



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

**Porcine sperm sexing by using polyclonal antibody bind specifically to Y-sperm
membrane specific antigen**

(การแยกเพศอสุจิโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่ผิวตัวอสุจิวาย)

โดย

อ.ดร.น.สพ.เต็มพงศ์ วงศ์ตะวัน

มิถุนายน 2557

สัญญาเลขที่ MRG5580026

โครงการ

Porcine sperm sexing by using polyclonal antibody bind specifically to Y-sperm membrane
specific antigen

(การแยกเพศอสุจิโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่ผิวตัวอสุจิวาย)

ผู้วิจัย สังกัด

อ.ดร.น.สพ.เต็มพงศ์ วงศ์ตะวัน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และมหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือความกรุณา จากหลายหน่วยงาน และผู้เชี่ยวชาญหลายท่าน โดยงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ จาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยมหิดล

ขอขอบคุณวราภรณ์ ก่อชื่นจิตร และ น.สพ.เชาวพันธ์ ยินหาญมิ่งมงคล ที่เข้ามาช่วยเหลือและร่วมมือในงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบคุณคำแนะนำจาก ศ.สพ.ญ.ยินดี กิตติยานันท์ และ รศ.ดร.น.สพ.กัมพล แก้วเกษ ซึ่งทำหน้าที่เป็นนักวิจัยที่ปรึกษาในโครงการนี้

ตัวอย่างเลือด และตัวอย่างที่ได้นี้ในโครงการนี้มาจาก รศ.ดร.น.สพ.กัมพล แก้วเกษ และขอขอบคุณสถานที่วิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้แก่ ห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อ และขอขอบคุณ รศ.น.สพ.ปานเทพ รัตนากร คณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาจัดหาพื้นที่และเครื่องมือเพื่อจัดตั้งห้องปฏิบัติการเซลล์ทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และการสัตวแพทย์เพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

(รหัสโครงการ) MRG5580026

(ชื่อโครงการ) การแยกเพศอสุจิโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีจับกับแอนติเจนที่ผิวตัวอสุจิชาย

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน อ.ดร.น.สพ.เติมพงศ์ วงศ์ตะวัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: tuempong.wan@mahidol.edu

(ระยะเวลาโครงการ) 2 ปี

โครงการทดลองนี้ประกอบด้วย 3 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์โดยรวมคือ เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ในการแยกเพศตัวอสุจิสุกร และมีวัตถุประสงค์ที่เฉพาะคือ 1) เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจเพศตัวอสุจิที่รวดเร็วและแม่นยำ 2) เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งตัวอสุจิต่อการรอดชีวิตของอสุจิ X และ Y และ 3) เพื่อศึกษาและพัฒนาการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการแยกเพศตัวอสุจิ

วิธีการทดลองจะใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ทำการตรวจเพศอสุจิโดยใช้เทคนิค Real-time PCR แยกตัวอสุจิที่แข็งแรงโดยใช้เทคนิค Sperm swim-up มีการเปรียบเทียบ Cryomedia และ Thawing extender และผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจากกระต่ายเพื่อใช้ในการแยกเพศอสุจิ

ผลการทดลอง ผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคนิคที่เร็วและแม่นยำในการตรวจเพศอสุจิโดยใช้เทคนิค Single sperm real-time PCR ร่วมกับ Melt curve analysis ซึ่งให้ specificity และ sensitivity ที่สูง และพบว่า Cryomedia และ Thawing extender มีผลต่อการรอดชีวิตของตัวอสุจิ X และ Y ทำให้สามารถใช้ในการแยกเพศตัวอสุจิได้ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังสามารถผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ DBY ที่สามารถใช้ในการแยกเพศอสุจิได้ และยังพบว่าซีรัมกระต่ายสามารถใช้ในการแยกเพศอสุจิได้เช่นกัน

ผลการทดลองนี้สรุปว่าผู้วิจัยสามารถแยกเพศอสุจิในห้องทดลองได้ แต่อย่างไรก็ดีจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตว่าเทคนิคนี้สามารถปรับไปใช้และได้ผลในการผสมเทียมสุกรในฟาร์มหรือไม่

คำหลัก : สุกร ตรวจเพศอสุจิ แยกเพศอสุจิ โ

Abstract

Project Code: MRG5580026

Project Title: Porcine sperm sexing by using polyclonal antibody bind specifically to Y-sperm membrane specific antigen

Investigator: Dr.Tuempong Wongtawan, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University.

E-mail Address: tuempong.wan@mahidol.edu

Project Period: 2 years

This research project contains 3 main experiments; the overall objective was to develop novel technique for separation porcine X and Y sperm. The specific objective were; 1) to develop new fast and effective technique to identify sex of sperm 2) to investigate effect of cryopreservation to survival of X and Y sperm and 3) to develop technique using polyclonal antibody to separate porcine X and Y sperm.

Fresh and frozen-thawed semen were used. Real-time PCR technique was used to identify sex of sperm. Sperm swim-up technique was performed to select strongly survived sperm. Cryomedia and thawing extenders were compared to investigate whether they had effect on X and Y sperm. Rabbit polyclonal antibody against DBY antigen was used to investigate the ability to separate X and Y sperm.

The results revealed that we could develop novel fast and effective technique to identify sex of sperm by using single sperm real-time PCR together with melt curve analysis which gave high specificity and sensitivity. We found that cryomedia and thawing extender affected survival of X and Y sperm and could be used to separate X and Y sperm. We were also able to produce rabbit serum contain polyclonal antibody against DBY antigen, and it was able to separate X and Y sperm inn vitro. Surprisingly rabbit serum without antibody against DBY antigen also could be used to separate X and Y sperm in vitro.

In summary, we could separate porcine X and Y sperm using cryopreservation, polyclonal antibody and rabbit serum in vitro. However, these techniques will need to be tested and optimized to use with in vitro fertilization or conventional artificial insemination, and to investigate whether these techniques will work in vivo and field study.

Keywords : Pig Sperm Sexing

เนื้อหาทบทวนวิจัย

บทนำ

การพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับแยกเพศตัวอสุจินั้นมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์มากเช่น ในสุกร สุกรเพศเมียมักมีราคาสูงกว่าตัวผู้ ความสามารถในการการควบคุมจำนวนเพศของสุกรเกิดใหม่นั้นจะช่วยให้การ บริหารจัดการฟาร์มมีประสิทธิภาพขึ้นในแง่ของเศรษฐศาสตร์ ปัจจุบันนี้เทคโนโลยีสำหรับแยกเพศตัวอสุจิที่ ได้ผลที่ดีที่สุดก็คือการใช้เครื่อง high-speed flow cytometry (Johnson et al., 1989) ซึ่งสามารถแยกเพศได้ ถูกต้องมากกว่า 90% ในสัตว์หลายๆชนิด (Seidel, 2009) เทคโนโลยีนี้ใช้หลักการความแตกต่างของปริมาณ ดี เอ็นเอ (DNA) ระหว่างอสุจเพศผู้ (Y Sperm) และเพศเมีย (X Sperm) อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีสำหรับแยกเพศตัว อสุจิโดย high-speed flow cytometry นั้นยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น สามารถแยกเพศตัวอสุจิได้ครั้งละ 12– 20 ล้านตัว ต่อ ชม หรือ จะได้ตัวอสุจิลบมาทั้งหมดประมาณ 10% หลังจากเข้าเครื่อง (Johnson and Welch, 1999; Rath et al., 2009). ซึ่งตัวอสุจิที่แยกได้เท่านี้จะเหมาะสมสำหรับใช้ในวัว (2 ล้านตัว ต่อการผสมเทียม หนึ่งครั้ง) แต่ไม่เหมาะสมสำหรับในสุกร เพราะปริมาณตัวอสุจิที่ใช้ในการผสมสุกรครั้งหนึ่งใช้มากถึง 50-100 ล้านตัว (Vazquez et al., 2009) ถึงแม้ว่าจะแก้ปัญหาปริมาณตัวอสุจิโดยใช้ laparoscopy ($0.3-1-10 \times 10^6$ sperm) แต่มันเป็นเทคนิคที่ไม่เหมาะในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม (Vazquez et al., 2008) และเมื่อนำตัวอสุจิที่ผ่าน การแยกเพศนำมาแช่แข็ง (sex-sorted frozen sperm) ก่อนนำไปผสมเทียมพบว่าทำให้ตัวอสุจิอ่อนแอเกินไป และไม่เกิดการตั้งท้องจนครบเวลาลด (Bathgate et al. 2008) นอกจากนี้ตัวอ่อนที่ได้จาก IVF ของ sex-sorted frozen sperm และนำไปย้ายฝากก็ไม่ตั้งท้องเช่นกัน (Bathgate et al., 2007) เมื่อพิจารณาแล้วจะเห็นได้ ว่าการแยกเพศด้วย high-speed flow cytometry ยังไม่เหมาะสมกับอุตสาหกรรมสุกรในปัจจุบัน และจำเป็นต้อง พัฒนาเทคนิคอื่นๆมาใช้

อีกเทคโนโลยีหนึ่งที่พยายามผลิตกันก็คือ การแยกเพศตัวอสุจิด้วย antibody ที่จำเพาะต่อ male surface antigen ที่ sperm membrane สำหรับ Male specific antigen นั้นอาจเรียกว่า H-Y antigen ซึ่งเป็นตระกูลของโปรตีนที่พบมากในเซลล์ตัวผู้ และไม่จำเป็นต้องเป็นยีนส์ที่อยู่ใน Y chromosome เท่านั้น (Ellis et al., 2011) ในปัจจุบัน male specific antigens ที่พบมีหลายตัวได้แก่ male enhanced antigens 1 (MEA 1) และ 2 (MEA 2), sex determining region Y (SRY) (Utsumi and Iritani, 1993) และ DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked (DBY) (Vogt et al., 2002)

ในช่วงแรกๆได้มีความพยายามในการผลิต Monoclonal antibodies ต่อ SRY (Utsumi and Iritani, 1993) แต่ก็ไม่ได้นำไปใช้ต่อ หลังจากนั้นก็มีการผลิต polyclonal antibody ต่อ H-Y antigen โดยใช้ whole male cells or cell lysates เป็นตัวกระตุ้น (Hendriksen et al., 1993; Hendriksen et al.,

1996; Veerhuis et al., 1994) แต่ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จในการแยกเพศ (Horng and Huang, 2003; Hendriksen et al., 1993; Hendriksen et al., 1996; Veerhuis et al., 1994).

เมื่อไม่กี่ปีมานี้ Mahammadi et al. (2011) พบยีนส์ที่อาจใช้ในการแยกเพศตัวสุจิได้ และได้ออกแบบ peptide สำหรับทำ rabbit-based polyclonal antiserum และ antibody ที่ได้ดูเหมือนจะจำเพาะกับตัวสุจิเพศผู้ ข้อดีของการใช้ polyclonal antibody คือมันจะถูกกว่า monoclonal antibody และจะสามารถผลิตได้เยอะหากผลิตในสัตว์ขนาดใหญ่ แต่ การผลิตแต่ละครั้งอาจมีความแตกต่างกันบ้าง

ดังนั้นในการทดลองนี้เรามีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนา polyclonal antibody specific for porcine Y-spermatozoa ในกระต่ายเพื่อนำไปใช้ในการแยกเพศตัวสุจิสุกร โดยผู้วิจัยหวังว่าการทดลองนี้จะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทย

ในโครงการวิจัยนี้มีการทดลอง 3 การทดลอง คือ

- 1.การพัฒนาเทคนิคการแยกเพศตัวสุจิที่รวดเร็วและแม่นยำ
- 2.การแยกเพศตัวสุจิหลังการแช่แข็ง
- 3.การแยกเพศตัวสุจิด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดี

การทดลองที่ 1 การพัฒนาเทคนิคการแยกเพศตัวอสุจิที่รวดเร็วและแม่นยำ

1.1 จุดประสงค์การทดลองที่ 1

- เพื่อพัฒนาเทคนิคการแยกเพศอสุจิที่รวดเร็วกว่าเทคนิค FISH และ แม่นยำกว่าเทคนิค whole semen PCR

1.2 วิธีการทดลอง

1.2.1 สัตว์ทดลอง และตัวอย่าง

ในการทดลองนี้ใช้ สุกรอายุ 1-3 ปี จากฟาร์มเกษตรกร ในจังหวัดนครปฐม เก็บตัวอย่างเลือดจากสุกรสายพันธุ์ผสม (Landrace x Large white) ตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 5 ตัว

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากสุกรสายพันธุ์ Duroc 3 ตัว โดยใช้ 3 หลอด ต่อ สุกรหนึ่งตัว (รวมทั้งหมด 9 หลอด) ใช้วิธีแช่แข็งแบบที่เคยตีพิมพ์มาแล้ว (Wongtawan et al., 2006, Kaeoket et al., 2012). การทดลองนี้ผ่านการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการสัตว์ทดลองของ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (FVS-ACUC)

1.2.2 การย่อยตัวอย่างเลือด อสุจิ และการทำ conventional PCR

สกัดดีเอ็นเอ จากเลือดและตัวอสุจิ (หลายเซลล์) โดยใช้ Azupure DNA purification kit (BIOTEC, Pathum Thani, Thailand) ใช้ 2x Taq Master Mix (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) (Cat.no.PLMM01) เพื่อทำ Conventional PCR และใช้เครื่อง PTC-200 Thermal cycle (MJ Research, Quebec, Canada) เพื่อทำ PCR

PCR reaction ประกอบด้วย 25 μ L Master Mix, 1 μ L forward primer (10 μ M), 1 μ L (10 μ M) reverse primer, 2 μ L ดีเอ็นเอของตัวอย่าง และ 25 μ L of DEPC water โปรแกรม PCR ที่ใช้คือ pre-denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 2 นาที, denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 2 วินาที, annealing ที่ 60°C เป็นเวลา 30 วินาที, extension ที่ 72°C เป็นเวลา 15 วินาที โดยทำทั้งหมด cycles และ final extension ที่ 71°C เป็นเวลา 7 นาที

ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง PCR products ที่ได้นำไป load ใน 2% agarose gel เพื่อทำ electrophoresis หลังจากนั้นย้อมสีดีเอ็นเอ ด้วย Gel Red dye (Biotium, California, USA) และส่องดู PCR ด้วย UV light ที่เครื่อง Gel Doc Sysem (Bio-Rad, California, USA).

1.2.3 PCR Primers

สังเคราะห์มาจาก Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) โดย primer sequences นั้นเคยถูกออกแบบและใช้มาแล้ว (Rubes et al., 1999, Parrilla et al., 2003, Choi et al., 2009, Mohammadi et al., 2011)

Chromosome 1, product size คือ 244 bp.

- Forward primer: 5' GTTGCACTTTCACGGACGCAGC 3'
- Reverse primer: 5' CTAGCCCATTGCTCGCCATAGC 3'

Chromosome Y, product size คือ 377 bp

- Forward primer: 5' AATCCACCATACCTCATGGACC 3'
- Reverse primer: 5' TTTCTCCTGTATCCTCCTGC 3'

1.2.4 การเตรียม และย่อย Single cell

Single sperm cells และ single white blood cells ถูกเก็บโดยใช้ mouth pipette แรกเริ่มต้องเตรียมโดยละลายตัวอย่างให้เจือจางใน 0.1% Poly vinyl alcohol (PVA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ใน Phosphate buffer saline (PBS)(PAA, GE Health Care, Velizy-Villacoublay, France) ที่ความเข้มข้น 1,500 cell/mL หลังจากนั้น 5 ml ของสารละลายที่มีเซลล์อยู่จะถูกเทลงใน 10 cm petri dish (Sterilin, Newport, U.K.) และส่องด้วยกล้อง inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) ในกำลังขยาย 400x magnification เพื่อจับตัวอสุจิด้วย mouth pipette หลังจากนั้นนำตัวอสุจิที่จับได้ใส่ลงไปใน 200 μ L PCR (Axygen®, Corning, CA, USA) (ปริมาตรของของเหลวที่ใส่ลงไปจะมีประมาณ 1 μ L)

The single cell จะถูกย่อยใน 5 μ L of lysis buffer (ประกอบไปด้วย 200mM KOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) และ 50mM DTT (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia)) และ incubated ที่ 65 °C เป็นเวลา 10 min หลังจากนั้น หยด 5 μ L ของ neutralising buffer ลงไปในหลอด

ทดลอง (ประกอบไปด้วย 900mM Tris-Cl, pH8.3 (Promega, Madison, WI, USA), 300mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), และ 200mM HCl (Merck Millipore, Billerica, MA, USA))

1.2.5 Single cell SYBR® green real-time PCR

ใช้ KAPA SYBR®Fast qPCR Master Mix (2x) Universal (KAPA Biosystem, Woburn, MA USA) (Cat.no.KK4600) โดย PCR reaction ประกอบไปด้วย 12.5 µL Master Mix, 0.4 µL forward primer (10 µM) and 0.4 µL (10 µM) reverse primer และน้ำ 0.7 µL

โปรแกรม Real-time PCR reaction ประกอบไปด้วย ขั้นที่ 1, Pre-denaturation (95 °C 1 นาที); ขั้นที่ 2, cycling, 95 °C 5 วินาที (denaturation), 58 °C 20 วินาที (annealing), ทำ 35 cycles; ขั้นที่ 3, final extension, 72 °C 3 นาที; ขั้นที่ 4, post PCR Melt setting, อุณหภูมิจะสูงขึ้นจาก 72 °C เป็น 99 °C โดยเพิ่มขึ้นทีละ 1 °C และจะหยุดทุก 15 วินาที เมื่ออุณหภูมิขึ้น 1 องศา ครั้งแรก หลังจากนั้นหยุดทุก 4 วินาที ในทุกๆ 1 องศาที่ขึ้น

PCR platform ที่ใช้คือ Rotor gene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany) วิเคราะห์ผล PCR และ and melt curve analysis โดยใช้ Rotor gene software 6.1 (Qiagen, Hilden, Germany) แต่ละตัวอย่างทำการตรวจ 3 ครั้ง พร้อมกัน

1.2.6 ความไว (Sensitivity) และ ความจำเพาะ (Specificity) ของเทคนิค

ความไว เป็นความสามารถของเทคนิคที่ใช้ว่าสามารถตรวจเจอตัวอย่างที่ positive ได้เท่าไร ในขณะที่ ความจำเพาะ เป็นความสามารถของเทคนิคที่ใช้ว่าสามารถตรวจเจอตัวอย่างที่ negative ได้เท่าไร โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

ความไว = จำนวนตัวอย่างที่ตรวจเป็น positive / จำนวนตัวอย่างที่เป็น positive ทั้งหมด

ความจำเพาะ = จำนวนตัวอย่างที่ตรวจเจอว่า negative / จำนวนตัวอย่างที่เป็น negative ทั้งหมด

ความล้มเหลวของการตรวจ (Failure of PCR reaction) = จำนวนตัวอย่างที่ตรวจเจอว่า negative PCR / จำนวนตัวอย่างที่เป็น positive control ทั้งหมด

โดยมีเงื่อนไขว่า

- Fluorescence signal ของ PCR positive products ของทั้ง chromosome 1 และ chromosome Y จะต้องขึ้นก่อน 25 cycles

- Positive melt peak of chromosome 1 จะต้องอยู่ประมาณ 88-90 °C
- Positive threshold ($-dF/dT$ unit) ของ melt peak ของ chromosome 1 จะต้องสูงกว่า 0.4 unit
- Positive melt peak ของ chromosome Y จะอยู่ระหว่าง 85-87 °C
- Positive threshold ($-dF/dT$ unit) ของ melt peak ของ chromosome Y จะต้องสูงกว่า 1 unit

