บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 เทคนิคการคัดเพศ

2.1.1 Flow Cytometry

คือวิธีการวัด (-metry) คุณสมบัติของเซลล์ (-cyto) ซึ่งอยู่ในสารละลายที่ไหล (flow) อยู่โดยใช้เลเซอร์ การทำงานของ Flow Cytometer อาศัยการตรวจวัดเซลล์ที่กำลัง flow อยู่ ซึ่งจะวัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ขณะที่ไหลผ่านทางกรวย ของเครื่องเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ในอัตราเร็ว 500-1,000 cell / sec ต้องใช้การย้อมด้วยสี fluorescence หรือ immuno-fluorescence จึงจะสามารถทำการตรวจนับหรือวัดได้

เทคนิคนี้เป็นวิธีที่ยอมรับมากที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากมีความแม่นยำในการคัดแยกเพศของสเปิร์มมาก โดยสามารถแยกสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์หรือวาย ให้บริสุทธิ์ได้ถึงได้ 85 - 95 % และ 85 – 96 % ตามลำดับ (Welch and Johnson, 1999) และเมื่อนำสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์ ที่ผ่านการคัดเลือกไปผสมในแม่โคจะได้ลูกเพศเมียประมาณ 91 - 95 % และเมื่อนำสเปิร์มที่ผ่านการแยกเพศไปผสมกับไข่ พบว่าตัวอ่อนระยะต้นที่แบ่งตัวได้ถึงระยะ Blastocysts น้อยกว่า (16 - 18 %) ตัวอ่อนที่ผสม กับสเปิร์มที่ไม่ได้ผ่านการคัดแยก (24 – 25 %) ลูกสัตว์ที่เกิดจากสเปิร์มที่แยกเพศแล้วมีความปกติ เช่นเดียวกับลูกสัตว์ที่เกิดโดยธรรมชาติ หรือลูกสัตว์ที่เกิดโดยการผสมเทียมโดยทั่วไป ในงานทดลองของ Roberto *et al*. (2006) ได้ทำการผสมสเปิร์มที่บรรจุในหลอดน้ำเชื้อทำให้ละลายแล้วนำมา swim up ใน media เพื่อคัดเลือกตัวที่รอดชีวิตมาคัดเพศโดยผ่านเครื่อง Flow cytometry พบว่าสามารถคัดเลือกสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์ได้แม่นยำถึง 91±2 % แต่การพัฒนาของเซลล์ที่ผ่านเครื่อง flow cytometry ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.01$) จากนั้นนำมาผสมกับไข่เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิภายในหลอดทดลอง (IVF) แล้วตรวจสอบความแม่นยำของเพศด้วยเทคนิค real-time PCR พบความถูกต้องของเพศตัวอ่อนถึง 87 % อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ทำให้สเปิร์มสูญเสียความสามารถในการเจาะไข่ (Oocytes) ในระหว่างขั้นตอนการคัดแยกเพศ ประมาณ 8.8 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จะอาศัยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยขั้นตอนแรกจะใช้อุณหภูมิสูงเพื่อแยกสาย DNA คู่สม

ออกจากกัน เรียกขั้นตอนนี้ว่า denaturation จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ primer ที่เป็นเบสคู่สมมาจับคู่กับ DNA ที่ต้องการอย่างถูกต้องเรียกขั้นตอนนี้ว่า annealing จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase จะเกิดการสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่เรียกขั้นตอนนี้ว่า extension ผ่านรอบที่ 1 แล้วจึงเริ่มรอบที่ 2 ต่อไป ทำเช่นนี้ 20 ~ 40 รอบ ปริมาณ DNA ที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (Sambrook and Russell, 2001)

จากรายงานการทดลองของ Bredbacka *et al*. (1995) ได้ศึกษาการคัดเลือกเพศของโคจากตัวอ่อนโดยวิธี PCR โดยใช้ primer DYZ ที่มีความจำเพาะกับโครโมโซมวาย ในการทำเพิ่มจำนวน DNA ใช้เวลา 3 นาทีในการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ^{O}C นาน 30 วินาที ขั้นตอน annaeling ที่อุณหภูมิ 55 ^{O}C นาน 30 วินาที และ primer extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{O}C นาน 30 วินาทีและในรอบสุดท้ายตัวอย่างจะถูกทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ 72 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ DNA ที่ได้มาทำ gel eletrophoresis โดยใช้เจล 3 % และย้อมด้วย 5 % ethidium bromide และนำไปส่องใต้แสง UV ถ้าตัวอย่างเป็นเพศผู้จะพบแถบสีชมพูของโครโมโซมวายปรากฏขึ้น

