เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(1): 9-19

บทความต้นฉบับ

การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะพื้นเมืองไทย

ศรุติวงศ์ บุญคง[1], ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์[1,2*], ทศพล มูลมณี[1], จิรัฐติ ธรรมศิริ[1], วิไลวรรณ ขันธุแสง[1], อารีย์ ไกรสูรย์[1]

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2]ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน (ABRCSE) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ วัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อ และแพะพื้นเมืองไทยโดยประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP โดยเก็บรังไข่โคและแพะ นำมาเจาะดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิล ประเมินอัตราการเก็บโอโอไซต์และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพาะเลี้ยงใน TCM-199 ที่ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระทั่งได้โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ ทำการปฏิสนธิและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินอัตราการปฏิสนธิ จากนั้นเพาะเลี้ยงตัวอ่อนต่อไปอีกจนถึงระยะมอรูล่า ทำการแช่แข็งตัวอ่อน และเก็บตัวอ่อนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เพื่อรอการคัดเพศ สุ่มตัวอย่างตัวอ่อนโคจำนวน 35 ตัวอย่าง และตัวอ่อนแพะ 18 ตัวอย่าง เพื่อสกัด DNA และเพิ่มจำนวนโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาคัดเพศโดยวิธี LAMP โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม LAMP กลุ่ม LAMP เสริมด้วย ethidium bromide (EB) ที่ความเข้มข้น 1 mM และกลุ่ม LAMP เสริมด้วย $CuSO_4$ (CS) ที่ความเข้มข้น 1 M ผลการศึกษาพบว่า การคัดเพศในโคโดยการเสริม EB (100.0%) ให้ผลดีกว่าการเสริมด้วย CS (74.3%) และกลุ่มควบคุม (57.2%)($P<0.01$) ความแม่นยำในโคโดยการเสริม EB (42.5%) สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม CS (35.0%) และกลุ่มควบคุม (22.5%)($P>0.05$) การคัดเพศในแพะโดยการเสริม EB (77.9%) สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม CS (61.1%) และกลุ่มควบคุม (38.9%)($P>0.05$) ความแม่นยำในแพะโดยการเสริม CS (50.0%) สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม EB (30.8%) และกลุ่มควบคุม (19.2%)($P>0.05$) ดังนั้น สรุปได้ว่า 1) การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP โดยการเสริม EB ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ 2) การเสริม CS ที่ความเข้มข้น 1 M ไม่สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะได้ **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2556; 11(1): 9-19**

คำสำคัญ: ปฏิกิริยา LAMP, การคัดเพศตัวอ่อน, โค, แพะ

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่: ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทรศัพท์: (043) 202362, โทรสาร: (043) 202362; E-mail address: chanav@kku.ac.th
ได้รับบทความวันที่ 17 ธันวาคม 2555