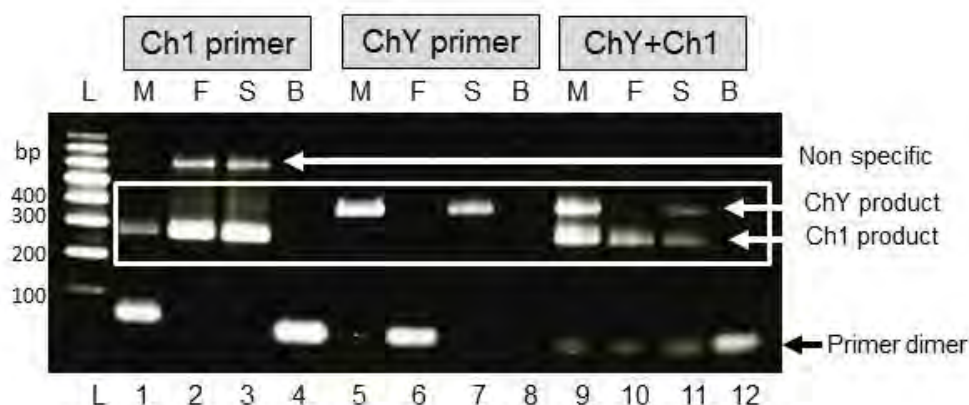
1.3 ผลการทดลอง

1.3.1 Validation ของ primer โดย conventional PCR

ใช้ ดีเอ็นเอ จากเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อทำการ validate PCR primers ผลการทดลองพบว่า primer ที่ใช้มีความจำเพาะต่อ chromosome 1 (รูปที่ 1, แถวที่ 1) หรือ chromosome Y (รูปที่ 1, แถวที่ 2) product ของ chromosome 1 จะเจอทั้งตัวอย่างของตัวผู้และเมีย ในขณะที่ product ของ chromosome Y จะเจอแค่ตัวอย่างของตัวผู้ (รูปที่ 1, แถวที่ 5-6)

นอกจากนี้ยังใช้ primers ในการตรวจปริมาณตัวสุจิจากน้ำเชื้อ (whole semen samples) ซึ่งจะมีทั้ง X และ Y Sperm ผลการตรวจพบ bands ที่จำเพาะต่อ chromosome 1 และ chromosome Y (รูปที่ 1, แถวที่ 3 และ 7)

แต่เมื่อใช้ Conventional PCR เพื่อทำการตรวจ single cell ผลการทดลองกลับตรวจไม่พบเลย ทางทีมวิจัยเลยลองเปลี่ยนวิธีการตรวจไปใช้ Taq polymerases ตัวอื่นๆ ซึ่งสุดท้ายก็พบว่า KAPA SYBR[®] DNA polymerase สามารถตรวจพบ chromosome 1 และ chromosome Y ในระดับ single cell

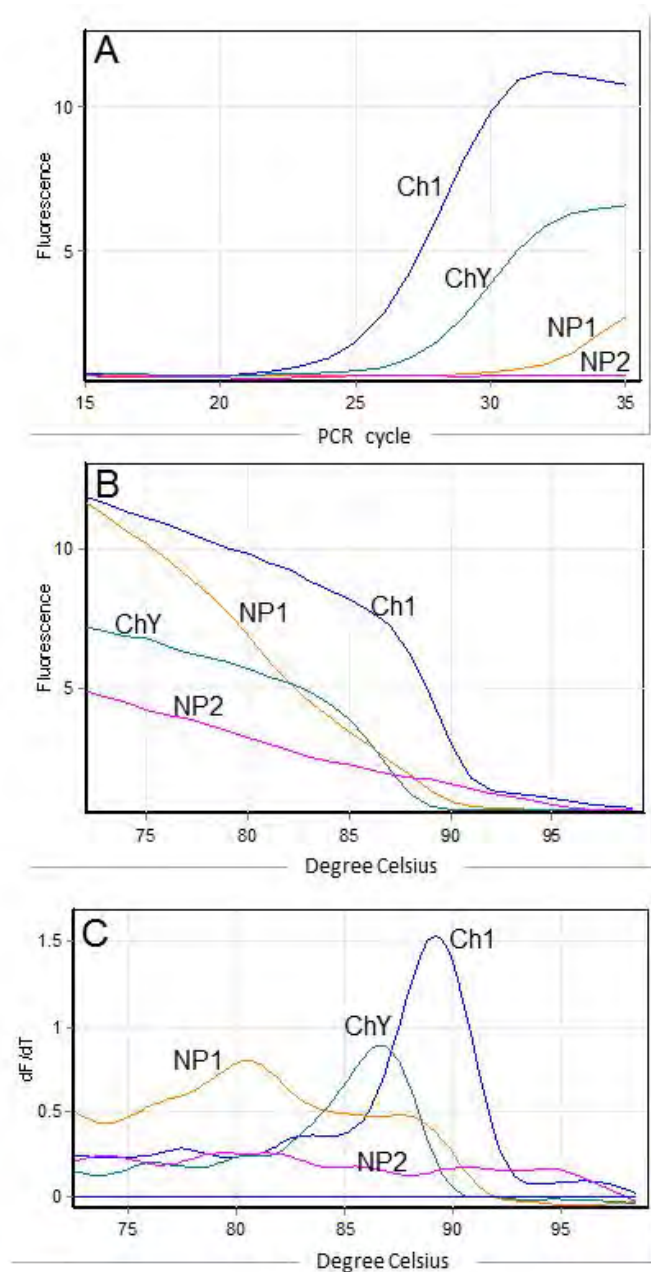


รูปที่ 1 Conventional PCR เพื่อตรวจ chromosome 1 (Ch1) และ chromosome Y (ChY). L = DNA Ladder, M=male white blood cell samples, F=female white blood cell samples, S=semen samples และ B=blank. แถวที่ 1-4, chromosome 1 detection. แถวที่ 5-8, chromosome Y detection. แถวที่ 9-12, both chromosome 1 และ Y detection (duplex PCR).

1.3.2 การตรวจเพศเซลล์โดยใช้ เทคนิค real-time PCR และ melt curve analysis

ใช้ ดีเอ็นเอ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากสุรตัวผู้ และตัวเมียในการทดลอง เพื่อหาลักษณะของ fluorescence pattern ของ PCR products จากการทำ real-time PCR และ ภายหลัง PCR melt ผลการทดลองแสดงลักษณะเฉพาะของ PCR product, nonspecific products (รูปที่ 2A) และ post PCR melt (รูปที่ 2B)

ภายหลังจากการคำนวณด้วยโปรแกรม melt curve analysis ลักษณะกราฟของ melt peak จะแสดงค่าเป็น negative derivative ($-dF/dT$) (รูปที่ 2C) melt peak นั่นคือ melting temperature ของ ดีเอ็นเอ ที่ทำให้เกิดการลดลงของสี fluorescence ณ จุดนั้น double stranded DNA จะแยกออกจากกัน ประมาณ 50% (Ririe et al., 1997) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า melt peak ของ chromosome Y อยู่ที่อุณหภูมิระหว่าง 85-87 °C ขณะที่ melt peak ของ chromosome 1 อยู่ระหว่าง 88- 90 °C (รูปที่ 2C) สำหรับ nonspecific products นั้นส่วนใหญ่จะเป็น primer dimer, (Brownie et al., 1997) ซึ่งจะมี melt peak ต่ำกว่า 80 °C (รูปที่ 2C) ซึ่งทำให้เราสามารถแยกมันออกจาก PCR product ได้จากลักษณะของกราฟสี fluorescence (รูปที่ 2A) และ post PCR melt curve (รูปที่ 2B) นอกจากนี้ fluorescence signal ของ primer dimer มักขึ้นหลังจากผ่าน 30 PCR cycles ไปแล้ว และ exponential curve มักจะขึ้นไม่ขึ้น (รูปที่ 2A).



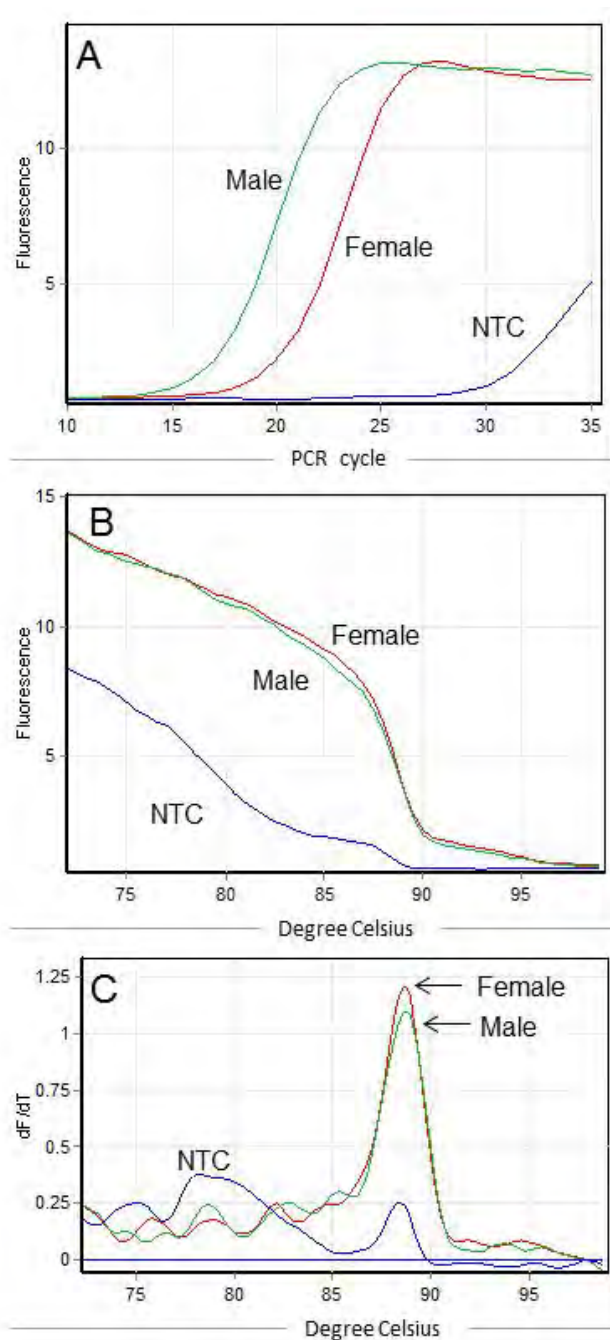
รูปที่ 2 ลักษณะเฉพาะของ chromosome 1 (Ch1) และ chromosome Y (ChY) ภายหลังจากการทำ SYBR® green simplex real-time PCR และ melt curve analysis ตัวอย่างที่ใช้คือเลือดของสุกรตัวผู้ และ no template control (NTC) รูป(A) Fluorescence pattern ของ PCR product ในระหว่างการทำ PCR รูป(B) Fluorescence pattern ของ PCR product ระหว่างการทำ PCR product melt รูป(C) เป็นกราฟของ melt curve analysis ซึ่งจะบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละกราฟ NS1 และ NS2 หมายถึง nonspecific PCR products หรือ primer dimer จาก NTC โดยที่ NP1 คือ ตัวอย่างที่มี nonspecific products จำนวนมาก ในขณะที่ NP2 คือ ตัวอย่างที่มี nonspecific products ในปริมาณน้อย

1.3.3 การทำ Duplex PCR

ข้อดีของการทำ duplex PCR คือ มันสามารถตรวจ chromosome 1 และ chromosome Y ได้พร้อมกันในหนึ่งตัวอย่าง สำหรับการทำให้ duplex PCR นั้นจะต้องเติม primer ทั้ง chromosome 1 และ chromosome Y ลงพร้อมกัน

ในการทดลองนี้เราใช้ เม็ดเลือดขาวของทั้งตัวผู้และตัวเมียเป็นตัวอย่าง เมื่อใช้ conventional PCR และ electrophoresis ในการตรวจ พบว่า duplex conventional PCR สามารถแยกเพศตัวอย่างได้ โดยตัวอย่างจากตัวผู้จะแสดงเป็น 2 DNA band ซึ่งเป็น band ของ chromosome 1 และ chromosome Y ในขณะที่ ตัวอย่างที่มาจากตัวเมียจะมี แค่ 1 DNA band ซึ่งเป็น chromosome 1 (รูปที่ 1, แถวที่ 9-12).

เมื่อทำ SYBR[®] green real-time duplex PCR พบว่า florescence pattern ของ PCR จะมีลักษณะของ chromosome 1 และ chromosome Y ที่แตกต่างกันในช่วงทำ PCR (รูปที่ 3A) แต่ไม่สามารถแยกได้ว่าตัวอย่างเป็นตัวผู้หรือตัวเมียหลังจากทำ post PCR melt (รูปที่ 3B) นอกจากนี้ melt peaks ยังมีลักษณะคล้ายกันด้วยคือ อยู่ที่ 88-89°C ซึ่งเป็นตำแหน่งของ chromosome 1 peak (รูปที่ 3C) ดังนั้นการทำ SYBR[®] green real-time duplex PCR และ melt curve analysis ไม่สามารถแยกตัวอย่างตัวผู้กับตัวเมียออกจากกันได้



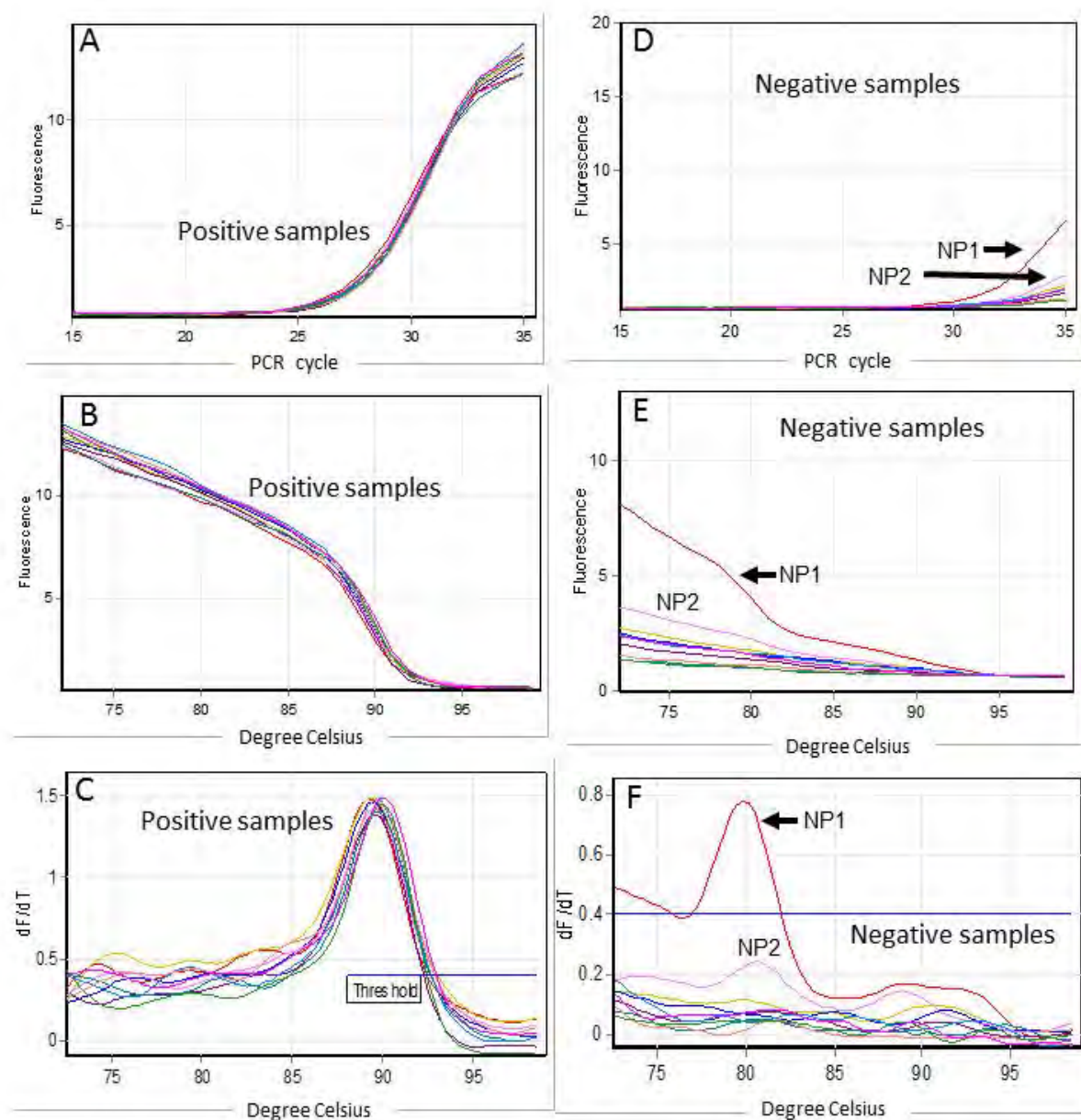
รูปที่ 3 ลักษณะเฉพาะของ Fluorescence ของ PCR product produced โดยการทำให้ SYBR® green duplex real-time PCR และ melt curve analysis ตัวอย่างที่ใช้คือเซลล์เม็ดเลือดขาวจากสุกรตัวผู้ ตัวเมีย และ no template control (NTC) รูป(A) Fluorescence pattern ของ PCR product ระหว่างการทำ PCR รูป(B) Fluorescence pattern ของ PCR product ระหว่าง PCR product melt รูป(C) Melt curve analysis ของ real-time duplex PCR แสดงให้เห็นว่า melt peak ของตัวอย่างตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะคล้ายกัน

1.3.4 Method sensitivity และ specificity ของ single cell PCR

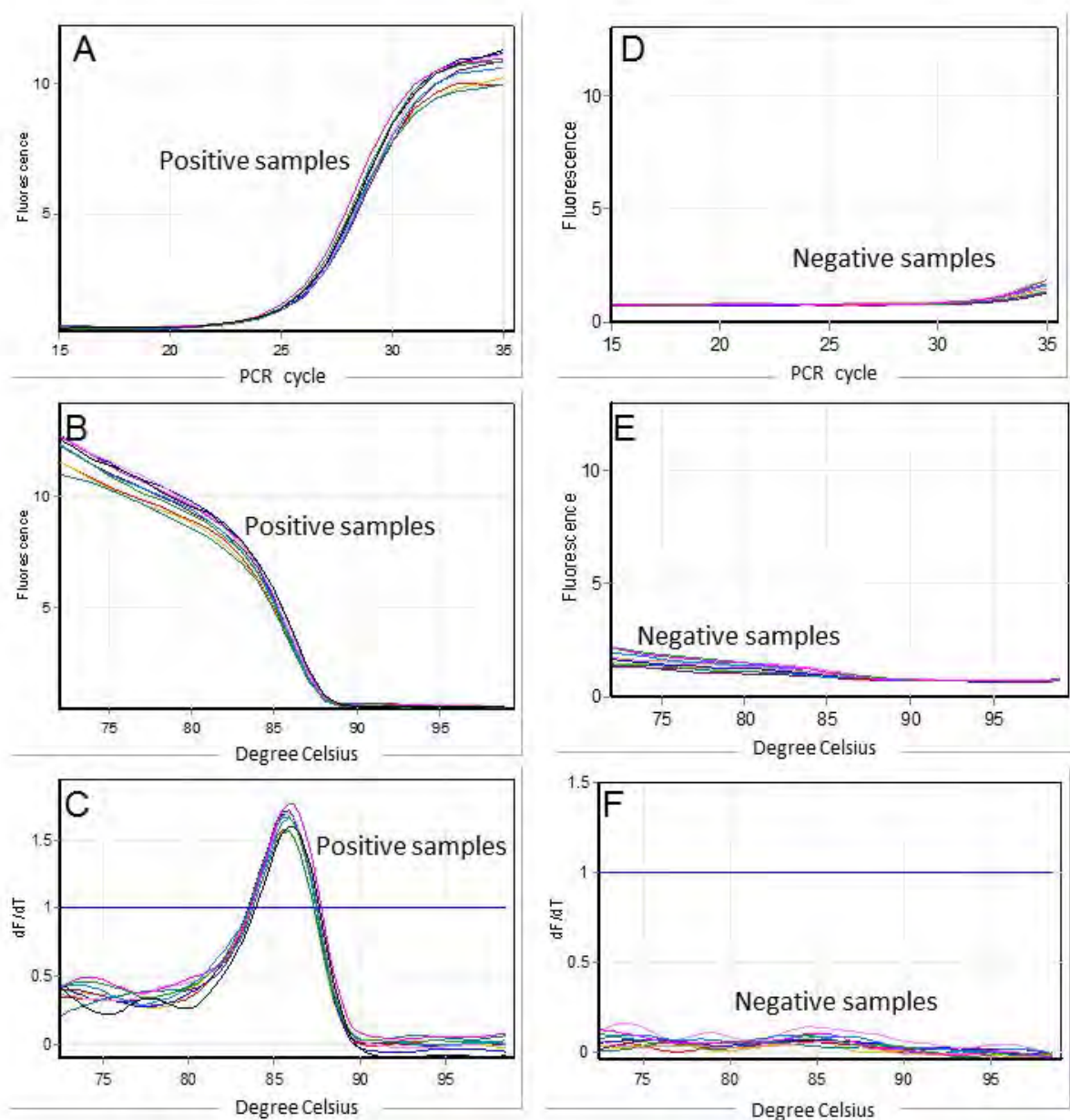
ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหา sensitivity และ specificity ของเทคนิค เพื่อตรวจหา chromosome 1 และ chromosome Y ในระดับ single cell ผลการทดลองถูกแสดงใน รูปที่ 4 (chromosome 1) และ รูปที่ 5 (chromosome Y) โดยใช้ตัวอย่างเม็ดเลือดขาวจำนวน 200 เซลล์

ผลการทดลองพบว่า สำหรับ chromosome 1 ในตัวอย่างที่ positive ตรวจพบ 198 เซลล์ และ ตรวจไม่พบ 2 เซลล์ ส่วนตัวอย่าง negative ตรวจไม่พบอะไรเลย ดังนั้น สำหรับ chromosome 1. Sensitivity เท่ากับ 99% และ specificity เท่ากับ 100%.