Park *et al*. (2000) ได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเพศโดยใช้ primer ชนิด BOV97M แต่มีการประยุกต์ใช้โดยตรวจสอบกับตัวอ่อนระยะต่างคือ บลาสโตซีส ระยะ 8 เซลล์ ระยะ 4 เซลล์ และระยะ 2 เซลล์ ในการตรวจสอบเพศพบว่าความแม่นยำของเพศจากการแบ่ง ตัวอ่อนออกเป็นระยะต่างๆ คือ 100, 96.3, 94.3 และ 92.1 % ตามลำดับ ถ้าต้องการให้มีความแม่นยำถึง 100 % จำเป็นต้องใช้ตัวอ่อนที่มีจำนวนเซลล์ที่มากเพื่อเพิ่มความแม่นยำของ primer จึงได้มีการนำเทคนิคต่างๆ เข้ามามีส่วนร่วมกับวิธี PCR ในการตรวจสอบเพศ นอกจากนี้ได้มีการคัดเพศตัวอ่อนโดยนำตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นเพื่อเพิ่มการตกไข่ ผสมและชะล้างจากมดลูกอายุประมาณ 6–8 วัน ซึ่งเป็นระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซีส มาตรวจดูโครโมโซมวาย (chromosome Y) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจด้วยวิธีคาริโอไทป์ จากการย้อมสีโครโมโซมเพื่อหาโครโมโซมวายโดยตัดเซลล์ตัวอ่อน ซึ่งต้องตัดเป็นจำนวนมากทำให้ส่งผลต่อเซลล์ที่เหลือในการย้ายฝาก และใช้เวลานาน ซึ่งมีการพัฒนาการคัดเพศด้วยดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) โดยผลิตไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซมวายในโค โดยใช้ร่วมกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพื่อเพิ่มสายดีเอ็นเอให้เพียงพอกับการตรวจสอบเพศซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ประมาณ 95–100 %

Hochman *et al*. (1995)ใช้ primer 3 ชนิดในการตรวจหาเพศผู้ของโคคือ BRY.1, Bov97M และ ZFX / ZFY พบว่าความแม่นยำในการตรวจสอบเพศของ primer ทั้ง 3 คือ BRY.1 เท่ากับ 87 % ZFX / ZFY เท่ากับ 97 % และ Bov97M เท่ากับ 100 % ในงานของ Virta *et al*. (2002) ได้ทำการติดสารเรืองแสงเข้ากับ primer ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อลดขั้นตอน gel electrophoresis ในการตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลของ PCR โดยดูการเรืองแสงของชิ้นส่วนโครโมโซมวายที่เพิ่มขึ้นจากการเทคนิค PCR ทำให้ทราบเพศตัวอ่อนที่เป็นเพศผู้จะเกิดการเรืองแสงขึ้น โดยมีความแม่นยำถึง 96 %

Hasler *et al*. (2003) ได้นำชุด PCR ตรวจสอบเพศทางการค้าที่ดูการเรืองแสง โดยตัวอย่างที่ศึกษากับชุดตรวจสอบต้องมีการผ่าแบ่ง (biopsy) ก่อนทำการตรวจเพศ ทำให้มีการศึกษาถึงอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนแบบสด ของตัวอ่อนที่ได้มาจากการชะล้างและจากห้องปฏิบัติการพบว่าตัวอ่อนจากการชะล้างมีอัตราการตั้งท้องที่ดีกว่าตัวอ่อนห้องปฏิบัติการและยังพบว่าตัวอ่อนที่ทำการผ่าแบ่งมีอัตราการตั้งท้องต่ำกว่าตัวอ่อนที่ไม่ได้ทำการผ่าทั้งในการย้ายฝากแบบสดและการย้ายฝากตัวอ่อนจากการแช่แข็ง ซึ่งชุดตรวจสอบเพศทางการค้าที่ใช้มีความแม่นยำในการบ่งบอกเพศผู้ 98.7 % และเพศเมีย 94.4 % จึงได้มีการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ต่างๆ เช่น k-casein ที่บ่งบอกโปรตีนในนม ร่วมกับการตรวจสอบเพศ ด้วย primer BOVM97 ทำให้มีความแม่นยำถึง 100 % ทำให้เริ่มมีการออกแบบ Primer ที่จำเพาะต่อโครโมโซมวายต่างๆ กันออกมาใช้ตรวจสอบเพศ แต่จากรายงานของ Enright *et al*. (2000) ที่ศึกษาถึงอัตราการตั้งท้องต่อการตัดตัวอ่อน พบว่าอัตราการท้องของตัวอ่อนที่ทำการตัดและไม่ทำการตัดมีอัตราการตั้งท้องที่ใกล้เคียงกัน

