

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของโปรตีนในเซมินอลพลาสมาของพ่อแพะที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน และ/หรือโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแพะอายุระหว่าง 2-5 ปี จำนวน 20 ตัว นำมาตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อเพื่อเก็บข้อมูลการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและรูปร่างของตัวอสุจิ น้ำเชื้ออีกส่วนหนึ่งนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเซมินอลพลาสมาไปแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE แล้วใช้สี Coomassie Brilliant blue ย้อมแผ่นเจล โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โปรตีนจุดที่ถูกวิเคราะห์ว่ามีปริมาณการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างพ่อแพะทดลอง หรือพบมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ ถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค LC MS/MS ข้อมูลอัตราการตั้งท้องที่ใช้ น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อแพะแต่ละตัวไปผสมเทียม ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้โมเดลทางสถิติเพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้อง ได้แก่ โปรตีนที่แสดงออกแตกต่างกัน จำนวนครั้งในการผสม ลำดับครอกของแม่แพะ การแสดงการเป็นสัด คะแนนความสมบูรณ์ของร่างกายแม่แพะ ฤดูกาล และเจ้าหน้าที่ผู้ทำการผสมเทียม ซึ่งข้อมูลนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ กรมปศุสัตว์ ผลการศึกษาพบว่า คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อแพะทดลองมีคุณภาพดี ซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่และรูปร่างของตัวอสุจิปกติสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ อัตราการตั้งท้องมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 47.95 เปอร์เซ็นต์ ผลการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE พบโปรตีนมากกว่า 213 จุด ที่มีค่า pI และ M_r ระหว่าง 3-10 และ 10-97 kDa ตามลำดับ และพบว่ามีโปรตีนที่มีปริมาณมากปรากฏบนแผ่นเจลในช่วง M_r ระหว่าง 10-16 kDa ผลจากการจำแนกพบว่า คือ โปรตีน PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like, PREDICTED: spermadhesin Z13-like, และ PREDICTED: caltrin-like ที่จำเพาะกับ *Capra hircus* การศึกษาครั้งนี้พบสิ่งที่น่าสนใจคือ โปรตีน PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ซึ่งปรากฏแตกต่างกันในระหว่างพ่อแพะแต่ละตัว อย่างไรก็ตาม จากผลการวิเคราะห์ด้วยโมเดลทางสถิติพบว่า การแสดงออกที่แตกต่างกันของโปรตีนชนิดนี้ไม่มีอิทธิพลต่ออัตราการตั้งท้อง ซึ่งไม่เหมือนกับปัจจัยอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน PREDICTED: caltrin-like (pI/ M_r เท่ากับ 10/ 10 kDa) มีและไม่มีปรากฏบนแผ่นเจลแตกต่างกันในพ่อแพะแต่ละตัว แต่เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้มีค่า pI ประมาณ 10 ซึ่งเป็นช่วงที่เป็นข้อจำกัดในการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE จึงได้ทำการนำตัวอย่างของเซมินอลพลาสมาของพ่อแพะทดลองทั้งหมด ไปแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และจำแนก

ด้วยเทคนิค LC MS/MS เพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง ผลการศึกษาพบว่า แลบโปรตีนขนาด 10 kDa ปรากฏในปริมาณที่แตกต่างกันบนเจลของตัวอย่างเซมินอลพลาสมาจากแพะแต่ละตัว และผลจากการจำแนกโปรตีนแถบนี้พบว่า เป็นชิ้นส่วนเปปไทด์ของโปรตีน PREDICTED: caltrin-like แต่อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการแยกโปรตีนด้วย 2 เทคนิคนี้ไม่เป็นไปในทำนองเดียวกัน จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาต่อไปด้วยเทคนิค Western blot ผลจากการศึกษารั้งนี้สรุปได้ว่า โปรตีนที่พบปริมาณมากใน เซมินอลพลาสมาของพ่อแพะ คือ PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like, PREDICTED: spermadhesin Z13-like, และ PREDICTED: caltrin-like การแสดงออกที่แตกต่างกันของโปรตีน PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like ทั้ง 4 รูปแบบ ไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อแพะ

คำสำคัญ: โปรตีนในเซมินอลพลาสมาของแพะ, MS, 2D-PAGE

Abstract

The objective of this study was to investigate the proteins in caprine seminal plasma and identify one(s) that differently expressed and/or associated with male fertility. Semen samples from 20 experimental bucks, 2-5 years of age, were assessed for semen quality in terms of spermatozoa motility and morphology. The aliquot of semen samples from each buck was centrifuged for collecting the seminal plasma. The seminal plasma samples were separated using 2D-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant blue. At least three replicate gels were performed for each sample. The proteins that expressed differently and/or related with pregnancy rate were cut from the gels and identified by LC MS/MS. The history pregnancy data using frozen semen insemination of each buck, from the years 2012 to 2017, were provided by Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Department of Livestock Development, Thailand. The multiple logistic regression analysis was used to estimate the effect of different protein expression and other factors; number of insemination, parity of the does, estrus, body condition score, season, and AI technician on pregnancy rate. The results of semen quality assessment of 20 experimental bucks showed good-quality semen which classified as >70% spermatozoa motility and >70% normal spermatozoa morphology. For fertility, in term of pregnancy rate, the average of pregnancy rate of the experimental bucks was 47.95 percent. The results obtained from 2D-PAGE showed more than 213 protein spots with a pI of pH 3-10 and M_r of 10-97 kDa could be detected in caprine seminal plasma. Of all these spots, there were proteins at molecular weight approximately 10-16 kDa expressed in a large amount on the gel. Identification of these protein spots matched to PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like, PREDICTED: spermadhesin Z13-like, and PREDICTED: caltrin-like, in *Capra hircus*. Interestingly, the 4 different expression patterns of PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like differently showed among bucks.

However, these protein patterns were not significantly associated with pregnancy rate ($p>0.05$) whereas the other factors had effect ($p<0.05$). In addition, this study also detected the different expression of PREDICTED: caltrin-like protein spot on the 2D gel at the pI 10 and M_r 10 kDa. Some bucks showed the high relative protein content on 2D gels whereas the other was absent. Due to the determined pI of this protein was at 10.0 and the limitation on 2D-PAGE performing to separate the basic proteins, the SDS-PAGE and MS were repeatedly conducted to clarify this point. The results obtained from SDS-PAGE separating showed that the protein band intensity among seminal plasma samples were different expression on 1D-gels especially at approximately 10 kDa. The identification results also showed the peptides abundant of 3 peptide fragments of PREDICTED: caltrin-like varied among bucks. Unfortunately, the results obtained from 2D-PAGE and SDS-PAGE was not consistent. The further western blot studies should be conducted to discovery this mysterious protein. In conclusion, the major proteins in caprine seminal plasma were PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like, PREDICTED: spermadhesin Z13-like, and PREDICTED: caltrin-like. The PREDICTED: seminal plasma protein PDC 109-like expressed in the 4 different patterns and it was not related to buck fertility.

Keywords: Caprine seminal plasma proteins, MS, 2D-PAGE