บทนำ

ในปัจจุบันยังไม่มีการอนุรักษ์โคและแพะพื้นเมืองไทยอย่างจริงจัง โคและแพะที่เกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงจะเป็นพันธุ์ลูกผสม ทำให้พันธุกรรมที่ดีของโคและแพะพื้นเมืองไทยมีการเปลี่ยนแปลงหรือสูญหายไป การเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยได้มีการนำเอาเทคโนโลยีต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ เช่น การผสมเทียม โดยการรีดน้ำเชื้อจากสัตว์พ่อพันธุ์แล้วนำไปฉีดเข้าในอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ตัวเมีย เมื่อสัตว์ตัวเมียนั้นแสดงอาการของการเป็นสัดแล้วทำให้เกิดการตั้งท้องแล้วคลอดออกมาตามปกติ ซึ่งเทคโนโลยี นี้ ทำให้ประหยัดพ่อพันธุ์เมื่อรีดเก็บน้ำเชื้อจากสัตว์พ่อพันธุ์ได้แต่ละครั้งสามารถนำมาละลายน้ำเชื้อแล้วแบ่งใช้ผสมกับสัตว์ตัวเมียได้จำนวนมาก มีส่วนทำให้การปรับปรุงพันธุกรรมของสัตว์มีความก้าวหน้าเพิ่มขึ้น ต่อมามีการประยุกต์ใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยมีการนำเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เป็นการนำตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างตัวอสุจิของพ่อพันธุ์และไข่ของแม่พันธุ์ที่คัดเลือกไว้ ต่อจากนั้นนำไปฝากใส่ไว้ให้เติบโตในมดลูกของตัวเมียอีกตัวหนึ่งจนคลอดเป็นเทคโนโลยีที่เข้ามาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์กว้างขวางขึ้น ทำให้ได้สัตว์ที่มีลักษณะดีตามความต้องการในปริมาณมากเนื่องจากวิธีการดังกล่าวเป็นการกระจายพันธุกรรมที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว (มงคล เตชะกำพุ, 2543) ดังนั้นการคัดเพศในสัตว์เลี้ยง เป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญในวงการปศุสัตว์และการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งมีประโยชน์ในการผลิตสัตว์รวมทั้งส่งผลตอบแทนต่อเกษตรกรผู้ผลิต เพราะสามารถผลิตสัตว์ได้ตรงกับความต้องการของตลาด ซึ่งการเลี้ยงโคเนื้อและแพะพื้นเมืองไทย มีความต้องการเพศผู้มากกว่าเพศเมีย เนื่องจากเพศผู้มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ใช้เป็นพ่อพันธุ์ และในแพะพบว่าใช้แพะเพศผู้ในพิธีกรรมทางศาสนาอิสลาม ซึ่งในปัจจุบันมีได้มีการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์เข้ามาช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์โดยเฉพาะเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ให้สูงขึ้นได้ การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการใหม่ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจศึกษาโดยใช้อุณหภูมิเดียวที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบถ้าสามารถสร้าง primer ที่เหมาะสมได้ โดยใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่ว ๆ ไป เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block และสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่า ปัจจุบันเทคนิค LAMP นี้นับว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในทางการแพทย์ในการตรวจเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้

LAMP และ PCR มีหลักการการทำงานที่คล้ายคลึงกันคือ การเพิ่มจำนวน DNA แต่อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างระหว่าง LAMP และ PCR กล่าวคือ LAMP สามารถตรวจสอบด้วยตาเปล่า และหากมีการเสริม EB และ CS ทำให้มีลักษณะปรากฏที่ชัดเจนขึ้น แต่วิธี PCR ต้องตรวจจากแถบ DNA การคัดเพศตัวอ่อนโดยใช้วิธี LAMP การตรวจเพศจะอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำกับ DNA ซึ่งเกิดเป็นสีหรือความขุ่น (turbidity) แทนการตรวจแถบ DNA ใช้เวลาตรวจเพียง 1-2 ชั่วโมง ตัวอย่าง เช่น หลังจากเตรียมตัวอย่างเซลล์ตัวอ่อน ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยปฏิกิริยา LAMP ภายหลังปฏิกิริยา LAMP ทำการเสริม ethidium bromide (EB) ซึ่งเป็นสารที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการย้อม (stain) DNA และ $CuSO_4$ (CS) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการตกตะกอน DNA เกิดจากปฏิกิริยาแทนที่ โดยจะมีการแลกเปลี่ยนคู่กันของประจุบวกและประจุลบภายหลังปฏิกิริยาจะมีการเปลี่ยนสีของ EB และ การตกตะกอนของ CS ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า (Zoheir & Allam, 2010) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะพื้นเมืองไทยโดยประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะพื้นเมืองไทย ซึ่งได้ผ่านการพิจารณา และรับความเห็นชอบจากคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณ และมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตามหนังสือลำดับที่: จส. มข. 10/2554 เลขที่: ศธ 0514.1.12.2/88 ศึกษาความแม่นยำในการคัดเพศจากตัวอ่อนด้วยปฏิกิริยา LAMP โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลอง ที่ 1 กลุ่มควบคุม LAMP