2.1.3 Male Specific Monoclonal Antibody

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody, MAb) คือแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนและสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมาก โดยอาศัยหลักการของการเชื่อมระหว่างบีลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนให้สร้างแอนติบอดี กับเซลล์ไมอิโลมาซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเซลล์มะเร็ง ผลจากการเชื่อมเซลล์ทั้งสองชนิดทำให้เกิดเซลล์ลูกผสม (hybridoma) ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีอายุยืนยาวตามคุณสมบัติของเซลล์ไมอิโลมา แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ เรียกว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดี เนื่องจากสร้างมาจากเซลล์โคลน (Clone) เดียวกัน และมีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนสูง (อรวดี, 2539)

Goodfellow and Andrews (1982) พบว่าการปลูกถ่ายผิวหนังของหนูต่างเพศและต่างสายพันธุ์ผลการตอบสนองต่อแอนติเจนที่แตกต่างกันมีผลมาจากโครโมโซมวายในเพศผู้ ทำให้ผิวหนังที่ปลูก ถ่ายเป็นสาเหตุให้เกิดการกระตุ้นการแบ่งตัวของทีเซลล์ (T cell) และรวมถึงการตอบสนองของทีเซลล์

Stephen *et al*. (1974) ได้ทดลองดูปฏิกิริยาข้ามของ Histocompatibility – Y antigen ของหนู โดยฉีดเซลล์ม้ามของหนูเพศผู้เข้าไปในหนูเพศเมียเพื่อให้สร้างแอนติบอดีต่อเอชวาย เนื่องจากมีการพบว่าการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อผิวหนังของหนูเพศผู้สู่เพศเมียไม่สามารถเข้ากันได้นั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องมาจากผลของเอชวายแอนติเจน มีผลต่อการปลูกถ่ายอวัยวะข้ามเพศจึงทำให้หนูเพศเมียสร้างแอนติบอดีขึ้นมาอย่างจำเพาะ แล้วนำไปศึกษาต่อการทำไซโตทอกซิค โดยนำน้ำเชื้อบ่มรวมกับเอชวายแอนติเจนร่วมกับคอมพลีเมนต์ของม้าแล้วเติมสี trypan blue เพื่อตรวจนับเซลล์ตายพบว่ามีการตายของน้ำเชื้อมากกว่า 50% ในสัตว์ทุกชนิด

จากรายงานของ Verrhuis *et al.* (1994) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน มาใช้ในการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนโค ทำการตรวจสอบความจำเพาะต่อเพศด้วยเทคนิค RIA (ในกลุ่มควบคุม) ตรวจสอบความจำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคเพศเมียและใช้เทคนิค ELISA ร่วมด้วย พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ระยะ 7 - 8 วันหลังการปฏิสนธิ มีช่วงความแม่นยำของการบ่งบอกเพศว่าเป็นเพศผู้อยู่ในระหว่าง 58 - 71 %

Kyozo *et al*. (1990) ทำการคัดเพศตัวอ่อนหนูด้วยแอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเพศผู้ โดยใช้เอชวายแอนติบอดี จากการกระตุ้นหนูเพศเมียพันธุ์ wistar ด้วยสเปิร์มของหนูเพศผู้พันธุ์เดียวกันนำแอนติบอดีมาบ่มร่วมกับตัวอ่อน 5 – 6 ชั่วโมง พบว่า 50% จะหยุดการพัฒนาในระยะมอลูล่า จากนั้นตัวอ่อนที่เหลือสามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้ และนำไปถ่ายฝากไว้กับตัวรับพบว่า 80 % ของตัวอ่อนเหล่านั้นเจริญเติบโตเป็นเพศเมีย และในปี 1992 ได้ทำการคัดเลือกเพศตัวอ่อนโคโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อหนูเพศผู้ที่เตรียมจากอัณฑะหนูแรกเกิด ทำการศึกษาในตัวอ่อนของหนู กระต่าย แพะ แกะ และโค เมื่อนำมาบ่มร่วมกับแอนติบอดี พบว่าครึ่งหนึ่งไม่สามารถเจริญถึงระยะมอลูล่าได้ แต่อีกครึ่งสามารถพัฒนาไปถึงระยะบลาสโตซีสได้ ผลพบว่า 80 – 90 % ของตัวอ่อนโค แอนติบอดีไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตซึ่งมีคารีโอไทป์แบบ XX และเกือบ 80 % มีคารีโอไทป์แบบ XY ซึ่งลูกโคที่เกิดออกมามีความถูกต้องใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยโครโมโซม

Bennett and Boyse (1973) ได้กระตุ้นให้หนูเพศเมียสร้าง เอชวายแอนติซีรั่ม ด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ผิวหนังของหนูเพศผู้พันธุ์เดียวกัน แล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยาไซโตทกซิคกับสเปิร์ม โดยใช้ความเข้มข้นของคอมพลีเมนต์จากม้า 1 : 20 สเปิร์มจำนวน 5 x 10^6 cell และเอชวายแอนติซีรั่ม 1 : 1 บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C นาน 35-45 นาที พบอัตราการตายของสเปิร์มจากสภาวะนี้ 70-80 % และการผสมตามธรรมชาติจะให้สัดส่วนหนูเพศผู้ 53.3 % แต่เมื่อทำปฏิกิริยาไซโตทอกซิตจะมีสัดส่วนเพศผู้ 45.4 %

Fayemi (2004) ได้ศึกษาปฏิกิริยาไซโตทอกซิคจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีของสุกรเพศผู้ต่อน้ำเชื้อในสุกร โค มนุษย์ แพะ แกะ และกระต่าย แล้ววัดปฏิกิริยาไซโตทอกซิคด้วยการนับจำนวนน้ำเชื้อด้วยแสงฟลูออเรสเซนต์ (immunofluoresence) พบว่าแอนติบอดีของสุกรสามารถทำลายน้ำเชื้อของสุกรเองและของมนุษย์แต่ไม่ตอบสนองกับน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดอื่น เช่นเดียวกับ Zaborski (1979) ได้ตรวจสอบหาเอชวายแอนติเจนในน้ำเชื้อของหนูที่บริเวณ acrosomal

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

membrane (ผิวส่วนหัว) ของน้ำเชื้อ ดูจากระดับการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในน้ำเชื้อของหนูก่อนผสมเทียมมาตรวจสอบเพศด้วย เอชวายแอนติซีรั่ม โดยวิธี cytotoxicity พบสัดส่วนของน้ำเชื้อวายที่แตกสลายอยู่ประมาณ 53.3% ในงานของ Booman *et al*. (1989) ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแยกเพศก่อนการถ่ายฝากตัวอ่อนโค โดยการใช้เทคนิค indirect immunofluoresence ซึ่งยังไม่สามารถแยกความต่างของเพศได้จึงทำการปรับปรุงเทคนิคใหม่ โดยลดตำแหน่งที่ไม่จำเพาะของโมโนโคลนอลออกไป พบว่าลดความผิดพลาดลงได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายสามารถวัดความจำเพาะต่อเพศผู้ได้

Ramalho *et al.* (2004) ได้กระตุ้นปฏิกิริยา cytotoxicity กับตัวอ่อนโคและม้าจากการบ่มด้วยโพลิโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal Antibody) ต่อเอชวายแอนติเจนเพื่อให้ตัวอ่อนเพศผู้ตายไป โดยดูจากระยะการพัฒนาของตัวอ่อน พบว่าตัวอ่อนโค 46.7 % เป็นเพศผู้เนื่องจากพัฒนาถึงระยะ มอลูล่า ส่วนตัวอ่อนเพศเมีย 53.3 % พัฒนาถึงระยะบลาสโตซีส ส่วนตัวอ่อนม้าให้ผลในการคัดเพศด้วยวิธีการดังกล่าว 84 % เป็นเพศผู้เมื่อตรวจเพศตัวอ่อนด้วยเทคนิค PCR และ karyotype

White *et al.* (1987) ใช้เอชวายแอนติเจนสำหรับจำแนกเพศตัวอ่อนแกะในช่วงของการฝังตัวซึ่งตัวอ่อนที่นำมาศึกษาได้ตรวจสอบโครโมโซมเพศแล้ว สามารถตรวจสอบการแสดงออกของเพศผู้ได้ประมาณ 88 % โดยอาศัยเทคนิค immunofluorescein เช่นเดียวกับในรายงานของ Ali *et al*. (1990) ได้ทำการเชื่อมฟูออเลสเซนต์ goat anti - mouse เพื่อในการตรวจสอบโครโมโซมวายในน้ำเชื้อของโคที่ติดฉลากด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อการแสดงออกของ H – Y แอนติเจน โดยดูการเรืองแสงของโครโมโซมวายที่หัวสเปิร์ม พบว่าสัดส่วนที่เป็นผลบวกของโครโมโซมวายและโครโมโซมเอ็กซ์เท่ากับ 76 : 24 , 88 : 12 และ 77 : 23 ตามลำดับ

