



ISSN 1905-6877

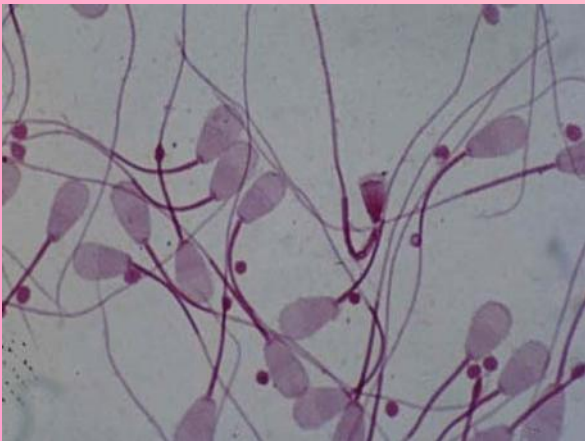
วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

Journal of Biotechnology in Livestock Production

ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2551 Vol.3; No. 1; June 2008

www.dld.go.th/biotech

น้ำเชื้อปลอดโรค
ปศุสัตว์ไทยปลอดโรค



โครงการศูนย์ผลิตน้ำเชื่อมาตรฐาน



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

กรรมปศุสัตว์



วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

Journal of Biotechnology in Livestock Production

ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2550 Volume 3; No. 1; June 2008

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร

ในปัจจุบันเทคนิคการผสมเทียมได้เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวางในวงการปศุสัตว์ของไทย โดยแต่เดิมจะมีเพียงภาคราชการ และรัฐวิสาหกิจเท่านั้นที่ดำเนินการผลิตน้ำเชื้อ และน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม ภายใต้มาตรฐานการควบคุมคุณภาพ และการควบคุมโรคติดต่อในปศุสัตว์

ในปัจจุบันเมื่อการเลี้ยงปศุสัตว์ขยายตัวอย่างกว้างขวาง ต้นทุนค่าอาหารสัตว์ที่สูงขึ้น ประกอบกับความสนใจของเกษตรกรที่ต้องการได้ลูกที่เกิดจากพ่อพันธุ์ดี ทำให้เกษตรกรเลิกละทิ้งพ่อพันธุ์ไว้ในฟาร์ม แต่หันมาใช้บริการผสมเทียมจากน้ำเชื้อและน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์ปศุสัตว์มากขึ้น ธุรกิจผลิตน้ำเชื้อและน้ำเชื้อแช่แข็งโดยภาคเอกชนจึงเกิดขึ้น และกระจายอยู่ทุกภูมิภาคของไทย จึงเป็นหน้าที่ของกรมปศุสัตว์โดย สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ซึ่งมีหน้าที่โดยตรง และมีความชำนาญในด้านการควบคุมคุณภาพ และความปลอดภัยในการผลิตน้ำเชื้อปศุสัตว์ ที่จะต้องควบคุม ดูแลศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ที่ดำเนินการโดยเอกชน ให้ได้มาตรฐาน ทั้งด้านคุณภาพ และความปลอดภัยจากโรคติดต่อต่างๆ

ในปี พ.ศ. 2550 กรมปศุสัตว์จึงได้ตั้งคณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ โดยมีนายสัตวแพทย์กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นประธานกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ ทำหน้าที่ ตรวจสอบ กำกับดูแล และให้คำแนะนำศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์เอกชน ตลอดจนรับรองให้เป็นศูนย์มาตรฐาน เพื่อให้มั่นใจว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ จะได้รับความปลอดภัยเมื่อใช้บริการผสมเทียมโดยน้ำเชื้อที่ผลิตโดยภาคเอกชน และเป็นการป้องกันปศุสัตว์ของประเทศให้ปลอดภัยจากโรคอีกทางหนึ่ง ในขณะที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อภาคเอกชนจะได้รับคำแนะนำ และความช่วยเหลือทางด้านวิชาการเพื่อให้สามารถพัฒนาการผลิตให้ได้มาตรฐานสากล อันจะเป็นแนวทางในการเปิดตลาดสินค้าปศุสัตว์ประเภทพันธุ์สัตว์ในรูปน้ำเชื้อแช่แข็งสู่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ต่อไป

วารสารฉบับนี้จึงได้นำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับ “ระเบียบกรมปศุสัตว์และประกาศกรมปศุสัตว์ที่เกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์” เพื่อเป็นข้อมูลให้ผู้สนใจได้ศึกษาในรายละเอียด นอกเหนือจากเอกสารทางวิชาการอื่นๆ ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่น่าสนใจ และหวังว่าผู้สนใจติดตามข้อมูลในวารสารฯ จะได้ประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้า และทำให้เกิดประโยชน์ได้ในการพัฒนางานการผลิตปศุสัตว์ไทยอย่างต่อเนื่อง

(นายยุทธ หรินทรานนท์)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

วัตถุประสงค์:

- 1 ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์
- 2 รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์โดยเทคโนโลยีชีวภาพ
- 3 ส่งเสริมความสัมพันธ์ และความร่วมมือระหว่างนักวิชาการและสถาบันต่างๆ

เจ้าของ:

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

สำนักงาน:

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ.ปทุมธานี 12000

โทร/โทรสาร 0-2501-2116

กำหนดออก:

ปีละ 1 ฉบับ

คณะที่ปรึกษา:

ผศช. พรรณพิไลเสกสิทธิ์

ดร. ณชัย ศราธพันธุ์

ดร. มาลี อภิเมธีธารง

บรรณาธิการบริหาร:

น.สพ.อุทัย หรินทรานนท์

บรรณาธิการ:

สพญ. กัลยา เก่งวิทย์กรรม

ผู้ช่วยบรรณาธิการ:

นสพ. วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา

กองบรรณาธิการ:

นสพ. ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย

นสพ. สาโรช งามจำ

สพญ. รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล

นสพ. รัตน์ ฉายรัตน์ศิลป์

สพญ. นุสตรา วัฒนกุล

นสพ. วิบูลย์ เชียงวิสาฎกร

นางจุรีรัตน์ แสนโกชน์

นายสายันท์ บัวบาน

ผู้จัดการวารสาร:

นางจุรีรัตน์ แสนโกชน์

นายวิบูลย์ เชียงวิสาฎกร

นางสาวทัศนีย์ พูนจำ

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ คือ เดือนกรกฎาคม วารสารนำลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด 2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขั้นตอนการพิจารณาผลงานวิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 1 ชุด และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ผลงานวิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ส่งแผ่นบันทึกข้อมูลมาให้ เมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ แล้วเท่านั้น โดยเลขาคณะกรรมการวิจัยฯ จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงาน

วิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่คณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ข้อเสนอแนะ

บันทึกผลงานวิชาการที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อแนะนำของ คณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ลงใน Diskette ขนาด 3.5 นิ้ว หรือ CD-ROM ใช้โปรแกรม Microsoft Word for Windows โดยมีรายละเอียดบนสติกเกอร์ติดหน้า Diskette หรือ CD-ROM ดังนี้

ชื่อผลงานวิชาการ.....
ชื่อเจ้าของผลงาน.....
ชื่อไฟล์.....
ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์/E-Mail.....

หรือส่งตรงทาง Internet มายัง jureeratn@gmail.com

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้คณะกรรมการวิจัย สทป. พิจารณา จะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนด จะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

ส่ง

บรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง
จ. ปทุมธานี 12000

3.6 หรือติดต่อสอบถามได้ที่

นางจุรีรัตน์ แสนโกชน์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 02-967-9792

โทรสาร. 02-5011386

ดูข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำสำหรับผู้เขียนผลงานที่ได้

<http://www.dld.go.th/biotech>

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ชัดเจน และพิมพ์โดยใช้ขนาดตัวอักษร 18 และตัวหนา

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวกพิมพ์ไว้ใต้ชื่อคณะผู้วิจัย โดยใช้ขนาดตัวอักษร 16 และตัวปกติ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆ ได้เนื้อความคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกัน

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน โดยพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปให้เขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้น

4.5.3 ผล (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะสมกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้นๆ

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว – ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเองอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและแนวทางที่จะนำไปใช้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างอิงจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นๆ ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)
2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “วิบูรณ์ และจรัสรัตน์ (2549), เลิศชัย และคณะ(2549) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (วิบูรณ์, 2549) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (ถาวรและคณะ, 2547; นริศ และสินสมุทร, 2543)
3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Rudbeck and Dissing (1998), Kashi *et al.* (1990) กล่าวว่า..... “ หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่างกลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Rudbeck and Dissing, 1998; Kashi *et al.*, 1990)
4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Walker, J.M., unpublished data),for other protocols (Walker, J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยานฐานะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

วิบูรณ์ ตูลารักษา และ จรัสรัตน์ แสนโกษณ์. 2549. การสกัด ดีเอ็นเอ กเซลล์รากขนในโคนมไทยโฮลสโตน.

การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 “ก้าวทันสมัยกับปศุสัตว์ไทย” วันที่ 24 มกราคม 2549.

โรงแรมโซฟิเทล ขอนแก่น. หน้า 452-463.

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และกัลยา เก่งวิทย์กรรม. 2549. การประเมินวิธีสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด น้ำเชื้อ และเซลล์รากขนของพ่อพันธุ์โค. สัตวแพทยสาร. 56 (3):68-79.

Jason, R. H. and Callings, D.F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

กรณีอ้างอิงจากตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

Allison, P.D. 2005. Survival analysis using SAS: A practical guide 8th edition. SAS institute Inc., Cary, NC, USA. 292 pp.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6th ed. Leman, A. D. ed.
Lowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

Weeden, N.F. 1993. Comparison of DNA extraction protocols. [Online]

<http://home.twony.rr.com/protocol.htm> Access 29/10/2005.

จันทร์หา เป็นคัม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพิงพิศ ดุลยพัชร . 2541 . อาหารจากข้าวโพด.
คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>. 27
มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่าน
และใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร Angsana UPC
16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป
กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อ
ผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16

กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X297 มม.) ใช้เพียงหน้า
เดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ดึงกันหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม
- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วยท้าย
ของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น
- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ ; เคาะ 1 เคาะ
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง
- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....ที่กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด
- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)
- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ **พิมพ์ด้วยตัวเอน** ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) คือประกอบด้วยคำ 2 คำ คำแรกเป็นชื่อ Genus ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ คำหลังเป็น specific epithet พิมพ์เว้นวรรคห่างจากคำแรก และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก ดังตัวอย่าง

จุลินทรีย์ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ด้วยตัวเอน *Escherichia coli*

พืช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ด้วยตัวเอน *Oryza sativa*

สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*

สารบัญ	หน้า
ระเบียบกรมปศุสัตว์และประกาศกรมปศุสัตว์ที่เกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และ สุเทพ ชีมละมูล	12
เปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris Optidyl® และ Bioexcel® ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคนม ด้วยเครื่อง flow cytometer และ CASA สุดา จันทาสี จตุพร พงษ์เพ็ง มุขดา รัตนภาสกร ธวัชชัย แก้วมาก ปิยวรรณ สุธรรมภินันท์	21
ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกตูกและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งโค กิตติศักดิ์ แสงสกุล นายสุพล จันทโคตร เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล สราวุธ ฉายประสาธ มุขดา รัตนภาสกร	29
ผลของระยะเวลาบ่มน้ำเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียสต่ออัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโคหลังแช่แข็ง นายสราวุธ ฉายประสาธ สุดา จันทาสี นายอภิชาติ ชาติเชื้อ นายพิชิตดวง เจริมปลั่ง	38
การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแม่โคนมโดยใช้ฮอร์โมนแบบสอดช่องคลอดเพื่อลดจำนวนวันท้องว่างในโค หลังคลอด ณรงค์กร เกษมสุขและ อมรรัตน์ สุวรรณรงค์	45
ผลของการเติมกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียส ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค จตุพร พงษ์เพ็ง มุขดา รัตนภาสกร สุดา จันทาสี กิตติศักดิ์ แสงสกุล จำเนียร สายขุน	52
คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา อนนท์ เทืองสันเทียะ จตุพร พงษ์เพ็ง บรรลือ กล้าพูล และ มาลี อภิเมธีธำรง	60
เปรียบเทียบความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคในการตรวจแยกเพศด้วยวิธี PCR โดยใช้ TSPY Gene วิบูรณ์ ตูลารักษาและ สายใจ ชื่นสุข	67
DNA Extraction from Cattle Frozen Semen Saijai Cheunsuk and Wiboon Tularaksa	75
การประเมินการใช้ ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 13 ตัวเพื่อการตรวจพิสูจน์ พ่อ แม่ และ ลูกในโคนม ไทยโฮลไนด์ นายเลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล และ รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล	84

ระเบียบกรมปศุสัตว์และประกาศกรมปศุสัตว์เกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพ

น้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล* สุเทพ ยิ้มละมุล**

*สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ **กองนิติการ

ความสำคัญและความเป็นมา

เดิมการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งดำเนินการโดยหน่วยงานราชการ คือ กองผสมเทียมหรือสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ในปัจจุบัน ซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคและให้บริการผสมเทียมโคของเกษตรกร ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีการดำเนินการตามหลักวิชาการ ทั้งด้านการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อทางชีวภาพซึ่งช่วยให้น้ำเชื้อมีคุณภาพดี มีศักยภาพในการผสมติดสูง และการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อทางสุขอนามัย มีการควบคุมป้องกันการแพร่โรคติดต่อที่ผ่านทางน้ำเชื้อผสมเทียม คูเลโคพ็อพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งให้อยู่ในรั้วรอบขอบชิด ณ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อผสมเทียม จังหวัดปทุมธานี ตรวจสอบสุขภาพโคพ็อพันธุ์เป็นประจำทุกปีและไม่นำโคพ็อพันธุ์ไปใช้ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติอันจะทำให้ติดโรคจากแม่โคได้

ในช่วงปี พ.ศ. 2533 ภาคเอกชนได้เข้ามาทำธุรกิจการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคพ็อพันธุ์ มีการนำเข้าโคพ็อพันธุ์จากต่างประเทศ ที่สำคัญคือโคเนื้อพ็อพันธุ์อินดูบราซิล และทำการประชาสัมพันธ์จำหน่ายน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ผลิตให้แก่เกษตรกรอย่างแพร่หลายในราคาสูงเกินความเป็นจริง เกษตรกรไม่สามารถทราบได้ถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ภายในหลอดน้ำเชื้อที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเอกชนผลิต รวมถึงการปลอมปนน้ำเชื้อจากโคพ็อพันธุ์ตัวอื่นซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับและน้ำเชื้อแช่แข็งมีราคาถูกกว่า การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งต้องใช้วิชาการและความรู้เฉพาะทาง ต้องมีอุปกรณ์สำคัญคือกล้องจุลทรรศน์ เกษตรกรไม่สามารถดำเนินการเองได้ จึงทำให้เกิดปัญหาการผสมไม่ติด ซึ่งอาจเนื่องจากน้ำเชื้อแช่แข็งมีคุณภาพต่ำหรือมีการปนเปื้อนเชื้อโรคติดต่อที่แพร่ได้ทางน้ำเชื้อที่มีผลต่ออัตราการผสมติด เนื่องจากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเหล่านี้ขาดความรู้และวิชาการเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจึงไม่ได้มาตรฐาน กระบวนการผลิตไม่ถูกต้องตามหลักวิชาการ โคพ็อพันธุ์ที่ใช้รีดเก็บน้ำเชื้อไม่ผ่านการตรวจโรค ใช้โคพ็อพันธุ์รับจ้างผสมพันธุ์ตามธรรมชาติกับโคตัวเมียที่นำเข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ มีการนำโคพ็อพันธุ์ไปรับจ้างผสมพันธุ์วิธีธรรมชาติตามฟาร์มต่างๆ หรือนำโคพ็อพันธุ์ออกไปประกวดในงานประกวดสัตว์ ตลาดนัดค้าสัตว์ กิจกรรมต่างๆ เหล่านี้เสี่ยงต่อการนำโรคกลับเข้ามายังศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่โคนันๆ อาศัยอยู่ อาจแพร่โรคให้แก่โคตัวอื่นที่อยู่ด้วยกัน ติดต่อผ่านไปทางน้ำเชื้อแช่แข็งและแพร่ไปยังโคของเกษตรกรที่ซื้อและใช้บริการผสมเทียมของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเหล่านี้

ด้วยสถานการณ์ที่เสี่ยงต่อการแพร่โรคติดต่อผ่านทางน้ำเชื้อที่อาจทำให้เกิดปัญหาการแพร่โรคไปอย่างรวดเร็วและกว้างขวางด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ผสมเทียม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (กองผสมเทียม) จึงได้ร่างหนังสือเสนอต่อกรมปศุสัตว์แต่งตั้งคณะทำงานร่างมาตรการการควบคุมการผลิตและจำหน่าย

น้ำเชื้อและตัวอ่อนแช่แข็งโค คณะทำงานประกอบด้วยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ (กองควบคุมโรคระบาดสัตว์) กองนิติการ ภาควิชาสัตวศาสตร์เช่นเวชวิทยาและ วิทยาการสืบพันธุ์ และภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีกลุ่มวิจัยและ ผลิตน้ำเชื้อเป็นผู้ดำเนินการร่าง “หลักเกณฑ์การพิจารณารับรองศูนย์รีดเก็บน้ำเชื้อสัตว์ฟาร์ม” ในปี พ.ศ. 2533 และนำเสนอต่อคณะทำงานซึ่งเห็นชอบในร่างฯ ดังกล่าวและนำเสนอกรมปศุสัตว์เพื่อพิจารณาอนุมัติใช้

กรมปศุสัตว์ได้เห็นชอบในหลักการแต่ในการดำเนินงานในขั้นต่อไปให้พิจารณาหนังสือจาก คณะกรรมการกฤษฎีกาในการให้ความเห็นทางกฎหมายว่า พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 จะ ครอบคลุมการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อฟาร์มสัตว์หรือไม่ ซึ่งคณะกรรมการกฤษฎีกาได้ตีความว่า พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ไม่อาจครอบคลุมถึงน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ได้ทุกมาตรา กรม ปศุสัตว์ต้องดำเนินการแก้ไขเพิ่มเติมบทบัญญัติมาตรานั้นๆ ให้ชัดเจนขึ้น ซึ่งกรมปศุสัตว์โดยสำนักควบคุมและ ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ได้ดำเนินการแก้ไขพระราชบัญญัติฯ ดังกล่าว ซึ่งรวมถึงดำเนินการร่าง แก้ไข ชี้แจง ต่อรัฐมนตรีกระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร โดยได้มอบหมายกลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อไปร่วมชี้แจง รายละเอียดในเรื่องเกี่ยวกับน้ำเชื้อและตัวอ่อนหรือคัพภะต่อคณะกรรมการกฤษฎีกา

ในระยะเวลาของการแก้ไขพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ต้องผ่านช่วงการเปลี่ยนแปลง รัฐบาลหลายชุด พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 และที่แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2542 จึงแล้วเสร็จ ซึ่ง ครอบคลุมถึงการควบคุมน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์และเอ็มบริโอของสัตว์ โดยอาศัยอำนาจแห่ง พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 และที่แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2542 มาตรา 21 ทวิ ห้ามมิให้บุคคลใดขาย จำหน่าย จ่าย แจก แลกเปลี่ยน หรือมีไว้เพื่อขายซึ่งน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์หรือเอ็มบริโอของม้า โค กระบือ แพะ แกะ สุกร หรือสัตว์ชนิดอื่นตามที่กำหนดในกฎกระทรวง เว้นแต่จะได้รับอนุญาตจากนายทะเบียน การขอ อนุญาตให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนดโดยประกาศในราชกิจจานุเบกษา

ดังนั้น กรมปศุสัตว์จึงได้ออกประกาศควบคุมการค้าน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ คือ โค กระบือ แพะ แกะ สุกร โดยให้ผู้ที่ทำการค้าหรือจำหน่ายน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ขึ้นทะเบียนเป็นผู้ค้าน้ำเชื้อสำหรับผสม พันธุ์สัตว์ ที่สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด และน้ำเชื้อที่จำหน่ายต้องผลิตจากศูนย์ผลิตหรือแหล่งผลิตที่กรมปศุสัตว์ รับรอง

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์โดยกลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อได้ได้เล็งเห็นภาระหน้าที่ในการ ควบคุมการผลิตน้ำเชื้อฟาร์มผสมเทียมของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อภาคเอกชนในประเทศ เนื่องจากเป็นหน่วยงานที่มี ความเชี่ยวชาญในด้านน้ำเชื้อฟาร์มสัตว์ การผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมเทียม และการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อ จึง ได้วางแผนการดำเนินงานต่อเพื่อให้เกิดความต่อเนื่องจากการที่ได้มีการแก้ไขพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ให้ครอบคลุมน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์แล้ว โดยเริ่มจากการปรับปรุงและพัฒนาห้องปฏิบัติการ ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อฟาร์มสัตว์เพื่อเพิ่มศักยภาพให้มีความพร้อมในการรองรับงานการตรวจและพิสูจน์

คุณภาพน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเอกชน โดยได้เล็งเห็นว่าความพร้อม ความแม่นยำทางด้านวิชาการ การให้ความรู้ที่ถูกต้องเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อรวมถึงการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จะเป็นกุญแจสำคัญในการทำความเข้าใจกับผู้ประกอบการ จึงได้จัดทำโครงการพัฒนาห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปศุสัตว์ภายใต้การสนับสนุนของสภากิจแห่งชาติ ในระหว่างปี พ.ศ. 2543-2545 ซึ่งจากการประสานงานกับสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ห้องปฏิบัติการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อจึงมีความพร้อม สามารถตรวจวิเคราะห์โรคติดต่อที่ผ่านทางน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ที่ผลิตโดยกรมปศุสัตว์และโดยเอกชน

นอกจากการมีส่วนร่วมในการดำเนินการในด้านกฎหมายเพื่อครอบคลุมการค้าน้ำเชื้อและการเตรียมความพร้อมในด้านห้องปฏิบัติการตรวจและควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อแล้ว กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อยังดำเนินการในการร่างระเบียบเกี่ยวกับมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ โดยเสนอกรมปศุสัตว์แต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาทบทวนร่างหลักเกณฑ์การพิจารณารับรองศูนย์รีดเก็บน้ำเชื้อสัตว์พ่อพันธุ์ที่ร่างในปี พ.ศ. 2533 โดยมีกลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อดำเนินการร่างด้านวิชาการเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อและมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อร่วมกับกองนิติการเพื่อให้เป็นไปตามหลักกฎหมาย และเสนอคณะทำงานพิจารณาอนุมัติร่าง จากนั้นจึงเสนอกรมปศุสัตว์อนุมัติโดยมีระเบียบและประกาศในการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเอกชน ดังนี้ 1) ระเบียบกรมปศุสัตว์ว่าด้วยการขอรับและออกใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ พ.ศ. 2548 2) ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การนำสัตว์เข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อและการกักแยกสัตว์ไว้ตรวจสุขภาพ 3) ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การรีดเก็บ และผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ และ 4) ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง โรคทางพันธุกรรมที่ต้องห้ามในสัตว์ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อได้ร่างระเบียบกรมปศุสัตว์

ในปี พ.ศ. 2550 เพื่อให้ครอบคลุมการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่ผลิตโดยศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสุกรภาคเอกชน กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อจึงร่วมกับกองนิติการเสนอ 1) ระเบียบกรมปศุสัตว์ ว่าด้วยการขอรับและออกใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ สำหรับผสมพันธุ์สัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 2) ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การนำสัตว์เข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อและการกักแยกสัตว์ไว้ตรวจสุขภาพ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และ 3) ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การรีดเก็บ และผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

จากที่มาและความสำคัญดังกล่าวแล้วข้างต้นนี้ การควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์จึงเริ่มดำเนินการได้โดยนายสัตวแพทย์กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อเป็นประธานกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ เพื่อควบคุมป้องกันการแพร่โรคติดต่อผ่านทางน้ำเชื้อพ่อพันธุ์รวมถึงเพื่อดูแลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ที่ต้องการให้มีหน่วยงานราชการทำหน้าที่ในการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อที่ผลิตโดยศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเอกชน

วิธีดำเนินการ

1. การตั้งคณะกรรมการ

1.1 ร่างหนังสือถึงผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เพื่อให้มีการจัดตั้งคณะกรรมการดำเนินการในเรื่องการผลิตและจำหน่ายน้ำเชื้อและตัวอ่อน (คัพภะ) พร้อมทั้งแนบคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการฯ เสนอกรมปศุสัตว์ เพื่อขออนุมัติการตั้งคณะกรรมการ

1.2 กรมปศุสัตว์อนุมัติคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการดำเนินการในเรื่องการผลิตและจำหน่ายน้ำเชื้อและตัวอ่อน (คัพภะ) ปศุสัตว์ และจัดประชุมคณะกรรมการฯ ซึ่งมอบหมายให้สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อดำเนินการร่างระเบียบ

2. การร่างระเบียบและอนุมัติระเบียบ

2.1 ศึกษา ค้นคว้า หาข้อมูล ระเบียบ และกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อในประเทศต่างๆ ทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และระเบียบขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International de Epizooties) เรื่องการค้าน้ำเชื้อและโรคที่ต้องตรวจ

2.2 ร่างระเบียบโดยใช้ข้อมูลจากข้อ 3 และวิชาการเกี่ยวกับพ่อพันธุ์ ระบบสืบพันธุ์พ่อพันธุ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โรคติดต่อที่ผ่านทางน้ำเชื้อ และการควบคุมศูนย์ผลิต

2.3 ปรับรูปแบบให้เป็นระเบียบและคำสั่งกรมปศุสัตว์ โดยจัดหมวดหมู่เป็น 1) การขอรับและออกไปรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ 2) การนำสัตว์เข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อและการกักแยกสัตว์ไว้ตรวจสอบสุขภาพ 3) โรคทางพันธุกรรมที่ต้องห้ามในสัตว์ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ 4) การรีดเก็บและผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์