กลุ่มการทดลอง ที่ 2 กลุ่ม LAMP เสริมด้วย EB ที่ความเข้มข้น 1 mM

กลุ่มการทดลอง ที่ 3 กลุ่ม LAMP เสริมด้วย CS ที่ความเข้มข้น 1 M

สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่างรังไข่

เก็บรังไข่โคพื้นเมืองไทย อายุ 3-6 ปี น้ำหนักประมาณ 200-400 กิโลกรัม ที่เข้าสู่โรงฆ่าสัตว์เทศบาลขอนแก่น จำนวน 48 รังไข่ และแพะพื้นเมืองไทย อายุ 14–18 เดือน น้ำหนักประมาณ 25–30 กิโลกรัม จากการผ่าตัดภายในฟาร์ม ภาควิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 38 รังไข่ นำรังไข่ทั้งสองข้างแช่ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.9% รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเจาะดูด แล้วนำมาส่องหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องสเตอริโอ (Gordon, 2004)

การเตรียมโอโอไซต์เพื่อพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์มาเพาะเลี้ยงในจานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 x 10 มล. แล้วปิดทับด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้น 99% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Hochi S., Kimura K., Ito K., & Hirabayashi M., 1997)

การเตรียมอสุจิและการปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ จากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิมาล้างด้วย dPBS จำนวน 4 ครั้ง หลังจากนั้นก่อนที่จะทำการปฏิสนธิต้องนำโอโอไซต์ไปใส่ในจานที่มี fertilization medium 250 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียมน้ำเชื้อ 1 หลอด (0.25 มล.) ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เติมน้ำยา fertilization medium 1000 ไมโครลิตร นำมาทำการปั่นเหวี่ยง 700 รอบ เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนที่เป็นตะกอนมาบ่มกับ fertilization medium ที่ตู้ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดเอาน้ำยาส่วนที่อยู่ข้างบนออกมา (swim-up) แล้วย้ายเข้าไปใส่ใน microdrops เพื่อทำการปฏิสนธิ หลังจากปฏิสนธินำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้น 99% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Rizos et al., 2003)

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกายและการแช่แข็งตัวอ่อน

ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ปฏิสนธิได้ โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้น 99% (Gandhi, Lane, Gardner, & Krisher, 2000) เมื่อได้ตัวอ่อนระยะมอรูล่า นำมาแช่ในสารละลายแช่แข็งซึ่งประกอบไปด้วย TCM-199 เสริมด้วยกลีเซอรอล (Sigma, St. Louis, M.O., USA) 20% เป็นเวลา 1 นาที แล้วบรรจุลงในหลอดขนาด 0.25 มล. ยาว 2 ซม. ที่มี TCM-199 ยาว 2 ซม. กั้นด้วยฟองอากาศ 0.5 ซม. นำหลอดบรรจุตัวอ่อนมาทำให้สัมผัสกับไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -170 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นจึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาเพื่อรอการวิเคราะห์ (Yang, Lu, Gordon, & Polge, 1992)

