การแยกเพศตัวอสุจิ X และ Y ในน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์โดยวิธี Layering spermatozoa on protein columns

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล* ปาริฉัตร สุขโต* มุขดา รัตนภาสกร*

บทคัดย่อ

การเพิ่มผลผลิตปศุสัตว์โดยการกำหนดเพศลูกที่เกิด เป็นวิธีที่มีผู้สนใจทำการทดลองเป็นจำนวนมาก และมีการวิจัยมาตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1933 โดยเฉพาะการแยกตัวอสุจิชนิดที่มีโครโมโซม X และตัวอสุจิชนิดที่มีโครโมโซม Y ให้ได้น้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิชนิดใดชนิดหนึ่งอย่างเดียวเพื่อสามารถเลือกเพศลูกได้ตามต้องการ การทดลองนี้ทำการแยกตัวอสุจิด้วยวิธี layering spermatozoa on protein columns โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นคอลัมน์ของโปรตีนที่ให้ตัวอสุจิว่ายผ่าน แล้วนำน้ำเชื้อที่แยกได้ไปทำการแช่แข็ง เพื่อใช้ผสมเทียมในแม่โคเป็นสัดจำนวน 465 ตัว พบว่าเมื่อนำน้ำเชื้อส่วนบนไปผสมเทียมได้ลูกโคเพศผู้จำนวน 33 ตัว (57.9%) ลูกโคเพศเมียจำนวน 24 ตัว (42.1%) ในทำนองเดียวกันน้ำเชื้อส่วนล่างได้ลูกโคเพศผู้จำนวน 30 ตัว (54.5%) ลูกโคเพศเมียจำนวน 25 ตัว (45.5%) แต่จำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่เกิดจากน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่างไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่างคือ 27.5% (57/207) และ 21.3% (55/258) ตามลำดับและไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) การแยกตัวอสุจิโคโดยใช้ BSA ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถใช้เป็นวิธีกำหนดเพศลูกโคได้ การกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกตัวอสุจิยังต้องทำการศึกษาอีกต่อไป

คำสำคัญ : การแยกเพศ ตัวอสุจิ โปรตีนคอลัมน์ โคพ่อพันธุ์

* กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ ถนนพญาไท กทม. 10400

บทนำ

ปัจจุบันผลผลิตปศุสัตว์ในประเทศเพื่อการบริโภคของประชากรยังไม่เพียงพอทั้งปริมาณเนื้อสัตว์และปริมาณน้ำนม การใช้เทคโนโลยีมาช่วยจะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ได้เร็วขึ้น เช่น การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อนตลอดจนการกำหนดเพศลูกโค เพื่อให้ได้เพศลูกโคตามความต้องการ เช่น ให้ได้ลูกเพศเมียเพื่อสามารถเพิ่มจำนวนโคที่ตั้งท้องได้มากขึ้น การกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกชนิดตัวอสุจินั้น มีผู้ทำการศึกษาทดลองมาตั้งแต่ปี 1933 ซึ่งอนันต์ (2535) ได้รวบรวมวิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกตัวอสุจิไว้ดังนี้

การกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกชนิดตัวอสุจิที่มีโครโมโซม X ซึ่งให้ลูกเพศเมีย และตัวอสุจิที่มีโครโมโซม Y ซึ่งให้ลูกเพศผู้นั้น ใช้หลักการที่ตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y มีความแตกต่างกันในด้านรูปร่าง น้ำหนัก ความเร็วในการว่าย ลักษณะการว่าย จำนวนหรืออัตราส่วนของตัวอสุจิ X และ Y ความหนาแน่นของสารพันธุกรรม DNA (Ericsson et al., 1973; Mann and Lutwak-Mann, 1981; Sarker et al., 1984; Bobbins et al., 1988; Gledhill, 1988; Ali et al., 1990; Shettle, 1990) รวมทั้ง H-Y antigen บนเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิ Y (Gledhill, 1988) ความแตกต่างเหล่านี้มีน้อยมาก แต่ส่วนที่แตกต่างกันของตัวอสุจิ X และ Y ที่เด่นชัดคือเฉพาะตัวอสุจิ Y เท่านั้นจะปรากฏมีจุดกลมเรืองแสงที่ส่วนหัวเมื่อย้อมด้วยสารเรืองแสง quinacrine เรียกจุดกลมนี้ว่า Y หรือ Q หรือ F-body (Quinacrine หรือ Fluorescent body) ส่วนตัวอสุจิ X ไม่มีจุดกลมนี้ แต่วิธีนี้ใช้ได้ดีเฉพาะอสุจิคนและอสุจิลิงกอริลลาเท่านั้น (Barlow and Vosa, 1970; Pearson et al., 1971; Sans et al., 1977) อสุจิสัตว์อื่นและโคไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ (Iwasaki et al., 1988)