2.4 จัดประชุมคณะกรรมการดำเนินการในเรื่อง การผลิตและจำหน่ายน้ำเชื้อและตัวอ่อน (คัพภะ) ปศุสัตว์ เพื่อพิจารณาร่างระเบียบ

2.5 เสนอร่างระเบียบกรมปศุสัตว์ 1 ฉบับ ประกาศกรมปศุสัตว์ 3 ฉบับ รวม 4 ฉบับ และคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ 1 ฉบับ อธิบดีกรมปศุสัตว์ลงนามอนุมัติ

3. การนำระเบียบไปปฏิบัติ

3.1 เสนอผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ให้ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ภายใต้อำนาจรับผิดชอบของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ดำเนินงานจำนวนผู้ประกอบการผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคของภาคเอกชนในพื้นที่รับผิดชอบ

3.2 เสนอผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จัดอบรมผู้ประกอบการ โดยทำหนังสือเชิญประชุมผู้ประกอบการ เพื่อชี้แจงระเบียบและคำสั่งกรมปศุสัตว์ทั้ง 4 ฉบับ ที่กรมปศุสัตว์อนุมัติ

3.3 ให้ผู้ประกอบการศูนย์ผลิตน้ำเชื้อเอกชนยื่นหนังสือขอรับการรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์

3.4 จัดอบรมการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคสำหรับนายสัตวแพทย์ผู้ควบคุมศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ ระหว่างวันที่ 7-11 สิงหาคม 2549 ณ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง ต. หอนงรี อ. ลำสนธิ จ. ลพบุรี

3.5 คณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ ทำการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่ยื่นขอรับการรับรอง

3.6 คณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อไปทำการตรวจต่ออายุ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อที่กรมปศุสัตว์รับรอง เป็นประจำทุกปี

4. การปรับปรุงการดำเนินงาน

เพื่อให้การควบคุมศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ครอบคลุมศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกร จึงปรับปรุงระเบียบและข้อปฏิบัติบางประการ เป็นระเบียบและประกาศกรมปศุสัตว์ (ฉบับที่ 2) จำนวน 3 ฉบับ ลงวันที่ 3 เมษายน 2550

ผลการดำเนินงาน

1. ระเบียบและประกาศกรมปศุสัตว์ ที่เกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ จำนวน 4 ฉบับ ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ จำนวน 3 ฉบับ ลงวันที่ 3 เมษายน 2550 รวมทั้งสิ้น จำนวน 7 ฉบับ และคำสั่งกรมปศุสัตว์ แต่งตั้งคณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ 1 ฉบับ (www.dld.go.th/biotech) ดังนี้

- 1.1 ระเบียบกรมปศุสัตว์ ว่าด้วย การขอรับและออกใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ พ.ศ. 2548 ลว. 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548
- 1.2 ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การนำสัตว์เข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อและการกักแยกสัตว์ไว้ตรวจสุขภาพ ลว. 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548
- 1.3 ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง โรคทางพันธุกรรมที่ต้องห้ามในสัตว์ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ ลว. 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548
- 1.4 ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การรีดเก็บ และผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ ลว. 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548

- 1.5 ระเบียบกรมปศุสัตว์ ว่าด้วย การขอรับและออกใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ลว. 3 เมษายน 2550
- 1.6 ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การนำสัตว์เข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อและการกักแยกสัตว์ไว้ตรวจสุขภาพ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ลว. 3 เมษายน 2550
- 1.7 ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การรีดเก็บ และผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ลว. 3 เมษายน 2550
- 1.8 คำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ ที่ 130/2548 ลว. 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548

2. แบบเอกสาร สำหรับการดำเนินงานของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ

- 2.1 แบบคำขอใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์เพื่อจำหน่าย
- 2.2 หนังสือรับรองของสัตวแพทย์ประจำศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์
- 2.3 บันทึกการตรวจศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โค กระบือ
- 2.4 สรุปการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์
- 2.5 รายงานผลการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์
- 2.6 บันทึกประวัติพ่อพันธุ์รายตัว
- 2.7 การเคลื่อนย้ายพ่อพันธุ์
- 2.8 รายงานการเคลื่อนย้ายสัตว์ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์
- 2.9 ข้อมูลการรีดเก็บน้ำเชื้อรายวัน
- 2.10 ตารางแสดงรายชื่อโคและจำนวนโคของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ
- 2.11 บันทึกการจ่ายน้ำเชื้อรายตัว
- 2.12 บันทึกการรับน้ำเชื้อรายตัว
- 2.13 ใบส่งน้ำเชื้อแช่แข็ง

3. ผลการสำรวจและเชิญผู้ประกอบการประชุมชี้แจงระเบียบฯ

หลังการอนุมัติใช้ระเบียบและประกาศกรมปศุสัตว์ ได้ทำการสำรวจผู้ประกอบการผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ โคภาคเอกชน มีดังนี้

ศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ	ผู้ประกอบการ (ราย)
ศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ อุบลราชธานี	35
ศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ ขอนแก่น	21
ศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ สระบุรี	17
ศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ ราชบุรี	5

4. ผลการจัดประชุม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยกลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ จัดประชุมผู้ประกอบการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคเพื่อจำหน่าย โดยมีผู้ประกอบการเข้าร่วมประชุมจำนวน 110 คน จากฟาร์มพ่อพันธุ์โค 67 ฟาร์ม เพื่อชี้แจงทำความเข้าใจในระเบียบและประกาศกรมปศุสัตว์ที่เกี่ยวกับการผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคในวันที่ 6 พฤษภาคม 2548 ที่สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี โดยมีรองอธิบดีกรมปศุสัตว์เป็นประธานในพิธีเปิดการประชุม ภายหลังการประชุมมีผู้ประกอบการยื่นขอการรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ รวมทั้งสิ้น จำนวน 23 ราย

5. ผลการตรวจรับรองศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคสำหรับผสมพันธุ์สัตว์

คณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ ได้ใช้ระเบียบและประกาศกรมปศุสัตว์ที่อนุมัตินี้เป็นคู่มือในการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ โดยในปี พ.ศ. 2548 มีศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่ได้รับการรับรองมาตรฐานจำนวน 8 ราย จากที่ยื่นขอการรับรองจำนวน 23 ราย และในปี พ.ศ. 2549 – 2550 มีจำนวน 9 ราย ในปี พ.ศ. 2551 มีศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่กรมปศุสัตว์รับรองและต่ออายุรวมทั้งสิ้นในประเทศ จำนวน 6 ราย ดังนี้

ลำดับ	เลขทะเบียน	ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ	ที่อยู่	จังหวัด	วันหมดอายุ
1	กษ 0601 3 02 03	โชคชัยแคร์ฟาร์ม	169 หมู่ 2 ต.หนอง น้ำแดง อ.ปากช่อง	นครราชสีมา	19 ธค. 2551
2	กษ 0601 3 02 04	ฟาร์มวิจัยโคนมปัก ธงชัย	99 หมู่ 19 ต.ตะขบ อ.ปักธงชัย	นครราชสีมา	19 ธค. 2551
3	กษ 0601 4 01 05	นาเชือกใต้ฟาร์ม	200 หมู่ 1 ต.นา เชือก อ.ยางตลาด	กาฬสินธุ์	22 ธค. 2551
4	กษ 0601 2 03 08	เอส เค พัทยาเรนซ์	19/19 หมู่ 4 ต.เขา ไม้แก้ว อ.บางละมุง	ชลบุรี	18 มิย. 2551
5	กษ 0601 2 03 09	ศูนย์อนุรักษ์และ พัฒนาควายไทย	76/6 หมู่ 2 ต.หนอง ซาก อ.บ้านบึง	ชลบุรี	29 มค. 2552
6	กษ 0601 1 06 07	ท่าหลวงเกษตรฟาร์ม	88 หมู่ 4 ต.ม่วงค่อม อ.ชัยบาดาล	ลพบุรี	10 มค. 2552

วิจารณ์และสรุป

ระเบียบและประกาศกรมปศุสัตว์ที่ได้ดำเนินการนี้ ใช้เป็นข้อบังคับเพื่อการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อผสมเทียมให้มีมาตรฐาน ป้องกันการแพร่โรคติดต่อผ่านทางน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียม และเป็นคู่มือสำหรับคณะกรรมการตรวจรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ เนื่องจากประกอบด้วยวิธีการพิจารณาคุณสมบัติของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อมาตรฐาน การจัดการด้านสุขภาพของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ ขั้นตอนการขอรับใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ การนำสัตว์เข้ามาในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อและกักแยกเพื่อตรวจสอบสุขภาพ โรคทางพันธุกรรมที่ต้องห้าม การควบคุมและป้องกันโรคและวิธีที่ใช้ในการตรวจโรคติดต่อที่ผ่านทางน้ำเชื้อ การบันทึกข้อมูล การรีดเก็บและผลิตน้ำเชื้อ รวมถึงมาตรฐานของน้ำเชื้อในสัตว์แต่ละชนิด นอกจากนี้ยังได้จัดทำแบบเอกสารสำหรับการดำเนินงานของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ และเพื่อเป็นคู่มือในการดำเนินงานด้านการบันทึกเอกสาร และเพื่อประโยชน์ในตรวจสอบย้อนกลับในกรณีมีปัญหาการปลอมปนน้ำเชื้อ

คำสั่งกรมปศุสัตว์ ในการแต่งตั้งคณะกรรมการตรวจรับรองศูนย์ผลิตน้ำเชื้อ ที่ได้ดำเนินการเป็นผลงานในครั้งนี้ ทำให้เกิดการบูรณาการของหน่วยงานในกรมปศุสัตว์ ที่เกี่ยวข้องทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาค เนื่องจากคณะกรรมการประกอบด้วย นายสัตวแพทย์กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ และนายสัตวแพทย์จากหน่วยงานส่วนภูมิภาค ได้แก่ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียม ผู้อำนวยการศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแห่งชาติโคในเขตที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อตั้งอยู่ นายสัตวแพทย์ส่วนรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ของจังหวัดนั้นๆ และผู้ทรงคุณวุฒิด้านน้ำเชื้อพอพันธุ์

ผลงานนี้สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ในการปฏิบัติงานได้อย่างแท้จริง ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพอพันธุ์ของภาคเอกชนหลายรายต้องการให้มีหน่วยงานราชการเป็นผู้ตรวจรับรอง เนื่องจากทำให้สามารถส่งออกน้ำเชื้อแช่แข็งพอพันธุ์โคออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้ ซึ่งกรมปศุสัตว์ยังไม่มีมีการดำเนินการเรื่องนี้มาก่อน เช่น โชคชัยแดรีฟาร์ม ซึ่งสามารถส่งออกน้ำเชื้อโคไปยังประเทศใกล้เคียงได้ เมื่อมีการตรวจรับรองศูนย์ผลิตน้ำเชื้อมาตรฐาน ทำให้ผู้ซื้อมีความมั่นใจ ทำให้การค้าน้ำเชื้อระหว่างประเทศของประเทศไทยเป็นที่เชื่อถือของประเทศเพื่อนบ้านเป็นการยกระดับมาตรฐานให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงปศุสัตว์ของประเทศไทย และในปี พ.ศ. 2551 องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย ได้ยื่นขอการรับรองเป็นศูนย์ผลิตน้ำเชื้อมาตรฐานที่กรมปศุสัตว์รับรอง ซึ่งอยู่ในระหว่างการดำเนินการตรวจรับรอง

การควบคุมศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพอพันธุ์สำหรับผสมเทียมของภาคเอกชน ทำให้การปฏิบัติงานของกรมปศุสัตว์ขยายกว้างครอบคลุมมากขึ้น ซึ่งเดิมกรมปศุสัตว์ไม่ได้เข้าไปควบคุมดูแลน้ำเชื้อพอพันธุ์ เกษตรกรต้องเสี่ยงในการซื้อน้ำเชื้อที่ไม่ได้มาตรฐานจากผู้ผลิต บางครั้งมีการปลอมปนน้ำเชื้อ เกษตรกรต้องการให้มีหน่วยงานราชการดูแลในเรื่องนี้ จากการประชุมของกลุ่ม 20 สหกรณ์ ครั้งที่ 4/2550 วันที่ 14 พฤษภาคม 2550 ณ ห้องประชุมกรมปศุสัตว์ ที่ประชุมต้องการให้กรมปศุสัตว์ดูแลเรื่องน้ำเชื้อผสมเทียมที่ภาคเอกชนผลิต

ปัจจุบันการควบคุมดูแลผู้ประกอบการด้านนี้ยังไม่สามารถทำให้ครอบคลุมได้ ซึ่งจะต้องมีการดำเนินการในหลายด้าน โดยเฉพาะการให้ความรู้แก่เกษตรกรในการเลือกใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ในการผสมเทียม และการให้ความรู้แก่ผู้ประกอบการเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อ การควบคุมศูนย์ผลิตน้ำเชื้อนี้ทำให้ผู้ประกอบการต้องมีการพัฒนาตนเองเพื่อปฏิบัติตามระเบียบของกรมปศุสัตว์ ซึ่งเป็นการพัฒนาและยกมาตรฐานอุตสาหกรรม การเลี้ยงปศุสัตว์ของประเทศไทยให้ก้าวหน้าด้วยหลักวิชาการและตามมาตรฐานสากลซึ่งเป็นการพัฒนาอย่างยั่งยืนถาวร

เอกสารอ้างอิง

- Code of Practice for Australian Livestock Artificial Breeding Centres. Australian Quarantine and Inspection Service. Australian Government Publishing Service, Canberra. pp.33.
- Minimum Health Standards for Stock Standing at Licensed or Approved Artificial Breeding Centres in Australia. 3rd Ed. Australian Quarantine and Inspection Service. Australian Government Publishing Service, Canberra. pp. 35.
- O.I.E., 2006. Office International des Epizooties. World Organization for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code 2006. Appendix 3.2.1. Bovine and Small Ruminant Semen.
- http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_chapitre_3.2.1.htm

เปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris Optidyl® และ Bioexcel® ต่อคุณภาพ

น้ำเชื้อแช่แข็งโคนมด้วยเครื่อง flow cytometer และ CASA

สุดา จันทาสี¹ จตุพร พงษ์เพ็ง¹ มุขดารัตนภาสกร²

ธวัชชัย แก้วมาก³ ปิยวรรณ สุธรรมากินันท์⁴

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคนม 3 ชนิด ได้แก่ Egg Yolk Tris Optidyl® และ Bioexcel® ต่อคุณภาพของอะโครโซม เยื่อหุ้มตัวอสุจิ และอัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งด้วยเครื่อง flow cytometer และ CASA (computerized automatic semen analyzer) ทำการทดลองโดยรีดเก็บน้ำเชื้อจากโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ฟรีเซียน-พื้นเมือง จำนวน 3 ตัวด้วย Artificial vagina สัปดาห์ละครั้งต่อเนื่องกัน 5 สัปดาห์เพื่อทำการแช่แข็ง ตรวจสอบคุณภาพตัวอสุจิหลังจากแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที แล้วจึงย้อมตัวอสุจิทันทีด้วยสี FITC-PNA (Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin) เพื่อตรวจสอบการติดของอะโครโซม และสี PI (Propidium iodide) เพื่อตรวจสอบการติดของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ จากนั้นนำไปตรวจสอบการติดด้วยเครื่อง Flow cytometer รวมทั้ง ตรวจสอบอัตราตัวอสุจิที่มีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ารวมทั้งลักษณะ การเคลื่อนที่ทาง kinetic ด้วยเครื่อง CASA

ผลการทดลองพบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Optidyl® และ Egg Yolk Tris มีผลต่อเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมสมบูรณ์สูงกว่า Bioexcel® โดยมีเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิและอะโครโซมสมบูรณ์ (52.82 ± 6.38 , 47.03 ± 2.09 และ 36.70 ± 1.51 ตามลำดับ) ($P < 0.05$) แต่ Bioexcel® มีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ตายแต่ยังมีอะโครโซมสมบูรณ์ สูงกว่า Egg Yolk Tris และ Optidyl® (45.02 ± 1.42 , 28.04 ± 1.14 และ 25.88 ± 3.33 ตามลำดับ) ($P < 0.05$) ส่วนอัตราตัวอสุจิที่มีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิด ($P > 0.05$) แต่การเคลื่อนที่ทาง kinetic (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF) พบว่า Bioexcel® สูงกว่า Egg Yolk Tris และ Optidyl® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: ฟอโคนม, Egg Yolk Tris, Optidyl®, Bioexcel®, flow cytometer, CASA.

เลขทะเบียน 51(2)-0208-091

¹ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลาง อ.ลำสนธิ ลพบุรี

²กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี ปทุมธานี

³สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อ.เมือง จ.นครปฐม

⁴คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จ. นครปฐม

Effects of Egg Yolk Tris , Optidyl[®] and Bioexcel[®] on frozen dairy bull semen quality assessed by flow cytometer and CASA

Suda Chuntasee¹ Jatuporn Pongpeng¹ Mukda Rattanapaskorn²
Thawatchai Keawmarg³ Piyawan Suthunmaponata⁴

Abstract

Three cattle semen extenders; Egg Yolk Tris and Optidyl[®] with egg yolk based and Bioexcel[®] with soybean extract based were compared for their effect on quality of frozen dairy bull semen. Semen from three Holstein-Thai native crossbred bulls were collected and frozen once a week for five consecutive weeks. Frozen semen samples were thawed at 37°C for 30 seconds then stained with FITC-PNA for acrosomal membrane test and with PI for spermatozoa plasma membrane test. Then all stained samples were processed through a Flow Cytometer. Percentage of live, motility, forward progression and kinetic movement of spermatozoa was accessed by CASA.

The percentage of live sperm with intact acrosomal membrane of frozen-thawed semen extended with Egg Yolk Tris and Optidyl[®] were better than Bioexcel[®] (52.82±6.38, 47.03±2.09 and 36.70±1.51, respectively), (P<.05). The percentage of dead sperm with intact acrosomal membrane and kinetic movement (VCL, VSL, VAP,ALH, BCF) of Bioexcel[®] were higher than Optidyl[®] and Egg Yolk Tris (P<0.05). However percentage of dead sperm with damaged acrosomal membrane, live sperm, motility, forward progression of the three extenders were not significantly different (P>0.05).

Keywords: dairy bull, DFS, Egg Yolk Tris, Optidyl[®] , Bioexcel[®] , flow cytometer, CASA.

¹ Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190, Thailand

² Semen Research and Production sub-Division , Bureau of Biotechnology for Animal Production, Muang, Pathumthani, 12000, Thailand

³ Department of Anatomy, Faculty of Science, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

⁴ Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทนำ

อาชีพการเลี้ยงโคนมมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งเกษตรกรนิยมผสมเทียม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการป้องกันโรคติดต่อที่ผ่านทางพ่อพันธุ์และสามารถปรับปรุงพันธุ์ด้วยโคนมพันธุ์ดีที่ราชการจัดหาไว้โดยไม่ต้องมีการะด้นทุนในการเลี้ยงพ่อพันธุ์ในฟาร์มรวมทั้งป้องกันอันตรายจากการเลี้ยงพ่อพันธุ์ที่อาจมีนิสัยคุกคามร้ายได้

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งนอกจากคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแล้วยังต้องคำนึงถึงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผลิตต้องมีอัตราการผสมติดสูง ซึ่ง อะโครโซม (acrosome) ตรงส่วนหัวมีเอนไซม์สำคัญที่ทำให้สpermปฏิสนธิกับไข่ หากส่วนอะโครโซมเสียหายการปฏิสนธิจะเกิดขึ้นไม่ได้ การเสียหายของอะโครโซมอาจเกิดจากขบวนการแช่แข็งหรือการละลายน้ำเชื้อ ดังนั้นขบวนการดังกล่าวรวมทั้งวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งต้องทำอย่างถูกต้อง (สุธีรัตน์, 2542) ในขบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งให้มีคุณภาพนั้นนอกจากประกอบไปด้วยน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ดีแล้วองค์ประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก็เป็นปัจจัยสำคัญ

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคมีหลายชนิดที่ผลิตออกมาในรูปแบบน้ำยาเจือจางสำเร็จรูปซึ่งมีส่วนประกอบแตกต่างกันโดยเฉพาะสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเพื่อลดความเสียหายของอสุจิเมื่ออุณหภูมิลดลงถึงจุดเยือกแข็ง ที่นิยมและใช้กันแพร่หลายมาเป็นเวลานานคือ Egg Yolk Tris ที่มีส่วนผสมของไข่แดงสด 25 % และ glycerol 7% (Ahmad and Foote, 1984) เป็นตัวช่วยป้องกันอสุจิเพื่อลดความเสียหายหรือตายในขณะที่ลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็ง (Gil et al., 1999) แต่ปัจจุบันมีการคิดค้นและดัดแปลงวิธีการนำไข่แดงมาใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ โดยการนำไข่แดงมาผ่านขบวนการไอออนไนเซชัน (ionization) เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อและช่วยให้สารจำพวก lipoprotein แยกตัวเป็นประจุและเกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นรวมทั้งลดการปนเปื้อนของ bacteria บางชนิด ทำให้สามารถลดปริมาณสารปฏิชีวนะที่ใช้ผสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (Jiménez et al., 2004) นอกจากนี้ Aires, et al., (2003) ใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งจากพืช ได้แก่ lecithin จากถั่วเหลือง มาเป็นส่วนผสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เนื่องจาก lecithin จัดอยู่ในกลุ่ม lipoprotein เช่นเดียวกับไข่แดง แต่สามารถแยกตัวเป็นไอออนได้ง่ายกว่าไข่แดง

ดังนั้นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง 3 ชนิดที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งแตกต่างกัน ได้แก่ Egg Yolk Tris ที่ใช้ไข่แดงสด, Optidyl[®] (Bio-vet, France) ใช้ไข่แดงที่ผ่านกระบวนการไอออนไนเซชัน และ Bioexcel[®] (IMV, France) ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองในน้ำยาเจือจาง เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการเลือกใช้น้ำยาป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสมเพื่อลดความเสียหายแก่อสุจิขณะลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็งในขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโคนม

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตล์ฟรีเชียน-พื้นเมือง อายุประมาณ 5-6 ปี น้ำหนักตัวประมาณ 800-850 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว มีคุณภาพน้ำเชื้อสดใกล้เคียงกัน และมีค่าดังนี้ ปริมาตรไม่น้อยกว่า 3 มล. ความเข้มข้นของตัวสpermไม่น้อยกว่า 500 ล้านตัว/มล. และตัวสpermมีชีวิตไม่น้อยกว่า 70 % ตัวสpermมีความผิดปกติส่วนหัวและส่วนหางไม่เกิน 10% และ 5% ตามลำดับ

การทดลอง

1 ริดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตล์ฟรีเชียน-พื้นเมือง จำนวน 3 ตัว 5 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้โยนีเทียม (Artificial Vagina:AV)

2 ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังนี้ ปริมาตร สี ความหนืด การเคลื่อนไหวหุ้ม และตรวจนับความเข้มข้นของน้ำเชื้อโดยใช้ spectrophotometer รุ่น REF.Z160 บริษัท IMV TECHNOLOGIES

3 แบ่งน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคแต่ละตัวออกเป็น 3 ส่วนเท่ากันแล้วผสมกับน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris, Optidyl[®] และ Bioexcel[®] ที่อุณหภูมิ 28 °C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำเชื้อเป็น 80 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

4 นำน้ำเชื้อจาก ข้อ 3 ไปทำการลดอุณหภูมิที่ 4 °C นาน 4 ชั่วโมงแล้วบรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร และแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (รุ่น Digitcool 5300 ZH 350 & UE 350 with 900 HP programmer) โดยเรียงน้ำเชื้อบนแท่นเรียงน้ำเชื้อแล้วนำไปวางเรียงในเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ อุณหภูมิ -140 °C นาน 6 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในไนโตรเจนเหลว เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้

4.1 ตรวจเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และอะโครโซมของตัวสpermในน้ำเชื้อแช่แข็ง ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยตรวจร้อยละของความผิดปกติของเยื่อหุ้มตัวสperm และอะโครโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้เครื่อง Flow Cytometer การตรวจความผิดปกติของอะโครโซมจะย้อมด้วยสี FITC-PNA และการตรวจความผิดปกติเยื่อหุ้มตัวสpermจะย้อมด้วยสี PI โดยทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37° C นาน 30 วินาที แล้วเจือจางทันทีด้วย Hepes-buffered modified Tyrode medium (SP-TALP; 2.0 mM CaCl₂, 3.1 mM KCL, 0.4 mM Mg Cl₂, 100.0 mM NaCl₂, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.6 mM sodium lactate, 10.0 mM Hepes, and 6 mg/ml BSA) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 C และกรองผ่าน 41µm nylon mesh (Spectrum, Los Angeles, CA) หรือคำนวณให้มีความเข้มข้นของตัวสperm 50/10⁶ cell/ml. จากนั้นย้อมด้วยสี FITC-PNA ใช้น้ำเชื้อปริมาตร 440 µl Aliquot ผสมกับสี FITC-PNA ปริมาตร 50 µl(10 µg/ml.) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37° C นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี PI ก่อนนำไปตรวจด้วยเครื่อง Flow Cytometer รุ่น FACS caliber จากบริษัท BECTON DECKINSON

4.2 ตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมิชีวิต (% living sperm) อัตราการเคลื่อนที่ (% motility) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (% progressive motility) ในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้เครื่อง CASA (computerized automatic semen analyzer) Hamilton Thorn Motility Analyzer, IVOS12.3 โดยตั้งค่าเพื่อการตรวจดังนี้ Frames Per Sec.50Hz, No. of Frames 30, minimum contrast 60, minimum cell size 5 pix, Path velocity, VAP 55ul/s, STR50%, cell Intensity 55, VAP cut off 21.9 u/s, VSL cut off 6 u/s

5. การวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบร้อยละของความผิดปกติอะโครโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมิชีวิตระหว่างน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 3 ชนิด วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD เปรียบเทียบความแตกต่างของ treatments โดย DMRT (Duncan's Multiple Rang test.)

