ผลของการเสริม Ethidium bromide หรือ $CuSO_4$ ในปฏิกิริยา Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ต่อการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อ

Effect of Ethidium Bromide or $CuSO_4$ Supplements in LAMP Reaction on Greater Accuracy of Sexing Cattle Embryos

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

Saruttiwong Boonkong[1], Chainarong Navanukraw[1,2*], Tossapol Moonmanee[1], Jiratti Thammasiri[1], Vilaivan Khanthusaeng[1] and Aree Kraisoon[1]

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อโดยการเสริม ethidium bromide (EB) หรือ $CuSO_4$ (CS) ในปฏิกิริยา LAMP ทำการเก็บรังไข่โคเนื้อจากโรงฆ่าสัตว์ นำมาเจาะดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิล ประเมินอัตราการเก็บโอโอไซต์และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพาะเลี้ยงใน TCM-199 ที่ 38.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระทั่งได้โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ ทำการปฏิสนธิและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินอัตราการปฏิสนธิ จากนั้นเพาะเลี้ยงตัวอ่อนต่อไปอีกจนถึงระยะมอรูล่า ทำการแช่แข็งตัวอ่อน และเก็บตัวอ่อนที่อุณหภูมิ -196 °ซ เพื่อรอการคัดเพศ สุ่มตัวอย่างตัวอ่อนโคเนื้อจำนวน 35 ตัวอย่าง เพื่อสกัด DNA และเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ แล้วนำมาคัดเพศโดยวิธี LAMP แบ่งเป็น 3 ทรีทเมนต์ ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่ม LAMP เสริมด้วย 1 mM EB และ กลุ่ม LAMP เสริมด้วย 1 M CS ผลการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์การคัดเพศในโคเนื้อโดยการเสริม EB ให้ผลดีกว่าการเสริมด้วย CS และกลุ่มควบคุม ($P<0.01$) (100.0, 74.3 และ 57.2% ตามลำดับ) ความแม่นยำในโคเนื้อโดยการเสริม EB สูงที่สุด รองลงมา คือ การเสริม CS และกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) (42.5, 35.0 และ 22.5% ตามลำดับ) ดังนั้นสรุปได้ว่า การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP โดยการเสริม EB ที่ความเข้มข้น 1 mM สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการเสริม CS ที่ความเข้มข้น 1 M ไม่สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้

คำสำคัญ: ปฏิกิริยา LAMP การคัดเพศตัวอ่อน โค

---

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[2] ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
The Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University 40002

* Corresponding author: chanav@kku.ac.th

ABSTRACT: The study was conducted to determine effect of EB or CS supplements in LAMP reaction on greater accuracy of sexing cattle embryos. Bovine ovaries were collected from the slaughterhouse, oocytes were aspirated from follicles then were evaluated morphology. Oocytes were cultured in TCM-199 at 38.5 ºC 24 h. For *in vitro* fertilization (IVF), oocytes were co-incubated with spermatozoa at 38.5 ºC 24 h. Fertilization rate was evaluated and then the embryos were in vitro cultured until morula stage. Then, embryo samples were frozen and stored at -196 ºC. Frozen embryos (n=35) were randomly extracted for total cellular DNA and amplified by PCR method. DNA samples were stored at -20 ºC. Sexing was determined by modification of LAMP method with either 1mM EB or 1M CS supplementation. The result found that percentages of sex detection in bovine was greater (P<0.01) in EB supplemented than CS and control groups (100.0, 74.3 and 57.2%, respectively). Percentages of accuracy of sexing bovine embryo supplemented with EB was the greatest, followed by the LAMP+CS and the control (42.5, 35.0 and 22.5%, respectively). Based on this study, conclusions were as follows. The LAMP reaction application by using 1 mM EB effectively increased the accuracy of sexing bovine embryos and supplemented with 1 M CS did not increase accuracy of sexing bovine embryos.
Keywords: LAMP reaction, sexing embryo, bovine