สำหรับ chromosome Y ตัวอย่างที่ positive ตรวจเจอ 196 เซลล์ ตรวจไม่เจอ 4 เซลล์ ส่วน ตัวอย่างที่ negative ตรวจไม่เจอทุกตัวอย่าง ดังนั้น sensitivity จึงเท่ากับ 97.5% และ specificity เท่ากับ 100%.



รูปที่ 4 Sensitivity และ specificity ของ SYBR® green real-time PCR และ melt curve analysis สำหรับการตรวจหา chromosome 1 รูป(A-C) Positive samples รูป(D-F) Negative samples รูป(A and D) PCR fluorescence pattern ระหว่าง PCR reaction โดย PCR products จะขึ้นก่อน 25 cycles ขณะที่ nonspecific product (NP) จะขึ้นหลังจาก 30 cycles รูป(B and E) post PCR melt fluorescence pattern รูป(C and F) melt curve analysis โดย melt peak ของ PCR products จะอยู่ช่วง 88-90 °C และ threshold ของ df/dt unit ของ melt curve เท่ากับ 0.4 สำหรับ melt peak ของ primer dimer อยู่ต่ำกว่า 80 °C NP1 คือตัวอย่างที่มี nonspecific products ในปริมาณสูง ในขณะที่ NP2 เป็นตัวอย่างที่มี nonspecific products น้อย

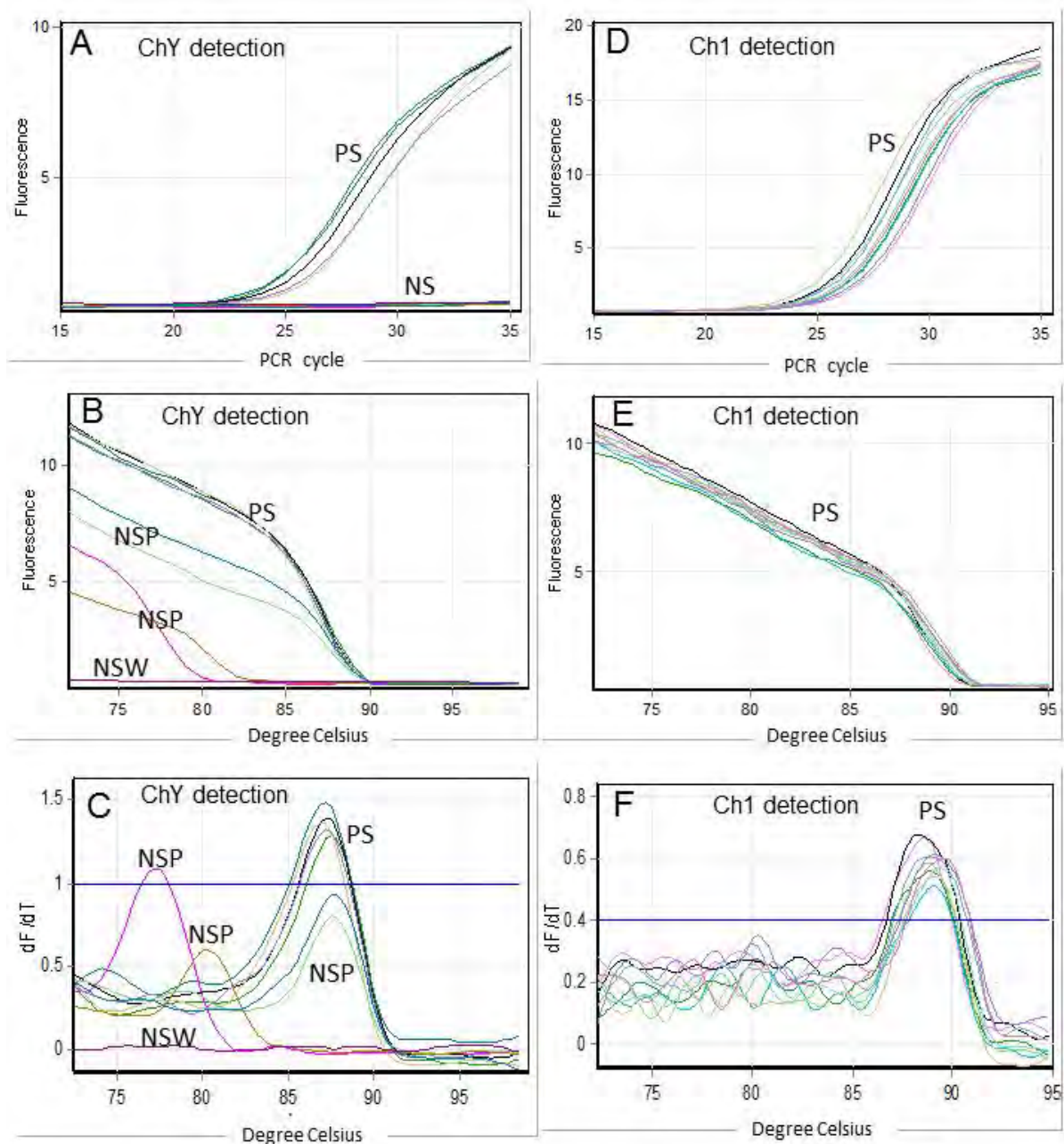


รูปที่ 5 Sensitivity และ specificity ของ SYBR® green real time PCR ของ การตรวจ chromosome Y รูป(A-C) Positive samples รูป(D-F) Negative samples รูป(A and D) PCR fluorescence pattern ระหว่าง PCR reaction โดย PCR product จะขึ้นก่อน 25 cycles ในขณะที่ nonspecific product จะขึ้นหลังจาก 30 cycles B and E คือ post PCR melt fluorescence pattern C และ F คือ melt curve analysis โดย melt peak ของ PCR products จะอยู่ระหว่าง 85-87 °C และ threshold ของ df/dt unit of melt มีค่าเท่ากับ 1

1.3.5 Single sperm real-time PCR เพื่อตรวจเพศอสุจิ

ในทางทฤษฎีแล้ว สัดส่วนของ X และ Y sperm ในน้ำเชื้อจะอยู่ที่ประมาณ 50:50 เพื่อเป็นการทดสอบความแม่นยำเราจึงนำ single sperm จำนวน 400 ตัวมาตรวจ โดยที่ 200 ตัว ตรวจ chromosome 1 และอีก 200 ตัว ตรวจ Y chromosome

ผลการทดลองพบ ตัวอสุจิ 190 ตัว positive ต่อ chromosome 1 ซึ่งแสดงว่า sensitivity ของเทคนิคนี้คือ 95% (รูปที่ 6) สำหรับ sex ratio นั้นอยู่ที่ 52% สำหรับ Y sperm (n=104) ส่วน ตัวอย่างที่เป็น negative ก็ถือว่าเป็น X sperm ซึ่งตรวจเจอ 48% (n=96) ซึ่งค่าที่ตรวจได้นั้นมีค่าใกล้เคียงกับทฤษฎี ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจเพศตัวอสุจิ สำหรับ fluorescence pattern และ melt curve analysis ถูกแสดงที่รูปที่ 6.



รูปที่ 6 Sex identification ของน้ำเชื้อ โดยใช้ semen samples โดยใช้ single sperm SYBR® green real-time PCR รูป(A-C) Chromosome Y detection รูป(D-F) Chromosome 1 detection PS คือ positive sample (Sperm Y) NS คือ negative samples (Sperm X) NSP คือ negative sample ที่มี nonspecific products (Sperm X) NSW คือ negative sample ที่ไม่มี nonspecific products (Sperm X).

1.4 การวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิค SYBR® green real-time PCR ร่วมกับ melt curve analysis เป็นเทคนิคที่รวดเร็ว และแม่นยำ สามารถใช้ในการตรวจเพศในระดับ single cell ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งเม็ดเลือดขาว และตัวอสุจิ เทคนิคนี้มี sensitivity specificity สูง แต่มีค่าการล้มเหลวของการตรวจ (failure percentage) ต่ำ ซึ่งประมาณ 3% ต่ำกว่า เทคนิคที่เคยมีรายงานมาแล้ว เช่น conventional single bovine sperm PCR (10%) (Wang et al, 2011) และใกล้เคียงกับเทคนิค FISH (2%) (Parilla et al, 2003).

ปัญหาหนึ่งของการทำ single sperm PCR ที่ผ่านมาก็คือ การทำ PCR ค่อนข้างยาก และประสบความสำเร็จต่ำ ในบางรายงานต้องทำ PCR หลายรอบ (Li et al., 1990, Lien et al., 2002) แต่เทคนิคที่เราใช้ในการทดลองนี้การทำ PCR รอบเดียวก็เพียงพอแล้ว

สำหรับการเก็บ single cell sample นั้นสามารถเก็บได้โดยวิธี manual หรือ automated เช่น การใช้เครื่อง flow cytometer ในบางการทดลองเก็บตัวอย่างจาก โดยการใส่ single sperm เข้าไปใน agarose gel (Lien et al., 2002, Wang et al., 2011) แต่ผู้วิจัยพบว่าการสกัด ดีเอ็นเอ จาก ตัวอย่างที่สด จะดีกว่าตัวอย่างที่ผ่าน agarose gel (unpublished observation) มาแล้ว ในการทดลองนี้ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ mouth pipette ซึ่งหากผ่านการฝึกฝนแล้วก็สามารถทำการเก็บตัวอย่างได้ 10-20 ตัวอย่าง ต่อหน้าที่

สำหรับข้อเสียของการทำ SYBR® green PCR นั้นคือมันจะสามารถตรวจได้แค่ 1 อย่าง ในแต่ละครั้ง ทำให้ใช้ตัวอย่างเยอะหากเราต้องตรวจหา หลายอย่าง วิธีปรับปรุงก็คือ อาจจะใช้ เทคนิค fluorescent primer probes เข้ามาช่วย โดยเทคนิค Duplex real-time PCR ซึ่งใช้สี fluorescent สองสี ได้นำมาใช้แล้วในการตรวจเพศเนื้อสุกร (Abdulmawjood et al., 2012) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียางานการใช้ว่าจะสามารถใช้ในการตรวจในระดับ single cell หรือไม่ นอกจากนี้การใช้ fluorescent primer probes จะมีราคาค่อนข้างสูงกว่า การใช้สี SYBR® green ด้วย

นอกจากนี้ประสิทธิภาพของ PCR reaction ของการทดลองจะยังสามารถปรับปรุงเพิ่มเติมโดยการปรับ PCR condition เช่น ความเข้มข้นของ MgCl₂ และ primer concentration เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase ก็เป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้การตรวจประสบความสำเร็จ โดยผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการทำ single cell PCR ด้วย Taq DNA polymerases ที่ขายกันอยู่ 3 ชนิด พบว่า แค่ KAPA Taq DNA polymerase เท่านั้นที่ใช้ในการตรวจเพศแบบ single cell ได้ (unpublished data) ในการทดลองในครั้งนี้ ส่วนใหญ่ผู้วิจัยทำ PCR เป็นจำนวน for 35 cycles แต่ผู้วิจัยพบว่าสามารถปรับลด cycle ลงเหลือ 30

ได้ และยังสามารถปรับค่าต่างๆของ PCR program จนสามารถลดเวลาการทำ PCR และ Melt curve ลงได้เหลือไม่ถึง 50 นาที

การทดลองนี้สรุปว่า นี่เป็นรายงานแรกสำหรับการใช้ single sperm SYBR® green real-time PCR technique ร่วมกับ melt curve เพื่อตรวจเพศสุจิ โดยเทคนิคนี้ตรวจเพศได้ไว มีประสิทธิภาพสูง และมีความแม่นยำสูง และควรจะมีการปรับปรุงประสิทธิภาพให้สูงขึ้นเพื่อสามารถนำไปใช้ในหลายๆช่องทาง และสัตว์หลายชนิด เพื่องานวิจัย และการวินิจฉัย

การทดลองที่ 2.การแยกเพศตัวอสุจิหลังการแช่แข็ง

2.1 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

- เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งตัวอสุจิหลังการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของอสุจิ X และ Y
- เพื่อศึกษาผลของสูตรน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็ง (cryomedia) ตัวอสุจิหลังการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของอสุจิ X และ Y
- เพื่อศึกษาผลของน้ำยาละลายน้ำเชื้อ (thawing extender) ต่อการแช่แข็งตัวอสุจิหลังการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของอสุจิ X และ Y

2.2วิธีการทดลอง

2.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรสายพันธุ์ Duroc (อายุ 1-3 ปี) สำหรับเก็บน้ำเชื้อ ทำการตรวจน้ำเชื้อ และเลือกน้ำเชื้อที่มีคุณภาพสูง โดยใช้หลักการดังนี้ น้ำเชื้อมี sperm motility > 70% และ normal morphology $\geq$ 80% จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เลือกไว้ไปแช่แข็ง ใช้น้ำเชื้อ 3 straws จากน้ำเชื้อแช่แข็งหมูแต่ละตัวในการทดลอง (รวมทั้งหมดใช้ 9 straw) การทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (FVS-ACUC)

2.2.2 การแช่แข็งตัวอสุจิ

ใช้วิธีการแช่แข็งตัวอสุจิโดยพัฒนาจากเทคนิคเดิมของผู้วิจัย (Wongtawan et al., 2006, Kaeoket et al., 2012) ในการทดลองนี้จะใช้ cryomedia 3 สูตร ใช้ชื่อว่า CryoA, CryoB and CryoC โดยในแต่ละสูตรจะประกอบไปด้วยส่วนผสมหลัก 3 อย่าง เรียกว่า Ext-1, Ext-2 และ Ext-3 โดย cryomedia แต่ละสูตรใช้น้ำยา Ext-1 Ext-3 เหมือนกัน แต่ใช้ Ext-2 ไม่เหมือนกัน ในขั้นตอนแรกผสมน้ำเชื้อ 1:1 กับ Ext-1 (Modena extender, Swine Genetics International, Iowa, USA) หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อปริมาณ 50 มล ไปแช่เย็นที่ 15°C เป็นเวลา 120 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง ที่ 800 × g, 15°C เป็นเวลา 10 นาที (Hettich Rotanta 460R, Andreas Hettich GmbH & Co, Germany) นำ supernatant ทั้ง และละลาย sperm pellet (2:1) ด้วย Ext-2 ทำการ incubated ที่ 5°C เป็นเวลา 90 นาที

น้ำยา Ext-2 มี 3 ชนิดคือ

- Ext-2A มีส่วนประกอบเป็น 2% King™ rice bran oil (Thai Edible Oil Ltd, Bangkok, Thailand) ใน LEY medium (80 mL of 11% lactose และ 20 mL egg yolk) ใช้ใน CryoA
- Ext-2B มีส่วนประกอบเป็น 1% Biogrow™ rice brand-germ oil (Biogrow Ltd, Bangkok, Thailand) ใน LEY medium ถูกใช้ใน CryoB
- Ext-2C มีส่วนประกอบเป็น LEY medium และใช้ใน CryoC.

หลังจากนั้น sperm solutions จะถูกผสม 1:1 ด้วย Ext-3 ซึ่งประกอบไปด้วย 89.5% LEY extender กับ 9% v/v glycerol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) และ 1.5% v/v Equex-STM® (Nova Chemical, Pennsylvania, USA) ซึ่งความเข้มข้นในท้ายที่สุดของ sperm จะประมาณ 1.0×10^9 sperm/มล. หลังจากนั้นสารละลายอสุจิจะถูกบรรจุลงใน 0.5 มล PVC straws (Bio-Vet, Z.I. Le. Berdoulet, France) และปิดด้วย plasticine และนำไปแช่แข็งด้วยเครื่อง controlled-rate freezer (IceCube 14s, Sy-lab, Neupurkersdorf, Austria) โดยใช้โปรแกรมดังนี้คือ 3°C/นาที จาก+5 ถึง -5°C, 1 นาทีของ holding time และหลังจากนั้น 50°C/นาที จาก-5 ถึง -140°C หลังจากนั้น straws จะถูกแช่แข็งลงใน liquid nitrogen (-196°C) ทันที เพื่อ

2.2.3 การละลายน้ำเชื้อ (Thawing of frozen sperm)

นำ Straws ของ frozen sperm ใส่ลงใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50°C เป็น 12 วินาที หลังจากนั้นตัวอย่างไปผสมใน thawing extender ที่เตรียมมา 30 mL ที่อุณหภูมิ 37 °C Thawing extender ที่ใช้มี 3 ชนิด คือ Modena (Swine Genetics International, Iowa, USA), Beltsville Thawing Solution (BTS) (IMV Technology, L'Aigle, France) และ Androstar® Plus (Minitube, Tiefenbach, Germany)

2.2.4 เทคนิคการทำ Sperm swim up

หลังจากละลายน้ำเชื้อแล้ว นำตัวอย่างไป incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อปล่อยให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นบนผิวของ extender หลังจากนั้นดูดตัวอย่างตัวอสุจิที่ผิวของ extender 10 มล เพื่อนำตัวอสุจิไปนับ และทำการตรวจเพศ

2.2.5 Real-time PCR

เทคนิค Real-time PCR ที่ใช้ทำเหมือนการทดลองที่ 1

2.2.6 การนับจำนวน X and Y sperm

ในขั้นแรก ทำการเปรียบเทียบปริมาณ X และ Y sperm แบบคร่าวๆ เพื่อเปรียบเทียบ cryomedia 3 ชนิด และเปรียบเทียบ thawing extenders 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค comparative quantification โดยการวัด ดีเอ็นเอ จากตัวอสุจิทั้งหมด และเมื่อทราบแล้วว่า cryomedia หรือ thawing extender ชนิดไหน สามารถช่วยในการแยกเพศได้ดี ก็เลือกมาใช้ร่วมกัน แล้วทำการตรวจเพศแบบละเอียดโดยใช้เทคนิค single sperm real-time PCR ร่วมกับ melt curve analysis

2.2.7 Comparative quantification

Comparative หรือ relative quantification (Pfaffl 2006) เพื่อวัด Y chromosome จาก ตัวอย่างอสุจิทั้งหมด สามารถใช้เพื่อการตรวจประเมินปริมาณตัวอสุจิแต่ละเพศแบบคร่าวๆได้ ว่าตัวอย่างใดมี Y sperm มากกว่ากัน เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และราคาไม่แพง แต่จะไม่แม่นยำเหมือนเทคนิค

2.2.8 Single sperm sex identification

ตัวอย่างอสุจิจะนำมาย่อยด้วย Azupure DNA purification kit (BIOTEC, Bangkok, Thailand) แล้วนำ ดีเอ็นเอ มาวัดหา chromosome 1 เพื่อทำเป็นตัว normalisation ของตัวอย่าง และวัด chromosome Y เพื่อตรวจเพศ Comparative quantification นั้นสามารถคำนวณโดยใช้โปรแกรม Rotorgene 6.1 software (Qiagen, Hilden, Germany) ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง Rotor gene PCR machine โดยผลที่ได้จะออกมาเปรียบเทียบว่ามีปริมาณ chromosome ที่วัดได้ มากน้อยกว่ากันกี่เท่า ในการทำวัดตัวอย่างแต่ละครั้ง จะแบ่งหนึ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วน เพื่อทำ PCR 3 หลอด เพื่อเป็น internal replication.