การสกัด DNA

นำตัวอย่างตัวอ่อนระยะมอรูล่ามาทำละลายโดยการนำหลอดบรรจุตัวอ่อนสัมผัสอากาศ 10 วินาที นำมาจุ่มในน้ำอุ่น 36 องศาเซลเซียส 3 นาที ในระหว่างนี้ให้ตั้งหลอดขึ้นแล้วเขย่าให้สารละลายทั้ง 2 เข้ากัน จากนั้นจึงนำตัวอ่อนออกจากหลอด และล้างในสารละลาย TCM-199 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที (Van Wagtendonk-De Leeuw, Den Daas, Kruip, &Rall, 1995) จากนั้นทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Tri Pure reagent® ตามวิธีการของบริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany เมื่อได้ DNA จากการสกัดนำไปทำการตรวจสอบคุณภาพ DNA โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ขั้นตอนการเตรียม PCR ด้วย forward primer (CAAGTGCTGCAGAGGATGTGGAG) และ reverse primer (GAGTGAGATTTCTGGATCATATGGCTACT) ตามวิธีการของ Hirayama et al. (2004) ซึ่งสรุปโดยคือ เตรียม PCR mix (ดังตารางที่ 1) ปริมาตร 9 ไมโครลิตร โดยเติม DNA ที่ได้สกัด 1 ไมโครลิตร แล้วทำการผสมสารให้เข้ากันอย่างดี vortex อย่างเบา ๆ นำเอา PCR reaction tube มาเข้าเครื่อง PCR เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม (ดังตารางที่ 2) นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Hirayama et al., 2004)

7. การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี LAMP

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวน (amplified) โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ male-specific primer และ male–female common primers ปฏิกิริยา LAMP โดยใช้อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 25 µl (reaction mixture) 1.6 mMinner primers, 0.2 mMouter primers, 0.8 mMloop primers, 1.4 mMdNTPs, 0.6 Mbetaine, 20 mMTris-HCL (pH 8.8), 10 mMKCl, 10 mM, $(NH_4)_2SO_4$, 8 mMMgSO$_4$, 0.1%, Tween 20, 8 U Bst DNA polymerase และ ตัวอย่าง DNA 5 ไมโครลิตร โดยเตรียม LAMP reaction จำนวน 25 ไมโครลิตร ในหลอด male-specific primer และ male–female common primers จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำออกมาแช่น้ำแข็งทันที แล้วเติม *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs) (8.0 U) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใน heat block เป็นเวลา 60 นาที และจะหยุดปฏิกิริยาที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Zoheir & Allam, 2010)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ศึกษาความแม่นยำในการคัดเพศจากตัวอย่างตัวอ่อนด้วยปฏิกิริยา LAMP โดยใช้เมทริกซ์จัตุรัส (เมทริกซ์ที่มีขนาดแถวและหลักเท่ากัน) หรือ 3 × 3 contingency table ซึ่งจะเปรียบเทียบคู่เหมือนของแต่ละทรีทเมนต์ จนครบทุกทรีทเมนต์ เปรียบเทียบความแตกต่างความแม่นยำในการคัดเพศของกลุ่มที่ได้รับกลุ่มการทดลองเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยการทดสอบไคสแควร์ (Steel, Torrie, & Dickey, 1996) โดยใช้โปรแกรม SAS

ผลการศึกษา

ลักษณะปรากฏของการคัดเพศโดยวิธี LAMP โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 หลอด หลัง LAMP reaction การคัดเพศยืนยันจาก male-specific primers และ male–female common primers หากทั้งสอง reaction ให้ผลบวกหรือขุ่นทั้งสอง จะเป็นเพศผู้ หากเกิดการขุ่นของหลอดเฉพาะ male–female common primers จะเป็นเพศเมีย หลังจากนั้นแบ่ง

เติม EB และ CS ดูการเปลี่ยนสีและ ลักษณะความขุ่น (turbidity) การเติม EB จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีโดยเพศผู้จะเป็นสีชมพูอมส้ม (positive) หากเป็นเพศเมียจะเป็นสีส้ม (negative) และ การเติม CS จะทำให้มีลักษณะใสในเพศผู้ (positive) หากเป็นเพศเมียจะมีลักษณะขุ่น (negative) ดังรูปที่ 1

ผลของการคัดเพศโค โดยทำการศึกษาในตัวอย่างตัวอ่อนโค (n=35) พบว่าในกลุ่ม LAMP+EB (100.0%) มีเปอร์เซ็นต์การคัดเพศดีกว่า LAMP+CS (74.3%) และกลุ่มควบคุม (57.2%) โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ดังตารางที่ 3