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาความสมบูรณ์ของอะโครโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมที่ผลิตโดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris , Optidyl[®] และ Bioexcel[®] โดยย้อมตัวอสุจิด้วยสี FITC-PNA ร่วมกับการย้อมด้วย PI และตรวจด้วยเครื่อง flow cytometer แสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ Egg Yolk Tris และ Optidyl[®] มีตัวอสุจิมิชีวิตและอะโครโซมสมบูรณ์ (Membrane-acrosome intact) มีจำนวนมากกว่า Bioexcel[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 1 ร้อยละของความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมภายหลังการแช่แข็งของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมในน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris , Optidyl[®] และ Bioexcel[®] เมื่อตรวจด้วยเครื่อง Flow Cytometer (ค่าเฉลี่ย±SE)

ลักษณะของอะโครโซมของอสุจิ	น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ^{1/}		
	Egg Yolk Tris	Optidyl [®]	Bioexcel [®]
Membrane- acrosome intact ;MAI(%)	47.03 ^a ±2.09	52.82 ^a ±6.38	36.70 ^b ±1.51
Membrane damage - acrosome intact ;MDAI(%)	28.04 ^b ±1.14	25.88 ^b ±3.33	45.02 ^a ±1.42
Membrane- acrosome damage ;MAD(%)	24.72±1.45	22.37±2.75	18.26±1.51

^{1/}: a, b : อักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ส่วนอสุจิตายแต่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (Membrane damage - acrosome intact) พบว่า Bioexcel[®] มีจำนวนมากกว่า Egg Yolk Tris และ Optidyl[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และอสุจิตายและอะโครโซมถูกทำลาย (Membrane-acrosome damage) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ของร้อยละของตัวอสุจิมีชีวิต และการเคลื่อนที่ทาง kinetic ของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งในน้ำเชื้อโคนมที่มีน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris , Optidyl[®] และ Bioexcel[®]

ลักษณะการเคลื่อนที่	น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ^{1/}		
	Egg Yolk Tris	Optidyl [®]	Bioexcel [®]
Rapid movement (%)	39.21 $\pm$ 3.11	43.60 $\pm$ 2.43	43.07 $\pm$ 3.19
Motility(%)	50.21 $\pm$ 3.19	52.40 $\pm$ 2.75	52.53 $\pm$ 3.68
Progressive motility (%)	30.85 $\pm$ 1.88	36.06 $\pm$ 1.28	33.76 $\pm$ 2.03
Curvilinear velocity ;VCL (μ m/s)	146.87 ^b $\pm$ 4.22	149.82 ^b $\pm$ 3.58	178.04 ^a $\pm$ 5.66
Straight-line velocity ;VSL(μ m/s)	56.90 ^c $\pm$ 1.11	61.48 ^b $\pm$ 1.19	68.30 ^a $\pm$ 2.33
Average path velocity ;VAP(μ m/s)	81.97 ^b $\pm$ 2.82	84.77 ^b $\pm$ 2.04	97.73 ^a $\pm$ 3.62
Amplitude of lateral head displacement; ALH(μ m/s)	7.88 ^b $\pm$ 0.20	7.62 ^b $\pm$ 0.20	8.89 ^a $\pm$ 0.18
Beat frequency; BCF (Hz)	24.50 ^b $\pm$ 0.41	24.60 ^b $\pm$ 0.51	28.58 ^a $\pm$ 0.56
Linearity; LIN(%)	40.28 ^b $\pm$ 0.63	42.53 ^a $\pm$ 0.89	39.46 ^b $\pm$ 0.81
Straightness; STR(%)	69.92 ^b $\pm$ 1.36	72.93 ^a $\pm$ 1.49	69.53 ^b $\pm$ 1.57

^{1/} a, b : อักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p>0.05$)

เมื่อตรวจการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิด้วยเครื่อง CASA พบว่าเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิต ได้แก่ % Rapid movement, % Motility และ % Progressive motility ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) สำหรับลักษณะการเคลื่อนที่ kinetic ของตัวอสุจิ ได้แก่ VCL (μ m/s) , VSL(μ m/s), VAP(μ m/s), ALH(μ m/s) และ BCF (Hz) พบว่าน้ำยาเจือจาง Bioexcel[®] มีค่ามากกว่า Egg Yolk Tris และ Optidyl[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และลักษณะการเคลื่อนที่ kinetic ของตัวอสุจิ ได้แก่ % LIN และ% STR พบว่าน้ำยาเจือจาง Optidyl[®] มีค่ามากกว่าน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris และ Bioexcel[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 2

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris , Optidyl[®] และ Bioexcel[®] เมื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Flow Cytometer พบว่าตัวอสุจิที่ผลิตโดยใช้ Egg Yolk Tris และ Optidyl[®] มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมสูงกว่า Bioexcel[®] ($p<0.05$) แสดงว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบมีความสามารถป้องกันความเสียหายของอะโครโซมขณะลดอุณหภูมิได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากไข่แดงประกอบไปด้วย Low density lipoprotein (LDL) มีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายของอสุจิได้ดี (Moussa et al., 2002) ซึ่งหากเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมได้รับความเสียหายมีผลทำให้ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ (สุธีรัตน์, 2542) ทำให้อัตราการผสมติดลดลง แต่จากรายงานของ Gil J. et al., (1999) และ Bousseau et al., (1998) พบว่าการใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองและไข่แดงเป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเป็นสารลดความเสียหายแก่อสุจิขณะแช่แข็งไม่ทำให้อัตราการผสมติดแตกต่างกัน

สำหรับ % rapid movement, % motility และ % progressive motility เมื่อตรวจด้วยเครื่อง CASA พบว่าไม่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ($p>0.05$) แต่การเคลื่อนที่ทาง kinetic ของตัวอสุจิพบว่าค่า VCL, VSL, VAP และ BCF ของ Bioexcel[®] สูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris และ Optidyl[®] ($P<0.05$) แสดงว่าตัวอสุจิดังกล่าวมีความแข็งแรงงอไวกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ Gil et al. (1999) ที่พบว่าน้ำยาเจือจางที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบสามารถรักษาระดับค่าการเคลื่อนที่ทาง kinetic ได้ยาวนานกว่า แต่ Optidyl[®] มีค่า % LIN และ % STR มากกว่าน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris และ Bioexcel[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่าสามารถเคลื่อนที่ได้ทิศทางมากกว่า แต่น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris และ Optidyl[®] ซึ่งมีไข่แดงเป็นองค์ประกอบมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมสูงกว่า Bioexcel[®] ($p>0.05$) ซึ่งตัวอสุจิมีชีวิตและมีอะโครโซมสมบูรณ์เป็นคุณสมบัติพึงประสงค์ของการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง เนื่องจากเป็นตัวอสุจิที่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ (สุธีรัตน์, 2542) แต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับ % rapid movement, % motility และ % progressive motility ที่ไม่พบความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แล้วหากต้องการใช้น้ำเจือจางน้ำเชื้อเพื่อการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถเลือกใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อได้ทั้ง 3 ชนิด แต่ถ้าต้องการประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำเชื้อใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ยังคงเป็นตัวเลือกที่ดี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ภานุพันธ์ พงษ์เพ็ง นายสัตวแพทย์สินชัย วิโรจน์วุฒิกุลที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ดร.จำเนียร สายขุน และอาจารย์กรชัย กรแก้วรัตน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและช่วยเหลือการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ และนายณรินทร์ จารีและนางสาวแก้ว แก้วเกิด และเจ้าหน้าที่ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมที่ให้ความช่วยเหลือการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สุธีรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2542. การผสมเทียมและการปรับปรุงพันธุ์ใน โคเนื้อ.22-23.

Ahmad, K., and Foote, R.H. 1984. Motility and fertility of froze bull spermatozoa in tris-yolk and milk extenders containing amikacin sulfate. J. Dairy Sci. 68: 2083-2086.

Aires, V. A., Klaus-Dieter,H., Mueller-Schloesser, F. , Bogner, K., Mueller-Schloesser, S. and Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk – based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology 60(2):269-279.

Bousseau,S., Brillard,J.P., Marquant-Le,G.B., Guerin,B., Camus,A. and Lechat,M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology.50:699-706.

Gil, j., Januskauskas,A., Haard, M. C., Haard, M.G.M., Johannisson, A., Soderquist, L. and Martinez. H.M. 1999. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus[®] and Triladyl[®]. Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing. Uppsala. Swedish .

Gillan, L., Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology 63:445-457.

Jiménez,F.M., Puchades, S ., Mocé,E., viudes-de-Cartro, MP., Vicente, J.S .and Rodriguez, M. 2004. Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen. Reproduction in Domestic Animals39:438.(Abstract)

Moussa, M., Martinet V., Trimeche, A., Tainturier, D., and Anton, M., 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method : cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology 57(6):1695-1706.

Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research 63(3):205-225.

White, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. Rreprod. Fertil. Dev. 6:639-658.

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งโค

กิตติศักดิ์ แสงสกุล^a นายสุพล จันทโคตร^b

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล^c สราวุธ ฉายประสาท^d มุขดา รัตนภาสกร^c

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ตรวจทันทีหลังจากการอุ่นละลายและหลังจากอุ่นละลาย 3 ชม. ด้วยเครื่อง computerized automatic semen analyzer (CASA) ลักษณะการเคลื่อนที่ที่ตรวจได้แก่ total motility (%MOT), progressively motility (%PMOT), path velocity (VAP), linearity (LIN), the velocity parameters; Progressive velocity (VSL), Tract speed (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF) และ straightness (STR) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งโคพันธุ์ขาว-ดำ จำนวน 6 ตัว ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโค 1 ตัว ผสมเทียมกับแม่โคจำนวนระหว่าง 167 – 243 ตัว รวมจำนวนแม่โคทั้งสิ้น 1,240 ตัว โดยคัดเลือกแม่โคที่มีคะแนนร่างกาย 2-3 และ ไม่มีปัญหาผสมซ้ำ โดยผสมเมื่อเป็นสัดครั้งที่ 2 หลังคลอด

ผลการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างค่า VAP, VSL และ VCL ของน้ำเชื้อที่ตรวจหลังการอุ่นละลาย 3 ชม. กับอัตราการตกูก ($r = 0.928, 0.746$ และ 0.809 ; $P = 0.001, 0.08$ และ 0.05 ตามลำดับ)

คำสำคัญ : ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ น้ำเชื้อโค อัตราการผสมติด

ทะเบียนผลงานวิชาการเลขที่ : 51(2)-0208-116

^a ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี อ.บ้านบึง จ. ชลบุรี 20170

^b สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครปฐม อ. เมือง จ. นครปฐม 73000

^c กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

^d ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ ต. ห้วยแก้ว อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50300

Correlation between calving rate and kinetic movements of bull spermatozoaKittisak Sangsakul^a Supon Chantarakot^b Lerdchai Chintapitaksakul^cSarawut Chaiprasart^d Mukda Rattanapaskorn^c**Abstract**

This study was conducted to determine whether the movement parameters of sperm from six bulls assessed immediately after thawing and 3 h. after thawing correlate with the calving rate. Sperm motility parameters assessed using a computerized automatic semen analyzer (CASA) were: total motility (%MOT), progressively motility (%PMOT), path velocity (VAP), linearity (LIN), the velocity parameters; Progressive velocity (VSL), Tract speed (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF) and straightness (STR). A total of 1,260 inseminations (167-243 cows per bull) were performed in cows which were non repeat breeding and had body condition score 2-3 and inseminated on the second heat after calving. Calving rates were recorded.

Significant correlations were observed between VAP, VSL and VCL assessed 3 h. after thawing and calving rate ($r = 0.928, 0.746$ and 0.809 ; $P = 0.001, 0.08$ and 0.05 respectively) . These results indicate that VAP, determined by CASA systems at 3 h after thawing can provide some information about the fertilizing potential of bull sperm.

Key words: sperm movement, fertility, bull spermatozoa

^a Chonburi Biotechnology and AI Research Center. , Bureau of Biotechnology for Animal Production
Banbung, Chonburi. 20170, Thailand

^b Nakhonpathom Provincial Livestock Office, Nakhonpathom, Muang district, 73000

^c Semen Research and Production sub-Division , Bureau of Biotechnology for Animal Production, Muang,
Pathumthani, 12000 Thailand

^d Livestock Semen Production Center (Inthanon Royal Project). Huaykaew, Muang, Chiangmai, 50300,
Thailand

บทนำ

คุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมโคนั้นเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการผสมติด การทราบความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของน้ำเชื้อก่อนนำไปใช้ผสมเทียมย่อมก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก (Tardif, 1999) โดยเฉพาะด้านเศรษฐกิจ (Sutkeviciene and Zilinskas, 2004) ในขบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งนั้น ส่วนมากจะนิยมการตรวจ motility เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ ทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในการตรวจ motility ได้แก่การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Hallap, 2005) ซึ่งเป็นการการประเมินด้วยตา (subjective) motility ของตัวอสุจินั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการสร้างและการใช้พลังงานในรูปของ ATP (Söderquist, 1991) ถึงแม้ว่าค่าดังกล่าวจะมีความเชื่อมโยงกับอัตราการผสมติด แต่ค่าความสัมพันธ์ (correlation) ที่พบจากการศึกษาต่าง ๆ ก็มีความแตกต่างกัน ทั้งที่มีความสัมพันธ์ต่ำจนถึงมีความสัมพันธ์สูง (Makhzoomi, 2005) Zhang et al (1998) รายงานว่า motility ของน้ำเชื้อที่ตรวจในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี subjective นั้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดน้อย ปัจจุบันมีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง computerized automatic semen analyzer (CASA) ซึ่งเป็นวิธีตรวจที่ไม่มีการ bias โดยผู้ตรวจ (objective) สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอสุจิได้จำนวนมากในแต่ละครั้งด้วยเวลาอันรวดเร็ว และมีแม่นยำสูง นอกจากนี้ยังสามารถตรวจลักษณะการเคลื่อนแบบต่างของตัวอสุจิได้อีกด้วย การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA พบความสัมพันธ์ (r^2) ของค่า linearity และอัตราการผสมติดระหว่าง 0.45- 0.63 (Zhang et al., 1998; Januskauskas et al., 2001; 2003) และพบความสัมพันธ์สูงขึ้นเมื่อนำลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลายลักษณะมาวิเคราะห์ร่วมกัน ($r^2 = 0.68-0.98$, Farrell, et al., 1998; Januskauskas, et al., 2001) แต่สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกคู่กับการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิที่ตรวจด้วยเครื่อง CASA เพื่อเป็นแนวทางในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งก่อนนำไปใช้ผสมเทียมให้ได้แม่นยำสอดคล้องกับอัตราการผสมติดมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. คัดเลือกพ่อโคนมขาวดำจำนวน 6 ตัว ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ AV เพื่อนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งให้ได้อย่างน้อย 300 โด๊ส ต่อพ่อโค 1 ตัว
2. ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังนี้ ปริมาตร สี ความหนืด การเคลื่อนไหวหาง และตรวจนับความเข้มข้นของน้ำเชื้อโดยใช้ spectrophotometer รุ่น REF.Z160 บริษัท IMV TECHNOLOGIES

3. นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาผสมน้ำยาละลาย Egg Yolk Tris Glycerol ที่มีส่วนประกอบของยาปฏิชีวนะ Gentamycin 250 µg/ml, Tylosin 50 µg/ml, Lincospectin 150/300 µg/ml โดยให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 80 ล้านตัวต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4. ทำการลดอุณหภูมิที่ 4 °C นาน 4 ชั่วโมงแล้วบรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร และแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (รุ่น Digitcool 5300 ZH 350 & UE 350 with 900 HP programmer) โดยเรียงน้ำเชื้อบนแท่นเรียงน้ำเชื้อแล้วนำไปวางเรียงในเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ อุณหภูมิ -140 °C นาน 6 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในไนโตรเจนเหลว

5. เมื่อแช่แข็งครบ 24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อเพื่อคุณภาพและการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิ (Kinetic movements) ในน้ำเชื้อแช่แข็งดังนี้ total motility (%MOT), progressively motility (%PMOT), path velocity (VAP), linearity (LIN), the velocity parameters; Progressive velocity (VSL), Tract speed (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF) and straightness (STR) โดยใช้เครื่อง CASA (computerized automatic semen analyzer) Hamilton Thorn Motility Analyzer, IVOS 12.3 ใช้ Leja slide ชนิด 2 chamber ความลึก 20 µm ที่อุณหภูมิ 37 °C ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ 2 ช่วงเวลา ดังนี้

5.1 ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทันทีหลังการอุ่นละลาย (after thawing)

5.2 ตรวจหลังจากอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 ชม. โดยเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C

6. นำน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคทั้ง 6 ตัวไปผสมเทียมกับแม่โคของเกษตรกรในเขตความรับผิดชอบของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี โดยใช้แม่โคระหว่าง 167 – 243 ตัว ต่อน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโค 1 ตัว โดยเลือกแม่โคที่ไม่มีปัญหาการผสมติด ใช้หลักเกณฑ์ดังนี้ (ไม่มีปัญหาผสมซ้ำ, Body condition score 3-4 (Rice, 1986), ผสมหลังคลอด ครั้งที่ 2)

7. ติดตามลูกเกิด (อัตราการตกูก หรือ calving rate) หลังทำการผสมเทียม

8. การวิเคราะห์ข้อมูล หาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างอัตราการตกูกกับค่าการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิ ที่ตรวจทั้ง 2 ช่วงเวลา

ผลการทดลอง

ผลของการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกกับลักษณะการเคลื่อนของตัวอสุจิแบบต่าง ๆ ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ตรวจทันทีหลังการอุ่นละลายนั้น พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกกับตัวแปรของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ตรวจด้วยเครื่อง CASA (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิของพ่อโค 6 ตัว ตรวจทันทีหลังจากอุ่นละลาย

Bull no	Sperm's Kinetic movements									No. of Cow Insem.	Calving rate (%)
	MOT (%)		VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)		
1	45	226	109.2	81.6	192.7	6.6	33.8	76	46	226	48.67
2	35	167	113.1	88.3	201.7	6.5	37.4	79	47	167	52.10
3	45	224	116.7	93.2	206.3	6.8	38	81	49	224	48.66
4	41	171	111.6	90.1	201.5	7.8	30.6	80	46	171	62.57
5	43	229	121.4	96	230	8.9	31.8	80	45	229	53.27
6	40	243	109.2	89.1	187.9	6.6	33.1	82	50	243	44.03

แต่ผลของการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกกับลักษณะการเคลื่อนของตัวอสุจิแบบต่าง ๆ ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ตรวจหลังจากอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว 3 ชม. พบว่า VAP, VSL และ VCL มีความสัมพันธ์กับอัตราการตกูก โดยค่าดังกล่าวมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ตามตารางที่ 2 และ 3 ดังนี้

ตารางที่ 2 อัตราการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิของพ่อโค 6 ตัว ตรวจหลังจากอุ่นละลาย 3 ชม.

Bull no	Sperm's Kinetic movements									No. of Cow Insem.	Calving rate (%)
	MOT (%)	PMOT (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)		
1	20	7	65.8	45.3	116.5	5.5	16.5	66	40	226	48.67
2	32	15	60.2	49	109.9	5.4	31.2	82	46	167	52.10
3	37	26	76.8	61.3	129.7	5.3	30.3	81	50	224	48.66
4	11	2	42.8	30.9	90.5	3.8	25.4	71	36	171	62.57
5	30	6	57	36.3	116.2	5.9	24.8	62	32	229	53.27
6	6	3	72.9	49	116.3	4.9	12.3	67	44	243	44.03

ตารางที่ 3 ค่าความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างอัตราการตกูกและลักษณะการเคลื่อนของตัวอสุจิแบบ VAP, VSL และ VCL ของน้ำเชื้อแช่แข็งโคเมื่อตรวจหลังจากอุ่นละลาย 3 ชม.

	Kinetic movements	r	p
Calving rate	VAP	- 0.928	0.001
Calving rate	VSL	- 0.746	0.08
Calving rate	VCL	- 0.809	0.05

วิจารณ์

ในขบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ เพื่อใช้เชื่อมโยง กับอัตราการผสมติดเป็นสิ่งจำเป็น การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพน้ำเชื้อที่ตรวจจากห้องปฏิบัติการและอัตราการผสมติดนั้นมีความต้องการศึกษาอยู่เสมอ แต่ความสัมพันธ์ระหว่างค่าของตัวแปรที่ตรวจจากห้องปฏิบัติการกับอัตราการผสมติดที่ศึกษาในภาคสนามจากการศึกษาต่าง ๆ ก็มีความแตกต่างกัน มีทั้งที่ความสัมพันธ์ต่ำจนถึงมีความสัมพันธ์สูง (Makhzoomi, 2005) ทั้งนี้เนื่องจากศึกษาในสิ่งแวดล้อมต่างกัน โคต่างสายพันธุ์ เป็นต้น จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกกับลักษณะการเคลื่อนของตัวอสุจิแบบต่าง ๆ ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ตรวจทันทีหลังการอุ่นละลายนั้นไม่สามารถตรวจพบรูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกกับตัวแปรของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิทุกตัวแปร จากรายงานของ Branton และคณะ (1951) และ Gillan และคณะ (2006) ก็ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง motility และ progressive motility ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลายกับ fertility แต่การศึกษาของ Gillan และคณะ (2006) พบความสัมพันธ์ ระหว่าง ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ VSL ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลายกับ fertility ($r = 0.636$ $p.048$) นอกจากนี้ Budworth และคณะ (1988) พบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการผสมติดกับ MOT, VCL and VSL ($r > 0.68$)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกกับลักษณะการเคลื่อนของตัวอสุจิแบบ ต่าง ๆ ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ตรวจหลังจากอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว 3 ชม. พบว่า VAP, VSL และ VCL มีความสัมพันธ์กับอัตราการตกูก ($r = 0.928, 0.746$ และ 0.809 ตามลำดับ , ตารางที่ 3) ซึ่ง Katila, (2001) พบความสัมพันธ์ระหว่าง motility ของน้ำเชื้อม้าที่ตรวจหลังจากอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว 2 and 4 ชม. กับอัตราการตกูก Dorado และคณะ (2007) พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อที่ตรวจทันทีหลังการอุ่นละลายไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีถึงอัตราการผสมติด โดยเสนอแนะให้ตรวจหลังจากอุ่นละลายแล้วอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ผลการตรวจจะมีความน่าเชื่อถือและมีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดมากกว่า เนื่องจากเมื่อทอดระยะเวลาการตรวจไป ตัวอสุจิที่มีความคงทน (longevity) จึงจะมีชีวิตรอด และปกติหลังจากการฉีดน้ำเชื้อเข้าสู่มดลูกแม่โคแล้วตัวอสุจิจะตั้งต้นเดินทางจากคอมดลูกเพื่อไปยังท่อไข่ โดยใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง อสุจิที่มีบทบาทในการผสมพันธุ์ คือ อสุจิที่

สามารถพบบริเวณที่นำไปในเวลาใกล้เคียงกับการตกไข่ (สุนิรัตน์, 2549) ฉะนั้นในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ควรตรวจถึงความคงทนของน้ำเชื้อภายหลังการอุ่นละลายด้วยเพื่อให้ทราบความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติด จากผลของความสัมพันธ์แสดงว่าควรตรวจหลังจากอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37°C อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จะได้ผลที่สอดคล้องกับอัตราการผสมติดได้ดีกว่า

สรุป

ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อควรตรวจถึงความคงทนของน้ำเชื้อภายหลังการอุ่นละลายด้วยเพื่อให้ทราบความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติด จากผลของความสัมพันธ์แสดงว่าควรตรวจหลังจากอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37°C อย่างน้อย 3 ชั่วโมง โดยพบว่าค่า VAP, VSL และ VCL มีความสัมพันธ์กับอัตราการตกไข่ โดยมีค่าสหสัมพันธ์ เป็น 0.928, 0.746 และ 0.809 ตามลำดับ ดังนั้นในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อควรให้ความสนใจต่อค่า VAP, VSL และ VCL มากกว่าค่าอื่น ทั้งนี้จะต้องศึกษาเพิ่มเติมว่าช่วงของค่าดังกล่าวที่เหมาะสมเป็นเท่าใด โดยต้องใช้ ประชากรในการศึกษาให้มากพอ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคุณคุณพุดนา รุ่งระวี ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเกษตร และ ดร. มนัส ไพฑูรย์ เจริญลาภ ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลและดำเนินการวิเคราะห์ข้อมูล ดร. จำเนียร สายขุน สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหิดล ศาสดา จ.นครปฐม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แก่คณะผู้วิจัย

เอกสารอ้างอิง

- สุนิรัตน์ เอี่ยมละมัย 2549. การเดินทางของตัวสpermและการปฏิสนธิ การผสมเทียมโค ตอนที่ 4 วารสารโคนม, 24:2
- Branton,C., James, C. B., Patrick, T. E. and Newsom, M. H. 1951. The Relationship between Certain Semen Quality Tests and fertility and the interrelationship of these Tests., J dairy sci., 34: 310-316.
- Budworth, P.R., Amann, R.P. and Chapman, P.L. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. J Androl, 9: 41–54.
- Dorado J., Rodri'guez, I., Hidalgo, M. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination Theriogenology, 68:168–177.
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C. and Foote, R.H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology, 49: 871–879.
- Gillan,L., Kroestsch,T., Maxwell,W.M.C. and Evans, G. 2007. Assessmant of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. Anim. Reprod. Sci. doi: 10.1016/j anireprosci.2006.12.010
- Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Foll, J., Aumuller, T.R. And Braun, J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Sus scrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors. J Androl, 22: 104–110.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D.M., Reed, H.C.B. and Curnock, R.M. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. J Androl, 18: 312–323.
- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci., 62: 3 – 22.
- Januskauskas, A., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. Theriogenology, 55: 947–961.
- Januskauskas A., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology, 60: 743–758.
- Katila, T., 2001. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen A Review. Acta vet. scand., 42: 199-217.