Gardon *et al.* (2004) ได้จำแนกเพศตัวอ่อนโคระยะต่างๆ ที่ผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ โดยการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวาย พบว่าระยะของตัวอ่อน (ระยะ 4 - 8 เซลล์ ระยะ 16 – 32 เซลล์ และ ระยะบลาสโตซีส) ไม่มีความแตกต่างกันในส่วนสัดส่วนเพศผู้และเพศเมียที่เกิดขึ้นจาการใช้แอนติซีรั่มต่อเอชวายแอนติเจนในการตรวจสอบ 85.8 : 14.2

Hoppe and Koo (1984) ได้ศึกษาการยับยั้งตัวสเปิร์มวายจากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนเพื่อผลิตตัวอ่อนหนูเพศเมียในห้องปฏิบัติการ(*in vitro* production of embryo) พบว่าการตอบสนองของสเปิร์มหนูต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนไม่มีอิทธิผลต่อสัดส่วนเพศของไข่ที่ปฏิสนธิแบบ *in vitro* และจากการใช้เทคนิค immuno selection ในการจับสเปิร์มวายโดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจน สามารถเพิ่มจำนวนลูกเพศเมียได้ประมาณ 6 – 8 % และพบว่าการแสดงออกของเอชวายแอนติเจนจะมีสูงในช่วงที่สเปิร์มอยู่ใน testicular และจะลดลงระหว่างการเคลื่อนที่ลงสู่ epididymis มีความเป็นไปได้ว่าที่เวลาจะชัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำการแสดงออกของเอชวายแอนติเจน อย่างไรตาม เอชวายแอนติเจนสามารถตรวจพบได้บริเวณ acrosomol membrane และเมื่อนำโพลีโคลนอลต่อเอชวายแอนติเจนมาใช้วิเคราะห์เพศสเปิร์มโดยเทคนิค complement – dependent cytotoxicity ได้ความน่าเชื่อถือ 71-85 % (Reilly and Goldberg, 1991)

2.2 ระบบภูมิคุ้มกัน

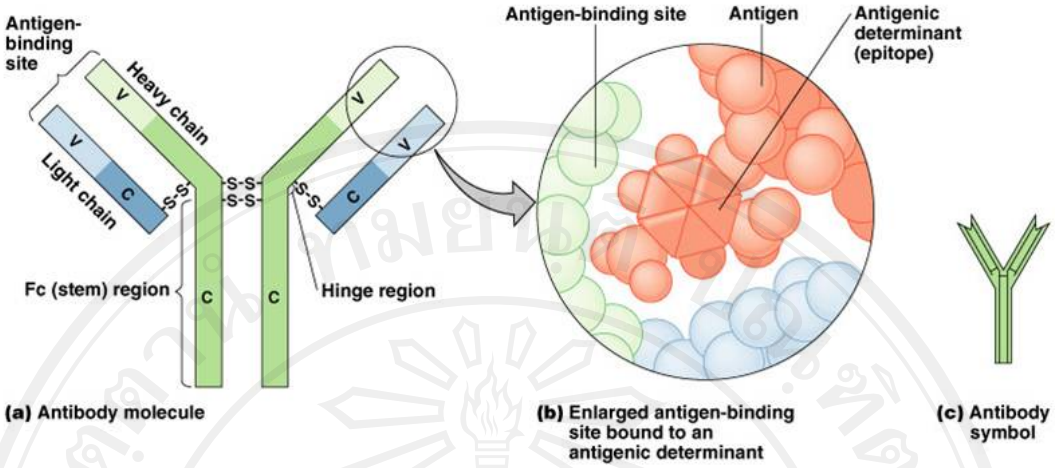
2.2.1 แอนติบอดี (Antibody)

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการตอบสนองต่อเชื้อโรค เป็นวิธีการป้องกันที่ธรรมชาติให้มา โดยระบบที่ใช้ทำหน้าที่ป้องกันโรคของร่างกายเรียกว่า ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ซึ่งจะแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม

ภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะเจาะจง (specific acquired immunity) จะแบ่งวิธีการตอบสนองออกเป็น 2 ระบบใหญ่ คือ