ผลของความแม่นยำในการคัดเพศในโค พบว่าในกลุ่ม LAMP+EB (42.5%) สูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม LAMP+CS (35.0%) และกลุ่มควบคุม (22.5%) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 4

ผลของการคัดเพศแพะ โดยทำการศึกษาในตัวอย่างตัวอ่อนแพะ (n=18) พบว่าในกลุ่ม LAMP+EB สูงที่สุด (77.9%) รองลงมาคือ กลุ่ม LAMP+CS (61.1%) และกลุ่มควบคุม (38.9%) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 5

ผลของความแม่นยำในการคัดเพศในแพะ พบว่าในกลุ่ม LAMP+CS สูงที่สุด (50.0%) รองลงมาคือ กลุ่ม LAMP+EB (30.8%) และกลุ่มควบคุม (19.2%) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารวิทยาศาสตร์ในการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl.)	ปริมาตร 5x (µl.)
Water, PCR grade	26.8	134
10x buffer	4.0	20
2.5 dNTPs	4.0	20
Primer Forward	0.4	2
Primer Backward	0.4	2
Taq polymerase	0.4	2

ตารางที่ 2 โปรแกรมในการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR

Program Name	Cycles	Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)
Denaturing at 95	1	95 °C	00:15:00
Amplification	15		
Segment 1		97 °C	00:00:08
Segment 2		50 °C	00:00:25
Segment 3		72 °C	00:00:15
Shuttle PCR	30		
Segment 1		98 °C	00:00:08
Segment 2		66 °C	00:00:20
Melting curve	1	72 °C	00:05:00

ตารางที่ 3 ผลของการคัดเพศตัวอ่อนในโค

กลุ่ม	จำนวนตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนที่คัดเพศได้	% การคัดเพศ
LAMP	35	20	57.2[b]
LAMP+EB	35	35	100.0[a]
LAMP+CS	35	26	74.3[ab]

ตารางที่ 4 ผลของความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนในโค

	LAMP	LAMP+EB	LAMP+CS	รวม	% ความแม่นยำ
LAMP	-	6	3	9	22.5
LAMP+EB	6	-	11	17	42.5
LAMP+CS	3	11	-	14	35.0

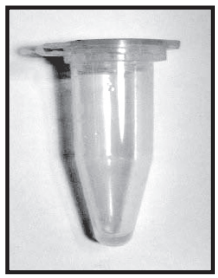
ตารางที่ 5 ผลของการคัดเพศตัวอ่อนในแพะ

กลุ่ม	จำนวนตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนที่คัดเพศได้	% การคัดเพศ
LAMP	18	7	38.9
LAMP+EB	18	14	77.9
LAMP+CS	18	11	61.1

ตารางที่ 6 ผลของความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนในแพะ

	LAMP	LAMP+EB	LAMP+CS	รวม	% ความแม่นยำ
LAMP	-	0	5	5	19.2
LAMP+EB	0	-	8	8	30.8
LAMP+CS	5	8	-	13	50.0

มีความขุ่น (+) (+,+; ผู้)



ไม่มีความขุ่น (-) (-,+; เมีย)

สีชมพู (ผู้)

สีส้ม (เมีย)

มีลักษณะใส (ผู้)

มีความขุ่น (เมีย)

