of Dairy Science* 103(7): 6698-6705.

- Dumrongsri, S., T. Khamlor, P. Pongpiachan and K. Sringarm. 2016. Determination of male-specific gene expression of White Lamphun cattle semen treated by monoclonal antibodies. *Indian Journal of Animal Sciences* 86(8): 878-882.
- Ericsson, R.J., C.N. Langevin and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 246(5433): 421-424.
- Garner, D.L., B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson, M.A. van Dilla and L.A. Johnson. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 28(2): 312-321.
- Goldberg, E.H., E.A. Boyse, D. Bennett, M. Scheid and E.A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature* 232(5311): 478-480.
- Gomez, K.A. and A.A. Gomez. 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd ed. John Wiley and Sons, NewYork. 680 p.
- Habermann, F.A., A. Winter, I. Olsaker, P. Reichert and R. Fries. 2005. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122(s1): 22-27.
- Husna, A.U., M.A. Awan, A. Mehmood, T. Sultana, Q. Shahzad, M.S. Ansari, B.A. Rakha, S.M. Saqlan Naqvi and S. Akhter. 2017. Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: Validation using SYBR[®] green real-time PCR. *Animal Reproduction Science* 182: 69-76.
- Iwasaki, S., Y. Shioya, H. Masuda, A. Hanada and T. Nakahara. 1988. Sex ratio of early embryos fertilized *in vitro* with spermatozoa separated by percoll. *Theriogenology* 30(6): 1191-1198.
- Joerg, H., M. Asai, D. Graphodatskaya, F. Janett and G. Stranzinger. 2004. Validating bovine sexed semen samples using quantitative PCR. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121(3): 209-215.
- Johnson, L.A., J.P. Flook and H.W. Hawk. 1989. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 41(2): 199-203.
- Khamlor, T., P. Pongpiachan, S. Sangsritavong and N. Chokesajjawatee. 2014. Determination of sperm sex ratio in bovine semen using multiplex real-time polymerase chain reaction. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27(10): 1411-1416.
- Machado, G.M., J.O. Carvalho, E. Siqueira Filho, E.S. Caixeta, M.M. Franco, R. Rumpf and M.A.N. Dode. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71(8): 1289-1297.
- Madrid-Bury, N., R. Fernández, A. Jiménez, S. Pérez-Garnelo, P. Nuno Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente and A. Gutiérrez-Adán. 2003. Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio. *Zygote* 11(3): 229-235.
- Maleki, A.F., A.H. Moussavi, M.R. Nassiri, M. Tahmoorespur and S.A. Vakili. 2013. Introducing and validation of SYBR green real-time PCR method to determinate sex ratio in bovine semen. *Animal Reproduction Science* 140(1-2): 1-6.
- Maxwell, W.M.C., G. Evans, F.K. Hollinshead, R. Bathgate, S.P. de Graaf, B.M. Eriksson, L.

- Gillan, K.M. Morton and J.K. O'Brien. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* 82-83: 79-95.
- Parati, K., G. Bongioni, R. Aleandri and A. Galli. 2006. Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 66(9): 2202-2209.
- Piumi F., D. Vaiman, E.P. Cribiu, B. Guerin and P. Humblot. 2001. Specific cytogenetic labeling of bovine spermatozoa bearing X or Y chromosomes using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Genetics Selection Evolution* 33(1): 89-98.
- Roti Roti, E., N. Cray, M. Wagner and M.R. Botts. 2017. Inventor. Genus PLC (GB), Assignee. Methods and systems for assessing and/or quantifying sperm cell subpopulations bearing a specific genetic signature. U.S. Patent No.: US-2019071725-A1. Date of Patent: September 1, 2017.
- Svec, D., A. Tichopad, V. Novosadova, M.W. Pfaffl and M. Kubista. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
- Welch, G.R., G.C. Waldbieser, R.J. Wall and L.A. Johnson. 1995. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm. *Animal Biotechnology* 6(2): 131-139.
- Yan, J., H.L. Feng, Z. Chen, J. Hu, X. Gao and Y. Qin. 2006. Influence of swim-up time on ratio of X- and Y-bearing spermatozoa. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 129(2): 150-154.
-