นอกจากนี้ยังมีการแยกชนิดตัวอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ คือ เยื่อหุ้มตัวอสุจิ X มีสารประกอบเป็น glycoprotein พวก sialic acid และ sulfate มากกว่าตัวอสุจิ Y จึงทำให้ตัวอสุจิ X วิ่งเข้าหาขั้วบวก (Anode) ส่วนตัวอสุจิ Y วิ่งเข้าหาขั้วลบ (cathode) (Kaneko et al., 1983a; Oshio et al., 1987) ในโคมีการแยกชนิดตัวอสุจิโดยอาศัยหลักการนี้ได้ลูกโคเพศเมีย 21 ตัว จากลูกโคที่ทำการทดลอง 33 ตัว หรือประมาณ 64% (Mohri et al., 1987)

การแยกชนิดตัวอสุจิโดยอาศัยน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y โดยใช้แรงเหวี่ยงจากการปั่นน้ำเชื้อให้ตกผ่านสารละลายที่มีความหนาแน่นต่างกันหรือใช้ Percoll density gradient centrifugation สามารถแยกน้ำเชื้อคนได้ตัวอสุจิ Y บริสุทธิ์ถึง 94% ทดสอบโดยการย้อมสี quinacrine ปรากฏจุดกลมเรืองแสงที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ Y เรียกว่า F-body (Kaneko et al., 1983b; Kaneko et al., 1984) แต่มีการทดลองที่รายงานว่าวิธีนี้ไม่ทำให้อัตราส่วนลูกเพศหญิงและเพศชายแตกต่างกัน (Upreti et al., 1988)

การแยกชนิดตัวอสุจิโดยเครื่องมือที่มีราคาแพง คือ Flow cytometry ใช้หลักความแตกต่างของความหนาแน่นของสารพันธุกรรม DNA ที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ ในการทดลองแยกน้ำเชื้อโค สุกร แกะ (Johnson and Clark, 1988) และน้ำเชื้อกระต่าย ได้ลูกกระต่ายเพศเมีย 94% ในน้ำเชื้อส่วนที่เป็นอสุจิ X และลูกกระต่ายเพศผู้ 81% ในน้ำเชื้อส่วนที่เป็นตัวอสุจิ Y (Johnson et al., 1989)

การทดลองอีกวิธีคือแยกชนิดตัวอสุจิในน้ำเชื้อคนโดยใช้ Sephadex gel fitration ได้ลูกเพศหญิง 39 คน จาก 52 การคลอดหรือ 75% (Carson and Betzer, 1987)

Ericsson et al. (1973) ทดลองแยกน้ำเชื้อคนโดยวิธี Layering spermatozoa on protein columns

ได้อสุจิที่มีโครโมโซม Y ถึง 85% พิสูจน์โดยการย้อมสี quinacrine การทดลองนี้ให้ตัวอสุจิว่ายผ่านชั้นของ bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากรายงานของ Ericsson et al., (1973) มีผู้ทำการทดลองวิธีเดียวกันแต่ได้ผลตรงกันข้าม (Evans et al., 1975; Ross et al., 1975; Ferguson et al., 1976; David et al., 1977; Dmowski et al., 1979; Quinlivan et al., 1982) อย่างไรก็ตามในปี 1982 Beernink and Ericson รายงานยืนยันอีกครั้งว่าสามารถเพิ่มจำนวนลูกเพศชายในคนได้ถึง 75% (จากการตั้งครรภ์ 91 ครั้ง) เมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่แยกชนิดตัวอสุจิโดยใช้ BSA