2.2.9 Single sperm sex identification

การตรวจเพศด้วยวิธี Single sperm real-time PCR ได้อธิบายแล้วได้การทดลองที่ 1 (หน้า)

2.2.10 การคำนวณทางสถิติ

ค่าของ Comparative quantification ของ Y sperm ถูกแสดงด้วยค่า Mean+SD และ ความแตกต่างทางสถิติถูกคำนวณโดยใช้เทคนิค ANOVA และ student's t test สำหรับการตรวจเพศด้วยเทคนิค single sperm real-time PCR ค่าจะแสดงออกมาเป็น เปอร์เซนต์ ของจำนวนตัวอสุจิ Y และ X และค่าความแตกต่างทางสถิติจะถูกคำนวณโดยใช้เทคนิค Chi-square technique โปรแกรมสถิติที่ใช้คือ SPSS 19 ภายใต้ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยมหิดล

2.3 ผลการทดลอง

2.3.1 ผลของ cryomedia ต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ X และ Y

ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยทำการศึกษา cryomedia 3 สูตร ว่ามีผลต่อการรอดชีวิตของอสุจิแต่ละเพศอย่างไร cryomedia ที่ใช้คือ CryoA, CryoB และ CryoC ผู้วิจัยใช้เทคนิค sperm swim-up เพื่อตรวจหาตัวอสุจิที่แข็งแรง แล้วนำตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นผิวน้ำไปตรวจหาเพศ

ผลการทดลองพบว่า CryoB มีแนวโน้มที่จะให้จำนวนตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นผิวน้ำสูงกว่า cryomedia อื่นๆ (ตารางที่ 1) ส่วน CryoA มีแนวโน้มที่จะให้จำนวนตัวอสุจิ Y ที่แข็งแรงมากกว่า cryomedia ตัวอื่น ส่วน CryoC มีแนวโน้มมีแนวโน้มที่จะให้ตัวอสุจิ Y ที่แข็งแรงน้อยกว่า cryomedia ตัวอื่น (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 1 ผลของ cryomedia ต่อจำนวนของตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นผิวน้ำ และจำนวนของตัวอสุจิ Y (relative number) (Mean $\pm$ SD)

Cryomedia	CryoA	CryoB	CryoC
No. of swim-up sperm ($\times 10^5$)	155 $\pm$ 69	169 $\pm$ 24	151 $\pm$ 25
Comparative Quantification	1.01 $\pm$ 0.14	0.89 $\pm$ 0.28	0.86 $\pm$ 0.38

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ $P>0.05$.

2.3.2 ผลของ thawing extenders ต่อการมีชีวิตของ ตัวอสุจิ X และ Y

ในการทดลองนี้เราเปรียบเทียบ thawing extender สามชนิด คือ Modena, BTS และ Androstar[®] plus ผลการทดลองพบว่า Modena extender มีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นมาที่ผิวน้ำมากกว่า extender อื่น (ตารางที่ 2) BTS ให้ปริมาณตัวอสุจิที่รอดชีวิตเป็น Y sperm มากกว่า extender อื่น และ Androstar[®] plus ให้ปริมาณตัวอสุจิที่รอดชีวิตเป็น Y sperm น้อยกว่า extender อื่น (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 2 ผลของ thawing extender ต่อจำนวนของตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นมาจากพื้นผิวน้ำ และจำนวนของตัวอสุจิ Y (relative number) (Mean±SD)

Thawing extender	Androstar®plus	BTS	Modena
No. of swim-up sperm ($\times 10^5$)	174±56	182±49	184±49
Comparative Quantification	1.00±0.00	1.49±0.77	1.07±0.25

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ $P>0.05$

2.3.3 การเลือกคู่ในการใช้ cryomedia และ thawing extender ที่เหมาะสมสำหรับการแยกเพศตัวอสุจิ

ถึงแม้ว่าผู้วิจัยจะไม่เจอความแตกต่างทางสถิติเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง cryomedia สามชนิด และระหว่าง thawing extender สามชนิด แต่ก็พบความเป็นไปได้ที่จะเลือกเพศอสุจิหากจับคู่ cryomedia และ thawing extender ที่เหมาะสม เช่น หากแช่แข็งตัวอสุจิด้วย CryoA และละลายน้ำเชื้อด้วย BTS อาจจะได้ ตัวอสุจิที่แข็งแรงและรอดชีวิตเป็นตัวอสุจิ Y มากกว่า X แต่ถ้าหากแช่แข็งตัวอสุจิด้วย CryoC และละลายน้ำเชื้อด้วย Androstar® plus อาจจะได้ ตัวอสุจิที่แข็งแรงและรอดชีวิตเป็นตัวอสุจิ X มากกว่า

ผลการทดลองพบว่า การจับคู่ของ CryoA และ BTS ให้ ตัวอสุจิ Y 62% ส่วนตัวอสุจิ X 38% . ในขณะที่การจับคู่ของ CryoC และ Andro star® plus จะให้ตัวอสุจิ Y 32% ตัวอสุจิ X 68% (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการทดลองนี้ให้ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$).

ตารางที่ 3 การแยกเพศตัวอสุจิโดยเลือกใช้ cryomedia และthawing extender การตรวจเพศอสุจิใช้เทคนิค single sperm real-time PCR.

Freeze/Thaw solution	% Sperm (n)		
	Y	X	P Value
CryoA+BTS	62 (124)	38 (76)	P = 0.03
CryoC+Androstar [®] plus	32 (64)	68 (136)	P=0.0002
Control sperm	51 (102)	49 (98)	

*กลุ่มควบคุม คือ อสุจิที่ไม่ได้ผ่านขบวนการ swim-up

2.4 การวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยพบว่า การแช่แข็งตัวอสุจิมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิ X และ Y โดย ขึ้นกับ cryomedia และ thawing extenders การใช้ CryoA (Cryomedium) ร่วมกับ BTS (Thawing extender) จะทำให้ตัวอสุจิ Y แข็งแรงและรอดชีวิตสูงกว่าตัวอสุจิ X ในขณะที่ การใช้ CryoC ร่วมกับ Androstar[®] plus จะทำให้ตัวอสุจิ X แข็งแรงและรอดชีวิตสูงกว่าตัวอสุจิ Y

สำหรับเหตุผลว่าทำไม การแช่แข็งจึงมีผลกับอัตราการรอดชีวิต อาจอธิบายได้เนื่องจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณโปรตีนบนพื้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ที่แตกต่างกันของตัวอสุจิ X และ Y ซึ่งได้มีผู้รายงานมาแล้วหลายกลุ่ม (Cumming et al., 2010, Chen et al., 2012, De Canio et al., 2013) ผลของ cryomedia และ thawing extender ที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็งอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาของไขมันกับ โปรตีน และ ไขมัน ที่ผนังเซลล์

น้ำยา CryoA นั้นประกอบไปด้วยน้ำมันรำข้าว (rice bran oil) ซึ่งเต็มไปด้วย fatty acid, vitamin E และ oryzanol (Rukmini and Raghuram 1991) Fatty acid นั้นสามารถ integrate เข้าไปใน เยื่อหุ้มเซลล์ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง สัดส่วนของไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ oryzanol และ vitamin E นั้นมีฤทธิ์เป็น antioxidant เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานวิจัยว่า น้ำมันรำข้าว (Kaeoket et al., 2012) หรือ vitamin E (Mendez et al., 2013) นั้นมีประโยชน์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันไม่ให้เกิดขบวนการ lipid oxidation และ protein peroxidation (Parrado et al., 2003)

Androstar® plus extender นั้นแตกต่างจาก BTS ตรงที่ว่ามันมีส่วนประกอบของ bovine serum albumin (BSA) และ Hepes (Gadea 2003) Albumin ใน Androstar® plus extender นั้นอาจทำปฏิกิริยากับ เยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น antioxidant และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cholesterol (Aitken and Nixon 2013) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า Androstar® plus extender ช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ (sperm motility และ acrosomal integrity) ในการเก็บที่อุณหภูมิ 16 °C ได้ถึง 8 วัน (Kaeoket et al., 2010b).

จากการเก็บข้อมูลผู้หญิง 203 คน ที่ผ่านการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในช่วงปี 1987-1994, พบว่า ลูกที่เกิดมาเป็นเพศชาย (55%; 101/184) มากกว่าเพศหญิง (45%; 83/184) แต่ข้อมูลนี้ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ (Sidhu et al., 1997) นอกจากนี้ก็ยังมีวิจัยได้ทำวิจัยผลของการแช่แข็งอสุจิคน กับอัตราส่วนของเพศของตัวอสุจิเพศที่สามารถปฏิสนธิได้ (ใช้ Hamster oocyte) ผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนเพศของตัวอสุจีก่อน และหลังแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Chernos and Martin 1989, Martin et al., 1991, Pu and Chen 2002) แต่การทดลองในอดีตนั้นไม่ได้มีการเปรียบเทียบ ระหว่าง cryopreservation medium และ thawing extender.

โดยปกติน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรไม่ได้เป็นที่นิยมนักในอุตสาหกรรม เพราะว่าให้ผลผลิตที่ต่ำกว่า น้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อแช่เย็น (Wongtawan et al., 2006) แต่นิยมใช้ในสุกรที่พันธุ์กรรมสูงเพื่อส่งออกไป ต่างประเทศ หรือเก็บน้ำเชื้อไว้ได้นาน (Didion et al., 2013) และถ้าหากการแช่แข็งน้ำเชื้อทำให้สามารถ เลือกเพศได้ก็จะเป็นการเพิ่มคุณค่าของน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร .

อย่างไรก็ดีการทดลองนี้เป็นแค่การทดลองในห้องทดลอง ซึ่งไม่ได้เป็นการรับประกันว่า หากนำ วิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ไปผสมเทียมในฟาร์ม จะได้ผลการทดลองที่เหมือนกับในห้องทดลอง เพราะใน มดลูกสุกรยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่เราไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นในอนาคตจึงมีความจำเป็นที่จะ ทดลองเพิ่มเติมเพื่อนำเทคนิคนี้ไปทดลองใช้ในการผสมเทียมสุกรในฟาร์มต่อไป

การทดลองที่ 3.การแยกเพศตัวสุจิด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody)

3.1 วัตถุประสงค์การทดลอง

- เพื่อศึกษาและพัฒนาการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการแยกเพศตัวสุจิ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White 3 ตัวในการทดลองนี้ โดย ตัวที่ 1 เป็นตัวควบคุม (non-immunised control) ไม่ถูกฉีดแอนติเจน ตัวที่ 2 และ 3 ถูกฉีดแอนติเจน DBY เพื่อกระตุ้นเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี

3.2.2 การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

แผนการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเจาะเลือดมีดังนี้

Day	วันที่	method
-1	4 Feb 56	● เก็บเลือด (Control)
0	5 Feb 56	● ฉีดแอนติเจนครั้งที่ 1
15	THU 21 Feb 56	● เก็บเลือด
22	TUE 26 Feb 56	● ฉีดแอนติเจนครั้งที่ 2
28	THU 7 Mar 56	● เก็บเลือด
35	THU 14 Mar 56	● เก็บเลือด
40	TUE 19 Mar 56	● ฉีดแอนติเจนครั้งที่ 3

49	THU 28 Mar 56	● เก็บเลือด
56	THU 4 Apr 56	● เก็บเลือด
60-63	WED 10 Apr 56 THU 11 Apr 56	● เจาะเลือดจากหัวใจ

3.2.3 การทดสอบผลของซีรัมต่ออสุจิ

ใช้ตัวอสุจิ 1 ล้านตัว ใน extender 0.5 มล. ในการทดสอบ โดยผสมกับซีรัม 0.5 มล ลงในหลอด microcentrifuge 0.5 มล และทำการทดสอบกับซีรัมในความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจาก 1:1 จนถึง 1:100000 ซีรัมจะถูกลดความเข้มข้นโดยการละลายลงใน thawing extender หลังจากนั้น incubate ตัวอย่างที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วดู ตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นไปที่ผิว (Sperm swim up) เพื่อตรวจสอบตัวอสุจิที่แข็งแรง

3.2.4 การตรวจเพศอสุจิ

การตรวจเพศอสุจิใช้วิธี Relative quantification และ single sperm real time PCR plus melt curve analysis (อธิบายไว้ในวิธีการทดลองในการทดลองที่ 2)

3.3 ผลการทดลอง

3.3.1 การสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

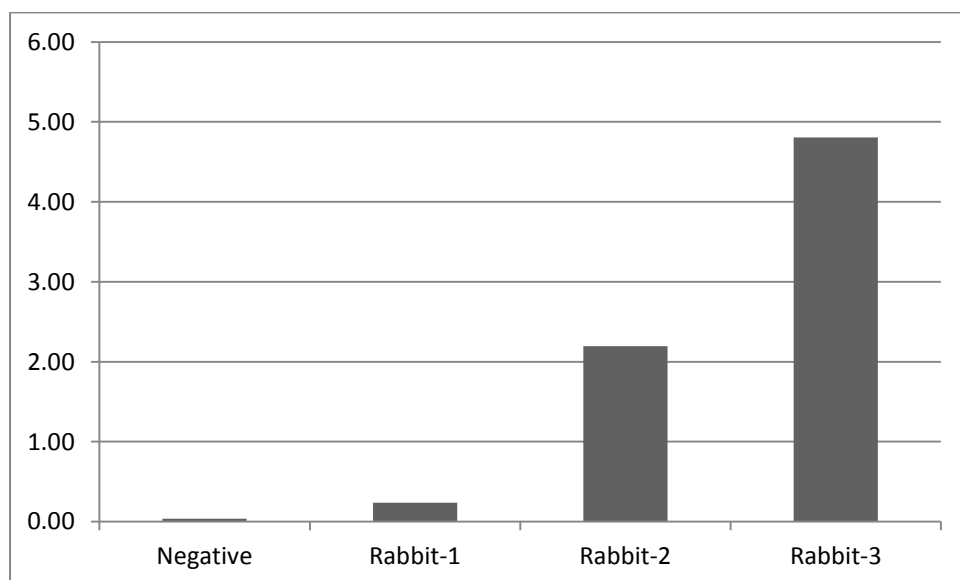
กระต่ายตัวที่ 1 เป็นตัวควบคุมแข็งแรงมีสุขภาพดีและถูกเก็บเลือดครั้งสุดท้ายจากหัวใจในวันที่ 60

กระต่ายตัวที่ 2 ที่ถูกฉีด antigen เกิดการติดเชื้อและมีไข้เกิดขึ้น ทำให้ต้องยุติการฉีดกระตุ้น antigen ในเข็มสุดท้ายแล้วทำการรักษาจนหายดี จากนั้น ถูกเก็บเลือดครั้งสุดท้ายจากหัวใจในวันที่ 60

กระต่ายตัวที่ 3 แข็งแรงสุขภาพดี ถูกเก็บเลือดครั้งสุดท้ายจากหัวใจในวันที่ 60

เมื่อนำซีรัมของกระต่ายทั้งหมดไปตรวจหาความเข้มข้นของแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่ากระต่ายตัวแรกไม่พบแอนติบอดีต่อ DBY กระต่ายที่ถูกฉีด antigen ทั้ง 2 ตัว สร้าง

แอนติบอดีขึ้นมาก่อแอนติเจน DBY โดยกระต่ายหมายเลข 3 ที่มีสุขภาพแข็งแรงมีปริมาณแอนติเจนสูงกว่า (ดูรูปที่ 7)



รูปที่ 7 กราฟแสดง relative concentration ของ โพลีโคลนอลแอนติบอดี ในซีรัมกระต่าย Negative = negative ELISA reaction, Rabbit-1=non-antigen injected rabbit, Rabbit-2=immunised rabbit number 2, and Rabbit-3=immunised rabbit number 3.