- Makhzoomi Anas., Al. 2005. Sperm morphology in progeny-tested Swedish AI dairy bull sires. Thesis, Master of Science, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 41pp.
- Rice, L.E. 1986. Reproductive Health Management in Beef Cows. In: Current Therapy in Theriogenology, 2. Morrow, D.A. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 402-404.
- Sutkevičienė, N. and Žilinskas, H. 2004. Sperm Morphology and Fertility in Artificial Insemination Boars. Veterinaria IR Zootechnika T., 26: 48.
- Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. and Janson, L. 1991. Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to fertility. J. Vet. Med., 38: 165-174.
- Tardif S., Laforest J.-P., Corriner N. and Bailey J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. Theriogenology, 52: 447-459.
- Hallap, T. 2005. Assessment of Sperm Attributes of Frozen-thawed AI Doses from Swedish and Estonian Dairy Bull Sires. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 35pp.
- Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N. and Rodriguez-Martinez, H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. Inter. J Androl, 21: 207-216.

ผลของระยะเวลาบ่มน้ำเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียสต่ออัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโคหลังแช่แข็ง

นายสราวุธ ฉายประสาธ¹ สุดา จันทาสี² นายอภิชาติ ชาติเชื้อ¹ นายพิชิตดวง เจริมปลั่ง¹

บทคัดย่อ

ทำการทดลองผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคขาวดำ เปรียบเทียบผลของระยะเวลาการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่มีช่วงเวลากการบ่มตั้งแต่ 4 ถึง 48 ชั่วโมง ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็ง โดยใช้ช่วงห่างเวลาละ 4 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 (กลุ่มควบคุม) ถึง 48 ชม. รวมทั้งสิ้น 12 ช่วงเวลา จากนั้นนำเชื้อพ่อโค จำนวน 5 ตัว นำน้ำเชื้อมาบ่มหลังจากเจือจางด้วย egg yolk tris ที่มีส่วนประกอบของ Glycerol 7% และไข่แดง 25% โดยให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 80 ล้านตัวต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งโดยกล้องจุลทรรศน์ตัดแสงด้วยวิธี subjective ผลการทดลองพบว่า ช่วงเวลากการบ่มตั้งแต่ 8, 12, 16, 20 , 24 ชม. มีค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่บ่มนาน 4 ชม. (กลุ่มควบคุม) โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 42.86 – 43.46 % ($P>.05$) แต่ในกลุ่มที่บ่มตั้งแต่ 28, 32, 36, 40, 44 ชม. จนถึง 48 ชม. พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งจะต่ำกว่า น้ำเชื้อที่บ่มนาน 4 ชม. อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($P<.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็ง 30.43 – 33.14 %

คำสำคัญ : ระยะเวลาบ่มน้ำเชื้อ , อัตราการเคลื่อนที่ , ตัวอสุจิโค , น้ำเชื้อแช่แข็ง

ทะเบียนผลงานวิชาการเลขที่ : 51(2)-0208-168

1. ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ ต. ห้วยแก้ว อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50300
2. ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง อ. ลำสนธิ จ. ลพบุรี 1519

Effect of equilibration time at 4 °C on after thawed sperm motility of bull semenSarawuth chaiprasat¹ Suda Chantasee² Apichart chartchue¹ Pichitduang Joemplang¹**Abstract**

This study was conducted to study the effect of different equilibration times at 4 °C on after thawed sperm motility of bull semen. Semen samples were collected from five HF bulls. The semen samples from each bull were subjected for cryopreservation. Different equilibration times in the process of semen cryopreservation were assigned into 12 periods, 4 hours interval on each period, which started from 4, 8, 12 hrs,... to 48 hrs. All semen samples were diluted with egg yolk Tris (7% glycerol and 25%egg yolk) into 80×10^6 /ml. Sperm after thawed motility was accessed by subjective method with phase contrast microscope. The results showed after thawed sperm motility's means of the 4 hours equilibration time group (control group) and the groups of 8 , 12, 16 , 20 and 24 hrs were not significantly different, 42.86-43.46% ($P > 0.05$). However, the after thawed sperm motility's means of the groups of 28, 32 ,36, 40, 44, to 48 hrs were significantly lower than the groups of 8 , 12, 16 , 20 and 24 hrs, 30.43-33.14%, ($P < 0.05$).

Keywords : equilibration time, sperm motility , bull frozen semen.

-
1. Livestock Semen Production Center (Inthanon Royal Project). Maewang, ChiangMai, 50300
 2. Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190, Thailand

บทนำ

คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งคือปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จของการผสมเทียม ดังนั้นในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจึงได้มีขั้นตอนและการควบคุมคุณภาพทั้งในขั้นตอนการเก็บน้ำเชื้อสดจากพ่อโคพันธุ์ รวมถึงกระบวนการในห้องปฏิบัติการอย่างเป็นระบบ ตั้งแต่กระบวนการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น เปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ของตัวสperm การเคลื่อนที่หมู่ จนกระทั่งกระบวนการแช่แข็ง และการอุ่นละลายน้ำเชื้อ เพื่อนำไปผสมเทียม

ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีหลายขั้นตอนที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความสำเร็จ เช่น อัตราการการลดอุณหภูมิ วิธีการเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ระยะเวลาในการบ่มหรือปรับสมดุลของน้ำเชื้อเป็นต้น (White,1993) เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่า ตัวสperm ประมาณ 50% จะเกิดความเสียหายในระหว่างขบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง (Watson ,2000) สาเหตุหลักเนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์ช่วงที่ทำการลดอุณหภูมิผ่านจุดเยือกแข็ง (Mazur,1984) การเลือกเติมสาร cryoprotectant ให้เหมาะสมทั้งชนิด ปริมาตร รวมทั้งระยะเวลาการบ่มสามารถช่วยลดความเสียหายของตัวสperm ได้ (Saroff and Mixner,1954) กลีเซอรอลเป็นสาร cryoprotectant ที่นิยมใช้กับเซลล์ต่าง ๆ หลายชนิดรวมทั้งน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากสามารถลดความเครียดของตัวสperm จากการแช่แข็งโดยการทำหน้าที่เป็น ‘salt-buffering’ (Lovelock,1953) ดึงน้ำออกจากเซลล์ (Lohmann, et.al., 1964) รวมทั้งลดปริมาตรของน้ำแข็งขณะแช่แข็ง (Gao, et.al., 1995) Jondet (1972) พบว่าการบ่มน้ำเชื้อในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลนาน 1 นาที หรือ 6 ชั่วโมงไม่พบความแตกต่างทั้งอัตราตัวเป็นและอัตราการผสมติด Stover, (1953) และ Holt, (1953) ทดลองผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งชนิด แอมพูล โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -79 °C พบว่า ระยะเวลาการบ่มระหว่าง 20-24 ชม. ได้น้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดีที่สุด สำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. โดยใช้น้ำยาเจือจาง egg yolk tris โดยใช้ระยะเวลายาวนานเกินกว่า 24 ชม. ยังไม่มีการทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากนักวิจัยส่วนมากสนใจที่จะลดเวลาการบ่มน้ำเชื้อมากกว่า

สำหรับกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยปกติใช้เวลาการบ่มน้ำเชื้อประมาณ 4 ชั่วโมง ตามมาตรฐานสากลแต่เนื่องจากปัจจุบันจำนวนโคที่ศูนย์ดังกล่าวมีมากขึ้น รวมทั้งโคบางตัวมีนิสัยคือ ควบคุมยาก ใช้เวลาในการรีดเก็บน้ำเชื่อนานกว่าตัวอื่นมาก ทำให้ระยะเวลาการบ่มน้ำเชื้อระหว่างพ่อโคพันธุ์ที่รีดตัวแรกและรีดตัวสุดท้ายอยู่ในเวลาที่แตกต่างกันมาก ถ้าน้ำเชื้อของโคตัวสุดท้ายบ่มนาน 4 ชม. น้ำเชื้อโคตัวแรกอาจได้รับการบ่มนานถึง 7-8 ชม. นอกจากนั้นพ่อโคหรือพ่อพันธุ์ที่อยู่ภายนอกศูนย์ผลิตน้ำเชื้อหรือของเอกชนหรือพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมที่จำเป็นต้องรีดเก็บน้ำเชื้อสดเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งหรือเก็บรักษาพันธุ์กรรมที่ดีไว้ เช่น โคขาวลำพูนหรือโคที่กำลังจะสูญพันธุ์ที่ต้องรีดเก็บน้ำเชื้อสดนอกสถานที่ บางครั้งต้องใช้ระยะเวลาในการเดินทางมากกว่า 4 ชั่วโมง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ดังนั้นการศึกษาผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าว จะทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้บ่ม

น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งว่าเป็นเท่าใด ที่ยังทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผลิตได้มีคุณภาพดีเหมาะสมที่จะนำไปผสมเทียมแก่แม่โคของเกษตรกร อันจะเป็นประโยชน์สำหรับการวางแผนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพในการผสมเทียม

อุปกรณ์ และวิธีการ

5.1. คัดเลือกพ่อโคพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียน (ขาวดำ) ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 5 ตัว เพื่อรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ AV เพื่อนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งให้ได้อย่างน้อย 480 โด๊สต่อพ่อโค 1 ตัว

5.2 ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังนี้ ปริมาตร สี ความหนืด การเคลื่อนไหวหุ้ม และตรวจนับความเข้มข้นของน้ำเชื้อโดยใช้ spectrophotometer ของบริษัท IMV TECHNOLOGIES

5.3 นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาผสมนํ้ายาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่มีส่วนประกอบของGlycerol 7% และไข่แดง 25% โดยให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 80 ล้านตัวต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.4 บรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร ให้ได้พ่อโคละ 480 หลอด แบ่งเป็น 12 กลุ่มทดลอง แต่ละกลุ่มมีน้ำเชื้อกลุ่มละ 40 หลอด โดยให้ทุกกลุ่มได้รับการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 ° C นาน 4 , 8,12,..., 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และให้ กลุ่มที่ได้รับการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 4 ° C นาน 4 ชั่วโมงเป็นกลุ่มควบคุม

5.5 ตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจีก่อนแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ 37° C ทุกกลุ่ม กลุ่มละ 7 หลอดต่อพ่อโคพันธุ์ 1 ตัว

5.6 ทำการแช่แข็งโดยการนำน้ำเชื้อที่เรียงบนถาดน้ำเชื้อให้มีระยะห่างเท่ากัน แล้วไปวางในถังแช่แข็งที่ระดับ 2.5-3 เซนติเมตรเหนือระดับของไนโตรเจนเหลว และปิดฝาไว้ที่อุณหภูมิ -140 ° C นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในไนโตรเจนเหลว

5.7 ตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37° C โดยการสุ่มหลอดน้ำเชื้อ 7 หลอดต่อพ่อโคพันธุ์ 1 ตัว เพื่อทำการตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็ง

5.8 การวิเคราะห์สถิติใช้การทดสอบ ANOVA in CRD

ผลการทดลอง

ผลการบ่มน้ำเชื้อพ่อโคขาวดำ จำนวน 5 ตัว ก่อนการแช่แข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่า น้ำเชื้อโคที่บ่มตั้งแต่ 4-24 ชม. ค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 42.86 – 43.46 % แต่เมื่อบ่มน้ำเชื้อตั้งแต่ 28 ชั่วโมงขึ้นไป อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็ง จะมีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานของการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของสำนัก

เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ คือให้มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็ง ไม่น้อยกว่า 40% เมื่อคำนวณจำนวนตัวเป็นจะได้อย่างน้อย 8 ล้านตัวต่อหลอด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็ง ของพ่อโคขาวดำ ที่บ่ม ตั้งแต่ 4 ถึง 48 ชั่วโมง

เวลาบ่ม (ชั่วโมง)	จำนวนพ่อ โค (ตัว)	จำนวนน้ำเชื้อแช่แข็งที่ ตรวจ (หลอด)	อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หลังแช่แข็ง ^{1/} $\pm$ SD
4 ชม. (กลุ่ม ควบคุม)	5	(5x7) = 35	43.29 ^a $\pm$ 2.26
8 ชม.	5	(5x7) = 35	42.86 ^a $\pm$ 4.01
12 ชม.	5	(5x7) = 35	42.86 ^a $\pm$ 4.01
16 ชม.	5	(5x7) = 35	43.29 ^a $\pm$ 2.45
20 ชม.	5	(5x7) = 35	43.46 ^a $\pm$ 1.65
24 ชม.	5	(5x7) = 35	43.43 ^a $\pm$ 1.27
28 ชม.	5	(5x7) = 35	33.14 ^b $\pm$ 1.09
32 ชม.	5	(5x7) = 35	32.14 ^b $\pm$ 2.69
36 ชม.	5	(5x7) = 35	31.00 ^c $\pm$ 0.96
40 ชม.	5	(5x7) = 35	32.14 ^c $\pm$ 1.52
44 ชม.	5	(5x7) = 35	30.43 ^c $\pm$ 2.12
48 ชม.	5	(5x7) = 35	31.57 ^c $\pm$ 0.59

หมายเหตุ : 1/ ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

วิจารณ์

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสของน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ในช่วงเวลาการบ่มที่ 4-24 ชั่วโมง ไม่ได้ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ O'Dell และ Almquist (1954) แต่ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้บ่มน้ำเชื้อที่เหมาะสมนั้นยังขึ้นกับความเข้มข้นของกลีเซอรอลในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและความเร็วในการลดอุณหภูมิและความเร็วในการอุ่นละลายน้ำเชื้อ ซึ่ง Saacke และ White (1972) พบว่า ยิ่งลดเวลาการบ่มน้ำเชื้อลงเท่าใด อัตราเร็วของการอุ่นละลายน้ำเชื้อยิ่งมี

ความสำคัญต่อคุณภาพน้ำเชื้อมากยิ่งขึ้น แต่ Wiggan และ Almquist (1975) พบว่าการลดเวลาบ่มน้ำเชื้อจะทำให้ตัวสุจิได้รับความเสียหายลดลง แต่ทั้งนี้ต้องเพิ่มอัตราเร็วในการอุ่นละลายน้ำเชื้อด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ ในเบื้องต้นสามารถนำไปใช้ในการวางแผนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนการผลิตจำนวนมากสามารถที่เก็บน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยที่ไม่ได้ลดอัตราการเคลื่อนไหวของตัวสุจิ เป็นการช่วยแก้ปัญหาเมื่อรีดน้ำเชื้อพ่อโคที่มีนิสัยก้าวร้าว ต้องนำพ่อโคพันธุ์เหล่านั้นทยอยมารีดเก็บน้ำเชื้อทีละตัวสามารถลดอัตราเสี่ยงอันตรายจากพ่อโค ทั้งนี้เนื่องจาก ในกระบวนการทางสังคมและพฤติกรรมทางเพศของพ่อโคบางตัวที่เกิดความก้าวร้าวขณะที่นำพ่อโคมาผูกไว้ใกล้กันหรืออยู่ใกล้กันทำให้ไม่สามารถนำมารีดเก็บน้ำเชื้อร่วมกับพ่อโคตัวอื่นได้ จำเป็นต้องรอให้พ่อโคตัวอื่นรีดเก็บน้ำเชื้อเสร็จและนำเข้าคอกแล้วจึงจะสามารถนำออกมาได้ ทำให้ระยะเวลาการรีดเก็บน้ำเชื้อใช้เวลานานมากขึ้นหรือการรีดเก็บน้ำเชื้อโคจากฟาร์มของเกษตรกร เพื่ออนุรักษ์พันธุ์กรรมสามารถที่จะทำได้ถ้าสามารถนำส่งห้องปฏิบัติการได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลัง แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อเกี่ยวกับคุณภาพด้านอื่นของ น้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการบ่มเป็นเวลานาน เช่น คุณภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือความสมบูรณ์ของโครโมโซมเป็นต้น ทั้งนี้อาจศึกษาร่วมกับปัจจัยอื่น เช่น ความเข้มข้นของไข่แดง กลีเซอรอล รวมทั้งอัตราเร็วในการแช่แข็งและอัตราเร็วในการอุ่นละลายน้ำเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดีที่สุดเมื่อจำเป็นต้องบ่มเป็นระยะเวลานาน

สรุป

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสของน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ในช่วงเวลาการบ่มที่ 4-24 ชั่วโมง ไม่ได้ทำให้อัตราการเคลื่อนไหวของตัวสุจิหลังแช่แข็งแตกต่างกัน ดังนั้นในการวางแผนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนการผลิตจำนวนมากสามารถที่เก็บน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 24 ชั่วโมงโดยที่ไม่ได้ลดคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง นอกจากนั้นการวางแผนในการนำพ่อโคพันธุ์มารีดเก็บน้ำเชื้อทีละตัวสามารถลดอันตรายจากความก้าวร้าวและความดุร้ายของพ่อโคพันธุ์ขณะมารีดน้ำเชื้อได้และสามารถรีดเก็บได้ทุกตัว

อย่างไรก็ตามในสถานการณ์ปกติที่สามารถควบคุมรักษาระยะเวลาบ่มน้ำเชื้อได้ก็ไม่ควรบ่มนานกว่า 4 ชั่วโมง ตามมาตรฐานสากล

เอกสารอ้างอิง

- Gao,D.Y., Watson,P.F., Crister, J.K. 1995. Fracture phenomina in an isotonic salt solution during freezing and their elimination using glycerol. *Cryobiol.* 32:270-284.
- Jondet, R. 1972. Survival rate and fertilizing ability of frozen bull spermatozoa following 8 and 1 minute of exposure to glycerol. VII Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Munich. 2:1371.
- Lohmann, W. Flower, C.F. Moss, Jr A.J., Perkin, W.H. 1964. Some remark about the effect of glycerol on cells during freezing and thawing; electron-spin resonance investigations concerning this effect. *Experimentia.* 20:290-293.
- Holt, A.F. 1953. The storage of bull semen at low temperature. *Vet. Rec.*, 65:561.
- Lovelock, J.E. 1953. The mechanism of the protection action of glycerol against hemolysis and thawing. *Biochem Biophys Acta.*, 11: 28-36.
- Mazur,P. 1984. Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am. J. Physiol.* 247:C125-142.
- O'Dell,W.T. and Almquist, J.O. 1953. Technique for Freezing Bull Spermatozoa in Heated Milk and Preliminary Breeding Results. *J. Dairy Sci.*, 37:45.
- Watson P.F. 2000. The causees of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60/61: 481-492.
- Saacke, R.G. and White, J.M. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th Tech., Conf. Artif. Insem. Reprod.*, p22.
- Saroff ,J. and Mixner, J.P. 1954. The relationship of egg yolk and glycerol content of diluters and glycerol equilibration time to survival of bull spermatozoa after low temperature freezing. *Journal Series, New Jersey Agric. Exp. Station.* 292-297.
- Stower, J. 1953. The storage of bull semen at low temperature. *Vet. Rec.* ,65: 560.
- Wiggin, H.B. and Almquist, J.O. 1975. Effect of Glycerol Equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. *J. Anim. Sci.* 40: 302- 305.

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดแม่โคนมโดยใช้ฮอร์โมน แบบสอดช่องคลอดเพื่อลดจำนวนวันท้องว่างในโคหลังคลอด

ณรงค์กร เกษมสุข¹, อมรรัตน์ สุวรรณรงค์²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาผลของผลโปรเจสเตอร์โรนชนิดสอดช่องคลอด (PRID) ในแม่ที่ไม่แสดงอาการเป็นสัด 90-100 วันหลังคลอด ต่อจำนวนวันที่เป็นสัดครั้งแรก จำนวนวันท้องว่าง และจำนวนโคเป็นสัดใน 120 วันหลังคลอด โคนมลูกผสม 90 ตัว ในเขต ลพบุรี และสระบุรี ถูกแบ่งแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองได้รับการเหนี่ยวนำด้วย PRID[®] นาน 10 วันพร้อมฉีดพรอสตาแกลนดิน 0.2ml/M ในวันเมื่อถอด PRID[®] ออก กลุ่มทดลองไม่ใส่ PRID[®] สังเกตการณ์การเป็นสัดและผสมเทียมเมื่อเป็นสัดครั้งแรก และตรวจท้องที่ 90 วันหลังผสมเทียมหลังผสมเทียมทั้ง 2 กลุ่ม

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่ากลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยจำนวนวันเป็นสัดครั้งแรกหลังคลอดสั้นกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (157.79 ± 36.18 vs 118.24 ± 11.81 ; $P < 0.005$) และมีจำนวนวันท้องว่างเฉลี่ยสั้นกว่ากลุ่มควบคุมเป็นเช่นกัน (148.76 ± 27.46 vs 177.69 ± 50.72 ; $P < 0.005$) จำนวนโคเป็นสัดจำนวน ใน 120 วันหลังคลอด ในกลุ่มทดลอง มีมากกว่า กลุ่มควบคุม (29 vs 19; $P < 0.005$) แต่กลุ่มควบคุมมีอัตราผสมติดเมื่อผสมครั้งแรกสูงกว่ากลุ่มทดลอง (36.53 vs 28.94 ; $P < 0.005$).

คำสำคัญ: จำนวนวันที่เป็นสัดครั้งแรก จำนวนวันท้องว่าง จำนวนโคเป็นสัดใน 120 วันหลังคลอด อัตราการผสมติดเมื่อผสมครั้งแรก โปรเจสเตอร์โรนแบบสอดช่องคลอด โคนม

ทะเบียนผลงานวิชาการเลขที่ : 51(2)-0208-166

¹ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี

²ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี

**Use of progesterone releasing intravaginal
device for inducing estrus and reducing calving intervals in dairy cows**

Narongkorn Kasemsuk¹, Amornrat Suwannarong²

Abstract

This study was conducted to investigate effects of progesterone intravaginal device (PRID[®]) on 90-100 days anestrous postpartum crossbred dairy cows in Saraburi and Lopburi province. Ninety crossbred dairy cows with history of 90-100 days anestrous postpartum were randomly assigned into 2 groups, treatment and control. The treatment group, thirty-eight crossbred dairy cows, were estrus synchronized by PRID[®] and the control group, fifty-two crossbred dairy cows without estrus synchronization treatment. After 10 days, Prostaglandin (cloprostenol, 250 mg/ml) was injected intramuscularly and PRID[®] was removed. Estrous observation was detected and AI was performed on first heat detected in all cows in both groups.

Results showed that the treatment group gave significantly shorter average days of first heat postpartum than in the control group (157.79 ± 36.18 vs 118.24 ± 11.81 ; $P < 0.005$). The average days open of the treatment group were also significantly shorter than the control group (148.76 ± 27.46 vs 177.69 ± 50.72 ; $P < 0.005$). Also the numbers of cows in heat 120 days postpartum were higher significantly in the treatment group than in the control group. However, the first service conception rate of the control group was higher than the treatment group (36.53 vs 28.94 ; $P < 0.005$).