รูปที่ 1 ลักษณะปรากฏของการคัดเพศโดยวิธี LAMP

วิจารณ์ผลการทดลอง

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และ polymerase chain reaction (PCR) มีหลักการการทำงานที่คล้ายคลึงกัน คือ การเพิ่มจำนวน DNA (Hirayama et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามก็มีความแตกต่างระหว่าง LAMP และ PCR กล่าวคือ ปฏิกิริยา LAMP มีการเสริม EB หรือ $CuSO_4$ พบว่าการเสริม EB จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีโดยเพศผู้จะเป็นสีชมพูอมส้ม หากเป็นเพศเมียจะเป็นสีส้ม (negative) และ การเติม $CuSO_4$ จะทำให้เกิดการตกตะกอนในเพศผู้ (ลักษณะใส) (positive) หากเป็นเพศเมียจะไม่ตกตะกอน (มีลักษณะขุ่น) (negative) วิธีการนี้ใช้เวลาเพียง 60-70 นาที และมีความถูกต้อง 100.0% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR ซึ่งเป็นเทคนิคในการแยกเพศตัวอ่อนแบบใหม่ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเพศในตัวอ่อนโดยการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP ซึ่งเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม ซึ่งการศึกษาของ Hirayama และคณะ ในปี 2004 ได้ทำการคัดเพศโดยวิธี LAMP โดยใช้ตัวอ่อนโค จำนวน 61 ตัวอย่าง เป็นเพศผู้ 23 ตัวอย่าง และเพศเมีย 38 ตัวอย่าง ทำการย้ายฝากตัวอ่อน พบว่า 57.4 % ไม่พบการตั้งท้อง โดยมีการตั้งท้อง 42.6% เมื่อโคออกลูกได้เพศผู้ 12 ตัว และเพศเมีย 21 ตัว ตรงกับการคัดเพศ

จากการศึกษาในครั้งนี้การคัดเพศตัวอ่อนด้วยเทคนิค LAMP ของโคสามารถคัดเพศได้ 57.2% ภายหลังที่มีการเสริม EB สามารถคัดเพศได้ 100.0% และ CS คัดเพศได้ 74.3% ผลของการคัดเพศตัวอ่อนด้วยเทคนิค LAMP ของแพะสามารถคัดเพศได้ 38.9% ภายหลังที่มีการเสริม EB สามารถคัดเพศได้ 77.8% และ CS คัดเพศได้ 61.1% แต่การศึกษาของ Zoheir และคณะ ในปี 2010 พบว่า EB และ CS สามารถคัดเพศได้ 100.0% (Zoheir & Allam, 2010) ส่วนการศึกษาของ Hirayama และคณะ ในปี 2004 ได้ศึกษาการคัดเพศโดยใช้จำนวนเซลล์ ของ blastomeres ตั้งแต่ 1-5 เซลล์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การคัดเพศสูงถึง 100.0% เมื่อใช้จำนวนเซลล์ของ blastomeres 4-5 เซลล์ (Hirayama et al., 2004) และจากการรายงานของ Zhang และคณะ ในปี 2009 ได้ทำการเปรียบเทียบการคัดเพศโดยใช้วิธี LAMP กับ วิธี PCR และศึกษาอิทธิพลของตัวอ่อนที่มีจำนวนเซลล์ตั้งแต่ 1, 3 และ 5 เซลล์ พบว่าวิธี เมื่อใช้จำนวนเซลล์ตัวอ่อน 1 เซลล์ การคัดเพศโดยวิธี LAMP มีเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ 78.0% ส่วนวิธี PCR มีเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ 74.0% แต่เมื่อใช้จำนวนเซลล์ตัวอ่อน 5 เซลล์ ทั้งสองวิธีมีความแม่นยำ 100.0% และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการคัดเพศวิธี LAMP ใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ส่วนวิธี PCR ใช้เวลาถึง 3.5 ชั่วโมง (Zhang et al., 2009)

เนื่องจากคุณสมบัติของเทคนิคที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ทำให้เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้งานในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้ในการตรวจหาจีนของเชื้อเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค ในระยะแรกใช้ตรวจหาเชื้อที่สามารถติดต่อได้ทางทางเดินอาหาร เช่น Salmonella, Legionella, *E.coli* เป็นต้น (อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, 2554) ต่อมาถูกใช้แพร่หลายมากตั้งแต่ปี 2003 ที่มีการระบาดของ West Nile และ SARS virus (อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, 2554) จะเห็นว่าเทคนิค LAMP ถูกใช้งานอย่างมากในการตรวจจับไวรัส เนื่องจากการวินิจฉัยเชื้อไวรัสทำได้ยาก ปัจจุบันเทคนิค LAMP ถูกใช้งานในการตรวจหาการติดเชื้อที่ยังเป็นปัญหาทั่วไปในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น เชื้อวัณโรค เชื้อมาเลเรีย เชื้อ HIV เป็นต้น

จากการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบ PCR และ LAMP พบว่ามีความไวในการตรวจเท่ากันแต่ต้องใช้จำนวนรอบ 40 รอบสำหรับการทำ PCR ซึ่งต้องใช้เวลามากกว่า 2 ชั่วโมง ส่วนในรายงานอื่น ๆ พบว่าการทำ LAMP มีความไวกว่าการทำ PCR (Iwamoto, Sonobe, & Hayashi, 2003; Kiatpathomchai, Jareonram, Jitrapakdee, & Flegel, 2007)

สำหรับในประเทศไทยเทคนิค LAMP ถูกนำมาใช้งานทางด้านตรวจจับเชื้อไวรัสต่าง ๆ ที่ก่อโรคในสัตว์ เช่น โรคไวรัสในกุ้ง ไวรัสในสุกร เป็นต้น มีการนำมาใช้ตรวจหาปรสิตในคน เช่น มาเลเรีย และตรวจหายีน

อื่น ๆ มากขึ้น เทคนิค LAMP นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด ตลอดจนการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่สามารถถ่ายทอดทางเลือดได้ เนื่องจากใช้เวลาสั้นและไม่ต้องใช้เครื่องมือยุ่งยาก จึงนับว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่น่าสนใจน่าติดตาม การประยุกต์ใช้งานต่าง ๆ ในอนาคตอันใกล้นี้

สรุป

1) การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP โดยการเสริม EB ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) การเสริม CS ที่ความเข้มข้น 1 M ไม่สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อและแพะได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2553 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน “กลุ่มวิจัยโคพื้นเมืองและกระบือ” มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ. (2543). *เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. (2554). เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). *วารสารโลหิตวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต,* 21, 201–206.

Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K., & Krisher, R. L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human reproduction* (Oxford, England), 15(2), 395–401.

Gordon, I. R. (2004). *Reproductive technologies in farm animals.* Wallingford: Cab international.

Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S., Takahashi, Y., ...Minamihashi, A. (2004). Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology,* 62(5), 887–896. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.007

Hochi S., Kimura K., Ito K., &Hirabayashi M. (1997). Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. *Theriogenology,* 47(1), 345–345.doi:10.1016/S0093-691X(97)82472-7

Iwamoto, T., Sonobe, T., & Hayashi, K. (2003). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples. *Journal of Clinical Microbiology,* 41(6), 2616–2622. doi:10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003

Kiatpathomchai, W., Jareonram, W., Jitrapakdee, S., & Flegel, T. W. (2007).Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of virological methods,* 146(1-2), 125–128. doi:10.1016/j.jviromet.2007.06.007

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids*

research, 28(12), E63.

Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of reproduction,* 68(1), 236–243.

Steel, R. G., Torrie, J. H., & Dickey, D. A. (1996). *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach* (3rd ed.). New York: McGraw-Hill Companies.

Van Wagtendonk-De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H., Kruip, T. A., & Rall, W. F. (1995). Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology,* 32(2), 157–167. doi:10.1006/cryo.1995.1014

Yang, N., Lu, K., Gordon, I., & Polge, C. (1992). Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology,* 37, 326.

Zhang, Z.-P., Zhang, Y., Liu, J.-P., Zhang, J.-T., An, Z.-X., Quan, F.-S., ...Pu, S. W. J. (2009). Codeposition of dNTPs detection for rapid LAMP-based sexing of bovine embryos. *Reproduction in domestic animals Zuchthygiene,* 44(1), 116–121. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.01006.x

Zoheir, K. M. A., & Allam, A. A. (2010). A rapid method for sexing the bovine embryo. *Animal reproduction science,* 119(1-2), 92–96. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.12.013