นอกจากนี้มีรายงานการทดลองโดยใช้ BSA ที่มีความเข้มข้นเดียวแยกน้ำเชื้อแกะ ได้จำนวนลูกแกะเพศผู้และลูกแกะเพศเมียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (White and Mendoza, 1984) ซึ่งเป็นผลการทดลองที่น่าสนใจ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดลองโดยใช้ BSA ที่มีความเข้มข้นเดียวทดลองแยกน้ำเชื้อโคเพื่อแช่แข็งและนำไปผสมเทียมในแม่โคเป็นสัด เพื่อดูว่าจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่ได้จะต่างกันดังเช่นการทดลองในแกะหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกชนิดตัวอสุจิ

รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อโคจำนวน 8 ตัว ด้วยวิธี Artificial vagina (AV) สัปดาห์ละครั้ง ครั้งละ 4 ตัว เป็นเวลา 36 สัปดาห์ ตรวจคุณภาพโดยดูปริมาตร สี ความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิต นำน้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตไม่ต่ำกว่า 80% มาทำการทดลอง โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาละลาย A (Tris 30.28g, Citric acid 17.00g, Fructose 12.50g, Demineralised water 920 ml) ให้มีจำนวนตัวอสุจิ 100 x 10^6/มล. หลังจากนั้นแยกชนิดตัวอสุจิโดยทำ protein columns ใช้ 10% w/v BSA ละลายในน้ำยาละลาย A เทใส่หลอดแก้วขนาด 20 x 150 มม. ให้มีความสูงของคอลัมน์ 8 ซ.ม. ค่อยๆ หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วบน protein columns ที่เตรียมไว้ให้มีความสูงของน้ำเชื้อที่หยดลงไป 1.0 ซ.ม. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 105 ชั่วโมง แยกเก็บน้ำเชื้อส่วนบนและส่วนล่างของ columns ใส่หลอดแก้วแล้วนำไปปั่นนาน 15 นาที (1,000 rpm) ดูดน้ำยาละลายส่วนใสข้างบนทิ้ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ

เติมน้ำยาละลาย B (Tris 30.28g, Citric acid 17.0g., Fructose 12.5g, Demineralised water 920 ml, Egg yolk 250 ml) ลงในหลอดแก้วที่มีตัวอสุจิที่ปั่นแล้ว เขย่าเบาๆ แล้วค่อยๆ ลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อที่แยกได้นี้ลงถึง 5°C โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 4-5°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นอีกครั้งนาน 15 นาที (1,000 rpm) แล้วดูดน้ำยาละลายส่วนใสข้างบนทิ้ง เจือจางส่วนที่เป็นตัวอสุจิที่อยู่ก้นหลอดด้วยน้ำยาละลาย Egg Yolk Tris (Tris 30.28g, Citric acid 17.00g, Fructose 12.50g, Demineralised water 920 ml, 87% Glycerol 80 ml, Egg yolk 250 ml, Penicillin G Sodium 1,000,000 IU, Streptomycin sulfate 1.00g) ให้มีตัวอสุจิ 120 x 10^6/มล. และ equilibrate น้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 1 ชั่วโมง ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อที่แยกได้โดยดูจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตและบรรจุน้ำเชื้อในหลอด French ministraw ขนาด 0.25 มล. ทำการแช่แข็งในไอของไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -120°C นาน 10 นาที แล้วเก็บน้ำเชื้อที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196°C เพื่อนำไปผสมเทียม

การผสมเทียมในโคตัวเมีย

คัดเลือกโคสาวอายุไม่น้อยกว่า 15 เดือน ที่มีวงจรการเป็นสัดส่วนสม่ำเสมอหรือแม่โคที่ให้ลูกมาแล้วไม่เกิน

2 ครั้ง ไม่มีปัญหาผสมไม่ติด ทดลองผสมเทียมน้ำเชื้อแช่แข็งที่แยกชนิดตัวอสุจิและติดตามผลการผสมเทียมและบันทึกเพศลูก นำข้อมูลเพศลูกโคมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ chi-squared test เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติของจำนวนลูกโคตัวผู้และลูกโคตัวเมียที่เกิดจากน้ำเชื้อที่แยกตัวอสุจิ และหาความแตกต่างของอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่าง

ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า การแยกน้ำเชื้อโคด้วยคอลัมน์ BSA ได้น้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่างของคอลัมน์เมื่อนำไปผสมเทียมในแม่โคเป็นสัด พบว่าน้ำเชื้อส่วนบน (ตารางที่ 1) ได้ลูกโคเพศผู้ 33 ตัว (57.9%) ลูกโคเพศเมีย 24 ตัว (42.1%) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย chi-squared test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำน้ำเชื้อส่วนล่างไปผสมเทียม ปรากฏว่าได้ลูกโคเพศผู้ 30 ตัว (54.5%) ลูกโคเพศเมีย 25 ตัว (45.5%) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (P>0.05) ส่วนอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อส่วนบนและน้ำเชื้อส่วนล่าง เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติด้วย chi-squared test ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่เกิดจากแม่โคที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่แยกชนิดตัวอสุจิโดยวิธี protein columns

	น้ำเชื้อส่วนบน[1/] (ตัว)	น้ำเชื้อส่วนล่าง[2/] (ตัว)
ลูกโคเพศผู้	33 (57.9%)[a]	30 (54.5%)[b]
ลูกโคเพศเมีย	24 (42.1%)[a]	25 (45.5%)[b]
รวม	**57**	**55**

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ที่แยกชนิดตัวอสุจิโดยวิธี layering spermatozoa on protein columns

น้ำเชื้อที่แยกชนิดตัวอสุจิ	จำนวนแม่โค (ตัว)	ผสมติดตั้งท้อง (ตัว)	อัตราการผสมติด[1/] (%)
น้ำเชื้อส่วนบน	207	57	27.5[a]
น้ำเชื้อส่วนล่าง	258	55	21.3[a]

1/, 2/ ตัวอักษรเหมือนกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

วิจารณ์

การแยกตัวอสุจิโดยวิธี โดยใช้ BSA โปรตีนคอลัมน์ ให้ตัวอสุจิว่ายผ่านในการทดลองนี้ พบว่าจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่เกิดจากน้ำเชื้อที่แยกได้ (ตารางที่ 1) ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ต่างจากการทดลองในแกะ ที่ได้จำนวนลูกแกะเพศผู้และลูกแกะเพศเมียแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือได้ลูกแกะเพศผู้ 36.4% ลูกแกะเพศเมีย 63.6% จากน้ำเชื้อส่วนบน และได้ลูกแกะเพศผู้ 75.0 % ลูกแกะเพศเมีย 25.0% จากน้ำเชื้อส่วนล่าง (White and Mendoza, 1984) จากการผสมเทียมในแกะตัวเมียทั้งหมด 87 ตัว แต่ไม่ได้ผลในการแยกน้ำเชื้อโคจากการทดลอง ครั้งนี้ และไม่ได้ผลเมื่อแยกน้ำเชื้อสุกร (Dixon et al., 1980) น้ำเชื้อกระต่าย (McCormick et al., 1983; Zavos, 1985) และน้ำเชื้อของคน (Evans et al., 1975; Ross et al., 1975; Ferguson et al., 1976; David et al., 1977; Dmowski et al., 1979; Quinlivan et al., 1982) แต่ Beernik and Ericsson (1982) รายงานยืนยันว่าประสบความสำเร็จในการแยกน้ำเชื้อของคน

การแยก BSA อาศัยหลักการที่อสุจิ Y ว่ายเร็วกว่าอสุจิ X ในตัวกลางที่มีความหนืด (Ericsson et al., 1973) แต่ในการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างของจำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมีย อาจเนื่องจากความแตกต่างของความเร็วในการว่ายของอสุจิทั้งสองชนิดในโคมีน้อยมากจนไม่สามารถแยกได้ด้วย BSA

การแยกน้ำเชื้อเพื่อกำหนดเพศลูกที่เกิดแม้จะมีผู้ทำการทดลองหลายท่าน มีทั้งฝ่ายที่รายงานว่าได้ผลและฝ่ายที่รายงานว่าไม่ได้ผล แต่ผู้ทำการวิจัยค้นคว้าก็ไม่ได้หยุดยั้ง ยังคงศึกษาหาวิธีการใหม่ ๆ เสมอ วิธีที่มีการทดลองและรายงานว่าได้ผลที่สุด คือ การใช้เครื่อง Flow cytomery แยกอสุจิ X และอสุจิ Y (Johnson et al., 1989) แต่น้ำเชื้อที่แยกด้วยวิธีนี้มีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิตต่ำและตัวอสุจิที่แยกได้อ่อนแอมากหลังจากผ่านกรรมวิธี (ข้อมูลจากการติดต่อกับนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่ทำการทดลองวิธีนี้)