KEYWORDS: number of days to first postpartum estrous, numbers of cows in estrous within 120 days postpartum, days open, first service conception rate, progesterone intra vaginal device, dairy cow

¹Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Centre

²Ubonrachathani Artificial Insemination and Biotechnology Research Centre

บทนำ

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเลี้ยงโคนมมีต้นทุนสูง คือ แม่โคหลังคลอดไม่แสดงอาการสัด หรือเป็นสัดหลังคลอดช้ากว่า 3 เดือน การที่แม่โคสูญเสียคะแนนร่างกาย เนื่องจากกินอาหารน้อยลง ป่วยหลังคลอด หรือ ให้ผลผลิตน้ำนมสูงในช่วง 2 เดือนหลังคลอด ล้วนเป็นสาเหตุที่ทำให้แม่โคไม่เป็นสัดหลังคลอดได้ การเป็นสัดและตกไข่หลังคลอดจะช้าลงเมื่อต่อมาได้สมองหลัง ลูกที่ในซิง ฮอร์โมน (Luteinizing Hormone, LH) น้อยลง ซึ่งอาจจะเป็นผลจากสิ่งแวดล้อม สภาพร่างกาย โภชนาการ หรือการให้น้ำนมมาก ซึ่งทำให้คะแนนร่างกายต่ำได้ (Rhodes, 2003) มีรายงานการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย โปรเจสเตอโรน (Progesterone) แบบสอดช่องคลอด แล้วผสมเทียม ทำให้โอกาสผสมติดมากขึ้น (Xu and Buston, 1999) และเพิ่มโอกาสผสมติดภายใน 60 วันหลังคลอด (Chebel *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Wash *et al.* (2007) ยังพบว่าการใช้โปรเจสเตอโรนแบบสอดช่องคลอด ทำให้แม่โคแสดงอาการสัดก่อนที่แม่โคจะมีปัญหาไม่แสดงอาการเป็นสัดหลังคลอด

การศึกษานี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการใช้ โปรเจสเตอโรนแบบสอดช่องคลอด เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด ในแม่โคที่ไม่แสดงอาการสัดหลังคลอด 90-100 วัน ต่อจำนวนวันที่แสดงอาการสัดครั้งแรกหลังคลอด จำนวนวันที่ท้องว่าง อัตราผสมติดจากการผสมครั้งที่ 1 และจำนวนวันที่แสดงอาการสัด 120 วันหลังคลอด

อุปกรณ์และวิธีการ

แม่โคจำนวน 90 ตัวที่เลี้ยงในฟาร์มโคนมเกษตรกร ในพื้นที่รับผิดชอบของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ซึ่งมีการเลี้ยงดูแบบเดียวกัน ให้ลูกแล้ว มีคะแนนร่างกาย 2-2.5 อยู่ระหว่างรีดนมและมีประวัติไม่แสดงอาการสัดหลังคลอด 90-100 วัน จากการสังเกตจริงไขไม่พบ คอร์ปัสลูเตียม (Corpus luteum) แบ่งแม่โค 90 ตัว นี้แบบสุ่มเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม หนึ่งชุดของแม่โค “ทดลอง” และ “ควบคุม” จะมาจากฟาร์มเดียวกันซึ่งมีหลายชุดและมาจากหลายฟาร์ม

กลุ่มทดลอง เป็นแม่โคจำนวน 52 ตัว จะได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย โปรเจสเตอโรน แบบสอดช่องคลอด (Progesterone intravaginal device, PRID[®]) ตามโปรแกรมที่ดังนี้

วันที่ 0 สอด PRID[®] เข้าช่องคลอด

วันที่ 10 ถอด PRID[®] และฉีด พรอสตาแกลนดิน (Cloprostenol, 250 mg/ml) เข้ากล้ามเนื้อ 2 ml แล้วสังเกตการเป็นสัดครั้งแรก และผสมเทียม

กลุ่มควบคุม เป็นแม่โคที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย PRID[®] เข้าช่องคลอด สังเกตการณ์การเป็นสัดและผสมเทียมเมื่อเป็นสัดครั้งแรก และตรวจท้องที่ 90 วันหลังผสมเทียมหลังผสมเทียมทั้ง 2 กลุ่ม

อัตราการผสมติดเมื่อผสมครั้งแรก (%) =
$$\frac{\text{จำนวนโคที่ผสมติด (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนโคที่ผสมเมื่อเป็นสัดครั้งแรกทั้งหมด (ตัว)}}$$

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ จำนวนวันที่เป็นสัดครั้งแรก จำนวนวันที่ท้องว่าง จำนวนโคเป็นสัดใน 120 วัน หลังคลอด อัตราผสมติดเมื่อผสมเทียมครั้งแรกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ด้วย T -test และ Chi-Square test

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนวันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอด และค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (วัน)

กลุ่มแม่โคนม	จำนวนสัตว์ (ตัว)	จำนวนวันที่เป็นสัด ครั้งแรกหลังคลอด Mean $\pm$ S.D. (วัน)	จำนวนวันที่เป็นสัด ครั้งแรกหลังคลอด ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (วัน)
กลุ่มควบคุม	52	157.79 ^a $\pm$ 36.18	106-232
กลุ่มทดลอง	38	118.24 ^b $\pm$ 11.81	105-154

a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนวันที่ท้องว่าง (วัน) และค่าต่ำสุด - ค่าสูงสุดของแม่โคนม 2 กลุ่ม

กลุ่มแม่โคนม	จำนวนสัตว์ (ตัว)	จำนวนวันที่ท้องว่าง เฉลี่ย Mean $\pm$ S.D. (วัน)	จำนวนวันที่ท้องว่าง ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (วัน)
กลุ่มควบคุม	52	177.69 ^a $\pm$ 50.72	106-258
กลุ่มทดลอง	38	148.76 ^b $\pm$ 27.46	105-203

a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 อัตราการผสมติดจากการผสมครั้งที่ 1 และจำนวนวัวที่เป็นสัดภายใน 120 วัน หลังคลอด

กลุ่มแม่โคนม	จำนวนสัตว์ (ตัว)	อัตราผสมติดจากการ ผสมครั้งที่ 1	จำนวนวัวที่เป็นสัด ภายใน 120 วัน หลังคลอด
กลุ่มควบคุม	52	36.53	19 ^a
กลุ่มทดลอง	38	28.94	29 ^b

a, b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

วิจารณ์

การศึกษานี้พบว่า แม่โคกลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยจำนวนวันที่เป็นสัดครั้งแรกหลังคลอดน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้จำนวนแม่โคกลุ่มนี้เป็นสัดภายใน 120 วันหลังคลอด มีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($P < 0.05$) อาจเป็นไปได้ว่าจากสถานะเครียดหลังคลอดสูง การรีดนม สภาวะเกี่ยวกับโภชนาการของแม่โค ซึ่งจะเห็นจากคะแนนร่างกาย 2-2.5 ทำให้มีผลกระทบต่อระบบต่อมไร้ท่อของแม่โคเหล่านี้ คือ มีการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินลดลง ซึ่งการที่โกนาโดโทรปินที่ลดลงนี้มีผลให้พัฒนาการของฟอลลิเคิลลดลง (Hafez, 1993) และแม่โคเหล่านี้ไม่แสดงอาการสัดหลังคลอด 90-100 วัน แต่เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย PRID[®] ที่เป็นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนาน 10 วัน ซึ่งในระหว่าง 10 วันนี้ผลของโปรเจสเตอโรนจะไปกดไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมอง ทำให้ยับยั้งการหลั่งโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin) (Hafez, 1993) และอาจมีการสะสมโกนาโดโทรปินที่สร้างให้เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อมีการถอด PRID[®] ออกในวันที่ 10 ก็จะไม่มีการโปรเจสเตอโรนไปกดการหลั่งโกนาโด

โทรปินจากต่อมใต้สมอง ทำให้มีโกนาโดโทรปินหลังเข้าสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้น และเกิดการกระตุ้นฟอลลิเคิลในรังไข่ให้เจริญเติบโตขึ้นด้วยฤทธิ์ของฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้งฮอร์โมน (Follicle stimulation hormone) ของโกนาโดโทรปิน ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของฟอลลิเคิลตัวแอฟ (Lopez *et al.*, 2005) จากสภาวะการพัฒนาของฟอลลิเคิลในรังไข่ ทำให้แม่โคแสดงอาการสัดได้ และมีการตกไข่เกิดขึ้น

Palomares-Naveda *et al* (2007) รายงานว่า การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้โปรเจสเตอโรนแบบสอดช่องคลอดในโคนมที่ผสมกับโคสายพันธุ์ในเขตร้อนที่มีปัญหาไม่เป็นที่สัดหลังคลอด ช่วยให้เพิ่มอัตราการเป็นสัดหลังคลอด แต่อย่างไรก็ดีเป็นที่น่าสังเกตว่าผลของอัตราผสมติดจากการผสมเทียมครั้งแรกของการศึกษานี้ (ตารางที่ 3) ปรากฏว่า กลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่เป็นสัดครั้งแรกจากการศึกษานี้ จะเห็นว่ากลุ่มควบคุมก็มีระยะเวลายาวนานกว่ากลุ่มทดลอง (ตารางที่ 1) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าระยะเวลาเป็นสัดครั้งแรกของกลุ่มควบคุมที่ยาวนานกว่ามีผลต่อการฟื้นฟูสภาพร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการผลิตโกนาโดโทรปินได้ดีและมากขึ้น ทำให้มีการแสดงอาการสัดและตกไข่อย่างมีประสิทธิภาพและมีอัตราผสมติดดีขึ้น แต่ Hanlon *et al* (2005) พบว่า การใช้โปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่อง

คลอดในโคที่มีปัญหาไม่แสดงอาการสัดหลังคลอด ไม่ช่วยเพิ่มอัตราผสมติดเมื่อผสมเทียมครั้งแรก ซึ่ง Nancy *et al* (1989) ; Jeffrey and Michael (1991) ก็รายงานผลเช่นเดียวกัน

การที่กลุ่มควบคุมมีจำนวนวันท้องว่างเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นผลมาจากการที่แม่โคกลุ่มทดลองกลับสัดก่อนและกลับเข้าวงจรสัดเร็วกว่า ทำให้มีโอกาสรับการผสมเทียมมากกว่าและผสมติดมากกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้จะเป็นผลของโปรเจสเทอโรนที่มีผลต่อการหลั่งโกนาโดโทรปินได้กล่าวแล้ว ซึ่งที่รายงานว่า การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรเจสเทอโรนแบบสอดช่องคลอดมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์โคนมที่มีปัญหาไม่แสดงอาการสัดหลังคลอด และช่วยเพิ่มอัตราผสมติด ในโคที่มีปัญหาหลังคลอด (Nancy *et al.*,1989; Jeffrey and Michael, 1991). Walsh *et al* (2007) ก็รายงานว่า การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรเจสเทอโรนชนิดสอดช่องคลอด ทำให้จำนวนวันท้องว่างลดลง 20 วัน

สรุป

แม้ว่าการศึกษานี้จะได้ว่าโคกลุ่มทดลองมีจำนวนเฉลี่ยวันเป็นสัดครั้งแรกสั้นกว่าจำนวนโคที่เป็นสัดใน 120 วัน หลังคลอดมากกว่าและจำนวนวันท้องว่างเฉลี่ยสั้นกว่าโคในกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจจะเป็นของโปรเจสเทอโรน แต่ข้อเท็จจริงที่มีผลแน่นอนต่อการเป็นสัดและการผสมติด คือ การจัดการเรื่องอาหารและสุขภาพของแม่โค ซึ่งจะมีผลต่อสภาพร่างกายของแม่โค ดังนั้นการใช้ฮอร์โมนเพิ่มประสิทธิภาพการจัดการโคนม จึงเป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งในการจัดการเลี้ยงโคนมและต้องคำนึงถึงความเหมาะสมรวมทั้งต้องคำนึงถึง ชนิดฮอร์โมน, ขนาด, วิธีการใช้ก็มีความแตกต่างและให้ผลต่างๆ กันด้วย (Sterry *et al.*,2006; Folman *et al.*,1990).

เอกสารอ้างอิง

- Chebel, R. C. , Santos, J. E. P., Cerri, R. L., Rutigliano ,A H. M. and Bruno ,R. G. S. 2006. Reproduction in Dairy Cows Following Progesterone Insert Presynchronization and Resynchronization Protocols .J. Dairy Sci. 89:4205-4219
- Folman, Y., Kaim, M., Herz, Z. and Miriam Rosenberg.1990. Comparison of Methods for the Synchronization of Estrous Cycles in Dairy Cows. 2. Effects of Progesterone and Parity on Conception . J. Dairy Sci. 73 No.10 :2817-2825
- Hafez, E.S.E.1993. Hormones, Growth Factors and Reproduction: Reproduction in Farm animals; 6th edition. Lea & Febiger, Philadelphia, USA. 59 pp.
- Hanlon,D. W., Davidson, P. J., Hittmann, A. R., and Joe, A. K. 2004. Supplementing previously treated anestrous dairy cows with progesterone does not increase first-service conception rate. Theriogenology. 63,Issue 1:239-245

- Jeffrey S. Stevenson and Michael O. Mee .1991. Pregnancy Rates of Holstein Cows After Postinsemination Treatment with a Progesterone-Releasing Intravaginal Device J. Dairy Sci.74 No.11: 3849-3856
- Lopez,H., Sartori,R. and Wiltbank,M.C. 2005. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. Biology of Reproduction 72, 788-795.
- Mcdougll, S., Compton, C. W. R., Hanlon, D. W., Davidson, P. J., Sull, D. J., Gore, A. H., Annis, F. M. 2005. Reproductive performance in anestrous dairy cows following treatment with two protocols and two doses of progesterone. Theriogenology.63:1529-1548
- Mcdougll, S., Loeffler,S.H. 2004. Resynchrony of postpartum dairy cows previously treated for anestrus. Theriogenology. [63, Issue1](#) :239-245
- Nancy, A., Robinson, Kenneth, E., Leslie and John, S. Walton.1989. Effect of Treatment with Progesterone on Pregnancy Rate and Plasma Concentrations of Progesterone in Holstein Cows. J. Dairy Sci. 72 No.1:202-207
- Palomares-Naveda ,R. A.,Portillo-Martinez,G.,Gutierrez-Añez,J. C.,De Ondiz-Sanchez, A., Goicochea-Llaque, J., Gonzalez-Fernandez, R , Perea-Ganchou, F., and Soto- Belloso ,E. 2007. [Tropical Animal Health and Production](#). 40:39-46
- Sterry,R. A., Welle, M. L. and Fricke, P. M. 2006. Treatment with Gonadotropin-Releasing Hormone After First Timed Artificial Insemination Improves Fertility in Noncycling Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 89: 4237-4245
- Rhodes, F. M., McDougall, S. , Burke ,C. R., Verkerk, G. A. and Macmillan, K. L. 2003. Invited Review Treatment of Cows with an Extended Postpartum Anestrous Interval. J. Dairy Sci. 86:1876-1894
- Walsh, R. B., LeBlanc, S. J. , Duffield, T. D. , Kelton, D. F. , Walton J. S. and Leslie, K. E. 2007. Synchronization of Estrus and Pregnancy Risk in Anestrous Dairy Cows After Treatment with a Progesterone-Releasing Intravaginal Device. J. Dairy Sci. 90:1139-1148.
- Xu,Z. Z. and Burton, L. J. 1999. Estrus Synchronization of Lactating Dairy Cows with GnRH , Progesterone, and Prostaglandin F2ALPHA. J. Dairy Sci. 36:1856-1274

ผลของการเติมกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียส

ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค

จตุพร พงษ์เพ็ง¹ มุขดา รัตนภาสกร² สุดา จันทาสี¹

กิตติศักดิ์ แสงสกุล³ จำเนียร สายขุน⁴

บทคัดย่อ

การศึกษาคูณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เกิดจากการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C และ 28°C ในพ่อพันธุ์โคเนื้อลูกผสมและโคนมขาวดำ จำนวน 13 และ 17 ตัว ตามลำดับ รวม 30 ตัว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ภายหลังการแช่แข็งทำการตรวจอัตราการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (Computerized Assister Semen Analysis : CASA) และย้อมสีตัวสุจิด้วย fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) และ propidium iodide (PI) เพื่อตรวจความผิดปกติของ อะโครโซมและเยื่อหุ้มตัวสุจิด้วยเครื่อง flow cytometer พบว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C ($P < 0.05$) โดยมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ที่เป็นร้อยละ 47.65 ± 2.29 , 37.00 ± 2.31 และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเป็นร้อยละ 22.37 ± 1.41 , 17.83 ± 1.26 ตามลำดับ นอกจากนี้การเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิที่ 4°C ยังมีผลให้ร้อยละของอะโครโซมปกติสูงกว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิที่ 28°C เช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 60.45 ± 2.38 , 47.38 ± 3.48 ตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคให้ผลดีกว่าเติมที่ 28°C ($P < 0.05$)

คำสำคัญ : กลีเซอรอล อุณหภูมิ น้ำเชื้อโค

รหัสโครงการวิจัย 25510702094

¹ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพญากลาง ต. ลำสนธิ อ. ชัยบาดาล จ.ลพบุรี 15190

² สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ปทุมธานี 12000

³ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี อ.บ้านบึง จ. ชลบุรี 20170

⁴ โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

Effect of Glycerol Addition at 4°C and 28°C on Quality of Frozen Bull SemenJatuporn Pongpeng¹ Mukda Rutanapaskorn² Suda Chantasee¹Kittisak Sangsakul³ Chamnian Saikhun⁴**Abstract**

Effect of glycerol addition into semen extender at 4°C and 28°C on freezability of bull semen was conducted. Semen samples were collected from 13 crossbred beef bulls and 17 crossbred dairy bulls. After freezing procedure, semen samples were thawed at 37°C for 30 seconds then percentage of progression motility and kinetic movement by Computerized Assisted Semen Analysis (CASA) were determined. Samples were also stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) and propidium iodide (PI) for acrosomal and plasma membrane examination using flow cytometer. The results showed that motility ($37.00 \pm 2.31\%$, $47.65 \pm 2.29\%$) and progressive motility ($17.83 \pm 1.26\%$, $22.37 \pm 1.41\%$) of glycerol addition at 4°C were higher than those at 28°C ($P < 0.05$), respectively. Intact acrosomal membrane of glycerol addition at 4°C was also higher than at 28°C, ($60.45 \pm 2.38\%$ and $47.38 \pm 3.48\%$, respectively. ($P < 0.05$)). This study indicated that glycerol addition at 4°C yielded higher percentage of motility, progressive motility and live spermatozoa with intact acrosomal membrane than that at 28°C.

Keyword : glycerol, temperature, bull semen¹. Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190² The Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development, Tiwanon Rd, Pathumthani, 12000³. Chonburi Biotechnology and AI Research Center. , Bureau of Biotechnology for Animal Production Banbung, Chonburi. 20170⁴. Department of Anatomy, Faculty of Science, Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170

บทนำ

ความเสียหายที่จะเกิดกับตัวอสุจิในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีปัจจัยหลายอย่าง และสามารถเกิดได้ทุกระยะขึ้น เนื่องจากอสุจิมีความไวต่อสารเคมี และอุณหภูมิ เช่น ระยะเวลาในการลดอุณหภูมิหรืออัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ ชนิดของน้ำยาเจือจาง และที่สำคัญการเลือกใช้สาร cryoprotectants เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายจากการลดอุณหภูมิ เนื่องจากการแช่แข็งมีผลทำให้อสุจิสูญเสียคุณสมบัติทางกายภาพส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่อสุจิใช้เจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ ถ้าหากอะโครโซมไม่สมบูรณ์ อสุจิก็นำไปปฏิสนธิกับไข่ไม่ได้ เพราะอะโครโซมมีเอนไซม์บรรจุอยู่ภายใน หากสูญเสียคุณสมบัติทางกายภาพหรือคุณสมบัติทางชีวเคมีจะทำให้ตัวอสุจิไม่สามารถเจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ได้ (Schneider and Mazur, 1984)

สาร cryoprotectants ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ การใช้ไข่แดงร่วมกับกลีเซอรอล (Foote, 1970) กลีเซอรอลสามารถช่วยลดความเสียหายอันเนื่องมาจากการแช่แข็งได้โดยกลีเซอรอลช่วยลดอุณหภูมิของจุดเยือกแข็ง และลดความเข้มข้นของ electrolytes ใน cytoplasm เป็นการป้องกันการเกิดผลกระทบจากช่วงเวลาที่เย็นของเหลวให้อยู่ในสภาวะ hyperosmotic ให้สั้นลง (Mazur et al., 1970) แต่ทั้งนี้กลีเซอรอลเองก็เป็นทั้งตัวที่ทำให้ทั้งคุณและโทษในเวลาเดียวกัน Colas (1975) พบว่าการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่มีกลีเซอรอลผสมอยู่ที่อุณหภูมิ 30 °C ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและภายหลังการแช่แข็งต่ำกว่าการเติมกลีเซอรอลในส่วนผสมของน้ำเชื้อและน้ำยาเจือจางเมื่อลดอุณหภูมิลงแล้วที่ 5 °C สอดคล้องกับ Liu และคณะ (1998) พบว่าที่อุณหภูมิ 25 °C กลีเซอรอลมีพิษต่ออสุจิ เนื่องจากระดับอุณหภูมิสูงจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอรอลกับผนังเซลล์ทำให้กลีเซอรอลแทรกซึมเข้าสู่เซลล์เร็วเกินไป ทำให้องค์ประกอบสำคัญภายในเซลล์ รวมทั้ง ไมโทคอนเดรียและอะโครโซมเกิดความเสียหาย ซึ่งมีผลให้อสุจิสูญเสียความสามารถในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ (Jones and Martin, 1973 ;Rodriguez and Martin, 1994 ; Watson, 1995) แต่ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ทำให้ลดกิจกรรมของเซลล์และการแผ่กระจายของสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์ดำเนินอย่างค่อยเป็นค่อยไปทำให้อสุจิมีเวลาในการปรับตัวเพิ่มขึ้นจึงได้รับผลกระทบไม่มากนัก เป็นผลให้ตัวอสุจิได้รับความเสียหายน้อยลง ส่งผลให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพสูงกว่า (Salamon and Maxwell, 1995)

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เกิดจากการเติมกลีเซอรอลระหว่างอุณหภูมิ 4°C กับอุณหภูมิ 28°C ที่ใช้ในกระบวนการผลิตในปัจจุบันของพ่อพันธุ์โคเนื้อลูกผสมและโคนมขาวดำ ที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพสูงสุด และคงสภาพความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมให้มากที่สุด

อุปกรณ์ และ วิธีการ

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้พ่อพันธุ์โคเนื้อลูกผสมและโคนมขาวดำ จำนวน 13 และ 17 ตัว ตามลำดับ รวม 30 ตัวเลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพูนกลาง จ.ลพบุรี ริดเก็บน้ำเชื้อด้วยการใช้ artificial vagina จากนั้นตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสดดังนี้

1. น้ำเชื้อที่ริดเก็บได้จะตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังนี้ ปริมาตร สี ความหนืดด้วยตาเปล่าตรวจการเคลื่อนไหว และอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (% motility) โดยวิธี subjective method ด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound ชนิด phase contrast สำหรับความเข้มข้นของน้ำเชื้อตรวจโดยการ spectrophotometer รุ่น REF.Z160 บริษัท IMV TECHNOLOGIES

2. จากนั้นแบ่งน้ำเชื้อเป็นสองส่วนเท่ากัน โดยส่วนที่ 1 ผสมกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk tris ที่มีกลีเซอรอล 7 % และไข่แดง 20% ที่อุณหภูมิ 28 °C ให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 80×10^6 ตัว/มล. ส่วนที่ 2 ผสมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk Tris ที่มีส่วนประกอบเหมือนกับส่วนที่ 1 แต่ไม่มีกลีเซอรอล ให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 160×10^6 ตัว/มล. บ่มน้ำเชื้อทั้ง 2 ส่วนที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง แล้วเติม egg yolk tris ที่มีกลีเซอรอล 14 % โดยใช้ปริมาตรเท่ากับส่วนที่ไม่มีกลีเซอรอล เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 80×10^6 ตัว/มล. หลังจากบ่มน้ำเชื้อทั้งสองกลุ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ต่อจนครบ 4 ชั่วโมงแล้ว บรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร ทำการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (รุ่น Digitcool 5300 ZH 350 & UE 350 with 900 HP programmer) โดยเรียงน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดเรียบร้อยแล้วบนแท่นเรียงน้ำเชื้อและนำไปวางเรียงในเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ อุณหภูมิ -140 °C นาน 6 นาที

3. จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในไนโตรเจนเหลว เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนี้

3.1 ตรวจร้อยละของอัตราการเคลื่อนที่ (% motility) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้าง หน้า (% progressive motility) ในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้เครื่อง CASA (computerized automatic semen analyzer) Hamilton Thorn Motility Analyzer, IVOS12.3

3.2 ตรวจเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และอะโครโซมของตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็ง ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยตรวจร้อยละของความผิดปกติของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้เครื่อง Flow Cytometer การตรวจความผิดปกติของอะโครโซมจะย้อมด้วยสี FITC-PNA และการตรวจความผิดปกติเยื่อหุ้มตัวอสุจิจะย้อมด้วยสี PI โดยทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที แล้วเจือจางทันทีด้วย Hepes-buffered modified Tyrode medium (SP-TALP; 2.0 mM CaCl₂, 3.1 mM KCL, 0.4 mM Mg Cl₂, 100.0 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.6 mM sodium lactate, 10.0 mM Hepes, and 6 mg/ml BSA) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C และกรองผ่าน 41µm nylon mesh (Spectrum, Los Angeles, CA) จากนั้นย้อมด้วยสี FITC-PNA

ใช้น้ำเชื้อปริมาตร 440 μ l ผสมกับสี FITC-PNA ปริมาตร 50 μ l (10 μ g/ml.) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37° C นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี PI ก่อนนำไปตรวจด้วยเครื่อง Flow Cytometer รุ่น FACS caliber จากบริษัท BECTON DECKINSON

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้แผนการทดลองแบบกลุ่มสมบูรณ์ (2x2 factorial in CRD) กำหนดให้อุณหภูมิขณะเติมกลีเซอรอลเป็นปัจจัยหลักและสายพันธุ์โคเป็นปัจจัยรอง เปรียบเทียบร้อยละของคุณลักษณะของอะโครโซมและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ ด้วยตาราง ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ย SE ของอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ของน้ำเชื้อ แซ่แข็งพ่อโค ที่เจือจางด้วย Egg Yolk Tris เมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4 °C และ 28 °C

ลักษณะที่ศึกษา	จำนวนโค (ตัว)	อุณหภูมิ ^{1/}	
		4 °C	28 °C
Motility (%)	30	47.65 ^a ±2.29	37.00 ^b ±2.31
Progressive motility (%)	30	22.37 ^a ±1.41	17.83 ^b ±1.26
Curvilinear velocity ; VCL (μ m/s)	30	142.89 ^a ±3.58	134.82 ^a ±2.84
Average path velocity; VAP(μ m/s)	30	78.07 ^a ±1.78	74.18 ^a ±1.30
Straight-line velocity; VSL(μ m/s)	30	57.38 ^a ±1.07	56.04 ^a ±0.93
Amplitude of lateral head displacement; ALH(μ m/s)	30	7.20 ^a ±0.15	7.01 ^a ±0.14
Beat frequency; BCF (HZ)	30	26.91 ^a ±0.46	25.95 ^a ±0.52
Linearity; LIN (%)	30	42.48 ^a ±0.70	43.55 ^a ±0.68
Straightness; STR (%)	30	74.17 ^a ±0.75	75.89 ^a ±0.69

^{1/} : ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (P<0.05)

ผลการทดลองพบว่าในขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโค การเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C และ 28°C ให้ผลตอบสนองในทิศทางเดียวกันทั้งโคเนื้อและโคนม แต่ตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิของการเติมกลีเซอรอลแตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C มีผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า สูงกว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C (P< 0.05) ดังตารางที่ 1

เมื่อพิจารณาคูสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซม พบว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C มีผลให้ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิตและอะโครโซมปกติ (MAI) สูงกว่า เมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C และในส่วนของอสุจิที่ตายแล้วแต่อะโครโซมปกติ (MDAI) และอสุจิที่ตายแล้วและอะโครโซมถูกทำลาย (MAD) พบว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C สูงกว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ย SE ของอะโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคที่เจือจางด้วย Egg Yolk Tris เมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4 °C และ 28 °C

ลักษณะที่ศึกษา	จำนวนโค (ตัว)	อุณหภูมิ ^{1/}	
		4 °C	28 °C
Membrane acrosome intact : MAI (%)	30	60.45 ^a ±2.38	47.38 ^b ±3.48
Membrane damage acrosome intact : MDAI (%)	30	20.21 ^a ±1.06	28.26 ^b ±2.02
Membrane acrosome damage : MAD (%)	30	19.06 ^a ±1.98	26.83 ^b ±2.75