1. Humoral Immune Response (HIR) อาศัยการสร้าง antibody (Ab) จาก B-lymphocyte ซึ่งมีกำเนิดจากไขกระดูก ในตอนแรกจะอยู่ในรูป pre-B-cell จากนั้นย้ายไปที่ lymphoid tissue เพื่อพัฒนาเป็น B-lymphocyte ที่เจริญเต็มที่จึงถูกปล่อยออกมาสู่กระแสเลือดและไปตาม lymphoid tissue ต่างๆ เข้าสู่กระแสน้ำเหลืองทั่วร่างกายเพื่อทำหน้าที่ เมื่อมี immunogen เข้ามาและทำการตอบสนองก็จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น blast cell และ plasma cell ตามลำดับเพื่อทำหน้าที่สร้าง antibody ที่จำเพาะต่อ immunogen แต่ละชนิด แอนติบอดี หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เป็นโปรตีนที่มีรูปร่างคล้ายตัว Y เปลี่ยนสีและรูปร่าง ตามลักษณะของเชื้อโรคที่จำเพาะนั้นๆ โดยที่ส่วนยอดของตัว Y จะมีความหลากหลายมากไม่เหมือนกันในแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละชนิด เรียกว่า variable region เป็นตำแหน่งที่จับกับแอนติเจน ส่วนที่โคนตัว Y ของโมเลกุลแอนติบอดีจะบ่งบอกถึงชนิดของแอนติบอดีว่าเป็น class ใดบ้าง เช่น IgG, IgA, IgM, IgD, IgE เรียกว่า constant region แอนติบอดีกระจายอยู่ตามท่อน้ำเหลือง และเส้นเลือด แอนติบอดีจะจับกับสิ่งแปลกปลอม หรือจุลชีพที่เข้ามาในร่างกาย เพื่อการทำลายจุลชีพนั้นๆ แอนติบอดีชนิด secretory IgA จะอยู่ตามช่องเยื่อบุต่างๆ ในน้ำตา น้ำลาย สารหลั่งในช่องทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ท่อปัสสาวะ ช่องคลอด เป็นต้น เพื่อยับยั้งไม่ให้จุลชีพ หรือสิ่งแปลกปลอมผ่านเข้าร่างกายทางเยื่อบุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2-1 แสดงแบบจำลองโครงสร้างของแอนติบอดี
(ที่มา: http://faculty.ircc.edu/)

1. Cell-mediated Immune Response (CMIR) เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองนี้คือ T lymphocyte กำเนิดมาจากไขกระดูกเช่นเดียวกับ B lymphocyte โดยในตอนแรกจะเป็น pre-T-cell จากนั้นจึงพัฒนาผ่านทาง thymus gland มาเป็น T-cell ที่สมบูรณ์ นอกจากนี้การตอบสนองอาจเกิดจากปฏิกิริยาของ mediators ที่ปล่อยออกมา (lymphokines) หรือร่วมกับเซลล์อื่นๆ เช่น killer cell (K cell), natural killer cell (NK cell) และ macrophage

ภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจงที่มีโดยธรรมชาติ (innate immunity หรือ natural resistance) เป็นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Iwanaga and Lee, 2005) กลไกการป้องกันแบ่งออกเป็น

1.1 ลักษณะป้องกันทางกายวิภาค (anatomical barrier) เช่น ผิวหนัง และเยื่อบุผิว

1.2 สารเคมีในร่างกาย (chemical factor) เช่น น้ำตา น้ำลาย สารคัดหลั่งจากเซลล์ เยื่อบุจมูกและน้ำย่อย

1.3 การสะกดกลืนกิน (phagocytosis) เซลล์ที่ทำหน้าที่ ได้แก่ neutrophil, monocyte, macrophage

1.4 ระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) คือกลุ่มของโปรตีนในซีรั่มมากกว่า 35 ชนิด ที่ในภาวะปกติจะอยู่ในรูป inactive form แต่เมื่อถูกกระตุ้นจาก antigen-antibody complex หรือ immune complex จะทำให้เกิดการกระตุ้นเชื่อมโยงต่อๆไป และผลผลิตที่เกิดขึ้นจับเป็นคอม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพล็กซ์ที่เมมเบรนและก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กลับคืนไม่ได้ของเมมเบรนทั้งหน้าที่และรูปร่าง ทำให้เซลล์เกิดการแตกสลาย (lysis) นอกจากนั้น biological products ที่เกิดขึ้นจะมีผลให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ตามมามากมาย เช่น inflammation และ anaphylaxis ระบบนี้จึงเป็นระบบที่สำคัญในการป้องกันร่างกาย (Nonaka and Yoshizaki, 2004) โดยระบบคอมพลีเมนต์ถือเป็นแกนหลักของการมีวิวัฒนาการมาก่อนระบบภูมิคุมกันแบบที่สร้างแอนติบอดีพบในครั้งแรกในปลาที่มีขากรรไกร (Nari *et al,* 2005) แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงระบบคอมพลีเมนต์มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงผลทั้งภูมิคุ้มกันแบบเจาะจงและภูมิคุ้มกันแบบที่มีแต่โดยกำเนิด (Zarkadis *et a*l., 2001)