หลังจากนั้นจึงนำซีรัมกระต่ายไปสกัดแอนติบอดี คณะวิจัยได้ทำการสกัดแอนติบอดีออกมาโดยใช้เครื่อง Protein purifier (GE, Health care) แต่ไม่ประสบความสำเร็จซึ่งอาจมาเนื่องจากคอลัมน์ที่ใช้ในการสกัดอาจจะเสื่อมสภาพไปจากการใช้งานมานาน จึงได้ใช้ซีรัมของกระต่ายซึ่งมีแอนติบอดีอยู่มากใช้ในการทดลองแทน โดยนำซีรัมในความเข้มข้นต่างๆผสมลงใน semen extender ที่มีตัวอสุจิอยู่ เพื่อดูว่าแอนติบอดีมีผลต่อ %motility (การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ) และการ agglutination (การจับกลุ่มของตัวอสุจิ) หลังจากนั้นจะเก็บตัวอสุจิที่สามารถ swim up ขึ้นมา (ตัวอสุจิที่แข็งแรง) นำตัวอสุจิที่ได้มานับและนำไปตรวจเพศอสุจิต่อไป

3.3.2 ผลของแอนติบอดี DBY ต่อ การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (Percentage of motility)

จากการทดลองสรุปได้ว่า ซีรัมมีผลต่อการเคลื่อนไหวและการจับกลุ่มของตัวอสุจิ ซึ่งจำทำให้ % motility ลดลงประมาณ 5-20% โดยเฉพาะซีรัมที่มีแอนติบอดี DBY อยู่ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 1/10 ของซีรัมที่มีแอนติบอดี DBY อยู่ จะลด Motility ของตัวอสุจิลงไปประมาณ 20-30% (ดูตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 อัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิภายหลังการใส่ซีรัมและแอนติบอดี

Sample	Dilution	%Mortality of Incubate time at 37°C (min)			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Sperm-extender	1/1	85.00±7.07	85.00±7.07	80.00±7.07	77.50±3.54
	1/1	75.00±7.07	75.00±7.07	75.00±7.07	70.00±7.07
	1/10.	80.00±7.07	75.00±7.07	72.50±3.54	70.00±7.07
	1/100	80.00±7.07	75.00±7.07	70.00±7.07	70.00±7.07
	1/1000	77.50±3.54	75.00±7.07	70.00±7.07	70.00±7.07
	1/10000	80.00±7.07	75.00±7.07	72.50±10.61	72.50±10.61
	1/100000	85.00±7.07	82.50±10.61	80.00±14.14	72.50±17.68
Sperm-antibody	1/1	75.00±0.00	70.00±0.00	67.50±3.54	67.50±3.54
	1/10.	72.50±3.54	67.50±3.54	65.00±0.00	60.00±0.00
	1/100	75.00±7.07	75.00±7.07	70.00±7.07	70.00±7.07
	1/1000	75.00±7.07	72.50±10.61	72.50±10.61	72.50±10.61
	1/10000	80.00±7.07	77.50±10.61	75.00±7.07	72.50±10.61
	1/100000	82.50±10.61	82.50±10.61	77.50±10.61	77.50±10.61

3.3.4 ผลของแอนติบอดี DBY ต่อ การว่ายน้ำขึ้นไปที่ผิวหน้าของตัวอสุจิ (Sperm swim up)

หลังจากนั้นเมื่อนับตัวอสุจิที่ว่ายน้ำขึ้นมายังผิวหน้า ซึ่งจะถือว่าเป็นตัวอสุจิที่แข็งแรง โดยตัวอสุจิที่ผู้วิจัยใส่เข้าไปในหลอดทดลองจะมีประมาณ 1 ล้านตัว ใน 1 มล เมื่อนำตัวอสุจิบนผิวหน้า (0.5 มล) จะพบว่าจำนวนตัวอสุจิลดลงในทุกกลุ่ม โดยในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ได้มีการใส่ซีรัมหรือแอนติบอดีลงไป (กลุ่ม Sperm-extender) จะมีตัวอสุจิลดลงประมาณ 15% เมื่อ incubate 15 นาที ผู้วิจัยพบว่า ยิ่งเวลา incubate นานขึ้น ตัวอสุจิที่ว่ายน้ำขึ้นมายังผิวหน้าจะยิ่งลดลง เช่น เมื่อ incubate 60 นาทีจะลดลงไปถึงประมาณ 70%

ในการศึกษานี้พบว่าซีรัมที่มีแอนติบอดี DBY และไม่มีแอนติบอดี มีผลต่อการว่ายน้ำขึ้นไปที่ผิวหน้าของตัวอสุจิ โดยจะมีผลอยู่ใกล้เคียงกัน ผู้วิจัยพบว่าซีรัมจะลดประมาณตัวอสุจิให้ว่ายน้ำขึ้นไปที่ผิวหน้าเมื่อ incubate 15 นาที อยู่ประมาณ 20-30% และเมื่อ incubate นานขึ้นถึง 60 นาที จะทำให้ตัวอสุจิลดลงไปถึงประมาณ 80%

ตารางที่ 5 จำนวนตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นมาบนผิวน้ำหลังจากทดสอบด้วยซีรัม และแอนติบอดี

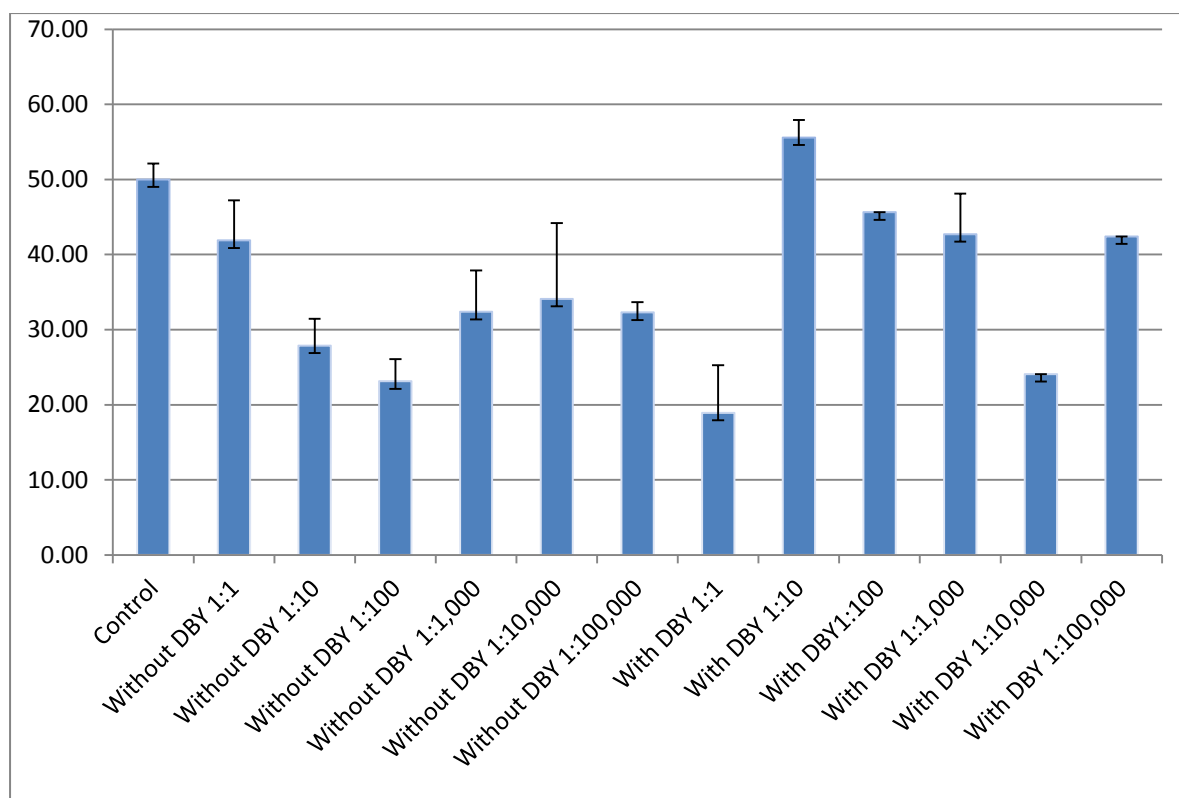
Sample	dilution	Spermatozoa (million)			
		15 min	30 min	45 min	60 min
Sperm-extender		0.84±0.00	0.76±0.03*	0.53±0.02	0.34±0.02
Sperm-serum	1/1	0.67±0.06	0.52±0.09*	0.52±0.19	0.26±0.41
	1/10.	0.81±0.15	0.55±0.02	0.20±0.11	0.21±0.07
	1/100	0.74±0.03	0.53±0.02	0.32±0.14	0.18±0.02
	1/1000	0.73±0.11	0.55±0.12	0.39±0.21	0.24±0.03
	1/10000	0.80±0.06	0.45±0.07	0.39±0.24	0.36±0.07
	1/100000	0.84±0.11	0.54±0.06	0.47±0.23	0.30±0.08
Sperm-antibody	1/1	0.67±0.15	0.27±0.25*	0.21±0.12	0.21±0.23
	1/10.	0.61±0.08	0.40±0.15	0.28±0.03	0.20±0.14
	1/100	0.79±0.12	0.44±0.05	0.36±0.05	0.31±0.02
	1/1000	0.72±0.02	0.48±0.19	0.29±0.14	0.26±0.04
	1/10000	0.63±0.32	0.59±0.14	0.32±0.08	0.22±0.00
	1/100000	0.61±0.34	0.49±0.15	0.27±0.16	0.29±0.06

*Control 1 ประกอบไปด้วย อสุจิ+ extender, Control 2 ประกอบไปด้วย อสุจิ+extender+serum without DBY antibody และ Treatment ประกอบไปด้วย อสุจิ+semen extender+serum with DBY antibody

3.3.5 อัตราส่วนเพศของตัวอสุจิ หลังจากสัมผัสกับซีรัมและแอนติบอดี

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าแอนติบอดีที่ปนอยู่ใน extender นั้นอาจจะรบกวน PCR reaction ทำให้ไม่สามารถแยกเพศได้ด้วยวิธี single sperm PCR ถึงแม้ว่าจะล้างตัวอย่างหลายครั้งก็ไม่ได้ผล ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนไปใช้วิธี Relative quantification ซึ่งเป็นการวัดโดยประมาณแทน โดยกลุ่มควบคุม (ตัวอสุจิที่รีดน้ำเชื้อมาจากสุกร และไม่ได้ผ่านการ treatment ใดๆทั้งสิ้น) ถูกตั้งค่าโครโมโซม Y ให้เป็น 50%

ผู้วิจัย incubate อสุจิประมาณ 30 นาที (จากสุกร 2 ตัว ผสมกัน) ผลการทดลองพบว่าทั้งซีรัมที่มีและไม่มีแอนติบอดีมีผลต่ออัตราส่วนของเพศตัวอสุจิ โดยส่วนใหญ่ดูเหมือนจะทำให้ตัวอสุจิ Y ที่ว่ายขึ้นมามีผิวน้ำ มีประมาณลดลงโดยกลุ่มที่ใส่ซีรัมที่ไม่มีแอนติบอดีในอัตราส่วน 1:100 ตัวอสุจิ Y ลดลงเหลือ 23.13% ส่วนกลุ่มที่มีแอนติบอดีในอัตราส่วน 1:1 ตัวอสุจิ Y ลดลงเหลือ 18.93%



รูปที่ 8 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ตัวสุจิ Y หลังจาก incubate 30 นาที ด้วย แอนติบอดี DBY ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองนี้ผู้วิจัยสามารถสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ DBY antigen ได้ และแอนติบอดีนี้สามารถแยกเพศตัวสุจิในห้องทดลองได้ โดยทำให้ตัวสุจิ Y อ่อนแอลง ทำให้ตัวสุจิที่เก็บได้มีตัวสุจิ X มากกว่า

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบว่า ซีรัมกระต่ายมีผลทำให้ตัวสุจิ Y อ่อนแอลงด้วย ทำให้สามารถช่วยในการแยกเพศตัวสุจิได้เหมือนกัน

อย่างไรก็ดีการทดลองในห้องทดลองอาจจะไม่เหมือนกับในการใช้งานจริงในการผสมเทียม ดังนั้นในอนาคตจะต้องมีการทดลองใช้ตัวสุจิ ร่วมกับซีรัมหรือแอนติบอดีในการผสมเทียมสุกร นอกจากนี้การแยกเพศตัวสุจิด้วยซีรัมหรือแอนติบอดีนี้ทำให้ได้ตัวสุจิโดยรวมอ่อนแอลงทำให้หากต้องนำไปใช้ในการผสมเทียมจะต้องเพิ่มปริมาณอสุจิมากขึ้น โดยในการศึกษาในอนาคตจะต้องศึกษาหา

ปริมาณและความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำเชื้อและซีรัมหรือแอนติบอดี เพื่อให้ใช้งานได้ในการปฏิบัติ
จริงและเหมาะสมสำหรับการใช้งาน

เอกสารอ้างอิง

- Aitken RJ, and Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod.* 19(12): 785-793.
- Abdulmawjood A, Krischek C, Wicke M, and Klein G. 2012. Determination of pig sex in meat and meat products using multiplex real time-PCR. *Meat Sci.* 91(3): 272-276.
- Ballester M, Castello A, Ramayo-Caldas Y, and Folch JM. 2012. A Quantitative Real-Time PCR Method Using an X-Linked Gene for Sex Typing in Pigs. *Mol Biotechnol.* 54(2): 493-496.
- Bathgate, R., Grossfeld, R., Susetio, D., Ruckholdt, M., Heasman, K., Rath, D., Evans, G., Maxwell, W. M., 2008. Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm. *Anim Reprod Sci.* 104, 440-4.
- Bathgate, R., Morton, K. M., Eriksson, B. M., Rath, D., Seig, B., Maxwell, W. M., Evans, G., 2007. Non-surgical deep intra-uterine transfer of in vitro produced porcine embryos derived from sex-sorted frozen-thawed boar sperm. *Anim Reprod Sci.* 99, 82-92.
- Barbas JP, and Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10(1): 49-62.
- Blecher SR, and Detmar J 2001 Sex-chromosome-specific proteins, species specific and sperm specific proteins and methods for their identification and isolation. In WIP Organisation (ed.). Canada: University Of Guelph.
- Blecher, S. R., Howie, R., Li, S., Detmar, J., Blahut, L. M., 1999. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology.* 52, 1309-21.
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, and Little S. 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 25(16): 3235-3241.
- Buranaamnuay K, Wongtawan T, Masuwatana S, Tummaruk P, and Techakumphu M. 2010. Intra-uterine and deep intra-uterine insemination using cryopreserved boar semen in spontaneously-ovulating sows. *Thai J Vet Med.* 40(2): 215-219.

- Chen X, Zhu H, Wu C, Han W, Hao H, Zhao X, Du W, Qin T, Liu Y, and Wang D. 2012. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. *J Proteomics*. 77(59-67).
- Chernos JE, and Martin RH. 1989. A cytogenetic investigation of the effects of cryopreservation on human sperm. *Am J Hum Genet*. 45(5): 766-777.
- Choi SC, Bae MS, Lee ES, Kim SO, Kim BK, Yang JH, Jeon CE, Kim HH, Hwang YJ, Lee ES, and Kim DY. 2009. Amplification of Porcine SRY Gene for Sex Determination. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 22(8): 1107-1112.
- Colley A, Buhr M, and Golovan SP. 2008. Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology*. 70(6): 978-983.
- Cui KH. 1997. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Mol Hum Reprod*. 3(1): 61-67.
- Cumming IR, Brewis IA, and Pitts SA 2010 Identification of sex-linked proteins. In WIP Organisation (ed.). United Kingdom: Ovasort Limited.
- De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbani A, and Roncada P. 2013. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. *Mol Biosyst*.
- Didion BA, Braun GD, and Duggan MV. 2013. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci*. 137(3-4): 189-196.
- Eisenberg ML, Murthy L, Hwang K, Lamb DJ, and Lipshultz LI. 2012. Sperm counts and sperm sex ratio in male infertility patients. *Asian J Androl*. 14(5): 683-686.
- Ellis, P. J., Yu, Y., Zhang, S., 2011. Transcriptional dynamics of the sex chromosomes and the search for offspring sex specific antigens in sperm. *Reproduction*.
- Gadea J. 2003. *Spanish Span J Agric Res*. 1(2): 17-27.

Gonzalez C, Boada M, Devesa M, and Veiga A. 2012. Concise review: fertility preservation: an update. *Stem Cells Transl Med.* 1(9): 668-672.

Harton GL, and Tempest HG. 2012. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl.* 14(1): 32-39.

Hendriksen, P. J., Tieman, M., Van der Lende, T., Johnson, L. A., 1993. Binding of anti-H-Y monoclonal antibodies to separated X and Y chromosome-bearing porcine and bovine sperm. *Mol Reprod Dev.* 35, 189-96.

Hendriksen, P. J., Welch, G. R., Grootegoed, J. A., Van der Lende, T., Johnson, L. A., 1996. Comparison of detergent-solubilized membrane and soluble proteins from flow cytometrically sorted X- and Y-chromosome bearing porcine spermatozoa by high resolution 2-D electrophoresis. *Mol Reprod Dev.* 45, 342-50.

Horng, Y. M., Huang, M. C., 2003. Male-specific DNA sequences in pigs. *Theriogenology.* 59, 841-8.

Hudson K, and Ravelich S 2009 Materials and methods for sperm sex selection. In *WIP Organisation* (ed.). USA: Androgenix Ltd.

Johnson LA, Rath D, Vazquez JM, Maxwell WM, and Dobrinsky JR. 2005. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology.* 63(2): 615-624.

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

Johnson, L. A., Welch, G. R., 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology.* 52, 1323-41.

Kaeoket, K., Chanapiwat, P., Wongtawan, T., Kunavongkrit, A., 2010a. Successful Intrauterine Insemination (IUI) with Frozen Boar Semen: Effect of Dose, Volume and Fixed-Time AI on Fertility. *Thai Journal of Agricultural Science.* 43, 31-37.

- Kaeoket, K., Srisowanna, T., Wichaidit, U., Chanapiwat, P., Manee-In, S., 2010b. Comparative Study on Six Different Long Term Commercial Extenders for Fresh Boar Semen. *Thai Journal of Veterinary Medicine*. 40, 257-263.
- Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, and Chanapiwat P. 2012. Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *J Vet Med Sci*. 74(9): 1149-1153.
- Korchunjit V, Kaeoket K, Kitiyanant Y, and Wongtawan T. 2014. Rapid Single Cell Typing using SYBR® Green Real-Time PCR Together with Melt Curve Analysis for Sex Identification of Porcine Sperm. *Thai J Vet Med*. 44(1): 41-48.
- Langen M, Peters U, Korner U, Gissel C, Stanislawski D, and Klein G. 2010. Semiquantitative detection of male pork tissue in meat and meat products by PCR. *Meat Sci*. 86(3): 821-824.
- Li H, Cui X, and Arnheim N. 1990. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(12): 4580-4584.
- Lien S, Szyda J, Leeflang EP, Hubert R, Zhang L, Schmitt K, and Arnheim N. 2002. Single-sperm typing. *Curr Protoc Hum Genet*. 32(May): 1.6.1-1.6.18.
- Martin RH, Chernos JE, and Rademaker AW. 1991. Effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm. *Mol Reprod Dev*. 30(2): 159-163.
- Mendez MF, Zangeronimo MG, Rocha LG, Faria BG, Pereira BA, Fernandes CD, Chaves BR, Murgas LD, and Sousa RV. 2013. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal*. 7(5): 793-798.
- Mergny JL, and Lacroix L. 2003. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*. 13(6): 515-537.
- Mohammadi AA, Tetro JA, and Filion LG. 2011. Epitope selection to male specific antigens for sex selection in swine. *J Reprod Immunol*. 89(1): 46-54.

Parrado J, Miramontes E, Jover M, Marquez JC, Angeles Mejias M, Collantes De Teran L, Absi E, and Bautista J. 2003. Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran. *Eur J Nutr.* 42(6): 307-314.

Parati K, Bongioni G, Aleandri R, and Galli A. 2006. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology.* 66(9): 2202-2209.

Parrilla I, Vazquez JM, Oliver-Bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, and Martinez EA. 2003. Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by nick translation. *Reproduction.* 126(3): 317-325.

Pfaffl MW 2006 Relative quantification. UK.: Taylor & Francis Group.

Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, and Conley AJ. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci.* 73(5): 1408-1415.

Pu J, and Chen ZX. 2002. [The effect of cryopreservation on human sperm chromosome]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 8(1): 45-47.

Rath, D., Moench-Tegeder, G., Taylor, U., Johnson, L. A., 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology.* 71, 22-9.

Ririe KM, Rasmussen RP, and Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 245(2): 154-160.

Rubes J, Vozdova M, and Kubickova S. 1999. Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and Y. *Cytogenet Cell Genet.* 85(3-4): 200-204.

Rubes J, Vozdova M, and Kubickova S. 1999. Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and Y. *Cytogenet Cell Genet.* 85(3-4): 200-204.

Rukmini C, and Raghuram TC. 1991. Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. *J Am Coll Nutr.* 10(6): 593-601.

- Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, and Pinyopummin A. 2006. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Int J Androl.* 29(2): 346-352.
- Sathasivam K, Kageyama S, Chikuni K, and Notarianni E. 1995. Sex determination in the domestic pig by DNA amplification using the HMG-box sequence. *Anim Reprod Sci.* 38(4): 321-326.
- Seidel, G. E., Jr., 2009. Sperm sexing technology-the transition to commercial application. An introduction to the symposium "update on sexing mammalian sperm". *Theriogenology.* 71, 1-3.
- Sembon S, Suzuki S, Fuchimoto D, Iwamoto M, Kawarasaki T, and Onishi A. 2008. Sex identification of pigs using polymerase chain reaction amplification of the amelogenin gene. *Zygote.* 16(4): 327-332.
- Sidhu RS, Sharma RK, and Agarwal A. 1997. Effects of cryopreserved semen quality and timed intrauterine insemination on pregnancy rate and gender of offspring in a donor insemination program. *J Assist Reprod Genet.* 14(9): 531-537.
- Spaulding GF 1990 Sex-associated membrane proteins and methods for increasing the probability that offspring will be of a desired sex. In WIP Organisation (ed.). USA: CYTOGAM, INC.
- Thongtip N, Saikhun J, Damyang M, Mahasawangkul S, Suthunmapinata P, Yindee M, Kongsila A, Angkawanish T, Jansittiwate S, Wongkalasin W, Wajjwalkul W, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, and Pinyopummin A. 2004. Evaluation of post-thaw Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa using flow cytometry: the effects of extender and cryoprotectant. *Theriogenology.* 62(3-4): 748-760.
- Torner E, Bussalleu E, Briz MD, Gutierrez-Adan A, and Bonet S. 2013. Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences. *Reprod Fertil Dev.* 25(2): 417-425.