ในการทดลองแยกตัวอสุจิ โดยผ่าน protein columns ครั้งนี้มีข้อน่าสังเกตคือน้ำเชื้อส่วนล่างที่แยกได้มีตัวอสุจิตายน้อยกว่าน้ำเชื้อที่ยังไม่ได้แยก ซึ่งเป็นไปได้ว่าตัวอสุจิที่ตายหรือไม่แข็งแรงไม่สามารถว่ายผ่านคอลัมน์ BSA ลงมาได้ ในทางการแพทย์จึงใช้วิธีนี้คัดเลือกตัวอสุจิที่แข็งแรงเพื่อใช้ในการผสมเทียมสำหรับผู้ที่ประสบปัญหาน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำ (Dmowski et al., 1979)

สรุปได้ว่าการทดลองแยกน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ครั้งนี้ด้วยวิธี protein columns ไม่ทำให้จำนวนลูกโคเพศผู้และลูกโคเพศเมียที่ได้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ไม่สามารถใช้เป็นวิธีในการกำหนดเพศลูกโคที่เกิดได้ การทดลองกำหนดเพศลูกโคโดยการแยกชนิดตัวอสุจิยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป จากการทดลองครั้งนี้มีข้อสังเกตคือ ตัวอสุจิของน้ำเชื้อส่วนล่างมีจำนวนตัวตายน้อยกว่าน้ำเชื้อที่ยังไม่ได้แยก จึงน่าจะนำวิธีนี้ไป ทดลองปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ที่มีปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อต่ำไม่สามารถใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์วิชัย ชนาธินาถ นายสัตวแพทย์ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ นายสัตวแพทย์สาโรช งามขำ คุณกฤษณะ โกมลจันทร์ และคุณอำนวย ธรรมลังกา ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมข้อมูลการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

อนันต์ ศรีขาว 2535. วิธีแยกอสุจิ X และ Y ในปศุสัตว์ก้าวหน้าไปถึงไหน ; เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง X and Y chromosome bearing sperm separation prospective. 24-25 มิถุนายน 2535 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ หน้า 961-962.

Ali J.I., Eldridge, F.E., Koo, F.C. and Schanbacher, B.D. 1990. Enrichment of bovine X and Y chromosome-bearing sperm with monoclonal H-Y antibody fluorescence activated cell sorter. Arch. Andr. 24 : 235-245.

Barlow, P. and Vosa, C.G. 1970. The Y Chromosome in human spermatozoa. Nature 226 : 961-962.

Beernik, F.J. and Ericsson, R.J. 1982. Male sex preselection through sperm isolation. Fertil. Steril. 38 : 493-495.

Bobbins, P.E., Lipshultz, L.I., Ward, J.B. and Legator, M.S. 1988. Fluorescent body distribution in spermatozoa in the male with exclusively female offspring. Fertil. Steril. 49(4) : 670-675.

Carson, S.L. and Betzer, F.R. 1987. Human gender selection. Semin. Reprod, Endocr, 5 : 81-89

David, G., Jeulin, C., Boyce, A. and Schwartz, D. 1977. Motility and percentage of Y-and YY-bearing spermatozoa in human semen samples after passage through bovine serum albumin. J. Reprod. Fertil. 50 : 377.

Dixon, R.E., Songy, E.A., Thrasher, D.M. and Kreider, J.L. 1980. Effect of bovine serum albumin on the isolation of boar spermatozoa and their fertility. Theriogenology 13 : 437-444.

Dmowski, W.P., Gaynor, L., Rao, R., Lawrence, M. and Scommegna, A. 1979. Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. Fertil. Steril. 31 : 52-57.

Ericsson, R.J., Langevin, C.N. and Nishino, M. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. Nature 246 : 421-424.

Evans, J.M., Douglas, T.A. and Renton, J.P. 1975. An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. Nature 253 : 352-354.

Ferguson, J.M., Souglas, T.A. and Renton, J.P. 1976. Studies on the separation of X-and Y-bearing spermatozoa. Brit. J. Obstet. Gynaecol. 83 : 411 (Abstr.)

Gledhill, B.L., 1988. Selection and separation of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm. Gam. Res, 20 : 377-395.

Iwasaki, S., Shioya, Y., Masuda, H., Hanada, A. and Nakahara, T. 1988. Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by Percoll. Theriogenology 30(6) : 1191-1198.