^{1/} : ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์

ในขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโค กลีเซอรอลเป็นตัวช่วยลดอุณหภูมิของจุดเยือกแข็ง และลดความเข้มข้นของ electrolytes ใน cytoplasm เป็นการป้องกันการเกิดผลกระทบจากช่วงเวลาที่เป็นของเหลวให้อยู่ในสภาวะ hyperosmotic ให้สั้นลง (Mazur et al., 1970) แต่ทั้งนี้กลีเซอรอลเองก็เป็นทั้งตัวที่ทำให้ทั้งคุณและโทษในเวลาเดียวกัน Colas (1975) ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อคือ ระดับอุณหภูมิของน้ำเชื้อขณะเติมกลีเซอรอล ผลการศึกษานี้พบว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C และ 28°C ให้ผลตอบสนองในทิศทางเดียวกันทั้งโคเนื้อและโคนม แต่ตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิของการเติมกลีเซอรอลแตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C มีผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า สูงกว่าเมื่อเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งมีผลให้จำนวนอสุจิที่ยังมีชีวิตและมีอะโครโซมปกติสูงกว่า เช่นเดียวกัน ($P < 0.05$) สำหรับในส่วนของอสุจิที่ตายแล้วแต่ยังมีอะโครโซมปกติ และอสุจิที่ตายแล้วและอะโครโซมถูกทำลาย พบว่ามีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิต่ำดีกว่าอุณหภูมิสูง ซึ่งสอดคล้องกับ Graham และคณะ (1978) พบว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิไม่เกิน 5°C สามารถรักษาสภาพความสมบูรณ์ของอสุจิได้ดีกว่าอุณหภูมิสูง ๆ รวมทั้งสนับสนุนการศึกษาของ Colas, (1975) และ Gil, และคณะ (2003) ที่พบว่า การเติมกลีเซอรอลที่ระดับอุณหภูมิ 4 – 5°C คุณภาพน้ำเชื้อแช่

แข็งดีกว่าเดิมที่ระดับอุณหภูมิ 15-30 °C ทั้งนี้เนื่องจากที่ระดับอุณหภูมิต่ำกลีเซอรอลจะมี hydraulic conductivity และ solute permeability ต่ำกว่าที่อุณหภูมิสูง (Gilmore, et. Al., 2000) ซึ่งที่ 4 – 5°C เป็นระดับอุณหภูมิที่มีอัตราการแลกเปลี่ยนของเหลวระหว่างตัวอสุจิและน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสม เป็นผลให้การรักษาสมดุลระหว่างแรงดันภายในและภายนอกเซลล์ได้ดีกว่าและทำให้ความแตกต่างของค่าแรงดันออสโมติก ลดลงในอัตราที่ไม่ก่อให้เกิด hypotonisation effect แต่ถ้าเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C จะเกิดความแตกต่างกันระหว่างแรงดันภายนอกและภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว ตัวอสุจิที่ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอาจตายหรือเกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของอสุจิ เช่น ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ (Rodriguez and Martin,1994) ไมโทคอนเดรีย (Watson,1995) อะโครโซม (Jones and Martin,1973) ทั้งนี้การเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิสูงๆ อุณหภูมิจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอรอลกับผนังเซลล์ทำให้กลีเซอรอลแทรกซึมเข้าสู่เซลล์เร็วเกินไปทำให้เป็นพิษต่อตัวอสุจิ แต่ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ กิจกรรมของเซลล์มีต่ำและการแผ่กระจายของสารต่างๆ เข้าสู่เซลล์อาจเป็นแบบค่อยเป็นค่อยไปทำให้อสุจิมีเวลาในการปรับตัวเพิ่มขึ้นจึงอาจได้รับผลกระทบไม่มากนัก จึงทำให้ตัวอสุจิได้รับความเสียหายน้อยส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งสูงกว่า (Salamon and Maxwell, 1995)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4°C มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมดีกว่าการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 28°C

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อุทัย หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย นายสัตวแพทย์สินชัย วิโรจน์วุฒิกุล ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพูนกลาง ที่ช่วยประสานงานของโครงการ และคุณรัชชัย แก้วมาก สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยมหิดลที่ช่วยตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง flow cytometer

เอกสารอ้างอิง

- Colas, G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 42(2) 277-285.
- Foote, R. H. 1970. Influence of extenders, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. *J. Dairy Sci.* 53:1478-1482.
- Gil, J., Lundeheim, N., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Therio.* 59: 1241-1255.
- Gilmore, J.A., Liu, J., Woods, E.J., Peter, A.T. and Crister, J.K. 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod.* 13: 335-343.
- Graham, E.F., Crabo, B.G. and Pace, M.M. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* 47 (Suppl.2): 80-119.
- Jones, R. C. and Martin, I. C. A. 1973. The effect of dilution, egg yolk and cooling to 5 °C in the ultrastructure to ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35: 311-320.
- Liu, Z., Foote, R.H. and Brockett, C.C. 1998. Survival of Bull Sperm Frozen at Different Rates in Media Varying in Osmolarity. *Cryobiology.* 37, 219-230.
- Mazur, P., Leibo, S.P., Farrant, J., Chu, H.H.Y., Hanna, M.G. and Smith, L.H. 1970. Interaction of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: Wolstenholme, G.W.E., O' Connor, M (Eds) . *The Frozen cells*, Churehill, London, pp. 69-88.
- Rodriguez, K. O. and Martin, H. 1994. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packed in plastic bags. *Vet. Med. A-Zbl Vet A-Physiol.* 41: 37-47.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- Schneider, U. and Mazur, M. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* , 21: 68-79.
- Watson, P. F. 1995. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.

คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

อนนท์ เทื่องสันเทียะ , จตุพร พงษ์เพ็ง , บรรลือ กล้าพูล และ มาลี อภิเมธีธารง

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ริดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแพะพันธุ์ผสมชานน-พื้นเมือง 2 ตัว สัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 5 สัปดาห์ ตรวจสอบคุณภาพแล้วรวมน้ำเชื้อก่อนแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งนำไปปั่นแยกเซมินอลพลาสมาแช่แข็ง อีกส่วนหนึ่งเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อทันทีก่อนแช่แข็งโดยไม่ปั่น ใช้น้ำยาเจือจาง Tris - citric -fructose มีไข่แดง 20% และ 7% glycerol เปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Student's t-test พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อโดยวิธีปั่นแยกเซมินอลพลาสมาให้ค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ตัวอสุจิมีชีวิต สูงกว่า ($p < 0.05$) การไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (motility: 62% vs 36% และ live spermatozoa: 72.4% vs 51.8%) แต่ค่าความผิดปกติของโครโมโซม (45.6% vs 42.6%) และ ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิเมื่อตรวจสอบด้วย HOS -Test (85.6 % vs 83.6%) ต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อแพะก่อนนำไปแช่แข็งในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Tris -citric -fructose ที่มีไข่แดงและ glycerol ทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายดีกว่าการไม่ปั่นแยก ในแง่ค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและตัวอสุจิมีชีวิต อย่างไรก็ตามวิธีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาไม่มีผลต่อค่าความผิดปกติของโครโมโซม และ ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิเมื่อเทียบกับวิธีไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

คำสำคัญ: น้ำเชื้อแช่แข็ง แพะ เซมินอลพลาสมา

ทะเบียนผลงานวิชาการเลข :

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

Effect of Seminal Plasma Removal on Quality of Frozen-Thawed Goat Spermatozoa

Anone Thuangsanthia, Jatuporn Pongpeng, Banluer Glamplu and Malee Apimeteetumrong

Abstract

This study was carried out to compare the effect of seminal plasma removal on quality of frozen-thawed goat semen. Semen from 2 Saanan-Thai native bucks was collected weekly for consecutive 5 weeks. After quality testing, semen was pooled and divided into 2 parts. First part, seminal plasma was removed by centrifugation before freezing. Another part, whole semen was directly added with extender. Extender was Tris -citric –fructose containing 20% egg yolk and 7% glycerol. Data were compared by Student's t-test. Motility and the percentage of live spermatozoa were higher ($p < 0.05$) after freezing of removed seminal plasma semen than that of non removed seminal plasma semen (motility: 62% vs 36% and live spermatozoa: 72.4% vs 51.8%). No significant difference was found on abnormal acrosome (45.6% vs 42.6%) and membrane integrity (85.6 % vs 83.6%, HOS-Test) of spermatozoa after freezing by removed or non removed seminal plasma procedure. These results showed that removal of seminal plasma prior to freezing goat spermatozoa in Tris extender containing egg yolk and glycerol gave better quality of frozen thawed semen, in terms of motility and survival of spermatozoa, as compared to non removal. However, removed seminal plasma procedure had no detrimental effect on acrosome abnormality and membrane integrity as compared to non removed seminal plasma procedure.

Keywords: frozen semen, goat, seminal plasma

Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development, Muang,
Pathumthani 12000

บทนำ

ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์เกือบทุกชนิด ไช้แดงมักถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนนำไปแช่แข็ง โดยไช้แดงจะทำหน้าที่ในการป้องกันความเสียหายของผนังเซลล์อสุจิจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วระหว่างแช่แข็ง (อ้างถึงโดย Cabrera et al., 2005) กรณียของแพะ ต่อม bulbourethral gland มีการขับเอ็นไซม์ phospholipases เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า egg yolk coagulating enzyme ปนในเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) ในน้ำเชื้อด้วย เอ็นไซม์นี้เมื่อทำปฏิกิริยากับสาร lecithin ในไช้แดง ทำให้เกิดสารพิษ ชื่อว่า Lysolecithin ซึ่งเป็นพิษต่อตัวอสุจิแพะ ทำให้เกิดการจับตัวกันของตัวอสุจิและทำให้การเคลื่อนที่ช้าลง (Iritani et al., 1961; Iritani and Nishikawa, 1963; Ritar and Salamon, 1982) มีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อเลี้ยงข้อจำกัดดังกล่าว โดยใช้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีปริมาณไช้แดงต่ำๆ หรือ การล้างเพื่อแยกเอาเซมินอลพลาสมา ออกก่อนการเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (Ritar and Salamon, 1982; Tuli and Holtz, 1994; Leboeuf et al., 2000; Cabrera et al., 2005) ซึ่งผลมีความแปรปรวนค่อนข้างมากในแต่ละห้องปฏิบัติการ รพีพรรณ และคณะ (2548) รายงานการใช้ น้ำยาเจือจางสำเร็จรูปที่ไม่มีส่วนประกอบของไช้แดงมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อแพะ โดยไม่มีการล้างเซมินอลพลาสมาออก พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิต่างกันอย่างไม่มียัยสำคัญระหว่างน้ำยาเจือจางสำเร็จรูปและน้ำยาเจือจางที่มีส่วนผสมของไช้แดง และไม่พบว่ามีน้ำยาที่ศึกษาชนิดใดให้ผลการเคลื่อนที่อสุจิผ่านเกณฑ์หลังละลายของน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับผสมเทียม อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะในประเทศไทย มีอยู่น้อยมาก อีกทั้งยังไม่มีรายงานการแยกเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อ ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยวิธีปั่นและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา

วิธีดำเนินการ

พ่อพันธุ์แพะที่ใช้รีดน้ำเชื้อ

พ่อแพะพันธุ์ผสมซานเนน-พื้นเมือง จำนวน 2 ตัว อายุประมาณ 3 - 4 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 40-60 กก. เคยผสมให้ลูกมาแล้ว มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ การศึกษาครั้งนี้ รีดเก็บน้ำเชื้อในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

น้ำยาพื้นฐาน คือ Tris (250 mM)-citric acid (90 mM)-fructose (70 mM) ปรับค่า pH เป็น 7.0 ค่า osmolarity ประมาณ 375 mOsm/kg (Choe et al., 2006) ใช้สำหรับปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ส่วนน้ำยาเจือจางที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อ ประกอบด้วย น้ำยาพื้นฐานที่มีไช้แดง 20 % และ 7 % glycerol (v/v)

การรีดเก็บน้ำเชื้อ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง

รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทั้ง 2 ตัวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 5 สัปดาห์ โดยใช้โยนีเทียม (Artificial Vagina) เติมน้ำอุ่นประมาณ 45 °C และใช้แพะตัวเมียเป็นสัตว์เป็นตัวล่อ บันทึกปริมาณ ตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยดู สี ความหนืด การเคลื่อนไหวมวล (mass movement) อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motility) อัตราส่วนตัวอสุจิมีชีวิต (Live spermatozoa) โดยการย้อมสี nigrosin-eosin ความผิดปกติของอโครโซม (abnormal acrosome) โดยการดองในน้ำยา formalsaline ความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิ ตรวจสอบความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิ (membrane integrity) ด้วยวิธี Hypoosmotic Swelling Test (HOS-Test) และตรวจนับความเข้มข้นโดยใช้ Haemocytometer โดยใช้ผู้ปฏิบัติที่มีความชำนาญคนเดียวกันตลอดการทดลอง คัดเลือกน้ำเชื้อที่ใช้ทดลองที่มีคุณสมบัติ ดังต่อไปนี้ คือ มีปริมาณน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้ ≥ 0.5 มล. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ $\geq 3,000 \times 10^6$ ตัว/มล. และอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ $\geq 70\%$ (Aboagla and Terada, 2004) น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ไปแช่ในอ่างน้ำอุ่น 30 °C

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อสดของพ่อแพะพันธุ์ผสมซานเน-พื้นเมือง จำนวน 2 ตัว มาผสมรวมกัน เนื่องจากต้องการเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อและต้องการลดปัจจัยจากพ่อพันธุ์ การผสมกันใช้สัดส่วนเท่ากัน จากนั้นแบ่งเป็นสองส่วนเท่าๆกัน ส่วนแรก นำไปปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ปรับแรงหนีศูนย์กลางที่ 1000g นาน 10 นาที ใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ : น้ำยาพื้นฐาน เท่ากับ 1:20 ตามวิธีของ Ritar and Salomon (1991) เสร็จแล้ว ดูดเอาน้ำยาส่วนใสออก เติมน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อ Tris ที่มีไข่แดง และ glycerol ปรับให้ความเข้มข้นเป็น 480×10^6 ตัว/มล. จากนั้นนำไปปรับลดอุณหภูมิ ที่ 4 °C ในตู้ปรับอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง น้ำเชื้อส่วนที่สอง เติมน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยไม่ต้องนำไปปั่นแยก จากนั้นนำไปแช่แข็งเช่นเดียวกับส่วนแรก เมื่อสิ้นสุดการปรับลดอุณหภูมิ ตรวจสอบอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในน้ำเชื้อทั้งสองส่วน บรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.25 มล. อุดปลายหลอดด้วยผงอุด นำไปแช่แข็งในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลวโดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ เหนือระดับไนโตรเจนเหลว ประมาณ 5 ซม. อุณหภูมิประมาณ -120 °C นาน 10 นาที จากนั้นแช่ลงในไนโตรเจนเหลว

ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากแช่แข็งแล้วไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง โดยละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่น 37 °C นาน 30 วินาที แล้วนำไปตรวจดูอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ตัวอสุจิมีชีวิต ความผิดปกติของอโครโซม และ HOS-Test โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสด วิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลโดยใช้ Student's t-test

ผลและวิจารณ์

ผลการปั่นแยกและไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อแพะก่อนแช่แข็ง ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จำนวนตัวอสุจิมีชีวิต ความผิดปกติของอโครโซม และ ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิ ตรวจสอบ

โดย HOS-Test (Table 1) พบว่า การแยกเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อแพะก่อนแช่แข็ง ให้ค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ตัวอสุจิมิชีวิต สูงกว่าการไม่แยกเซมินอลพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (motility: 62% vs 36% และ live spermatozoa: 72.4% vs 51.8%, $p < 0.05$) เป็นการยืนยันผลของเอนไซม์ในเซมินอลพลาสมาของน้ำเชื้อแพะที่มีต่ออัตราการเคลื่อนที่และตัวอสุจิมิชีวิตเมื่อเจือจางโดยใช้น้ำยาเจือจางที่มีส่วนผสมของไข่แดง สอดคล้องกับงานของ Ritar and Salamon (1982), Cabrera et al. (2005), Choe et al. (2006) แต่ผลจากการศึกษาครั้งนี้กลับตรงกันข้ามกับรายงานของ Tuli and Holtz (1994) ซึ่งทดลองในแพะพันธุ์บอร์ อาจเนื่องจากการใช้แพะต่างสายพันธุ์ ต่างสถานที่และฤดูกาลที่รีดเก็บน้ำเชื้อ ซึ่งมีผลกระทบต่อความเข้มข้นของเอนไซม์ในเซมินอลพลาสมา (Leboeuf et al., 2000) การปั่นเพื่อแยกเอาเซมินอลพลาสมาออก อาจเป็นการล้างเอาสารที่ให้พลังงาน เช่น ฟรุคโตส และสารอาหารอื่นๆ ที่เป็นออกไปด้วย จึงทำให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลาย (Tuli and Holtz, 1994)

Table 1. Effect of removal of seminal plasma on motility, live spermatozoa, abnormal acrosome and membrane integrity of spermatozoa (HOS -Test) after freezing of Saanan-Thai native goat semen.

Treatment	Motility	Live spermatozoa	Abnormal acrosome	HOS -Test
Removed seminal plasma	62.0 $\pm$ 3.7 ^a	72.4 $\pm$ 3.5 ^a	45.6 $\pm$ 3.6	85.6 $\pm$ 1.5
Non removed seminal plasma	36.0 $\pm$ 4.0 ^b	51.8 $\pm$ 3.5 ^b	42.6 $\pm$ 2.4	83.6 $\pm$ 1.4

Values are mean percentages $\pm$ SEM. The experiment was repeated 5 times.

^{a, b} The values with different superscripts within the same column differ significantly ($p < 0.05$).

การปั่นแยกหรือไม่แยกเซมินอลพลาสมา ให้ค่าอัตราความผิดปกติของอโครโซม (45.6% vs 42.6%) และความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิเมื่อตรวจสอบด้วย HOS -Test (85.6 % vs 83.6%) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) แสดงว่า เอนไซม์ phospholipases ในเซมินอลพลาสมาของแพะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ไม่มีผลกระทบต่อค่าความผิดปกติของอโครโซมและความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิ อีกทั้งการปั่นซึ่งนับว่าเป็นการกระทำที่ค่อนข้างรุนแรง ไม่ทำให้ค่าความผิดปกติของอโครโซมเพิ่มขึ้นและไม่ได้ลดความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับที่ไม่ได้ปั่น นอกจากนี้ยังมีไข่แดงอยู่ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อถึง 20% ซึ่งช่วยปกป้องความเสียหายที่จะเกิดกับอโครโซมและความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิ การมีปริมาณไข่แดงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ 12% จะให้ค่าความสมบูรณ์ของอโครโซมและผนังเซลล์ตัวอสุจิสูงกว่าไข่แดงปริมาณที่ 6% (Cabrera et al., 2005)

เมื่อพิจารณาจากค่าตัวแปรต่างๆ คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ ที่ได้จากการศึกษานี้ นับว่าผ่านมาตรฐานของน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับใช้ผสมเทียม (Salvador et al., 2005) คือ มีค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ > 35% อโครโซมปกติ > 50% และความสมบูรณ์ของผนังเซลล์อสุจิ > 35% ฉะนั้น สามารถนำวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ ดังในการศึกษานี้ไปใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ เพื่อใช้ผสมเทียมกับแม่แพะต่อไป

จากผลการศึกษานี้ สรุปว่า คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่ผลิตโดยวิธีปั่นแยกเซมินอลพลาสมาให้ค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ตัวอสุจิมีชีวิต สูงกว่าการไม่ปั่นแยกเซมินอลพลาสมา แต่ไม่มีผลต่อค่าความผิดปกติของอโครโซม และความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ตัวอสุจิเมื่อตรวจสอบด้วย HOS –Test อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้มาจากพ่อพันธุ์แพะเพียงพันธุ์เดียว หากจะนำไปใช้กับแพะพันธุ์อื่น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ถึงปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ พันธุ์แพะและฤดูกาลที่รีดเก็บน้ำเชื้อ ตลอดจนการนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมในฟาร์ม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ยุทธ หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ นายสัตวแพทย์ณรงค์ เลี้ยงเจริญ หัวหน้าศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน ที่สนับสนุนงบประมาณและแพะทดลอง พนักงานราชการของสำนักฯ และศูนย์ที่ช่วยให้การศึกษารุ่นนี้สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และ อนนท์ เทื่องสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus[®] Bioexcel[®] และ Egg Yolk Tris. ประมวลผลงานการประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 20 ประจำปี 2548, 27-29 สิงหาคม 2548, กรมปศุสัตว์ (CD-ROM, no. 33).
- Aboagla, E.M. and Terada, T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(6): 1160-1172.
- Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A. and Gracia, A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (*Capra hircus*). *Reprod. Dom. Anim.* 40: 191-125.
- Choe, C.Y., Kim, J.G., Cho, S.R., Son, D.S., Kim, Y.K., Balasubramanian, S., Choe, S.Y. and Rho, G.J. 2006. Influence of season, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 55-60.

- Iritani, A., Nishikawa, U. and Fukuhara, R. 1961. Studies on the egg-coagulating factor in goat sperm: I. Localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating. In: Proceeding Silver Jubilee Laboratory Animal Husbandry, Kyoto University, pp.89-96.
- Iritani, A. and Nishikawa, Y. 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen:IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. Japan J. Anim. Reprod. 8(4): 113-117.
- Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci. 62: 113-141.
- Ritar, A. J. and Salamon, S. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. Aust. J. Biol. Sci. 35: 305-312.
- Ritar, A. J. and Salamon, S. 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. Small Ruminant Research. 4: 29-37.
- Salvador, I., Viudes-de-Castro, M.P., Bernacer, J., Gomez, E.A. and Silvestre, M.A. 2005. Factor affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadian goat: a field assay. Reprod. Dom. Anim. 40: 526-529.
- Tuli, R.K. and Holtz, W. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT- release from Boer goat spermatozoa. Theriogenology. 42: 547-555.

เปรียบเทียบความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโค

ในการตรวจแยกเพศด้วยวิธี PCR โดยใช้ TSPY Gene

วิบูรณ์ ตุลาภักษา^{1*} สายใจ ชื่นสุข¹

บทคัดย่อ

Testis-specific protein, Y-encode (TSPY) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม Y และมีความจำเพาะต่อการศึกษาคัดเลือกเพศในโคเพศผู้ โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจแยกเพศโดยยีน TSPY ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียน 100 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 50 ตัวอย่าง และใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน TSPY ด้วยเทคนิค PCR พบว่าประสิทธิภาพการตรวจให้ผลแม่นยำถึง 100% โดยให้ผลบวกที่มีขนาดผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ขนาด 260 bp เฉพาะตัวอย่างจากโคเพศผู้เท่านั้น และไม่พบผลบวกในเพศเมียเลย นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบผลผลิต PCR จากการทดลองใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น (DNA template) เพียง 1 pg จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า TSPY เป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อโคสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียนเพศผู้

คำสำคัญ: โคสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียน, การตรวจแยกเพศ, polymerase chain reaction, ยีน TSPY

ทะเบียนวิจัยเลขที่ : 51 (1)-0208-045

¹ กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: twiboon5257@yahoo.com

Comparison on DNA Concentration Extracted from Bovine Blood Samples in Sexing Determination by Polymerase Chain Reaction and using the TSPY Gene

Wiboon Tularaksa^{1*} Saijai Cheunsuk¹

Abstract

Testis-specific protein, Y encoded (TSPY) is gene cluster on Y chromosome and specific to study sex determination for male cattle dairy. This study was performed in order to compare DNA concentration for sex determination with TSPY gene using PCR technique. DNA from blood samples of 100 Thai Holstein dairy (50 male and 50 female), were tested with specific primer for TSPY gene using PCR technique. The study showed that sexing efficiency was 100% with all male samples were positive and all female were negative. Moreover, only small amount of DNA template (1 pg) was used in each test. This result indicated that TSPY was male-specific marker for Thai Holstein dairy cattle.

Keywords: bovine, sex determination, polymerase chain reaction, TSPY gene

¹Livestock Biotechnology Research and Development Section, Bureau of Biotechnology in Livestock Production.