Utsumi, K., Iritani, A., 1993. Embryo sexing by male specific antibody and by PCR using male specific (SRY) primer. *Mol Reprod Dev.* 36, 238-41.

Vazquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, and Martinez EA. 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology.* 71(1): 80-88.

Vazquez, J. M., Roca, J., Gil, M. A., Cuello, C., Parrilla, I., Caballero, I., Vazquez, J. L., Martinez, E. A., 2008. Low-dose insemination in pigs: problems and possibilities. *Reprod Domest Anim.* 43 Suppl 2, 347-54.

Veerhuis, R., Hendriksen, P. J., Hengst, A. M., Kruijt, L., Tieman, M., Booman, P., 1994. The production of anti-H-Y monoclonal antibodies: their potential use in a sex test for bovine embryos. *Vet Immunol Immunopathol.* 42, 317-30.

Vogt, M. H., van den Muijsenberg, J. W., Goulmy, E., Spierings, E., Kluck, P., Kester, M. G., van Soest, R. A., Drijfhout, J. W., Willemze, R., Falkenburg, J. H., 2002. The DBY gene codes for an HLA-DQ5-restricted human male-specific minor histocompatibility antigen involved in graft-versus-host disease. *Blood.* 99, 3027-32.

Vossen RH, Aten E, Roos A, and den Dunnen JT. 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat.* 30(6): 860-866.

Wang D, Zhu HB, Guo JM, Lin B, Zhang LB, Hao HS, Du WH, and Zhao XM. 2011. A Study of a Method to Assess the Purity of Sorted Bovine Semen Using Rapid Single-Sperm Sexing PCR. *J Anim Vet Adv.* 10(6): 750-756.

Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, and Rodriguez-Martinez H. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology.* 65(4): 773-787.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ได้ผลงานที่สามารถตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติได้ โดยตีพิมพ์ไปแล้ว 1 เรื่อง และอีก 1 เรื่องอยู่ในขั้นตอนส่งตีพิมพ์

Published paper

- Korchunjit V, Kaeoket K, Kitiyanant Y, Wongtawan T. 2014. Rapid Single Cell Typing using SYBR Green Real-Time PCR together with melt curve analysis for sex identification of porcine sperm. Thai J Vet Med. 44(1): 41-48.

Manuscript

- Wongtawan T., Korchunjit V, Kaeoket K, Kitiyanant Y. Effect of cryomedia and thawing extenders on survival of frozen-thawed X and Y boar sperm. This manuscript will publish to Cryobiology.

2. ผลงานที่ได้อาจจะนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้ ตอนนี้อยู่ในขั้นตอนการพิจารณากับภาครัฐกิจ

3. ผลงานที่ได้อาจจะสามารถทำการจดสิทธิบัตรได้ กำลังอยู่ในขั้นตอนปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญอยู่

ภาคผนวก

จะประกอบไปด้วย Reprint และ Manuscript

Rapid Single Cell Typing using SYBR® Green Real-Time PCR Together with Melt Curve Analysis for Sex Identification of Porcine Sperm

Varaporn Korchunjit¹ Kampon Kaeoket^{2,3} Yindee Kitiyanant^{4,5} Tuempong Wongtawan^{1, 2, 6*}

Abstract

Identification of X or Y chromosome is a very useful technique to verify the sex of boar sperm, but common methods used in pig such as Fluorescence In situ Hybridisation (FISH) and whole semen Polymerase Chain Reaction (PCR) have some limitations. FISH is highly accurate, but time-consuming (>3 days). Whole semen PCR is faster than FISH (3-6 h), but not highly accurate (approximate methods). The objective of this study was to develop a fast and highly accurate protocol to identify sex of boar sperm. In the present study, our team developed an alternative sex identification protocol using single cell SYBR® green real-time PCR technique together with low resolution melt curve analysis. Primers specific for chromosome 1 and chromosome Y, a high performance KAPA SYBR® DNA polymerase and Rotor gene PCR platform were used. Male and female single white blood cells were used to calculate sensitivity and specificity. Single sperm was picked up under inverted microscope and transferred to 1 µl of lysis buffer, and real-time PCR was run according to the programmed protocol and analyzed with melt curve analysis. Results showed that our method was a fast (<50 min) accurate method with high sensitivity (95-99%) and specificity (100%) with low percentage of PCR failure (< 3%). Validation of this method using boar whole semen detected Y sperm at 52% and X sperm at 48%, which was comparable to the theory ratio of X and Y sperm (50:50) in semen. It may be concluded that the single cell SYBR® green real-time PCR technique together with melt curve analysis is fast and accurate that can be used to identify sex of boar sperm.

Keywords: pig, real-time PCR, sex identification, single cell

¹Laboratory of Cellular Biomedicine and Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Puttamonthon, Nakhon Pathom 73170, Thailand

²Semen Laboratory, Faculty of Veterinary Sciences, Mahidol University, Salaya, Puttamonthon, Nakhon Pathom 73170, Thailand

³Department of Clinical science and Public Health, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya campus, Salaya, Puttamonthon, Nakhon Pathom 73170 Thailand

⁴Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai, Bangkok 10400, Thailand

⁵Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Puttamonthon, Nakhon Pathom, 73170, Thailand

⁶Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya campus, Salaya, Puttamonthon, Nakhon Pathom, 73170, Thailand

*Correspondence: tuempong.wan@mahidol.edu

Introduction

Sex identification in pig is very important for research and diagnosis such as sex identification of sperm (Parrilla et al., 2003) and embryo sexing (Torner et al., 2013) as well as for the control of boar taint in meat products (Langen et al., 2010). Separation of X and Y sperm (sexing technology) can be used to select and control sex of offspring in pig (Vazquez et al., 2009). Development of sexing technology is very useful and important for the pig industry because it provides flexible farm management and an increase in product value and productivity (Johnson et al., 2005, Vazquez et al., 2009). Sex identification technique is used to verify the accuracy and purity of sperm sexing technology (Parrilla et al., 2003).

Polymerase chain reaction (PCR) (Wang et al., 2011) and fluorescence in situ hybridisation (FISH) (Parrilla et al., 2003; Eisenberg et al., 2012) are effective techniques to validate sexing sperm. An easier, cheaper and faster technique is the whole semen sex ratio PCR (Parati et al., 2006; Choi et al., 2009), but this technique is less accurate than single cell PCR.

Single cell PCR and FISH are the most accurate techniques for sperm typing (Harton and Tempest, 2012) but FISH is the only method which has been used to identify sex of porcine single sperm (Parrilla et al., 2003; Mohammadi et al., 2011). However, the main disadvantages of FISH are time-consuming (3-5 days) and labor intensive (Parrilla et al., 2003; Mohammadi et al., 2011; Eisenberg et al., 2012).

Use of conventional single sperm PCR has been mainly reported in cattle and human (Colley et al., 2008; Cui 1997; Wang et al., 2011), but not in pigs. All of PCR sex identification in pigs has been done in samples which have a high number of cells such as whole semen (Choi et al., 2009), embryos (Pomp et al., 1995; Sembon et al., 2008) tissues (Sathasivam et al., 1995; Ballester et al., 2012) and meat (Langen et al., 2010; Abdulmawjood et al., 2012).

Therefore, the use of rapid single cell PCR for sex identification in pigs will be useful to verify sperm sexing technology. The objective of this study was to develop a fast and highly accurate technique to identify sex of boar sperm. In the present study we developed an alternative sex identification technique by using single cell SYBR[®] green real-time PCR together with melt curve analysis. This technique is fast and accurate. Melt curve analysis is an assessment of the dissociation-characteristics of double-stranded DNA during slowly increasing temperature and can be used to validate PCR product (Mergny and Lacroix 2003; Vossen et al., 2009).

Materials and Methods

Animals and Samples:

One to three year old pigs from a commercial farm in Nakhon Pathom province were used in the experiment. Blood samples were collected from 5 male and 5 female domestic pigs (Landrace x Large White). Frozen semen samples from 3 boars (Duroc) were used. Three frozen-thawed semen straws of each boar were

used. Semen collection and cryopreservation were performed according to previous studies (Wongtawan et al., 2006; Kaeoket et al., 2012). This experiment was performed under the permission of the Faculty of Veterinary Science Animal Care and Use Committee (FVS-ACUC) Mahidol University.

Whole blood, semen lysis and conventional PCR: DNA was extracted from whole blood and sperm using Azupure DNA purification kit (BIOTEC, Pathum Thani, Thailand). Conventional PCR was performed using 2xTaq Master Mix (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) (Cat.no.PLMM01) with PTC-200 Thermal cycle (MJ Research, Quebec, Canada). The PCR reaction included 25 µl of Master Mix, 1 µl of 10 µM forward primer, 1 µl (10 µM) of reverse primer, 2 µl of sample and 25 µl of DEPC water. DNA and the conventional PCR program was as follows: pre-denaturation at 94°C for 2 min, denaturation at 94°C for 2 sec, annealing at 60°C for 30 sec, extension at 72°C for 15 sec. The PCR was performed 30 cycles and final extension at 71°C for 7 min. The process was repeated three times.

PCR Primers: Primers were synthesized by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the primer sequences were designed and used in previous publications (Rubes et al., 1999; Parrilla et al., 2003; Choi et al., 2009, Mohammadi et al., 2011).

Chromosome 1, product size is 244 bp.

Forward primer: 5'TTGCACTTTCACGGACGACG3'

Reverse primer: 5'CTAGCCCATTGCTCGCCATAGC3'

Chromosome Y, product size is 377 bp.

Forward primer: 5'AATCCACCATACCTCATGGACC 3'

Reverse primer: 5' TTTCTCCGTATCCTCCTGC 3'

Single cell collection and lysis: Single sperm and single white blood cells were collected. The cells were diluted in 0.1% Poly vinyl alcohol (PVA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in phosphate buffered saline (PBS) (PAA, GE Health Care, Velizy-Villacoublay, France) approximately 1,500 cell/ml. Five milliliters of suspension were poured into a 10 cm Petridish (Sterilin, Newport, UK) and observed under an inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) using 400x magnification, and a single cell was collected using mouth pipette. Approximately 1 µl buffer contained a single cell and was released into 200 µl PCR tube (Axygen[®], Corning, CA, USA).

The single cell was lysed with 5 µl of lysis buffer (200 mM KOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 50 mM DTT (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia)) and incubated at 65 °C for 10 min, then 5 µl of neutralising buffer (900mM Tris-Cl, pH 8.3 (Promega, Madison, WI, USA), 300 mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 200 mM HCl (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) were added.

Single cell SYBR[®] green real-time PCR: KAPA SYBR[®] Fast qPCR Master Mix (2x) Universal (KAPA Biosystem, Woburn, MA, USA) (Cat.no.KK4600) was used. The PCR reaction included 10 µl of MasterMix,

0.4 μ l (10 μ M) of forward primer and 0.4 μ l (10 μ M) of reverse primer. Reagents were added into a 200 μ l PCR tube that already contained the lysed single cell.

Real-time PCR reaction program protocol was as follows: step 1, pre-denaturation at 95°C for 1 min; step 2, cycling, 95°C for 5 sec (denaturation), 58°C for 20 sec (annealing), performed for 35 cycles; Step 3, Final extension at 72°C for 3 min; step 4, post PCR melt setting, temperature was increased from 72°C to 99°C, 1°C step, waited for 15 sec on first step and 4 sec on each step afterwards.

PCR platform was Rotor gene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany). PCR results and melt curve analysis were analyzed using Rotor gene software 6.1 (Qiagen, Hilden, Germany). The process was repeated three times of each sample.

Sensitivity and Specificity: Sensitivity is the ability of a test to identify positive results, while specificity is the ability of test to identify negative results. Sensitivity is calculated by dividing number of PCR positive PCR by total number of positive control samples. Specificity is calculated by dividing number of PCR negative PCR by total number of negative control samples. Fluorescence signal of PCR positive products of both chromosome 1 and chromosome Y should arise before 25 cycles. Positive melt peak of chromosome 1 should be between 88 to 90°C. Positive threshold ($-dF/dT$ unit) of the melt peak of chromosome 1 should be higher than 0.4 unit. Positive melt peak of chromosome Y should be approximately 85 to 87°C and positive threshold ($-dF/dT$ unit) of the melt peak of chromosome Y should be higher than 1 unit. Failure of PCR reaction was calculated by number of negative PCR / total number of positive control samples.

Results

Validation of primer by conventional PCR: DNA samples extracted from male and female white blood cells were used to validate PCR primers. The results revealed that each primer had a specific band for chromosome 1 (Fig 1, lane 1) or chromosome Y (Fig 1, lane 2). The product of chromosome 1 was found in both male and female blood samples while the product of chromosome Y was found only in male blood samples (Fig 1, lanes 5-6). Both primers were also validated with whole semen samples (both X and Y sperm) and the results showed specific bands for both chromosome 1 and chromosome Y (Fig 1, lanes 3 and 7). Conventional PCR was also tested for single cell level detection, but it could not detect it. We, then, tested several Taq polymerases in our lab and found that only KAPA SYBR® DNA polymerase could detect chromosome 1 and chromosome Y at single cell level.

Identification of PCR product and nonspecific products by real-time PCR and melt curve analysis DNA from male and female white blood cells was used to identify the fluorescence pattern of PCR products during real-time PCR and post-PCR melt. The results showed different fluorescence patterns for each PCR product and nonspecific products during PCR (Fig 2A) and post-PCR melt (Fig 2B). After calculating with melt curve analysis software, the melt peak was observed as the negative derivative ($-dF/dT$) of the melt curves

(Fig 2C). The melt peak is the melting temperature of the DNA sample that causes the highest rate of fluorescence decrease, at this point the double stranded DNA is 50% dissociated (Ririe et al., 1997). These results showed that the melt peak of chromosome Y was approximately 85 to 87°C while the melt peak of chromosome 1 was approximately 88 to 90°C (Fig 2C). For nonspecific products which are usually a primer dimer, (Brownie et al., 1997), the melt peak was generally lower than 80°C (Fig 2C) and it could also be separated from the PCR product by the PCR fluorescence pattern (Fig 2A) and post-PCR melt curve (Fig 2B). Notably, the fluorescence signal of primer dimer arose after 30 PCR cycles and the exponential curve was not sharp (Fig 2A).

Duplex PCR: The advantage of duplex PCR is that it can detect chromosome 1 and chromosome Y at the same time for a single sample. To perform duplex PCR both chromosome 1 and chromosome Y primers were added. Male and female white blood cells were tested. For conventional PCR and electrophoresis, the duplex conventional PCR was successful to identify sex of samples. Male samples revealed double specific DNA bands which represented chromosome 1 and chromosome Y whereas female samples revealed a single specific DNA band which represented chromosome 1 (Fig 1, lanes 9-12).

For the SYBR® green real-time duplex PCR, the fluorescence pattern during PCR was different between chromosome 1 and chromosome Y (Fig 3A). However, we found that both male and female samples gave a similar fluorescence pattern of post PCR melt (Fig 3B). The melt peaks were also found at the same temperature approximately 88 to 89°C whereabouts of chromosome 1 peak (Fig 3C). Therefore, SYBR® green real-time duplex PCR and its melt curve analysis could not distinguish between male and female samples.

Method sensitivity and specificity of single cell PCR: In this experiment, we investigated the sensitivity and specificity of this technique to detect chromosome 1 and chromosome Y in a single cell sample. The fluorescence pattern and melt curve analysis are shown in Fig 4 for chromosome 1, and Fig 5 for chromosome Y. Two hundred single female white blood cells were used as positive samples. Results showed that 198 cells were positive while 2 cells were negative. In the negative samples, no cell was added to 200 PCR tubes, and PCR reaction showed that all tubes were negative for chromosome 1. Therefore, the sensitivity of this technique for chromosome 1 was 99% while specificity was 100%.

DNA from male single white blood cells was used as positive samples and 200 of PCR reaction were tested. Results showed that 196 cells were positive for chromosome Y whereas 4 cells were negative. DNA from female white blood cells was used as a negative control. The results revealed that 200 female blood cells were negative for chromosome Y. Hence, the sensitivity of this method for chromosome Y was 97.5% and specificity was 100%. Single sperm real-time PCR with chromosome Y primer for whole semen sample.

In theory, the ratio of X and Y sperm in semen is approximately 50:50. To test the accuracy of this

technique, 400 of the single sperm were randomly picked and tested by real-time PCR. Two hundred sperm were used to identify chromosome 1 and another 200 sperm were used to identify the Y chromosome.

Results showed that 190 sperm were positive for chromosome 1, this means that the sensitivity of this technique for sperm is about 95% (Fig 6). For the sex ratio, 52% of the sperm (n=104) were positive for chromosome Y and 48% (n=96) were negative (chromosome X). The results are comparable to theory's ratio of X and Y sperm in pig semen. The fluorescence pattern and melt curve analysis were shown in Fig 6.

Discussion

The present study showed that using SYBR® green real-time PCR together with melt curve analysis was fast and accurate to identify the sex of a single cell such as sperm and white blood cells. High sensitivity and specificity were obtained with very low failure percentage using this method. The approximately 3% failure is considered lower than previous conventional single bovine sperm PCR (approximately 10%) (Wang et al., 2011), and comparable to FISH (approximately 2%) (Parilla et al., 2003).

One problem of the single sperm PCR technique is a low yield of PCR causing a failure of the test. As a result, several studies in human sperm (Li et al., 1990, Lien et al., 2002) applied two or more rounds of PCR to increase the sensitivity of detection, but multiple rounds of PCR were not necessary for our method. A single cell sample can be collected by manual or automated technique such as flow cytometer. Some previous studies collected single sperm from agarose gel (Lien et al., 2002, Wang et al., 2011), but we found that extraction of DNA directly from fresh samples produced better DNA yield than from agarose gel (unpublished observation). Picking up a single cell directly from the dilution buffer with a mouth pipette was not difficult and in our hand we could collect approximately 10 to 20 cells per minute. The disadvantage of the SYBR® green PCR is that it can detect only one product at a time. In the identification of the sex of a single cell using SYBR® green dye, only chromosome X or Y can be detected for one sample. In this experiment, in which chromosome Y was used, if the sample was negative for chromosome Y, the sample was expected to contain chromosome X, with about a 97% possibility due to the failure of PCR (3%). Therefore, further development of this technique is to develop a way to identify chromosome 1, X and Y at the same time. Using two to three different fluorescent primer probes might be possible. Duplex real-time PCR with two colour fluorescent primer probes has been used in determination of pig sex in meat and meat products (Abdulmawjood et al., 2012). However, the sensitivity of the probe for a single cell sample is still an unanswered question and the cost is more expensive than SYBR® green.