บทนำ

การเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยได้มีการนำเทคโนโลยีต่างๆ มาประยุกต์ใช้ เช่น การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย เป็นต้น ซึ่งเทคโนโลยีเหล่านี้ช่วยในการปรับปรุงพันธุกรรม และเป็นการกระจายพันธุกรรมที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว (มงคล, 2543) ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ การควบคุมอัตราส่วนของเพศเป็นส่วนหนึ่งของการจัดการฟาร์มในการผลิตลูกสัตว์ให้ได้เพศตามต้องการเพื่อใช้ทดแทนฝูงสัตว์ และส่งผลกำไรต่อผู้ผลิต ซึ่งการเลี้ยงโคเนื้อมีความต้องการเพศผู้มากกว่าเพศเมีย เนื่องจากเพศผู้มีอัตราการเจริญเติบโตสูง หรือใช้เป็นพ่อพันธุ์ ทั้งนี้การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายทำให้มีความก้าวหน้าในเรื่องการคัดเพศมากขึ้น เทคนิคที่ใช้ในการคัดเพศมีหลายวิธี ซึ่งวิธีที่นิยมคือ polymerase chain reaction (PCR) แต่วิธีการนี้ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีความซับซ้อน ไม่เหมาะสมกับการปฏิบัติงานในภาคสนาม และใช้เวลานาน ในปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค LAMP ซึ่งสามารถทำได้ในภาคสนามและใช้เวลาสั้นกว่า

LAMP และ PCR มีหลักการการทำงานที่คล้ายคลึงกันคือ การเพิ่มจำนวน DNA แต่อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างระหว่าง LAMP และ PCR กล่าวคือ LAMP สามารถตรวจสอบด้วยตาเปล่า และหากมีการเสริม EB และ CS ทำให้มีลักษณะปรากฏที่ชัดเจนขึ้น แต่วิธี PCR ต้องตรวจจากแถบ DNA (Zoheir and Ahmed, 2010) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อโดยการเสริม EB หรือ CS ในปฏิกิริยา LAMP

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้แบ่งเป็น 3 ทรีทเมนต์ ดังนี้ ทรีทเมนต์ที่ 1 กลุ่มควบคุม ทรีทเมนต์ที่ 2 กลุ่ม LAMP เสริมด้วย EB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล และ ทรีทเมนต์ที่ 3 กลุ่ม LAMP เสริมด้วย CS ที่ความเข้มข้น 1 โมล

การเก็บตัวอย่างรังไข่และเตรียมโอโอไซต์เพื่อพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย

เก็บรังไข่โคเนื้อจากโรงฆ่าสัตว์ แช่ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.9% รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37 ºซ (Gordon, 2005) ทำการเก็บโอโอไซต์ แล้วนำโอโอไซต์มาเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา TCM-199 ปิดทับด้วย mineral oil เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 ºซ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Hochi et al., 1998)

การเตรียมอสุจิและการปฏิสนธินอกร่างกาย

ปฏิสนธิโดยนำโอโอไซต์ใส่ในจานที่มี IVF-SAGE media™ จากนั้นเตรียมน้ำเชื้อ 1 หลอด ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 ºซ เป็นเวลา 30 วินาที เติมน้ำยา fertilization medium 1000 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยง 700 รอบ เป็นเวลา 8 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนมาบ่มกับ

fertilization medium ที่ตู้ที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ดูดของเหลวที่อยู่ข้างบนออกมา (swim-up) แล้วย้ายเข้าไปใส่ใน microdrops เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Rizos et al., 2003)

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกายและการแช่เข็งตัวอ่อน

ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ปฏิสนธิได้ โดยเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยง (IVC-SAGE media™) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ (Gandhi et al., 2000) เมื่อได้ตัวอ่อนระยะมอรูล่า นำมาแช่ในสารละลายแช่แข็งซึ่งประกอบไปด้วย TCM-199 เสริมด้วยกลีเซอรอล 20% เป็นเวลา 1 นาที แล้วบรรจุลงในหลอดขนาด 0.25 มล. เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อรอการคัดเพศ (Yang et al., 1992)

การสกัด DNA

ทำละลายโดยการนำหลอดบรรจุตัวอ่อนสัมผัสอากาศ 10 วินาที นำมาจุ่มในน้ำอุ่น 36 °ซ 3 นาที จากนั้นจึงนำตัวอ่อนออกจากหลอด และล้างในสารละลาย TCM-199 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที (Van et al., 1995) สกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป TriPure reagent® เมื่อได้ DNA จากการสกัดนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี PCR วิธี LAMP