Johnson, L.A. and Clark, R.N. 1988. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. Gam. Res. 21 : 335-343.

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.

Kaneko, S., Iizyka, R., Oshiro, S., Nakajima, S. and Mohri, H. 1983a. Separation of human X and Y bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. Bioch. Bioph. Res. Com. 124 (3) : 950-955

Kaneko, S., Yamaguchi, J., Kobayashi, T. and Lizuka, R. 1983b. Separation of human X and Y bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. Fertil. Steril. 40 : 661-665.

Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T., Mohri, H. and Lizuka, R. 1984. Selective isolation of human X-bearing sperm by differential velocity sedimentation in Percoll density gradients. Biomed. Res. 5(2) : 187-194.

Mann, T. and Lutwak-Mann, C. 1981. Examination of spermatozoa and isolated structural components. In : Maler productive spermatozoa and isolated structural. Berlin, Heidlberg, NY. p. 63-68.

Maxwell, W.M.C., Mendoza, G. and White, I.G. 1984. Post-thawing survival of motile ram sperm after isolation by layering on protein columns. Theriogenology 21 : 601-607.

McCormick, R. E., Zavos, P. M. and Edgerton, L. A. 1983. Sex preselection in the rabbit via immunological or immunosedimentation techniques. Infertility 5 : 217-227.

Mohri, H., Oshio, S., Kaneko, S., Kobayashi, T. and Lizuka, R. 1987. Separation and characterization of mammalian X and Y bearing sperm. In : New Horizons in Sperm Cell Research. Mohir, H. ed., Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/Lordon and Breach Sci. Pub., NY. p. 469-481.

Oshio, S., Kaneko, S., Lizuka, R. and Mohri, H. 1987. Sialic acid in purified human sperm. Arch Andr 18 : 225-230.

Pearson, P. L., Boblow, W., Vosa, C. C. and Barlow, P. W. 1971. Quinacrine fluorescense in mammalian chromosomes. Nature. 231 : 326-329.

Quinlivan, E.L.G., Preciado, K. Long, T. L. and Sullivan, H. 1982. Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and sephadex chromatography. Fertil. Steril. 31 : 104-107.

Ross, A., Robinson, J. A. and Evans, H. J. 1975. Failure to confirm separation of X-and Y- bearing human sperm using BSA gradients. Nature 253 : 354-355.

Sans, P. J., Berrios, M. S., Fontecilla, E. 1977. Spermatozoal ratio in normal and oligozoospermic human semen and its relationship to fertility parameters. Andrologia. (3) 271-278.

Sarker, S., Jolly, D. J., Friedman, T. and Jones, O. W. 1984. Swimming behavior of X and Y human sperm differentiation which Journal.

Shettle, L. B. 1990. How sperm commence movement and their isolation for in vitro fertilization and sex selection. Am. J. Obstet. Gyne. 163(1) : 271.

Upreti, G. C., Riches, P. C. and Johnson, L. A. 1988. Attempted sexing of bovine spermatozoa by fractionation on a Percoll density gradient. Gamete. Research. 20 : 83-92.

White, I.G. and Mendoza, G. 1984. Preselection of sex of lamb by layering spermatozoa on protein columns. Reproduction in sheep. p. 299-300.

Zavos, P. M. 1985. Sperm separation attempts via the use of albumin gradeints in rabbits. Theriogenology. 23(6) : 875-879.

Preselection of Sex of Bovine by Layering Sprematozoa on Protein Columns

Rapiphan Uavechanichkul* **Parishat Sukhato*** **Mukda Ratanapaskorn***

Abstract

This experiment was undertaken to determine whether the method of layering spermatozoa on protein columns could be used in preselection of sex of bovine. Diluted semen from A.I. bulls were layered on column of bovine serum albumin (BSA) allowing the spermatozoa to swim into it. Semen was recovered and processed to be frozen. Four hundred sixty-five cows were randomed to be artificially inseminated. Spermatozoa from the top of the BSA column produced 33 (57.9%) male and 24 (42.1%) female calves, while spermatozoa from the bottom of the column produced 30 (54.5%) male and 25 (45.5%) female offsprings. The numbers of the male and the female offsprings as well as the conception rates of the semen from the top and the bottom of the columns were not signigicantly different (P>0.05).

Key words : sex, spermatozoa, protein columns, bovine

* Artificial Insemination Division, Department of Livestock Development; Phyathai, Bangkok 10400