Moreover, the effectiveness of PCR reaction may increase by optimising PCR conditions such as MgCl₂ and primer concentration. Most of the present study performed real-time PCR for 35 cycles, but we

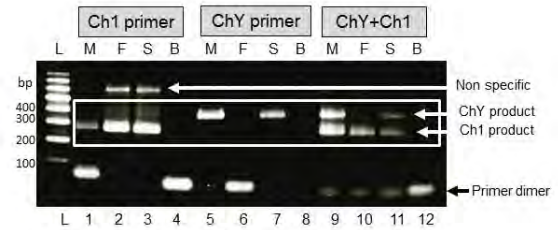


Figure 1 Conventional PCR used to detect chromosome 1 (Ch1) and chromosome Y (ChY). L=DNA Ladder, M=male white blood cell samples, F=female white blood cell samples, S=semen samples and B=blank. Lanes 1-4, chromosome 1 detection. Lanes 5-8, chromosome Y detection. Lanes 9-12, both chromosome 1 and Y detection (duplex PCR)

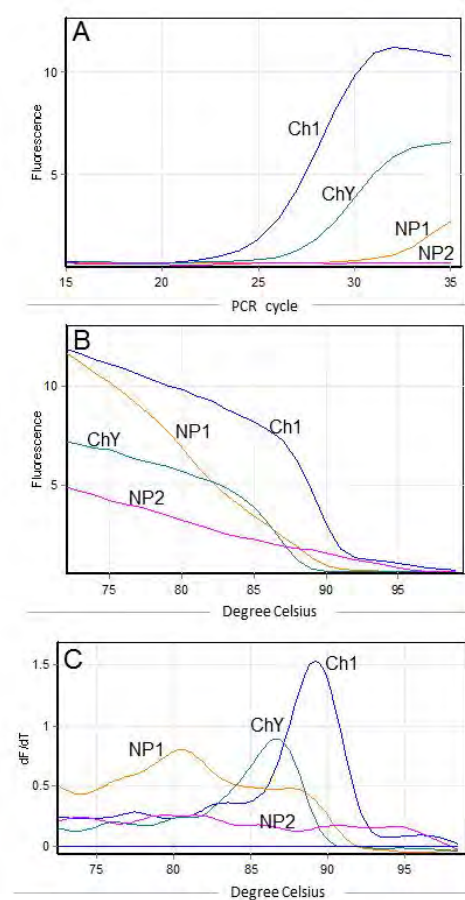


Figure 2 Identification of chromosome 1 (Ch1) and chromosome Y (ChY) using SYBR® green simplex real-time PCR and melt curve analysis. Samples are male white blood cells (Male), female white blood cells (Female) and no template control (NTC). (A) Fluorescence pattern of PCR product during PCR. (B) Fluorescence pattern of PCR product during PCR product melt. (C) Graph of melt curve analysis revealing specific peak for each PCR product. NS1 and NS2 are non-specific PCR products or primer dimer from NTC. NP1 represents samples with high amount of non-specific products while NP2 represents samples with small amount of nonspecific products

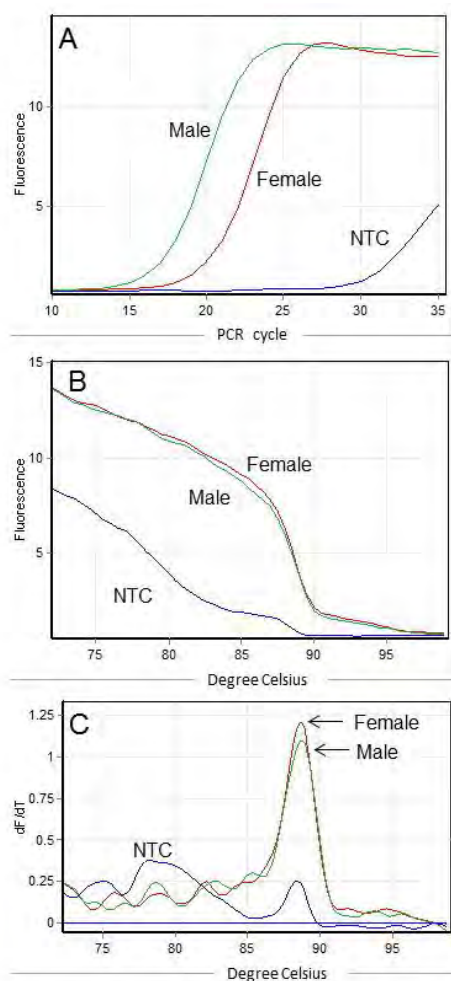


Figure 3 Fluorescence pattern of PCR product produced by SYBR® green duplex real-time PCR and melt curve analysis. Samples are male white blood cells (Male), female white blood cells (Female) and no template control (NTC). (A) Fluorescence pattern of PCR product during PCR. (B) Fluorescence pattern of PCR product during PCR product melt. (C) Melt curve analysis of real-time duplex PCR revealing similar melt peak pattern of male and female samples.

Figure 5 Sensitivity and specificity of SYBR® green real time PCR for chromosome Y detection. (A-C) Positive samples. (D-F) Negative samples. (A and D) PCR fluorescence pattern during PCR reaction, PCR product was raised before 25 cycles whereas nonspecific product was raised after 30 cycles. B and E are post PCR melt fluorescence pattern. C and F are melt curve analysis, the melt peak of PCR products ranged from 85-87°C. The threshold for df/dT unit of melt curve was 1.

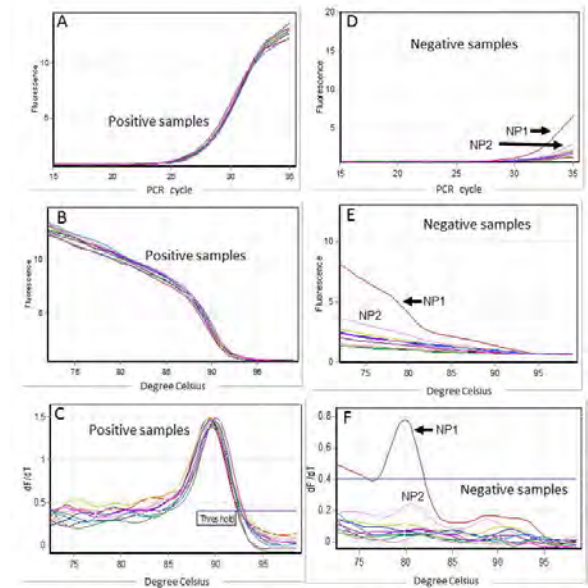
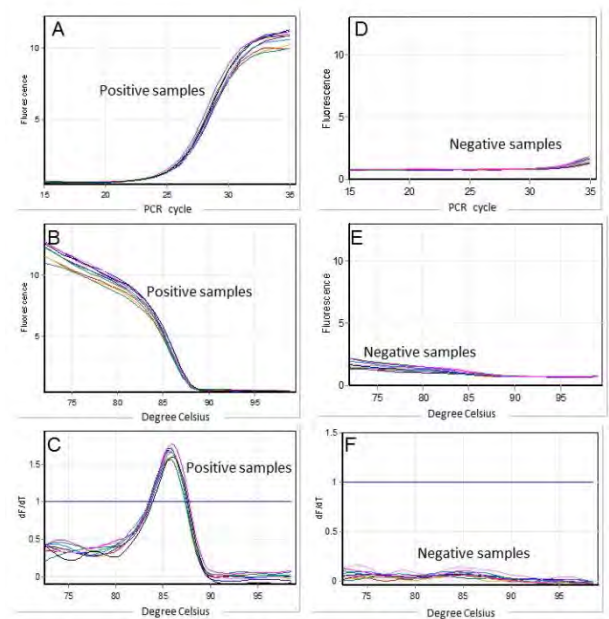


Figure 4 Sensitivity and specificity of SYBR® green real-time PCR and melt curve analysis for chromosome 1 detection. (A-C) Positive samples. (D-F) Negative samples. (A and D) PCR fluorescence pattern during PCR reaction, PCR products were raised before 25 cycles whereas non-specific product (NP) were raised after 30 cycles. (B and E) Post PCR melt fluorescence pattern. (C and F) Melt curve analysis, the melt peak of PCR products ranged from 88 to 90°C and the threshold for df/dT unit of melt curve was 0.4. The melt peak of primer dimer is 80°C. NP1 represents samples with high amount of nonspecific products while NP2 represents samples with small amount of nonspecific products



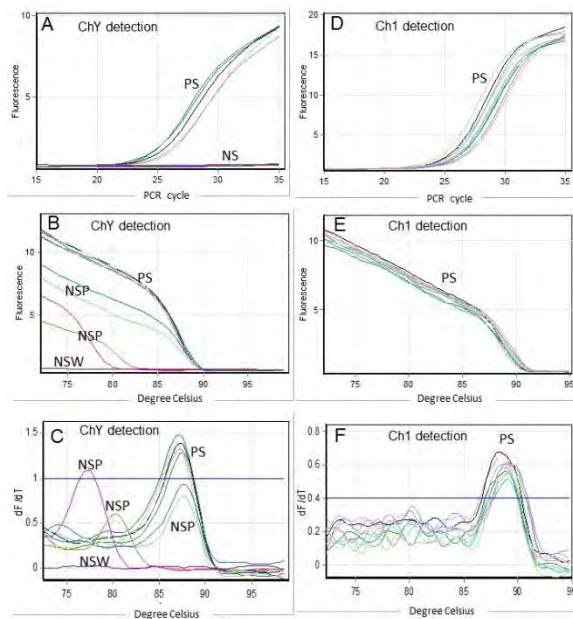


Figure 6 Sex identification of semen samples using single sperm SYBR® green real-time PCR. (A-C) Chromosome Y detection. (D-F) Chromosome 1 detection. PS represents positive sample (Sperm Y). NS represents a negative samples (Sperm X). NSP represents a negative sample with nonspecific products (Sperm X). NSW represents a negative sample without nonspecific products (sperm X).

found that it was possible to reduce the cycle to 30 cycles.

In conclusion, this is the first report using single sperm SYBR® green real-time PCR technique together with melt curve to identify the sex of sperm. This technique is fast, accurate and effective. It can be used to identify the sex of a single sperm and other cells. Further development of this method might be applicable to apply in single sperm typing in other genes or chromosomes and other species for research and diagnosis.

Acknowledgements

We thank the staff from the Semen laboratory and Molecular unit for their collaboration and expertise on this project. Dr. Neel Aziz and Dr. Nlin Arya for their English proof reading. This project was funded by the Thailand Research Fund (TRF; MRG5580026) and the Faculty of Veterinary Science, Mahidol University to Dr. Tuempong Wongtawan.

References

Abdulmawjood A, Krischek C, Wicke M, and Klein G 2012. Determination of pig sex in meat and meat products using multiplex real time-PCR. *Meat Sci.* 91(3): 272-276.

Ballester M, Castello A, Ramayo-Caldas Y, and Folch JM 2012. A Quantitative Real-Time PCR Method Using an X-Linked Gene for Sex Typing in Pigs. *Mol Biotechnol.* 54(2): 493-496.

Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, and Little S 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res.* 25(16): 3235-3241.

Choi SC, Bae MS, Lee ES, Kim SO, Kim BK, Yang JH, Jeon CE, Kim HH, Hwang YJ, Lee ES, and Kim DY 2009. Amplification of Porcine SRY Gene for Sex Determination. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 22(8): 1107-1112.

Colley A, Buhr M, and Golovan SP 2008. Single bovine sperm sex typing by amelogenin nested PCR. *Theriogenology.* 70(6): 978-983.

Cui KH 1997. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis. *Mol Hum Reprod.* 3(1): 61-67.

Eisenberg ML, Murthy L, Hwang K, Lamb DJ, and Lipshultz LI 2012. Sperm counts and sperm sex ratio in male infertility patients. *Asian J Androl.* 14(5): 683-686.

Harton GL, and Tempest HG 2012. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl.* 14(1): 32-39.

Johnson LA, Rath D, Vazquez JM, Maxwell WM, and Dobrinsky JR 2005. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology.* 63(2): 615-624.

Kaeket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, and Chanapiwat P. 2012. Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *J Vet Med Sci.* 74(9): 1149-1153.

Langen M, Peters U, Korner U, Gissel C, Stanislawski D, and Klein G 2010. Semiquantitative detection of male pork tissue in meat and meat products by PCR. *Meat Sci.* 86(3): 821-824.

Li H, Cui X, and Arnheim N 1990. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(12): 4580-4584.

Lien S, Szyda J, Leeftang EP, Hubert R, Zhang L, Schmitt K, and Arnheim N 2002. Single-sperm typing. *Curr Protoc Hum Genet.* 32: 1.6.1-1.6.18.

Mergny JL, and Lacroix L 2003. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides.* 13(6): 515-537.

Mohammadi AA, Tetro JA, and Filion LG 2011. Epitope selection to male specific antigens for sex selection in swine. *J Reprod Immunol.* 89(1): 46-54.

Parati K, Bongioni G, Aleandri R, and Galli A 2006. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology.* 66(9): 2202-2209.

Parrilla I, Vazquez JM, Oliver-Bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, and Martinez EA 2003. Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by nick translation. *Reproduction.* 126(3): 317-325.

Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, and Conley AJ 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci.* 73(5): 1408-1415.

Ririe KM, Rasmussen RP, and Wittwer CT 1997. Product differentiation by analysis of DNA

- melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 245(2): 154-160.
- Rubes J, Vozdova M, and Kubickova S 1999. Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and Y. *Cytogenet Cell Genet.* 85(3-4): 200-204.
- Sathasivam K, Kageyama S, Chikuni K, and Notarianni E 1995. Sex determination in the domestic pig by DNA amplification using the HMG-box sequence. *Anim Reprod Sci.* 38(4): 321-326.
- Sembon S, Suzuki S, Fuchimoto D, Iwamoto M, Kawarasaki T, and Onishi A 2008. Sex identification of pigs using polymerase chain reaction amplification of the amelogenin gene. *Zygote.* 16(4): 327-332.
- Torner E, Bussalleu E, Briz MD, Gutierrez-Adan A, and Bonet S 2013. Sex determination of porcine embryos using a new developed duplex polymerase chain reaction procedure based on the amplification of repetitive sequences. *Reprod Fertil Dev.* 25(2): 417-425.
- Vazquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, and Martinez EA 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology.* 71(1): 80-88.
- Vossen RH, Aten E, Roos A, and den Dunnen JT 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat.* 30(6): 860-866.
- Wang D, Zhu HB, Guo JM, Lin B, Zhang LB, Hao HS, Du WH, and Zhao XM 2011. A Study of a Method to Assess the Purity of Sorted Bovine Semen Using Rapid Single-Sperm Sexing PCR. *J Anim Vet Adv.* 10(6): 750-756.
- Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, and Rodriguez-Martinez H 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology.* 65(4):73-787.

บทคัดย่อ

การตรวจเพศตัวสุจิในระดับเซลล์เดี่ยวแบบรวดเร็วโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเรียลไทม์โดยใช้ไซโตกรีนร่วมกับการวิเคราะห์กราฟของการสลายดีเอ็นเอ

วราภรณ์ กอชื่นจิตร¹ กัมพล แก้วเกษ^{2,3} ยินดี กิตยานันท์^{4,5} เต็มพงศ์ วงศ์ตะวัน^{1,2,6*}

การตรวจแยกเพศอสุจิ เป็นเทคนิคที่สำคัญที่จะใช้ในการหาปริมาณและอัตราส่วนของเพศตัวสุจิสุกร แต่เทคนิคที่ใช้กันทั่วไปในการตรวจเพศอสุจิของสุกร เช่น การติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง (FISH) และ การใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ตรวจตัวสุจิเป็นกลุ่มในน้ำเชื้อ (whole semen PCR) ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง การติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงเป็นเทคนิคที่แม่นยำ แต่ใช้เวลาในการตรวจนาน (มากกว่า 3 วัน) ในขณะที่การใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ตรวจตัวสุจิเป็นกลุ่มในน้ำเชื้อเป็นเทคนิคที่ทำได้เร็วกว่า (ใช้เวลา 3-6 ชม.) แต่มีความแม่นยำน้อยกว่าเพราะเป็นเทคนิคที่ใช้การประมาณการ จุดประสงค์ของการทดลองนี้คือ เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ที่จะเร็วกว่าการติดฉลากดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง แต่แม่นยำกว่าการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ตรวจตัวสุจิเป็นกลุ่มในน้ำเชื้อ ในการทดลองนี้คณะวิจัยได้พัฒนาเทคนิคที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจเพศอสุจิ โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเรียลไทม์กับเซลล์เดี่ยวโดยใช้ไซโตกรีน (single cell SYBR[®] green real-time PCR) ร่วมกับการวิเคราะห์กราฟการสลายดีเอ็นเอ (Melt curve analysis) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโครโมโซม 1 และโครโมโซมวาย เอ็นไซม์ KAPA SYBR[®] DNA polymerase และ เครื่อง Rotor gene PCR platform ในการทำการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ และใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวเดี่ยวจากสุกรทั้งเพศผู้และเพศเมียในการวิเคราะห์ความไวและความจำเพาะของเทคนิค จากผลการทดลองพบว่า เทคนิคนี้จะใช้เวลารวดเร็ว (<50 นาที) และแม่นยำ โดยความไวของเทคนิคประมาณร้อยละ 95-99 และร้อยละความจำเพาะ 100 มีโอกาสในการวิเคราะห์ตัวอย่างผิดพลาดประมาณ ร้อยละ 3 เมื่อทำการทดสอบกับน้ำเชื้อสุกรพบว่าในน้ำเชื้อที่มีตัวสุจิชายร้อยละ 52 และตัวสุจิเอ็กร้อยละ 48 ซึ่งตรงกับทฤษฎีว่าอัตราส่วนของตัวสุจิเอ็กรและตัวสุจิชายในน้ำเชื้อสุกรจะมีประมาณ 50:50 ผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าการตรวจเพศเซลล์อสุจิด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเรียลไทม์กับเซลล์เดี่ยวโดยใช้ไซโตกรีนนั้นเป็นเทคนิคที่รวดเร็วและแม่นยำ

คำสำคัญ: สุกร ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบเรียลไทม์ การตรวจเพศอสุจิ เซลล์เดี่ยว

¹ห้องปฏิบัติการเซลล์ทางชีวการแพทย์และสัตวแพทย์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

²ห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

³ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

⁴ภาควิชากายวิภาคศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงทุ่งพญาไท เขต ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

⁵สถาบันวิจัยชีวโมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

⁶ภาควิชาปรสิตวิทยาและสัตวศาสตร์ประยุกต์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: tuemping.wan@mahidol.edu

Effect of cryomedia and thawing extenders on survival of frozen-thawed X and Y boar sperm

Tuempong Wongtawan^{1,2,3*}, Varaporn Korchunjit¹, Kampon Kaeoket^{2,4}, Yindee Kitiyanant⁵

¹Laboratory of Cellular Biomedicine and Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Salaya campus, Nakhonpathom, 73170, Thailand.

²Semen Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Salaya campus, Nakhonpathom, 73170, Thailand.

³Department of Pre-clinic and Applied Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Salaya campus, Nakhonpathom, 73170, Thailand.

⁴Department of Clinical Science and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Mahidol University, Salaya campus, Nakhonpathom, 73170, Thailand.

⁵Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Phayathai campus, Bangkok, 10400, Thailand.

*Corresponding author: email tuempong.wan@mahidol.ac.th

Abstract

Boar semen cryopreservation was used for storage and distribution of highly genetic materials worldwide. It has been considered that plasma membrane X and Y sperm are different, therefore freezing and thawing process may affect X and Y sperm differently. The

objective of this study was to investigate the effect of cryopreservation on survival of X and Y sperm, particularly focus on the differences of cryomedia and thawing extenders. In this experiment we compared three cryomedia (CryoA, CryoB and CryoC) and three thawing extenders (BTS, Androstar[®] plus and Modena). Sperm swim-up technique was used to assess strongly survived sperm. Real time PCR was used to identify sex of sperm. The ratio of X-Y sperm in semen usually 50:50, but our results revealed that cryomedia and thawing extender could affect ratio of survived X and Y sperm, the specific combination of cryomedia and thawing extenders could significantly alter a survived X-Y sperm ratio. Using CryoC for semen freezing and BTS as thawing extender gave a higher number of survived swim-up Y sperm (62%) than control (51%). Conversely, semen freezing with CryoB and thawing with Androstar[®] plus gave a lower number of survived swim-up Y sperm (32%) than control (68%). Both treatment were statistic difference from the control ($P < 0.05$). In conclusion the present study revealed that using defined combination of cryomedia and thawing extender affected X-Y sperm ratio in vitro, however; more in vivo study need to test the possibility to apply in pig industry.