โดยเตรียม PCR mix ปริมาตร 9 ไมโครลิตร โดยเติม DNA ที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร vortex อย่างเบาๆ นำ PCR reaction tube มาเข้าเครื่อง PCR เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อรอการคัดเพศ จากนั้นเตรียม LAMP reaction จำนวน 25 ไมโครลิตร ในหลอด male-specific primer และ male–female common primers และ DNA ที่ได้จากวิธี PCR 5 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำออกมาแช่น้ำแข็ง แล้วเติม Bst polymerase (8.0 U) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 60 นาที และจะหยุดปฏิกิริยาที่ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที (Notomi et al., 2000)

การตรวจสอบผล

ลักษณะปรากฏของการคัดเพศโดยวิธี LAMP โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 หลอด หลัง LAMP reaction หากทั้งสอง reaction ให้ผล positive หรือขุ่นทั้งสอง จะเป็นเพศผู้ หากเกิด positive เฉพาะ male–female common primers จะเป็นเพศเมีย หลังจากนั้นแบ่งเติม EB และ CS การเติม EB จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีโดยเพศผู้จะเป็นสีชมพูอมส้ม หากเป็นเพศเมียจะเป็นสีส้ม และ การเติม CS จะทำให้มีลักษณะใสในเพศผู้ หากเป็นเพศเมียจะมีลักษณะขุ่น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแม่นยำในการคัดเพศ โดยใช้เมทริกซ์จัตุรัส ซึ่งจะเปรียบเทียบคู่เหมือนของแต่ละทรีทเมนต์ เปรียบเทียบความแตกต่างกลุ่มที่ได้รับทรีทเมนต์เทียบกับกลุ่มควบคุมโดยการทดสอบ Chi-square test (Steel et al., 1997)

ผลการศึกษา

ผลของการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อ (n=35) พบว่าในกลุ่ม LAMP+EB มีเปอร์เซ็นต์การคัดเพศดีกว่า LAMP+CS และกลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) (100.0, 74.3 และ 57.2% ตามลำดับ) ดังแสดงใน **Table 1**

ลักษณะปรากฏของการคัดเพศโดยวิธี LAMP โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 หลอด หลัง LAMP reaction การคัดเพศยืนยันจาก male-specific primers และ male–female common primers ดังแสดงใน **Figure 1**

ผลของความแม่นยำในการคัดเพศในโคเนื้อ พบว่าในกลุ่ม LAMP+EB สูงที่สุด รองลงมาคือ กลุ่ม LAMP+CS และกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) (42.5, 35.0 และ 22.5% ตามลำดับ) ดังแสดงใน **Table 2**

Table 1 Percentage of sex detection in bovine embryos

Treatment	No. of embryos	Detection	% Detection
LAMP	35	20	57.2[b]
LAMP+EB	35	35	100.0[a]
LAMP+CS	35	26	74.3[ab]

[a, b] Different superscripts in the same column indicate significant difference among treatment groups (P< 0.05).

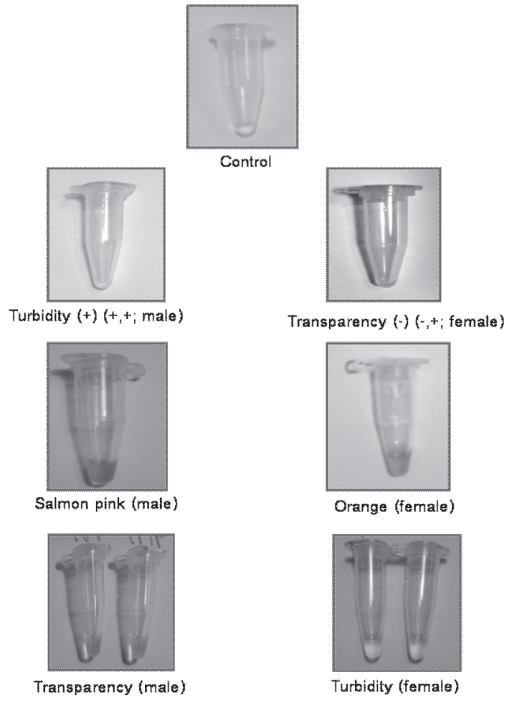

Figure 1 The natural light observation of the reaction tube using digital camera. Left shows the positive reaction (turbidity) (+,+; male), and right shows the negative reaction (transparency) (-,+; female). Color change after addition of EB – left shows the positive reaction (salmon pink; male), and right shows the negative reaction (orange; female). Precipitate formation after addition of CS – left shows the positive reaction (transparency; male), and right shows the negative reaction (turbidity; female).