ไซโตทอกซิค (Cytotoxic) คือ ภาวะเริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ ที่เกิดจากการได้รับ สารเคมี หรือเซลล์ถูกกระทำโดยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน สภาวะเป็นพิษสามารถวัดได้ เป็นปฏิกิริยาที่ระบบภูมิคุ้มกันเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อมีการทำงานของแอนติบอดี (Antibody) ต่อแอนติเจน (Antigen) มีผลกระตุ้นการทำงานของระบบโปรตีนในเลือดที่เรียกว่า Complement ทำให้เซลล์แปลกปลอมนั้นถูกทำลาย เรียกระบบภูมิคุ้มกันที่ทำลายเซลล์แปลกปลอมแบบนี้ว่า Antibody - Dependent Cell - mediated Cytotoxicity (ADCC) โดยมีโปรตีนคอมพลีเมนต์ และแอนติบอดีเป็นสองปัจจัยหลักในการทำลายเซลล์

2.2.2 ระบบคอมพลีเมนต์ (The complement system)

Jules Bordet (1898) ได้ค้นพบแอนติบอดี โดยแสดงให้เห็นว่า serum ที่เก็บใหม่ หรือ fresh serum ที่มีแอนติบอดีต่อแบคทีเรียอยู่ เมื่อใส่แบคทีเรียเข้าไปที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C พบว่าเซลล์ของแบคทีเรียแตก (lysis) แต่ถ้านำ serum ดังกล่าวไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 56 ^{O}C หรือสูงกว่านี้ พบว่าเหตุการณ์ดังกล่าวจะไม่เกิดขึ้น คือไม่เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรีย โดยการสูญเสียความสามารถในการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (loss of lytic capacity) นี้ ไม่ได้เกิดจากการที่แอนติบอดีถูกทำลาย ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีจัดเป็นโมเลกุลที่ทนความร้อน (heat stable) ดังนั้น Bordet จึงสรุปว่า ใน serum จะต้องมีองค์ประกอบอีกอย่างหนึ่งที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน (heat labile component) หรือ คอมพลีเมนต์ (complements) ต่อมาจึงให้ชื่อองค์ประกอบนั้นว่า “complement”

ระบบคอมพลีเมนต์เป็นระบบการตอบสนองอย่างแรก ที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้ามา ซึ่งทำหน้าที่อยู่ในภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด ระบบคอมพลีเมนต์ประกอบด้วยโปรตีนในพลาสมามากกว่า 35 ชนิด ซึ่งเรียกว่า complement component ช่วยแอนติบอดีในการทำลายแบคทีเรีย และเชื้อโรค (Boshra and Sonyer, 2006) โดยที่โปรตีนเหล่านี้อยู่ในกระแสเลือด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในรูปของ inactive form ปฏิกิริยา complement เริ่มจากโปรตีน C1 ถูกกระตุ้นด้วยแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนเป็นแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพ็ลกซ์ (antigen-antibody complex) แล้วจึงมีการกระตุ้นโปรตีนในระบบอย่างต่อเนื่อง จนทำให้เซลล์เสียสมดุลของภายในเซลล์ ด้วยการเกิดรูที่ผิวเซลล์ เซลล์จึงถูกทำลาย (lysis)

2.2.3 ส่วนประกอบของระบบคอมพลีเมนต์ (The Complement Components)

1. Classical pathway : C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9
2. Alternative pathway : properdin, factor B, factor D, C3, C5-C9
3. MBLectin pathway : MASP-1, MASP-2, C4, C2, C3, C5-C9
4. Complement receptor : CR1, CR2, CR3, CR4, C3a/C4a receptor, C5a receptor
5. Regulatory protein : C1 inhibitor, C3b inactivator, factor I, factor H, S-protein

2.2.4 การกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (Complement Activation)

เกิดได้ 3 ทางใหญ่ คือ Classical pathway, Alternative pathway, The MBLectin pathway แบ่งเป็น 3 phase (Fujita, 2004)

ก. Initiation phase เริ่มการทำงานแบบต่อเนื่อง

ข. Amplification phase เพื่อเพิ่มจำนวน C3 ด้วยวิธีที่ต่างกัน

ค. Membrane attack phase เหมือนกันทั้ง 3 pathways

2.2.4.1 Classical pathway

สิ่งที่สามารถกระตุ้นได้คือ soluble Ag-Ab complex, Staphylococcus protein A, C-reactive protein complexes, myelin basic protein, DNA, endotoxin เป็นต้น