* Corresponding author:twiboon5257@yahoo.com

บทนำ

ในปัจจุบันมีการศึกษาการแยกเพศสัตว์ด้วยดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือด, เนื้อเยื่อ, เส้นขน หรือเซลล์ตัวอ่อน เพื่อใช้ประโยชน์ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ การพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล หรือกระทั่งการคัดแยกเพศตัวอ่อน ก่อนการย้ายฝากเพื่อให้ได้เพศที่ต้องการเป็นต้น ในด้านปศุสัตว์พบว่ามีการศึกษาในส่วนโครโมโซม Y ซึ่งพบเฉพาะในเพศผู้ได้เริ่มทำการศึกษาในปี 1987 มีศึกษาการแยกเพศของตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ในระยะ blastomere ทำปฏิกิริยากับ anti-histocompatibility (H)-Y antiserum พบการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ในเพศผู้ แต่วิธีนี้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและใช้ระยะเวลานาน [White *et al.*, 1987] ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค in situ hybridization โดยใช้ probe ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซม Y เพื่อใช้ในการแยกเพศ [Popescu *et al.*, 1988] ในปี 1990 เริ่มมีการแยกเพศตัวอ่อนโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับเทคนิค hybridization โดยใช้ primers และ probe ที่มีความจำเพาะกับโครโมโซม Y ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วกว่า [Kirszenbaum *et al.*, 1990] และมีการพัฒนาการสร้าง primers ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซม Y ทำให้สามารถแยกเพศโดยใช้วิธี PCR ร่วมกับวิธี gel electrophoresis ทำให้มีความแม่นยำมากขึ้น [Peura *et al.*, 1991] ในปี 1994 เทคนิค PCR ถูกใช้ใช้ในการตรวจเพศก่อนทำการย้ายฝากตัวอ่อนในโคสายพันธุ์ Indian Zebu โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อ bovine satellite บนโครโมโซม Y พบว่าไม่สามารถใช้ในการแยกเพศได้ แต่เมื่อใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อ bovine Y chromosome โดยตรง พบว่าให้ผลบวกเฉพาะใน ดีเอ็นเอที่มาจากเพศผู้เท่านั้น และนำมาทดสอบในเซลล์ตัวอ่อนระยะblastotrichis พบว่าสามารถใช้ในการแยกเพศตัวอ่อนได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว และสามารถฝากตัวอ่อนได้ทันทีโดยไม่ต้องแช่แข็งตัวอ่อน [Appa Rao K.B.C. *et al.*, 1994] ในปี 2001 Lopes และคณะ ทำการทดสอบเพศตัวอ่อนของโค โดยใช้ male specific Y-chromosome ด้วย PCR พบว่ามีประสิทธิภาพในการแยกเพศได้ 92 – 94% และมีความแม่นยำ 90 – 100% จากลูกโคที่ฝากและคลอดสมบูรณ์ [Lopes *et al.*, 2001] ซึ่งต่อมาในปี 2003 มีการพัฒนาใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซม Y เพื่อใช้ในการแยกเพศในตัวอ่อนของ taurine ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Bos taurus จำนวน 30 ตัวอย่างและ zebu ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Bos indicus จำนวน 173 ตัวอย่าง ด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) ร่วมกับเทคนิค in situ hybridization (FISH) พบว่าสามารถใช้ในการแยกเพศได้ถึง 100% [Alves *et al.*, 2003]

Testis-specific protein, Y-encoded หรือ TSPY gene เป็นยีนที่มีตำแหน่งเฉพาะบนโครโมโซม Y [Affara *et al.*, 1996] มีโครงสร้างของยีนที่เหมือนกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น มนุษย์, ม้า และ โค เป็นต้น โดยเฉพาะในมนุษย์และโคมี conserved region 2 บริเวณ และพบที่มีความเหมือนกันถึง 88% และ 71% [Jakubiczka *et al.*, 1993 และ Vogel *et al.*, 1997] TSPY gene ในโคประกอบไปด้วย 7 exons และ 6 intron อยู่ในส่วนของ Yq มีขนาด 3179 bp [Vogel *et al.*, 1997 และ 1998] ซึ่งพบการแสดงออกเฉพาะในเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และระหว่างการพัฒนาเป็นตัวอ่อนเท่านั้น ในปี 2001 Park และคณะ [2001] สามารถแยกเพศจากดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคที่มีความเข้มข้น 5 pg และสามารถแยกเพศตัวอ่อนของโคโดยใช้ blastomere 1, 2, 4 และ 8 เซลล์จาก

ตัวอ่อนของโค พบว่ามีประสิทธิภาพถึง 92.1, 94.3, 96.3 และ 100% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณดีเอ็นเอ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจ นอกเหนือจากการพัฒนาวิธีการต่างๆ แล้ว การศึกษาเกี่ยวกับปริมาณดีเอ็นเอ ยังไม่แพร่หลาย ซึ่งมีการศึกษาของ Daniela และคณะ รายงานการตรวจ TSPY ในตัวอย่างเลือดโคด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาณ DNA เพียง 1 pg [Daniela *et al*, 2005] ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบหาปริมาณ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้ในการตรวจแยกเพศโคโดยใช้ TSPY Gene ด้วยเทคนิค PCR และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคก่อนย้ายฝากหรือเก็บเป็นตัวอ่อนแช่แข็งที่ทราบเพศ ซึ่ง จะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต โดยจะต้องมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดโคสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียน จำนวน 100 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศผู้ 50 ตัวอย่าง และ เพศเมีย 50 ตัวอย่าง ด้วยหลอดเก็บเลือดที่มีสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโค 100 ตัวอย่าง โดยใช้เม็ดเลือดขาว (Buffy coat) ด้วย QIAamp® DNA blood mini kit และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

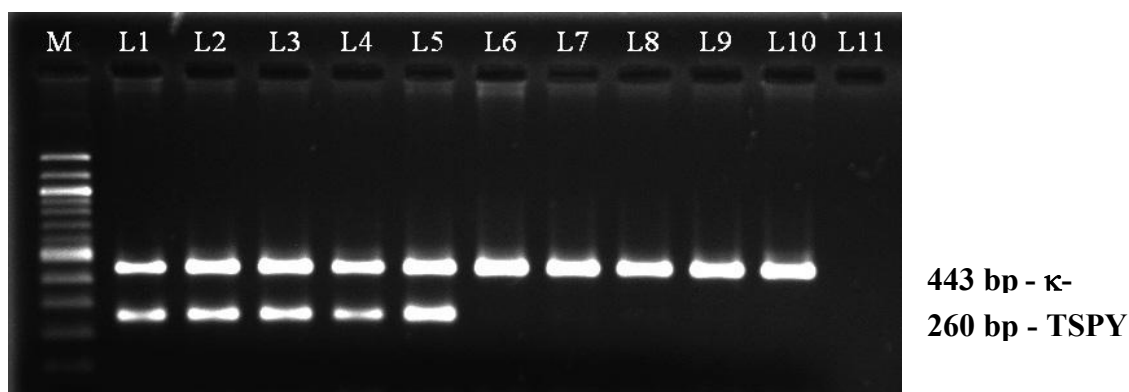
ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดนำมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับ TSPY gene [Daniela Cristina Lemos *et al*. 2005] และ K- casein gene [Chen Cong-Ying *et al*. 2003] เป็น primers ควบคุม (internal control) โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา 20 นาโนกรัม โดยปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2mM Mg²⁺, 200 μM dNTP, 0.1 μM primers และ 0.5 U PlatinumTaq DNA (invitrogen™) ที่สภาวะการทำงาน 94°C 5 นาที, 94°C 30 วินาที 62 °C 30 วินาที 72 °C 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72 °C 10 นาที ด้วยเครื่อง GeneAmp® PCR 9700

การทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่น้อยที่สุดและเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ทดสอบด้วย primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene โดยเจือจางดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม, 1 นาโนกรัม, 0.1 นาโนกรัม, 0.01 นาโนกรัมและ 0.001 นาโนกรัม ตามลำดับ โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ดังข้างต้น

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 2% Agarose gel electrophoresis และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย ethidium bromide และดูภายใต้แสง UV

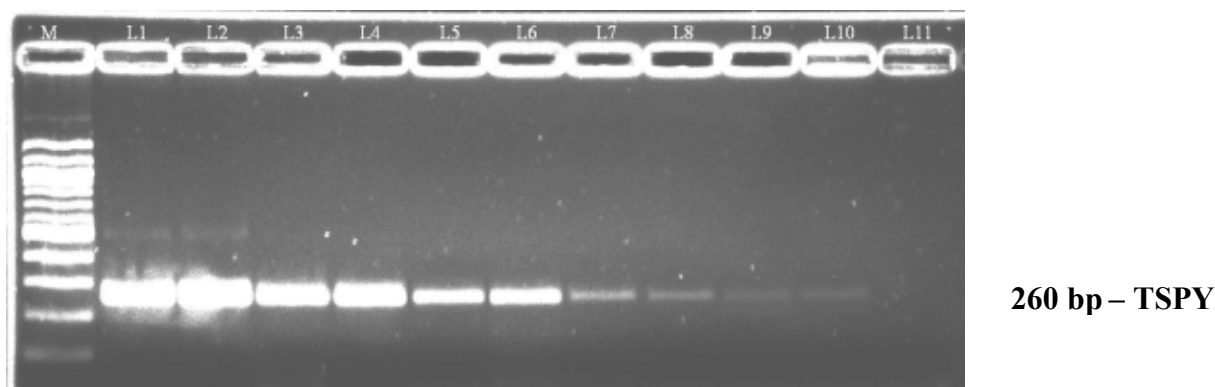
ผลการทดลอง

เมื่อทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดโคสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียน จำนวน 100 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเพศผู้ 50 ตัวอย่าง และเพศเมีย 50 ตัวอย่าง ด้วย QIAamp® DNA blood mini kit และทำ PCR โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซม Y คือ TSPY gene ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ด้วย 2% agarose gel และย้อมด้วย ethidium bromide พบผลผลิตที่เกิดขึ้นจาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene มีขนาด 260 bp. พบเฉพาะโคเพศผู้เท่านั้น และผลผลิตที่เกิดขึ้นจาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ K-casein มีขนาด 443 bp. ซึ่งเป็น primers ควบคุม (internal control) พบทั้งโคเพศผู้และเพศเมีย ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลผลิต PCR จาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene มีขนาด 260 bp. และ ผลผลิต PCR จาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ K-casein มีขนาด 443 bp. M; 100 bp ladder, L1 – L5; โคเพศผู้สายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียน, L6 – L10; โคเพศเมียสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชียน, L11; negative control

เมื่อทดสอบ primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene กับปริมาณความเข้มข้น DNA template 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.001 ng (1 pg) ตามลำดับ ในการเปรียบเทียบหาปริมาณความเข้มข้น DNA template ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบด้วยวิธี PCR พบว่าสามารถตรวจสอบได้ถึงระดับความเข้มข้นของ DNA template 0.001 ng (1pg) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 เปรียบเทียบรูปแบบของผลผลิต PCR จาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene โดยใช้ DNA template จากโคเพศผู้สายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียนที่มีปริมาณความเข้มข้น 10 ng (L1 – L2), 1 ng (L3 – L4), 0.1 ng (L5 – L6), 0.01 ng (L7 – L8), 0.001 ng (L9 – L10) ตามลำดับ, M; 100 bp ladder, L11; negative control

วิจารณ์ผลการทดลอง

TSPY gene เป็นส่วนที่อยู่บนโครโมโซม Y พบได้ทั้งในโคและสิ่งมีชีวิตอื่น และมีการแสดงออกเฉพาะในเพศผู้เท่านั้น [Affara *et al.*, 1995; Jakubiczka *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1997] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่า TSPY gene สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโคเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน จากการทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ primers ที่จำเพาะต่อยีนนี้ ผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของการตรวจสอบมีค่าถึง 100% โดยดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียนสามารถตรวจสอบเพศของสัตว์ทั้งหมดได้อย่างถูกต้องทั้งในเพศผู้ 50 ตัวอย่าง และเพศเมีย 50 ตัวอย่าง นอกจากนี้การทดสอบความไวของปฏิกิริยายังสามารถกระทำได้โดยการลดขนาดความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น (DNA template) ซึ่งผลการทดลองสามารถลดปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเหลือเพียง 1 pg และสามารถตรวจสอบผลผลิต PCR ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการศึกษาที่กระทำโดย Lemos และคณะ (Daniela Cristina Lemos *et al.* 2005) ในปี 2005 แสดงให้เห็นว่ายีน TSPY มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา PCR และมีประสิทธิภาพสูงถึงแม้ว่าปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นมีปริมาณน้อยยังสามารถให้ผลบวกที่ชัดเจน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำยีน TSPY มาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจแยกเพศตัวอ่อนในโอกาสต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบ Primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY Gene ด้วยเทคนิค PCR พบว่า TSPY gene สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโคเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน โดยผลผลิตที่เกิดขึ้นจาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene มีขนาด 260 bp. จะพบเฉพาะในโคเพศผู้เท่านั้น สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ในการเปรียบเทียบหาปริมาณความเข้มข้น DNA template(ดีเอ็นเอเริ่มต้น) ที่น้อยที่สุดที่สามารถใช้ในการตรวจแยกเพศโคโดยให้ผลบวกนั้น พบว่าสามารถตรวจสอบได้ที่ระดับความเข้มข้นของ DNA template เพียง 0.001 ng (1pg) แสดงให้เห็นว่ายีน TSPY มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจแยกเพศโค

เอกสารอ้างอิง

- Affara N, et al. 1996. Report of the Second International Workshop on Y Chromosome Mapping 1995. Cytogenet Cell Genet 73: 33-76.
- Alves BC, Hossepian de Lima VF, Teixeira CM, Moreira-Filho CA. 2003. Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing Bos taurus and Bos indicus embryos. Theriogenology 59: 1415-1419.
- Appa Rao K. B. C., S. M. Totey, Pawshe CH. 1994. Biopsy of Indian Zebu and crossbred cattle preimplantation embryos and sexing by polymerase chain reaction. Animal Reproduction Science 34: 209-216.
- Chen Cong-Ying, Huang Lu-Sheng, Chen Jing-Bo, Ding Neng-Shui, Zhou Li-Lua, Hai-Xia X. 2003. Establishing and optimizing the system for sex determination of bovine preimplantation embryos. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 1: 13-16.
- Daniela Cristina Lemos, Lopes Rios A.F., Caetano C.L., Lobo R.B., Vila R.A., Martelli L, Takeuchi P.L., Ramos ES. 2005. Use of the *TSPY* gene for sexing cattle. Genetics and Molecular Biology 28: 117-119.
- Jakubiczka S, Schnieders F, Schmidtke J. 1993. A bovine homologue of the human TSPY gene. Genomics 17: 732-735.
- Kirszenbaum M, Cotinot C, Leonard M, Vaiman M, Fellous M. 1990. [Diagnosis of the sex of bovine embryos using molecular biology]. Reprod Nutr Dev Suppl 1: 125s-132s.

- Lopes RF, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.
- Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI, Im KS. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 55: 1843-1853.
- Peura T, Hyttinen JM, Turunen M, Janne J. 1991. Reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35: 547-555.
- Popescu CP, Cotinot C, Boscher J, Kirszenbaum M. 1988. Chromosomal localization of a bovine male specific probe. *Ann Genet* 31: 39-42.
- Vogel T, Schmidtke J. 1998. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet* 80: 209-213.
- Vogel T, Dechend F, Manz E, Jung C, Jakubiczka S, Fehr S, Schmidtke J, Schnieders F. 1997. Organization and expression of bovine TSPY. *Mamm Genome* 8: 491-496.
- White KL, Anderson GB, Bondurant RH. 1987. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 37: 867-873.

DNA Extraction from Cattle Frozen Semen

Saijai Cheunsuk^{1*} Wiboon Tularaksa¹

Abstract

Four different methods of DNA extraction, (1) guanidine thiocyanate method A, (2) guanidine thiocyanate method B, (3) chelex100 method, and (4) phenol-chloroform method, were used to extract DNA from cattle frozen semen. The results indicated that guanidine thiocyanate method B and chelex100 method gave the highest purity of DNA ($OD=1.72\pm0.16$ and 1.67 ± 0.05) compared to guanidine thiocyanate A and phenol-chloroform method ($OD=2.50\pm0.27$ and 1.58 ± 0.07). In addition, chelex100 method gave the highest amount of DNA 201.7 ± 72.86 $\mu\text{g/ml}$ compared to guanidine thiocyanate A, guanidine thiocyanate B, and phenol-chloroform method (DNA yield= 47.76 ± 9.32 , 14.51 ± 4.61 , and 29.27 ± 7.14 $\mu\text{g/ml}$, respectively). There was no difference in DNA quality except DNA extracted with guanidine thiocyanate A when used to perform PCR reaction. DNAs extracted from guanidine thiocyanate method B, chelex100, and phenol-chloroform method presented positive results of PCR whereas DNA extracted from guanidine thiocyanate A gave the negative result. These results indicated that all three methods except guanidine thiocyanate A could be used to extract DNA from cattle frozen semen.

Keywords: DNA extraction, frozen cattle semen, guanidine thiocyanate, chelex100, phenol-chloroform

¹Livestock Biotechnology Research and Development Section, Bureau of Biotechnology in Livestock Development, Tiwanon Road, Pathumthani 12000, THAILAND.

* Corresponding author: keemojung@yahoo.com

การสกัด Sperm DNA จากน้ำเชื้อโคแช่แข็ง

สายใจ ชื่นสุข^{1*} วิบูรณ์ ตูลารักษ์¹

บทคัดย่อ

การสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อโคแช่แข็งมีหลายวิธี ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีแยกสกัดดีเอ็นเอ 4 วิธี ดังนี้คือ วิธีสกัดโดยใช้ (1) guanidine thiocyanate method A, (2) guanidine thiocyanate method B, (3) chelex100 และ (4) phenol-chloroform เพื่อหาวิธีที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด และมีคุณภาพดีที่สุด ผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่ใช้ guanidine thiocyanate B และ chelex100 มีความบริสุทธิ์มากที่สุด ($OD=1.72\pm0.16$ และ 1.67 ± 0.05) เมื่อเทียบกับวิธี guanidine thiocyanate A และ phenol-chloroform method ($OD=2.50\pm0.27$ และ 1.58 ± 0.07) ในแง่ปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่ใช้ chelex100 ให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด คือ 201.7 ± 72.86 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี guanidine thiocyanate A, guanidine thiocyanate B, และ phenol-chloroform method (47.76 ± 9.32 , 14.51 ± 4.61 , และ 29.27 ± 7.14 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากวิธีสกัดทั้ง 4 วิธี มาทดสอบด้วยวิธี PCR พบว่า เฉพาะดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี guanidine thiocyanate B, chelex100, และ phenol-chloroform เท่านั้นที่ให้ผลบวก ส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี guanidine thiocyanate A ให้ผลลบ ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี ได้แก่ guanidine thiocyanate B, chelex100, และ phenol-chloroform สามารถนำมาใช้เป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอจากน้ำเชื้อโคแช่แข็งได้

คำสำคัญ: การสกัดดีเอ็นเอ น้ำเชื้อโคแช่แข็ง guanidine thiocyanate chelex100 phenol-chloroform

ทะเบียนผลงานวิชาการเลขที่ : 51 (2)-0208-169

¹ กลุ่มงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: keemojung@yahoo.com

Introduction

Several DNA extraction methods are routinely used in molecular laboratories for DNA preparation. However, a single DNA extraction technique is not suitable to all types of samples due to the variation in their gross and microscopic structures and how the samples are preserved. To optimize both DNA quality and quantity, many techniques are developed to process different tissues (Roe *et al.*, 1996).

In contrast to mammalian somatic cells, mammalian spermatozoa are resistance to conventional DNA extracted procedures (Shibura and Nandi., 1979; Bahnak *et al.*, 1988). The DNA of mammalian spermatozoa is presented in a group of low molecular weight proteins called protamines while the DNA of somatic cells is presented in a complex with histones. The sperm-specific protamines are tightly bound to the DNA make them sixfold more highly condensed than those in somatic cells (Balhorn., 1982; Pienta and Coffey., 1984; Evenson and Jost., 1994). Because of highly DNA condensation, specific procedure to extract DNA is needed to be developed. Moreover, the preservation of semen such as cryopreservation to maintain the quality of sperm until used is also considerable since many chemical reagents have been added. The preparation of sperm DNA is absolutely necessary for certain research objectives such as sperm genotyping, sex determination, paternal testing, etc, through several molecular techniques.

Guanidine Thiocyanate is a powerful protein denaturant; both the guanidinium cation and thiocyanate anion are strong chaotropic agents. It is recommended for use in isolation of nucleic acid, especially from tissues high in ribonuclease activity such as pancreas (Chirgwin *et al.*, 1979). Many studies have been done to optimize the appropriated concentration of guanidinium thiocyanate solution (Chomczynski and Sacchi., 1987; Hossain *et al.*, 1997).

Chelex 100 is a [chelating resin](#) used to purify other compounds via [ion exchange](#). It is noteworthy for its ability to bind [transition metal](#) ions. Procedures utilizing Chelex 100 chelating resin have been developed for extracting DNA from forensic-type samples for use with the PCR. Polar resin beads bind polar cellular components after breaking open cells. Non-polar nuclear DNA and RNA remain in water solution above chelex (Walsh *et al.*, 1991).

The goal of this study was to compare the quantity and quality of DNA extracted using four different methods: guanidinium thiocyanate method A, guanidinium thiocyanate method B, the chelex 100 method, and the phenol-chloroform method which is currently used in Animal Molecular Biology Laboratory at Bureau of Molecular Biotechnology in Livestock Production.

Materials and Methods

1. Semen samples

Twenty frozen semen samples from one bull and one batch were used in each DNA isolation method.

2. DNA extraction

Method 1: Guanidinium Thiocyanate method A

The procedure was modified from a protocol described by Hossain, A.M. et al (1997). Semen samples were thawed and 100 µl of each sample was used. The spermatozoa were separated from the extender by centrifugation and washed 3 times with phosphate-buffered saline. The sperm pellet was lysed in a lysis buffer containing 4M guanidinium, 30mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% Sarcosyl, 0.20mg/ml proteinase K, and 0.3M b-mercaptoethanol, and incubated at 55°C for 3-4 hr. To precipitate DNA, two volume of isopropanol was added directly to the lysate and the tubes were gently inverted back and forth until DNA fibers clumped together. After removal of the transparent gel matrix (incompletely lysed protein), DNA fibers were washed in 70% ethanol. The recovered DNA was dissolved in Tris-EDTA (TE) buffer and keep at -20°C until analysis.

Method 2: Guanidinium Thiocyanate method B

The procedure was modified from a protocol available at www.protocol-online.org. Semen samples were thawed and 100 µl of each sample was used. The spermatozoa were separated from the extender by centrifugation and washed 3 times with 1.1M Sodium Citrate. The sperm pellet was lysed in a lysis buffer containing 100 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, and 0.2 mg/ml proteinase K. To precipitate protein, 100 µl of 4M Guanidine Thiocyanate in 0.1 M Tris-Cl, pH 7.5 was added into the lysate, centrifuged at 13,000 rpm for 5 minutes. Transfer supernatant into a new tube and precipitated DNA by adding 2 volume of isopropanol and washed DNA pellets with 70% ethanol. The recovered DNA was dissolved in Tris-EDTA (TE) buffer and keep at -20°C until analysis.

Method 3: Chelex 100 method.

The procedure was modified from a protocol available at www.protocol-online.org. Semen samples were thawed and 100 µl of each sample was used. The spermatozoa were separated from the extender by centrifugation and washed 3 times with wash buffer pH8.0 (10mM Tris, 10mM EDTA, 50mM NaCl, 2% w/v SDS) followed by a final wash with sdH₂O. The sperm pellet was lysed in a lysis buffer containing 5% w/v Chelex 100, 10mg/ml Proteinase K, 1M DTT and incubated at 55°C for 3-4 hr. then 100°C for 10 minutes. Vortex briefly and centrifuge at 13,000 rpm 2 minutes. Transfer supernatant into a new tube and precipitated

DNA by adding 300 μ l isopropanol and washed DNA pellets with 70% ethanol. The recovered DNA was dissolved in Tris-EDTA (TE) buffer and keep at -20°C until analysis.

Method 4: Phenol-chloroform method.

This method is currently used in Animal Molecular Biology Laboratory at Bureau of Molecular Biotechnology in Livestock Production. One hundred μ l of thawed semen was washed 3 times with 1.1M Sodium citrate. The sperm pellets were lysed in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM EDTA. After incubation at 55°C 1 hour, equal volume of phenol:Chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) was added, mixed together and centrifuge at 13,000 rpm for 1 minute. Upper phase (water phase) was transferred to a new tube, 2 volume of cold absolute ethanol and 1/10 volume of 3M sodium acetate pH5.2 was added to precipitate DNA. DNA pellets were washed with 70% ethanol. The recovered DNA was dissolved in Tris-EDTA (TE) buffer and keep at -20°C until analysis.

3. DNA analysis:

The quality and quantity of the DNA extracted by the above four methods was assessed by spectrophotometer (Beckman coulter DU 730). The optical density (OD) of DNA samples was measured at 260 and 280 nm. and the ratio of 260/280 indicated the purity. The DNA yields obtained from equal numbers of spermatozoa and dissolved in a fixed volume of TE buffer.

The quality of the DNA yield was further assessed by PCR with primers for TG5 gene which given final product of 500 bp. Two samples of each method were randomly selected for PCR reaction. Amplifications were done in PCR tubes. Reaction mixture consisted of 30 ng. DNA template, 1x PCR buffer, 2mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 0.1 μ M primers, and 0.5 U Tag DNA Polymerase. The samples were preheated at 95°C for 5min. followed by PCR amplification. Thirty cycles included: denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 58°C for 30 sec, and elongation at 72°C for 1 min. Final elongation was done in 72°C for 8 minutes. PCR products were analyzed using gel electrophoresis in 2% agarose gel and gel was stained with ethidium bromide and photographed under UV light.

4. Statistic analysis: Both amount of DNA (DNA yield) and DNA purity (OD) of four methods were compared by one-way ANOVA. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Four methods of DNA extraction were used to extracted cattle frozen semen with 20 repeats of each method. These DNA samples were collected from one bull and preserved under the same condition until experimented.

The outcome of four extraction methods is summarized in Table 1. As shown in Table 1. The 260/280 ratio (indicated of protein contamination) of DNA, extracted by guanidine thiocyanate method A, B, Chelex 100, and phenol-chloroform method, were 2.50 ± 0.27 , 1.72 ± 0.16 , 1.67 ± 0.05 , and 1.58 ± 0.07 respectively. However, Chelex100 method provided the highest yield of DNA (201.7 ± 72.86).

Table1. Comparison of the outcome of four different methods of DNA extraction from frozen bull spermatozoa

Parameters	Methods			
	1	2	3	4
Organic solvent	not used	not used	not used	used
Hazardous reagents	used	not used	not used	not used
Time requirement	1 day	1 day	1 day	1 day
Protein contamination ¹	2.50 ± 0.27	1.72 ± 0.16	1.67 ± 0.05	1.58 ± 0.07
DNA yield ($\mu\text{g/ml}$) ²	47.76 ± 9.32	14.51 ± 4.61	201.7 ± 72.86	29.27 ± 7.14
PCR reaction ³	no reaction	complete	complete	complete
Method1	= guanidine thiocyanate method A.			
Method 2	= guanidine thiocyanate method B.			
Method 3	= chelex 100 method.			
Method 4	= phenol-chloroform method.			

