

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5580005

ชื่อโครงการ: การคัดแยกเพศอสุจิของโคนมด้วยวิธี discontinuous PureSperm® gradients

ชื่อนักวิจัย: คณางค์ บุรณะอำนาจ และคณะ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: ningkakanang@yahoo.com (คณางค์ บุรณะอำนาจ)

ระยะเวลาโครงการ: 1 ปี (กรกฎาคม 2555 – กรกฎาคม 2556)

งานวิจัยชิ้นนี้ขึ้นเพื่อศึกษาถึงผลของการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อโคนมผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสาร PureSperm® และ OptiPrep™ ที่มีต่อคุณภาพเชื้ออสุจิและสัดส่วนของเพศตัวอ่อนที่ได้ โดยแบ่งน้ำเชื้อสดที่รีดได้จากโคนมแต่ละตัว (n=12) ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (I) เป็นน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศ ซึ่งจะถูกนำไปแช่แข็งกับสารละลายทริสและไข่แดง กลุ่มคัดแยกเพศ เป็นน้ำเชื้อที่ถูกนำไปปั่นเหวี่ยง (500g นาน 20 นาที) ผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้น (จำนวน 8 ชั้น) ของสาร PureSperm® (II), OptiPrep™ (III) และ Percoll (IV) ก่อนนำตะกอนที่ก้นหลอดซึ่งคาดว่าจะ เป็นเชื้ออสุจิเพศเมียไปแช่แข็งด้วยสารละลายชนิดเดียวกันกับกลุ่มควบคุม นำตัวอย่างแช่แข็งทั้ง 4 กลุ่มมา อุ่นละลาย ตรวจสอบคุณภาพและนำไปปฏิสนธิกับไข่ในห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบเพศของตัวอ่อนด้วยวิธี ปฏิกริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่าหลังอุ่นละลาย ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อสุจิมีรูปร่างโครโมโซมเป็นปกติ และอสุจิมียึดหุ้มสมบูรณ์ในกลุ่ม PureSperm® (II) และ Percoll (IV) มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (I) ($P>0.05$) และมีค่ามากกว่ากลุ่ม OptiPrep™ (III) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.0001$ ถึง $P=0.03$) สัดส่วนของตัวอ่อนเพศเมียที่ได้จากอสุจิซึ่งผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารทั้ง 3 ชนิดมีค่าไม่แตกต่างกับค่าของกลุ่ม ควบคุม (58.8%, 61.6%, 61.0% และ 54.3%, สำหรับตัวอย่างกลุ่ม I, II, III และ IV ตามลำดับ, $P>0.05$) จึงได้ข้อสรุปว่า การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อโคนมผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสาร PureSperm® นั้นไม่ ส่งผลเสียต่อคุณภาพของเชื้ออสุจิ อย่างไรก็ตาม สาร PureSperm® และ OptiPrep™ ไม่สามารถทำให้ สัดส่วนของตัวอ่อนเพศเมียในตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงได้

คำหลัก: โค การปั่นเหวี่ยง อสุจิเพศเมีย การปฏิสนธิในหลอดแก้ว พีซีอาร์

Abstract

Project Code: TRG5580005

Project Title: Separation of X- and Y-bearing bovine sperm through discontinuous PureSperm[®] gradients, evaluated by *in vitro* embryo production and polymerase chain reaction (PCR)

Investigators: Kakanang Buranaamnuay et al., Mahidol University

E-mail Address: ningkakanang@yahoo.com (K. Buranaamnuay)

Project Period: 1 year (July 2012 – July 2013)

Influence of 8-layer PureSperm[®] and OptiPrep[™] density gradients on the quality of bovine sperm and the sex ratio of *in vitro* produced embryos was evaluated. Fresh semen (n=12) with the sperm motility of at least 65% was divided into four aliquots. One aliquot served as a non-centrifuged control sample was frozen in Tris-egg yolk extender. The other three were applied to 8-layer gradients in PureSperm[®] (II), OptiPrep[™] (III), or Percoll (IV). After centrifugation, the sperm pellet was added with the extender and then frozen. The thawed semen was evaluated for the sperm quality; the sex ratio of sperm was determined in the *in vitro* produced embryos by multiplex PCR. The viability, acrosome morphology and membrane integrity (HOST) of thawed sperm in the PureSperm[®] and Percoll groups were similar to the control ($P>0.05$) and were significantly higher than those in the OptiPrep[™] ($P<0.0001$ to $P=0.03$). The PureSperm[®], OptiPrep[™] and Percoll centrifugations did not show a significant increase in X-bearing sperm in the pellet (61.6%, 61.0% and 54.3%, respectively) compared to the control sample (58.8%, $P>0.05$). In conclusions, centrifugation of fresh bovine semen in discontinuous 8-layer PureSperm[®] gradients did not damage the survival of frozen-thawed sperm. However on the basis of testing in the *in vitro* produced embryos by multiplex PCR, discontinuous PureSperm[®] and OptiPrep[™] gradient centrifugations were not able to deviate the sex ratio of bovine sperm.

Keywords: Bovine, Centrifugation, X-bearing sperm, IVF, PCR