Keyword Boar semen, Cryopreservation, X and Y sperm

Introduction

Cryopreservation has been used to preserve and store biological samples including semen worldwide in many species (Barbas and Mascarenhas 2009). Cryopreserved semen can be used to help infertility patients (Gonzalez et al., 2012), effective management of farm animal breeding (Kaeoket et al., 2010a), fast distribution of high genetic samples (Buranaamnuay et al., 2010), and conservation of endangered species (Thongtip et al., 2004). However, semen

Manuscript

freezing and thawing process can damage sperm plasma membrane and cytoskeleton resulting in decreasing sperm motility and viability (Sa-Ardrit et al., 2006).

In the last decade many reports (Chen et al., 2012, De Canio et al., 2013) and patents (Spaulding 1990, Blecher and Detmar 2001, Hudson and Ravelich 2009, Cumming et al., 2010) using modern proteomic technology reveal the differences in protein expression between X and Y sperm, these proteins include sperm plasma membrane and cytoskeleton proteins. The variation of these proteins may produce a different physical and biochemical properties between X and Y sperm. In the present studies we hypothesised that cryopreservation might affect the survival of X and Y sperm differently. The objective of this study was to investigate the effects of cryomedia and thawing extenders on survival of frozen-thawed X and Y boar sperm.

Material and Methods

Animals

Three Duroc boars (1-3 years old) were used for semen collection by gloved hand technique. Microscopic sperm motility and morphology test was used to validate semen quality. Semen that had $\geq 70\%$ sperm motility and $\geq 80\%$ normal morphology was selected for cryopreservation. Three straws of frozen semen from each boar were randomly selected for the experiment. The research proposal of this project was approved by the Faculty of Veterinary Science-Animal Care and Use Committee (FVS-ACUC) of Mahidol University.

Sperm Cryopreservation

Sperm cryopreservation was slightly modified from previous reports (Wongtawan et al., 2006, Kaeoket et al., 2012). Three different formulas of cryomedia were used and named CryoA, CryoB and CryoC. Each cryomedia contained three extenders and were named Ext-1, Ext-2 and Ext-3. Ext-1 and Ext-3 were used in those three formulas, but different type of Ext-3. Firstly, semen was diluted 1:1 (v/v) with Ext-1 (Modena extender, Swine Genetics International, Iowa, USA). Then 50 mL diluted semen was cooled at 15°C for 120 min and centrifuged at $800 \times g$, 15°C for 10 min (Hettich Rotanta 460R, Andreas Hettich GmbH & Co, Germany). The supernatant was removed, and sperm pellet was re-suspended (2:1) with Ext-2, and was incubated at 5°C for 90 min. Three different formulas of Ext-2 were used. Ext-2A contained 2% King™ rice bran oil (Thai Edible Oil Ltd, Bangkok, Thailand) in LEY medium (80 mL of 11% lactose and 20 mL egg yolk) and was added to CryoA. Ext-2B contained 1% Biogrow™ rice bran and germ oil (Biogrow Ltd, Bangkok, Thailand) in LEY medium and was added to CryoB. Ext-2C was LEY medium and was added to CryoC. Thereafter sperm solutions were mixed with a half volume of Ext-3 (89.5% LEY extender with 9% v/v glycerol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1.5% v/v Equex-STM® (Nova Chemical, Pennsylvania, USA)). The sperm concentration finally was 1.0×10^9 sperm/mL, and it was loaded into 0.5 mL PVC straws (Bio-Vet, Z.I. Le. Berdoulet, France) and sealed with plasticine. Sperm were frozen in a controlled-rate freezer (IceCube 14s, Sy-lab, Neupurkersdorf, Austria). The cooling/freezing rate was as follows: 3°C/min from +5 to -5°C, 1 min of holding time and then 50°C/min from -5 to -140°C. After that, the straws were immediately plunged into liquid nitrogen (-196°C) for long term storage.

Thawing of frozen sperm

Straws of frozen sperm were plunged into water bath at 50°C for 12 sec. After that samples were gently diluted in 30 mL of 37 °C pre-warm thawing extender. Three commercial extenders: Modena (Swine Genetics International, Iowa, USA), Beltsville Thawing Solution

(BTS) (IMV Technology, L'Aigle, France) and Androstar[®] Plus (Minitube, Tiefenbach, Germany) were used as thawing extender.

Sperm swim up

After thawing, 30 mL of sperm in extender were incubated in 37 °C incubator for 15 min to allow strongly viable sperm to swim up to the surface of solution. Thereafter 10 mL of surface solution containing swim up sperm were collected for cell counting and quantification of X and Y sperm.

Real-time PCR

Real-time PCR has been used follow previously description (Korchunjit et al., 2014). KAPA SYBR[®]Fast qPCR Master Mix (2x) Universal (KAPA Biosystem, Woburn, MA USA) was used for PCR reaction. Primers were synthesised by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), the primer sequences has been designed and used in previous publications.(Rubes et al., 1999, Parrilla et al., 2003, Choi et al., 2009, Mohammadi et al., 2011, Korchunjit et al., 2014). Chromosome 1, (244 bp), forward primer: 5' GTTGCACTTTTCACGGACGCAGC 3', and reverse primer: 5' CTAGCCCATTGCTCGCCATAGC 3'. Chromosome Y, (377 bp), forward primer: 5' AATCCACCATACTCATGGACC 3', and reverse primer: 5' TTTCTCCTGTATCCTCCTGC 3'. The PCR platform was Rotor gene 6000 (Qiagen, Hilden, Germany). The fluorescence pattern, melt curve analysis and quantification analysis were performed using Rotor gene software 6.1 (Qiagen, Hilden, Germany).

Real-time PCR reaction program protocol: Step 1, Pre-denaturation (95 °C for 1 min); Step 2, cycling, 95 °C for 5 sec (denaturation), 58 °C for 20 sec (annealing), performed 30-35 cycles; Step 3, final extension, 72 °C for 3 min; Step 4, post PCR Melt setting, temperature was

increased from 72 °C to 99 °C by rising 1 °C each step, waited for 15 sec on first step and 4 sec on each step afterwards.

Quantification of X and Y sperm

Approximate comparison of three cryomedia and three thawing extenders was performed using total sperm PCR and comparative quantification of Y sperm. Thereafter the best combinations of cryomedia and thawing extender were selected based on the preference of sperm sex. The preference of sperm sex by defined combinations of cryomedia and thawing extender were validated using single sperm real-time PCR and melt curve analysis.

Comparative quantification

Comparative or relative quantification (Pfaffl 2006) of Y chromosome from whole semen was used to approximately measure and compare Y sperm between samples. It was cheaper and quicker, but less accurate than single sperm detection. DNA of total sperm was extracted by using Azupure DNA purification kit (BIOTEC, Bangkok, Thailand). Quantification of chromosome 1 was performed and used to normalisation of chromosome Y quantification. Comparative quantification was performed after finishing real-time PCR by using function comparative quantification in Rotorgene 6.1 software (Qiagen, Hilden, Germany). The results were report fold time difference between samples. Three internal replication of PCR were used for one sample.

Single sperm sex identification

Single sperm were collected and lysed as a previous report (Korchunjit et al., 2014). Briefly sperm was diluted in 0.1% Poly vinyl alcohol (PVA)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in Phosphate buffer saline (PBS)(PAA, GE Health Care, Velizy-Villacoublay, France) on 10 cm petri dish (Sterilin, Newport, U.K.), and observed under inverted microscope (Olympus,

Manuscript

Tokyo, Japan) using 400x magnification. Single sperm was collected using mouth pipette into 20 µl PCR tube, and lysed with 5 µL of lysis buffer contained 200 mM KOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 50 mM DTT (Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia), incubated at 65 °C for 10 min. Then 5 µL of neutralising buffer contained 900 mM Tris-Cl, pH8.3 (Promega, Madison, WI, USA), 300 mM KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 200 mM HCl (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), was added. Fifteen microliter of KAPA® PCR master mix with primer was added before performing real-time PCR. Analysis of chromosome Y and chromosome 1 was done based on the fluorescence pattern following the previous publication (Korchunjit et al., 2014).

Statistical analysis

Comparative quantification of Y sperm was presented as Mean±SD, and statistical difference was analysed using ANOVA and student's t test. Sex identification by single sperm real-time PCR technique was represented as percentage of Y and X sperm, and statistical difference was calculated using Chi-square technique. SPSS version 19 statistic software was used under Mahidol University license.

Results

Effect of cryomedia on survival of X and Y sperm

In this experiment we tested whether cryomedia affect survival of X and Y sperm differently. Three different cryomedia (CryoA, CryoB and CryoC) were used and sperm swim-up technique was performed to select strongly survived sperm. Modena thawing extender was used to dilute sperm. Swim-up sperm was counted and chromosome Y was relatively quantified.

Manuscript

The results showed that CryoB tend to give a higher number of swim-up sperm than other cryomedia (Table 1). CryoA seem to give a relatively highest number of Y sperm whereas CryoC seem to give relatively lowest number of Y sperm (Table 1). However, no statistical difference ($P>0.05$) was found between cryomedia.

Table 1 Effect of cryomedia on number of swim-up sperm and relative number of Y spermatozoa (Mean $\pm$ SD)

Cryomedia	CryoA	CryoB	CryoC
No. of swim-up sperm ($\times 10^5$)	155 $\pm$ 69	169 $\pm$ 24	151 $\pm$ 25
Comparative Quantification	1.01 $\pm$ 0.14	0.89 $\pm$ 0.28	0.86 $\pm$ 0.38

No statistical difference between treatments $P>0.05$.

Effect of thawing extenders on survival of X and Y sperm

In this experiment we tested whether thawing extenders used after thawing frozen semen could affect survival of X-Y sperm differently. Three different thawing extenders (Modena, BTS, Androstar[®] plus) were used and swim up method were used for select strongly survived sperm. Modena extender tends to give a higher number of swim-up sperm than other extenders (Table 2). BTS gave give highest number of Y sperm whereas Androstar[®] plus gave lowest number of Y sperm (Table 2); however, no statistical difference ($P>0.05$) was found between thawing extenders.

Table 2 Effect of thawing extenders on number of swim-up sperm and relative number of Y spermatozoa (Mean $\pm$ SD)

Manuscript

Thawing extender	Androstar		
	[®] plus	BTS	Modena
No. of swim-up sperm (x10 ⁵)	174±56	182±49	184±49
Comparative Quantification	1.00±0.00	1.49±0.77	1.07±0.25

No statistical difference between treatments P>0.05

Defined combination of cryomedia and thawing extender can separate X and Y sperm

Although no statistical difference was found from initial experiments, our results suggested that combining specific cryomedia and thawing extenders may use to select X and Y sperm from frozen-thawed semen. For Y sperm selection, we froze semen with CryoA and diluted frozen-thawed semen with BTS. For X sperm selection we froze sperm with CryoC and diluted frozen-thawed semen with Androstar[®] plus. Identification of X and Y sperm was performed using single-sperm real-time PCR and the percentage of X and Y sperm was calculated. The results showed that a combination of CryoA and BTS gave 62% of swim-up Y sperm and 38% of X sperm. Whereas a combination of CryoC and Andro star[®] plus gave 32% of swim-up Y sperm and 68% X sperm (Table 3). Both treatments were statistical difference from the control (P<0.05).

Table 3 Sperm sexing using specific combination of cryomedium and thawing extender.

Percentage of X-Y spermatozoa was analysed using single sperm real-time PCR.

Freeze/Thaw solution	% Sperm (n)
----------------------	-------------

Manuscript

	Y	X	P Value
CryoA+BTS	62 (124)	38 (76)	P = 0.03
CryoC+Androstar [®] plus	32 (64)	68 (136)	P=0.0002
Control sperm	51 (102)	49 (98)	

*Control sperm was randomly selected from frozen-thawed semen before performing swim-up technique.

Discussion

In these studies we found the different effect of cryopreservation on survival of X and Y sperm. The ratio of survived frozen-thawed X and Y sperm in vitro depended on combination of cryomedia and thawing extenders. Y sperm preferred combination of CryoA (Cryomedium) and BTS (Thawing extender) whereas CryoC and Androstar[®] plus favoured X sperm survival.

The different effect of cryopreservation on X and Y sperm may explain by a different composition of cell membrane. There are several reports show that X and Y sperm contain different expression of membrane proteins (Cumming et al., 2010, Chen et al., 2012, De Canio et al., 2013). The effect of cryomedia and thawing extender on cryopreserved X and Y sperm may due to the interaction of media component to sperm membrane protein and lipid. CryoA contains rice bran oil which includes fatty acid, vitamin E and oryzanol (Rukmini and Raghuram 1991). Fatty acid may integrate into cell membrane and alter structure of rate into lipid cell membrane while oryzanol and vitamin E have antioxidant property. Recent reports reveals that addition of rice bran oil (Kaeoket et al., 2012) or vitamin E (Mendez et al., 2013) can benefit sperm quality of cryopreserved boar. This mechanism involves the prevention of lipid oxidation and protein peroxidation (Parrado et al., 2003). Androstar[®] plus extender differ from BTS in which it contains bovine serum albumin (BSA) and Hepes (Gadea 2003).

Manuscript

Albumin in Androstar® plus extender may interact with plasma membrane by provide antioxidant protection and promote change of cholesterol (Aitken and Nixon 2013). It help to maintain sperm quality (sperm motility and acrosomal integrity) in 8 day of cold storage (Kaeoket et al., 2010b).

The record of 203 woman in artificial insemination program from 1987-1994, using standard cryopreservation of human sperm revealed that more male children are born more than female (101 vs 83) (Sidhu et al., 1997), but several studies revealed that chromosome and sex ratios of sperm are not affected by cryopreservation (X=53.5%) (Chernos and Martin 1989, Martin et al., 1991, Pu and Chen 2002). However, differ from our study the record from human infertility clinic does not compare directly between cryopreservation medium and thawing extender.

Normally cryopreserved boar sperm are not popular in pig AI due to lower pregnancy rate and farrowing number (Wongtawan et al., 2006). It has been used specifically in genetically valuable breeder (Didion et al., 2013). The ability to select sex of sperm may increase the value of cryopreserved boar sperm.

Notably, the result of our *in vitro* study may not directly represent the *in vivo* result due to many factors involve during fertilisation and implantation. Therefore, further *in vivo* investigation will be essential, especially on practical application and sex ratio of the offspring.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF; MRG5580026), and the Faculty of Veterinary Science, Mahidol University to Dr. Tuempong Wongtawan.

References

- Aitken RJ, and Nixon B. 2013. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod.* 19(12): 785-793.
- Barbas JP, and Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10(1): 49-62.
- Blecher SR, and Detmar J. 2001. Sex-chromosome-specific proteins, species specific and sperm specific proteins and methods for their identification and isolation. In *WIP Organisation* (ed.). Canada: University Of Guelph.
- Buranaamnuay K, Wongtawan T, Masuwatana S, Tummaruk P, and Techakumphu M. 2010. Intra-uterine and deep intra-uterine insemination using cryopreserved boar semen in spontaneously-ovulating sows. *Thai J Vet Med.* 40(2): 215-219.
- Chen X, Zhu H, Wu C, Han W, Hao H, Zhao X, Du W, Qin T, Liu Y, and Wang D. 2012. Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa. *J Proteomics.* 77(59-67).
- Chernos JE, and Martin RH. 1989. A cytogenetic investigation of the effects of cryopreservation on human sperm. *Am J Hum Genet.* 45(5): 766-777.
- Choi SC, Bae MS, Lee ES, Kim SO, Kim BK, Yang JH, Jeon CE, Kim HH, Hwang YJ, Lee ES, and Kim DY. 2009. Amplification of Porcine SRY Gene for Sex Determination. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* 22(8): 1107-1112.
- Cumming IR, Brewis IA, and Pitts SA. 2010. Identification of sex-linked proteins. In *WIP Organisation* (ed.). United Kingdom: Ovasort Limited.
- De Canio M, Soggiu A, Piras C, Bonizzi L, Galli A, Urbani A, and Roncada P. 2013. Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation. *Mol Biosyst.*
- Didion BA, Braun GD, and Duggan MV. 2013. Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Anim Reprod Sci.* 137(3-4): 189-196.
- Gadea J. 2003. *Spanish Span J Agric Res.* 1(2): 17-27.
- Gonzalez C, Boada M, Devesa M, and Veiga A. 2012. Concise review: fertility preservation: an update. *Stem Cells Transl Med.* 1(9): 668-672.
- Hudson K, and Ravelich S. 2009. Materials and methods for sperm sex selection. In *WIP Organisation* (ed.). USA: Androgenix Ltd.
- Kaeoket K, Chanapiwat P, Wongtawan T, and Kunavongkrit A. 2010a. Successful intrauterine insemination (IUI) with frozen boar semen: effect of dose, volume and fixed-time AI on fertility. *Thai Journal of Agricultural Science.* 43(1): 31-37.
- Kaeoket K, Donto S, Nualnoy P, Noiphinit J, and Chanapiwat P. 2012. Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *J Vet Med Sci.* 74(9): 1149-1153.
- Kaeoket K, Srisowanna T, Wichaidit U, Chanapiwat P, and Manee-in S. 2010b. Comparative Study on Six Different Long Term Commercial Extenders for Fresh Boar Semen. *Thai J Vet Med.* 40(3): 257-263.
- Korchunjit V, Kaeoket K, Kitiyanant Y, and Wongtawan T. 2014. Rapid Single Cell Typing using SYBR® Green Real-Time PCR Together with Melt Curve Analysis for Sex Identification of Porcine Sperm. *Thai J Vet Med.* 44(1): 41-48.

- Martin RH, Chernos JE, and Rademaker AW. 1991. Effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm. *Mol Reprod Dev.* 30(2): 159-163.
- Mendez MF, Zangeronimo MG, Rocha LG, Faria BG, Pereira BA, Fernandes CD, Chaves BR, Murgas LD, and Sousa RV. 2013. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal.* 7(5): 793-798.
- Mohammadi AA, Tetro JA, and Fillion LG. 2011. Epitope selection to male specific antigens for sex selection in swine. *J Reprod Immunol.* 89(1): 46-54.
- Parrado J, Miramontes E, Jover M, Marquez JC, Angeles Mejias M, Collantes De Teran L, Absi E, and Bautista J. 2003. Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran. *Eur J Nutr.* 42(6): 307-314.
- Parrilla I, Vazquez JM, Oliver-Bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, and Martinez EA. 2003. Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by nick translation. *Reproduction.* 126(3): 317-325.
- Pfaffl MW 2006 Relative quantification. UK.: Taylor & Francis Group.
- Pu J, and Chen ZX. 2002. [The effect of cryopreservation on human sperm chromosome]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 8(1): 45-47.
- Rubes J, Vozdova M, and Kubickova S. 1999. Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and Y. *Cytogenet Cell Genet.* 85(3-4): 200-204.
- Rukmini C, and Raghuram TC. 1991. Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. *J Am Coll Nutr.* 10(6): 593-601.
- Sa-Ardrit M, Saikhun J, Thongtip N, Damyang M, Mahasawangkul S, Angkawanish T, Jansittiwate S, Faisaikarm T, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, and Pinyopummin A. 2006. Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Int J Androl.* 29(2): 346-352.
- Sidhu RS, Sharma RK, and Agarwal A. 1997. Effects of cryopreserved semen quality and timed intrauterine insemination on pregnancy rate and gender of offspring in a donor insemination program. *J Assist Reprod Genet.* 14(9): 531-537.
- Spaulding GF 1990 Sex-associated membrane proteins and methods for increasing the probability that offspring will be of a desired sex. In WIP Organisation (ed.). USA: CYTOGAM, INC.
- Thongtip N, Saikhun J, Damyang M, Mahasawangkul S, Suthunmapinata P, Yindee M, Kongsila A, Angkawanish T, Jansittiwate S, Wongkalasin W, Wajjwalkul W, Kitiyanant Y, Pavasuthipaisit K, and Pinyopummin A. 2004. Evaluation of post-thaw Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa using flow cytometry: the effects of extender and cryoprotectant. *Theriogenology.* 62(3-4): 748-760.
- Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, and Rodriguez-Martinez H. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology.* 65(4): 773-787.