¹ The 260/280 ratio indicating the relative abundance of protein in DNA samples.

² Amount of DNA per equal spermatozoa dissolved in equal volume.

³ PCR reaction was performed using primers specific to TG5 gene in cattle.

The quality of DNA was further evaluated by PCR reaction using specific primers for detection of cattle TG5 gene with 500 bp product in length. Two DNA samples of each DNA extraction method were

randomly selected to perform PCR reaction. All samples except DNA samples from method 1 were positive for the presence of TG5 gene (Figure 1.)

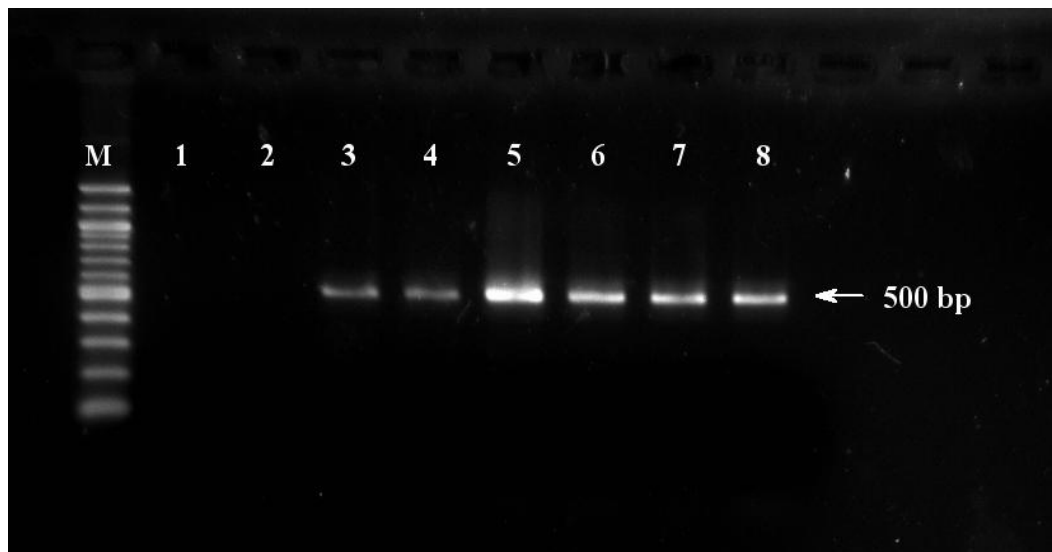


Figure1. Electrophoresis of amplified DNA products of TG% gene from bull semen with four DNA extraction methods. Lanes: M=100 bp marker, lane1-2 =DNA extracted using guanidine thiocyanate method A, lane3-4 = DNA extracted using guanidine thiocyanate method B, lane5-6 = DNA extracted using chelex100 method, 7-8= DNA extracted using phenol-chloroform method.

Discussion

Guanidine thiocyanate and chelex 100 have been used in the extraction of nucleic acid from human sperm and forensic material (Chomczynski and Sacchi., 1987; Hossain *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1991) in which sperm DNA extraction has been routinely performed in molecular laboratory especially human fertility laboratory. However, cattle sperm using in the field of artificial insemination is different due to the preservation of spermatozoa in cryogenic condition before use. The process of cryopreservation has added many reagents to maintain the quality of semen. Appropriated method to extract the DNA from cryopreserved semen is necessary.

For our study, method 1 and method 2 both used guanidine thiocyanate as protein precipitation reagent. The difference of these 2 methods was the combination of reagents using during the process. In guanidine thiocyanate method A, hazardous reagent such as b-mercaptoethanol which has a strong rancid

smell and toxic to respiratory system was used. Moreover, the process to separate DNA pellets and the gel matrix (incomplete lysed protein) was labored. This corresponded to the OD value which was 2.50 ± 0.27 in guanidine thiocyanate method A indicated higher protein contamination than guanidine thiocyanate method B ($OD = 1.72 \pm 0.16$, $p < 0.01$). In addition, guanidine thiocyanate B gave the highest purity among all four methods although yielded the lowest amount of DNA ($OD = 14.51 \pm 4.61$ $\mu\text{g/ml}$). Chelex100, in our study, also gave the highest purity DNA ($OD = 1.67 \pm 0.05$) with no significant difference to that of guanidine thiocyanate B (1.72 ± 0.16 , $p > 0.05$) but yielded significantly a great highest amount of DNA (201.7 ± 72.86 $\mu\text{g/ml}$) than guanidine method A, guanidine method B, and phenol-chloroform method which yielded 47.76 ± 9.32 , 14.51 ± 4.61 , and 29.27 ± 7.14 $\mu\text{g/ml}$ of DNA ($p < 0.01$), respectively. Phenol-chloroform method is currently used to extract DNA in our facility. For our study, this method gave a moderate value of both purity and amount of DNA ($OD = 1.58 \pm 0.07$ and $\text{yield} = 29.27 \pm 7.14 \mu\text{g/ml}$). However, phenol and chloroform used in this method are considered as hazardous chemical which harm to both respiratory system and direct contact. Any method which could avoid using these chemical should be considered.

For the quality of the DNA, PCR using primers specific to cattle TG5 was used to detect the reaction of each DNA group. As shown in figure 1, all samples except samples from guanidine thiocyanate method A, gave positive results which presented 500bp bands of TG 5 PCR product. This indicated that DNA from 3 out of 4 methods which were guanidine thiocyanate method B, Chelex 100, and phenol-chloroform method, were be able to used in further molecular procedures. For guanidine thiocyanate method A, the negative result of TG5 PCR reaction might come from the high contamination from incomplete lysed protein which gave the fault measurement of DNA yield and in turned interfered the reaction of PCR which is a very sensitive reaction.

In conclusion, three DNA extraction methods which were guanidine thiocyanate method B, Chelex 100, and phenol-chloroform method could be selected procedure to perform DNA extraction in molecular laboratory. Due to the less harmful reagent and easy to perform of guanidine method B, this method could be used in case of enough amount of sample provided.

Acknowledgements

All frozen semen samples were provided by Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190, Thailand.

References

- Bahnak, B.R., Wu, Q.Y., Coulombel, L. 1988. A simple and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm. *Nucleic Acids Res.*, 16:1208-1209.
- Balhorn, R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Bio*, 193:298-305.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. 1979. *Biochemistry* 18:5294–5299.
- Chomczynski, P and Sacchi, N .1987. *Anal. Biochem.* 162:156–159.
- Evenson, D. and Jost, L. 1994. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Enzymol.* Vol 42: 159-176.
- Hossain, A.M., Rizk., Behzadian, A., and Thorneycroft, I.H. 1997. Modified guanidinium thiocyanate method for human sperm DNA isolation. *Mol. Human Reprod.* 3: 953-956.
- Pienta, K.J. and Coffey, D.S. 1984. A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J Cell Sci Suppl*, 1: 123-135.
- Roe, B.A., Crabtree, J.S. and Khan, A.S. 1996. *DNA Isolation and Sequencing*. 1st ed. John Wiley and Sons, New York, pp. 164.
- Shiurba, R. and Nandi, S. 1979. Isolation and characterization of germ line DNA from mouse sperm. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3947-3951.
- [Walsh, P.S.](#), [Metzger, D.A.](#), [Higuchi, R.](#) 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. [Biotechniques](#). Apr; 10(4):506-13.

The Evaluation of Selected 13 Polymorphic Microsatellite Markers for the Parentage Test of Thai Holstein Cattle.

Lerdchai Chintapitaksakul* Rapiphan Uavechanichkul

Abstract

Nineteen families of 44 Thai Holstein cattle were evaluated for microsatellite characteristics and the parentage test. The total of 13 microsatellite markers were selected from the genome database and the genomic DNAs were isolated and used as templates for amplification. Multiplex PCR of these thirteen markers in a single reaction showed that only ten markers; b1, b2, b3, b4, b6, b7, b10, b11, b12 and b13 could amplify the fragments ranging from 5 to 12. Nine markers are highly informative with PIC of more than 0.5. Accuracy test revealed that seven markers (b2, b4, b6, b7, b10, b11 and b12) are completely matched with known relationship. The combination of seven markers in pedigree testing showed 0.9915 and 0.9997 exclusion probabilities for one and both parents exclusion, respectively. We concluded that seven out of thirteen selected microsatellite markers can be used as a tool in parentage testing in Thai Holstein cattle. This study is a good application for evaluation of microsatellites DNA in parts of breeding program and improvement of livestock production.

Keywords: Exclusion probability, Microsatellite marker, Multiplex PCR, Parentage test, Thai Holstein cattle

Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development, Tiwanon Rd., Pathumthani Province, THAILAND 12000

*Corresponding author. Tel. 662-967-9700 ext 3305, 3302 E-mail address: lerdchai_th@hotmail.com.

การประเมินการใช้ ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 13 ตัวเพื่อการตรวจพิสูจน์

พ่อ แม่ และ ลูกในโคนมไทยโฮลส์ไตน์

นายเลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล* รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้เลือกเครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์ ๑ ชุด จำนวน ๑๓ ตัว เพื่อนำมาประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เครื่องหมายนี้เพื่อตรวจพิสูจน์ความเป็น พ่อ แม่และลูก จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่นำมาจากโคนมไทยโฮลส์ไตน์จำนวน ๔๔ ตัวอย่าง (๑๕ ครอบครัว) ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ขนาดของไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธี Multiplex PCR ในปฏิกิริยาเดียว สามารถเพิ่มจำนวนได้ ๑๐ ไมโครแซทเทลไลต์ (b1, b2, b3, b4, b6, b7, b10, b11, b12 และ b13) จากทั้งหมด ๑๓ ไมโครแซทเทลไลต์ และสามารถหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้นด้วยการใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ โดยขนาดของอัลลีลที่พบในแต่ละตำแหน่ง (locus) มีความแตกต่างระหว่าง ๕ ถึง ๑๒ แบบ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลต์จำนวน ๕ ตัว (b1, b2, b3, b4, b6, b7, b10, b11 และ b13) ให้ค่า PIC (Polymorphism Information Content) มากกว่า ๐.๕ สำหรับการทดสอบความถูกต้องพบว่าไมโครแซทเทลไลต์ ๗ ตัว (b2, b4, b6, b7, b10, b11 และ b12) ให้ผลสอดคล้องกับพันธุ์ประวัติจริงและให้ผล one and both parents exclusion probabilities เท่ากับ ๐.๕๕๑๕ และ ๐.๕๕๕๗ ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายพันธุกรรมที่คัดเลือกมาจำนวน ๗ ตัวสามารถนำมาพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ และลูกของโคนมไทยโฮลส์ไตน์ และเป็นตัวอย่างของวิธีการประเมินเครื่องหมายพันธุกรรม

คำสำคัญ: Exclusion probability, เครื่องหมายพันธุกรรมไมโครแซทเทลไลต์, Multiplex PCR, การตรวจพิสูจน์ พ่อ แม่ และ ลูก, โคนมไทยโฮลส์ไตน์

ทะเบียนผลงานวิชาการเลขที่ : 51(2)-0208-167

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถ.ฉนวนนันท อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทร. 02-967-9700 ต่อ 3305, 3302 อีเมลล์: lerdchai_th@hotmail.com

Introduction

Microsatellite is a stretch of DNA containing distribution of short tandem repeat sequences, normally being 1-6 bp repeat type. Typically, microsatellites span between twenty and a few hundred bases (Beckmann and Weber 1992) and most of microsatellites, about 30-67%, found in vertebrates' genome are dinucleotides. The first dinucleotide type, (AC)_n repeat, is the most common dinucleotide motif which is 2.3 folds more frequent than (AT)_n, the second most general type of dinucleotids (Toth *et al.* 2000). Microsatellites can be found anywhere in the genome, both in protein-encoding and noncoding DNA (Toth *et al.* 2000). In eukaryotic organisms, microsatellites have been shown to be in excess in noncoding regions compared to a random distribution pattern (Metzgar *et al.* 2000).

Traditionally, pedigree verification in dairy cattle has been carried out using blood groups and protein polymorphism (Stormont 1967). Molecular techniques using DNA-based microsatellite markers offer several advantages over traditional blood typing. Any sample from an individual (for example, blood, hair, milk and saliva) can be used, as long as it contains DNA; hence, the technique can be noninvasive and retrospective from stored tissue or semen samples. The accuracy of the DNA test is much greater than for blood group markers, as DNA markers can have many alleles and a virtually unlimited supply of markers are available (Kappes *et al.* 1997). The DNA-based markers have been become the international standard system of identification verification in livestock. In most farm animals, there is now a wide choice of suitable codominantly inherited genetic markers of known chromosomal location (Barendse *et al.* 1994; Bishop *et al.* 1994; Rohrer *et al.* 1994; Burt *et al.* 1995; Crawford *et al.* 1995). Currently, the microsatellites are markers for individual identification in cattle which is also applied for parentage testing. In this study, our experiment was assigned to evaluate the possibility of thirteen selected microsatellites for parentage test in nineteen Thai Holstein cattle families.

Materials and Methods

1) Genomic DNA samples

Genomic DNA samples used in this study were kindly provided by Dr Wiboon Tularaksa. The DNA samples were isolated from blood samples using QIAGEN kit. Total of 44 dairy Thai-Holstein cattle (6 bulls, 19 cows and 19 daughters) from 19 families were included.

2) Selection of thirteen microsatellite markers

Thirteen microsatellite markers, named b1 to b13, were selected from cattle markers previously reported by Ihara *et al.* (2004). They were selected based on heterozygosity over 0.6 and the expected size should be between 100 and 270 bp (table 1). The b1 to b13 markers were corresponded to markers previously reported as DIK1118, TGLA40, DIK023, MS2063, DIK1125, DIK4511, DIK2662, DIK5156, DIK5411, DIK116, DIK2733, DIK4356 and DIK4515, respectively (Ihara *et al.* 2004).

3) Amplification and fragment analysis of the thirteen microsatellite markers

Thirteen pairs of primers were used and each pair of primers was labeled with fluorescent dyes. Details of primers are shown in table 1.

Multiplex PCR reaction was performed in the total volume of 50 μ l. Each reactions composed of 0.2 mM dNTPs, 4 mM $MgCl_2$, 5 pmoles of each 13 primers and 1 Unit of *Taq* DNA polymerase in buffer (2 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 0.01 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 0.05% Tween® 20 and 0.05% Nonidet® – P40) with 100 ng DNA template from DNA pellet suspensions above. The PCR reaction was started with 94 °C for 7 min followed by 10 cycles of 94 °C for 30 sec, the touch down annealing step was used at the temperature of 65 to 57 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 15 sec. This reaction was followed by 25 cycles of 94 °C for 30 sec, 57 °C for 30 sec and 72 °C for 15 sec, and a final extension step of 72 °C for 7 min. The amplified products were analyzed by gel electrophoresis using 1.5% agarose.

The sizes of amplified products were analyzed by MegaBACE 500 DNA Analysis System. The sample was heated at 95 °C for 2 min prior to analyze by MegaBACE 500. Raw data obtained from MegaBACE Instrument Control Manager program version 2.5 was analyzed by MegaBACE Genetic Profiler program version 2.0.

4) Characteristics of the thirteen microsatellite markers

The individuals were genotyped based on allele size data. Allele frequency, heterozygosity and polymorphism information content (PIC) were calculated using MS tools v3 software (Park SDE, 2001).

Each microsatellites marker was evaluated for their accuracies by comparing the genotypes obtained from known relationship. All markers with more than 95% accuracy were further analyzed for exclusion probability/cumulative exclusion probability following method of Jamieson *et al.* (1997).

Results

The total of 44 genomic DNA samples from 19 families were used as templates to amplify thirteen microsatellite markers in single reaction. Amplified fragments were analyzed and the result showed that fragment sizes of ten markers; b1, b2, b3, b4, b6, b7, b10, b11, b12 and b13 were obtained in all samples, whereas that of two markers, b5 and b9, were inconsistently amplified due to the efficiency of amplification. One marker, b8, was inapplicable. In addition, it was found that b5 contains di-nucleotide repeat instead of tri-nucleotide repeat as previously reported (table 1). The data of ten markers was then further analyzed.

The observed size of the 10 markers is between 103 and 266 bp, allele frequencies, expected/observed heterozygosities and PIC as shown in tables 2 and 3.

For accuracy test by computing percentage of matched families for each marker found that seven of ten markers had 100% matched except three markers; b1-94.74%, b3-89.47% and b13-94.74%. The seven markers (b2, b4, b6, b7, b10, b11 and b12) with completely matched pedigree were further computed for each exclusion probabilities and cumulative exclusion probabilities as shown in table 4.

Discussion

All thirteen microsatellite markers, except b8, contained dinucleotide short tandem repeat. However, one set of primer, b8, could not give an application and two markers which are b5 and b9 could amplify only in some samples. This result indicated that the efficiency of all markers in single reaction is different due to several factors such as types of templates, length of amplified product and numbers of repeat.

This study found that the ten markers have numbers of alleles ranged from 5 to 12 (table 2) which is polymorphic and useful for individual identification. In addition, these markers can be used for pedigree analysis. Based on the selective standard of microsatellite loci (Barker 1994), microsatellite loci ought to have at least four alleles to be considered useful for the evaluation of genetic diversity.

The polymorphism information content or PIC is a parameter indicative for the degree of informativeness of a marker (Botstein *et al.* 1980). PIC of the ten markers found that nine are highly informative ($PIC > 0.5$) and one (b12) is moderately informative ($0.25 < PIC < 0.5$) based on criteria of Botstein *et al.* (1980).

Accuracy test indicated that seven markers (b2, b4, b6, b7, b10, b11 and b12) are completely matched with known relationship. These seven markers were calculated for exclusion probability (PE) which is the

probability that two random individuals do not share any alleles, so that parentage can be excluded (Visscher *et al.* 2002). The seven markers have highest PEs and the combination of these markers has 0.9915 and 0.9997 cumulative PEs for one parent exclusion and both parents exclusion, respectively (table 4). This study demonstrated that seven markers can be used for parentage testing based on number of alleles, PIC and exclusion test. However, further analysis of all parameters in a larger sample size is required to evaluate the capability of the selected markers in parentage testing.

Conclusion

In this study revealed that the ten out of thirteen multiplexed PCR microsatellite markers which are assigned as b1, b2, b3, b4, b6, b7, b10, b11, b12 and b13, could amplify all 44 Thai Holstein genomic DNA samples. Numbers of alleles in all ten markers are between five and twelve that is useful for parentage test. Nine out of ten markers are highly informative (more than 0.5). For accuracy test at 95% confidence level, seven (b2, b4, b6, b7, b10, b11 and b12) out of ten markers can be used for parentage testing with the highest cumulative PEs at 0.9915 and 0.9997 for the single and both parents exclusions, respectively.

Acknowledgement

Authors would like to thank Associate Prof Varaporn Akkarapatumwong, Institute of Molecular Biology and Genetics (IMBG), Mahidol University, to provide critical reviews of this manuscript and be grateful to Miss Pattama Wiriyasermkul for polymerase chain reaction optimization. We also thanked Associate Prof Monchai Duangjinda, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, for kindly suggestion in statistical analysis.

References

- Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li N, Neibergs HL, Zhang N, Grosse WM, Weiss J, Creighton P, McCarthy F, Ron M, Teale AJ, Fries R, McGraw RA, Moore SS, Georges M, Solter M, Womack JE and Hetzel DJS. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet.* 6:227-235.
- Barker JSF. 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. *In: Proceedings of the 25th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph and Ontario, Canada* 21, 501-508.
- Beckmann JS and Weber JL. 1992. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics.* 12:627-631.
- Bishops MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SLF, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo JY and Beattie CW. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics.* 136:619-639.
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms. *Amer J Hum Genet.* 32:314-331.
- Burt DW, Bumstead N, Bitgood JJ, Ponce De Leon FA and Crittenden LB. 1995. Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. *Trends Genet.* 11:190-194.
- Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, Garmonsway HG, Beattie AE, Davies K, Maddox JF, Kappes SW, Stone RT, Nguyen TC, Penty JM, Lord EA, Broom JE, Buitkamp J, Schewaiger W, Epplen JT, Matthews P, Matthews ME, Hulme DJ, Beh KJ, McGraw RA and Beattie CW. 1995. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics.* 140:703-724.
- Ihara N, Tahasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, Beattie CW, Bennett GL and Sugimoto Y. 2004. A Comprehensive Genomic Map of the Cattle Genome Based on 3802 Microsatellites. *Genome Res.* 14:1987-1998.
- Jamieson A and Taylor StCS. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics.* 28: 397-400.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sonstegard TS, Smith TPL, McGraw RA, LopezCorrales NL and Beattie CW. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7:235-249.
- Metzgar D, Bytof J and Wills C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.* 10:72-80.

Park SDE. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis] University of Dublin for “The Excel Microsatellite Tool Kit”.

[<http://www.animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>]

Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP and Beattie CW. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*. 136:231-245.

Stormont C. 1967. Contribution of blood typing to dairy science progress. *J Dairy Sci*. 50:253-260.

Toth G, Gaspari Z and Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res*. 10:967-981.

Visscher PM, Woolliams JA, Smith D and Williams JL. 2002. Estimation of Pedigree Errors in UK Dairy Population using Microsatellite Marker and the Impact on Selection. *J Dairy Sci*. 85:2368-2375.

Table 1: Thirteen microsatellite markers with known characteristics were selected from Genome database. Each pair of primer was labeled with fluorescent dye to be used in fragment analysis.

Marker name	Locus name	Chromosome	Relative position (cM)	Repeat type	Expected size (bp.)	Expected heterozygosity	Florescent dye
b1	DIK1118	10	7	di-nucleotide	102-118	0.821	Ned
b2	TGLA40	25	12.3	di-nucleotide	103-125	0.750	Fam
b3	DIK023	11	43	di-nucleotide	106-128	0.769	Hex
b4	MS2063	3	116.5	di-nucleotide	151-169	0.643	Ned
b5	DIK1125	9	59	tri-nucleotide	151-174	0.786	Fam
b6	DIK4511	6	44.2	di-nucleotide	152-170	0.679	Hex
b7	DIK2662	24	14.2	di-nucleotide	203-219	0.679	Ned
b8	DIK5156	20	64.3	tri-nucleotide	203-228	0.731	Hex
b9	DIK5411	18	2.8	di-nucleotide	204-218	0.808	Fam
b10	DIK116	16	40.6	di-nucleotide	244-270	0.654	Ned
b11	DIK2733	30	1.6	di-nucleotide	247-255	0.607	Fam
b12	DIK4356	5	77.6	di-nucleotide	248-268	0.786	Hex
b13	DIK4515	30	150.5	di-nucleotide	186-198	0.714	Fam

Table 2: Allele frequencies and observed fragment sizes obtained from ten markers.

b1		b2		b3		b4		b6		b7		b10		b11		b12		b13	
<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>	<i>Allele</i>	<i>Freq.</i>
103	1.14	113	51.14	105	20.45	145	3.41	155	1.14	205	52.27	240	12.50	239	9.09	255	1.14	192	2.27
105	36.36	115	20.45	109	6.82	149	11.36	157	31.82	209	1.14	244	3.41	243	2.27	257	3.41	196	14.77
107	6.82	117	10.23	111	1.14	151	2.27	161	2.27	211	12.50	246	15.91	247	42.05	261	69.32	198	12.50
109	20.45	119	3.41	113	3.41	153	17.05	163	52.27	213	10.23	252	3.41	249	2.27	263	19.32	200	45.45
111	25.00	121	11.36	115	9.09	155	14.77	165	3.41	215	11.36	254	40.91	251	2.27	265	6.82	202	18.18
113	4.55	123	3.41	117	21.59	157	13.64	167	3.41	217	9.09	256	7.95	253	13.64			204	6.82
115	5.68			119	13.64	161	15.91	169	5.68	219	2.27	260	3.41	255	26.14				
				121	3.41	163	21.59			223	1.14	264	5.68	257	2.27				
				123	9.09							266	6.82						
				125	2.27														
				127	4.55														
				129	4.55														
<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>		<i>Observed size</i>	
103-115 bp		113-123 bp		105-129 bp		145-163 bp		155-169 bp		205-223 bp		240-266 bp		239-257 bp		255-265 bp		192-204 bp	

Table 3: PIC analysis in ten markers.

	Marker name									
	b1	b2	b3	b4	b6	b7	b10	b11	b12	b13
<i>Locus name</i>	DIK1118	TGLA40	DIK023	MS2063	DIK4511	DIK2662	DIK116	DIK2733	DIK4356	DIK4515
<i>No. alleles</i>	7	6	12	8	7	8	9	8	5	6
<i>Expected heterozygosity</i>	0.762	0.679	0.875	0.854	0.626	0.687	0.783	0.734	0.482	0.726
<i>Observed heterozygosity</i>	0.705	0.500	0.909	0.864	0.682	0.795	0.841	0.659	0.500	0.636
<i>Polymorphic information content (PIC)</i>	0.716	0.633	0.851	0.824	0.559	0.651	0.752	0.687	0.434	0.683

Table 4: Exclusion probability and cumulative exclusion probability in seven markers.

	Marker name						
	b4	b10	b11	b7	b2	b6	b12
<i>Locus name</i>	MS2063	DIK116	DIK2733	DIK2662	TGLA40	DIK4511	DIK4356
<i>Exclude a parent</i>							
<i>Exclusion probability (PE)</i>	0.6847	0.5958	0.5052	0.4751	0.4481	0.3673	0.2633
<i>Cumulative PE</i>		0.8726	0.9369	0.9669	0.9817	0.9884	0.9915
<i>Exclude both parents</i>							
<i>Exclusion probability (PE)</i>	0.8543	0.7949	0.6970	0.6822	0.6436	0.5423	0.4197
<i>Cumulative PE</i>		0.9701	0.9909	0.9971	0.9990	0.9995	0.9997

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