Table 2 Percentage of sex accuracy in bovine embryos

Treatment	LAMP	LAMP+EB	LAMP+CS	Total	% Accuracy
LAMP	-	6	3	9	22.5^{NS}
LAMP+EB	6	-	11	17	42.5^{NS}
LAMP+CS	3	11	-	14	35.0^{NS}

NS: non significant (P>0.05)

วิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าการคัดเพศตัวอ่อนโคด้วยเทคนิค LAMP สามารถคัดเพศได้ 57.2% ภายหลังที่มีการเสริม 1 mM EB สามารถคัดเพศได้ 100% และ 1 M CS คัดเพศได้ 74.3% แต่การศึกษาของ Zoheir and Ahmed (2010) พบว่า 1 mM EB และ CS ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ (0.5 M, 1 M, 1.5 M, 2 M, 3 M และ 5 M) สามารถคัดเพศได้ 100% ส่วนการศึกษาของ Hirayama et al. (2004) ได้ศึกษาการคัดเพศโดยใช้จำนวนเซลล์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การคัดเพศ 100% เมื่อใช้จำนวนเซลล์ของบลาสโตเมียร์ 4-5 เซลล์ และจากการรายงานของ Zhang et al. (2009) ได้ทำการเปรียบเทียบการคัดเพศโดยใช้วิธี LAMP กับวิธี PCR และศึกษาอิทธิพลของตัวอ่อนที่มีจำนวนเซลล์ตั้งแต่ 1, 3 และ 5 เซลล์ พบว่าเมื่อใช้จำนวนเซลล์ตัวอ่อน 1 เซลล์ การคัดเพศโดยวิธี LAMP มีเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ 78.0% ส่วนวิธี PCR มีเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ 74.0% แต่เมื่อใช้จำนวนเซลล์ตัวอ่อน 5 เซลล์ทั้งสองวิธีมีความแม่นยำ 100% และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการคัดเพศวิธี LAMP ใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ส่วนวิธี PCR ใช้เวลา 3.5 ชั่วโมง การคัดเพศโดยใช้เทคนิค LAMP เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม ซึ่งการศึกษาของ Hirayama et al. (2004) ได้คัดเพศโดยวิธี LAMP โดยใช้ตัวอ่อนโคจำนวน 61 ตัวอย่าง เป็นเพศผู้ 23 ตัวอย่าง และเพศเมีย 38 ตัวอย่าง โดยมีการตั้งท้อง 42.6% เมื่อโคออกลูกได้เพศผู้ 12 ตัว และเพศเมีย 21 ตัว ตรงกับการคัดเพศ

สรุป

การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP โดยการเสริม EB ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ และการเสริม CS ที่ความเข้มข้น 1 โมล ไม่สามารถเพิ่มความแม่นยำในการคัดเพศตัวอ่อนโคเนื้อได้

คำขอบคุณ

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

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ. 2543. เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Gandhi, A.P., M. Lane, D.K. Gardner and R. L. Krisher. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Hum. Reprod. 15: 395-401.

Gordon, I. 2005. Reproductive technologies in farm animals. Cab International, Wallingford.

Hirayama, H., S. Kageyama, S. Moriyasu, K. Sawai, S. Onoe and Y. Takahashi. 2004. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology 62: 887-896.

Hochi, S., K. Ito, M. Hirabayashi, M. Ueh, K. Kimura, and A. Hanada. 1998. Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes. Theriogenology 49: 787-796.

Notomi, T.H., H. Okayama, H. Massubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28: 1-7.

Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. De la Fuente, M. P. Boland and P. Lonergan. 2003. Bovine embryo culture in the presence or serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol. Reprod. 68: 236-243.

Steel, R. G., J. H. Torrie and D. A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach.

Van, W., A. M. Leeuw, J. H. G. den-Daas, A. M. Kruip, and W. F. Rall. 1995. Comparison of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. Cryobiology 32: 157-167.

Yang, N. S., K. H. Lu, I. Gordon and C. Polge. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro. Theriogenology 37: 326.

Zhang, Z. P., Y. Zhang, J. P. Liu, J. T. Zhang, Z. X. An, F. S. Quan, L. Zhang, X. Cai and S. W. Pu. 2009. Codeposition of dNTPs detection for rapid LAMP-based sexing of bovine embryos. Reprod. Domest. Anim. 44: 116–121.

Zoheir, K. M. A. and A. A. Ahmed. 2010. A rapid method for sexing the bovine embryo. Anim. Reprod. Sci. 119: 92–96.