การกระตุ้นเส้นทางนี้ด้วยแอนติบอดีนั้นพบว่า มีแอนติบอดีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถกระตุ้น classical pathway ได้คือ IgG (IgG1, IgG2, IgG3) และ IgM เท่านั้น เริ่มจาก soluble Ag-Ab complex กระตุ้น C1q ให้มาตรึงตรง Fc ของ IgG หรือ IgM (โดย IgG 2 โมเลกุลจับกับคอมพลีเมนต์ 1โมเลกุล ส่วน IgM 1โมเลกุลสามารถจับกับ คอมพลีเมนต์ 1โมเลกุลได้) เกิดการเปลี่ยนแปลงได้เอนไซม์ C1r กระตุ้นC1s ได้ C1s(esterase) C1s ย่อย C4 ออกเป็น C4a และC4b ส่วนC4a นั้นถูกปล่อยออกมาอยู่ในกระแสโลหิต ส่วนC4b ส่วนใหญ่จะถูกย่อยต่อด้วยน้ำได้ iC4b ที่เหลือจะจับตัวบนผิวห่อหุ้มของเซลล์ใกล้เคียงแบบcovalent คือไม่สามารถเปลี่ยนกลับมาในรูปเดิมได้ C2 รวมตัวกับ C4b ถ้าC4b อยู่ใกล้กับC1 จะย่อย C2 เป็น C2aและC2b ทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้เกิด C4b2a ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น C3 convertase ย่อย C3 ได้ C3a และ C3b (Boshra, 2006) C3a มีคุณสมบัติ anaphylatoxin จะถูกปล่อยออกสู่กระแสโลหิต C3b ส่วนใหญ่จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็น hydrolyzed C3b หรือ C3b รวมตัวกับกลุ่มของ C4b2a ทำให้เกิด C4b2a3b ซึ่งทำหน้าที่เป็น C5 convertase, C3b เป็นตัวสำคัญที่เชื่อมโยงระหว่างทางตรงและทางอ้อม

2.2.4.2 Alternative pathway

การกระตุ้นผ่านทาง Alternative เป็นวิธีการที่มีวิวัฒนาการเกิดขึ้นมาก่อน Classical และ MBLectin เพราะองค์ประกอบของโปรตีนภายในกระบวนการนี้สามารถจับกับผิวของแบคทีเรียได้โดยตรง ไม่ต้องอาศัยแอนติบอดีในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาคือสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้โดยสารหลายอย่าง เช่น bacterial cell wall (bacterial polysaccharide), lipopolysaccharides, virus, insulin, cobra venum factorและเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิด

การกระตุ้นจะเกี่ยวข้องกับซีรั่มโปรตีน 4 ชนิด คือ C3 factor B, factor D and properdin การกระตุ้นเริ่มจาก C3 ซึ่งมี thioester bond ที่ไม่คงตัวจะถูกสลายด้วยน้ำ (spontaneous hydrolysis) ได้เป็น C3a และ C3b C3b สามารถจับตัวกับผิวของ foreign antigens (เช่น bacterial cells และ viral particles) C3b ที่อยู่บนผิวของ foreign cells จะรวมตัวกับ factor B โดยต้องมี Mg^{2+} อยู่ด้วย ต่อมาจะถูกแยกตัวออกโดย factor D ได้เป็น Ba และ Bb factor B จะถูกแบ่งแยกโดย factor D ได้ต่อเมื่อ factor B รวมตัวกับ C3b แล้วเท่านั้น Ba ไม่มีหน้าที่แน่ชัดและอยู่ในกระแสโลหิต Bb ซึ่งยังจับตัวอยู่กับ C3b เกิดเป็น C3bBb หรือ alternative pathway C3 convertase กลุ่มของ C3bBb มีคุณสมบัติไม่คงตัว โดยปกติมีช่วงครึ่งชีวิตประมาณ 5 นาที แต่ถ้ามี properdin (P) มายึดอยู่ด้วยเป็น C3bBbP จะยืดเวลาเป็น 30 นาที ทั้ง C3bBbP และ C3bBb สามารถแยกสลายโมเลกุลของ C3 ตัวต่อมาให้เป็น C3a และ C3b ได้อีก C3b อาจเข้าสู่วงจรทางสายอ้อมอีกโดยการรวมตัวกับ factor B แล้วถูกกระตุ้นด้วย factor D ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ convertase มากขึ้น (feedback amplification loop) การที่มี C3b มารวมกับ C3bBb ก่อให้เกิด (C3b) Bb ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น alternative pathway C5 convertase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4.3 The MBLectin pathway (Mannan Binding Lectin Pathway)

เป็น pathway ที่เริ่มสังเกตพบในปี คศ.1982 โดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นโดย Ihara และในปี 1990 มีการตีพิมพ์กลไกในการกระตุ้น complement ใน pathway นี้

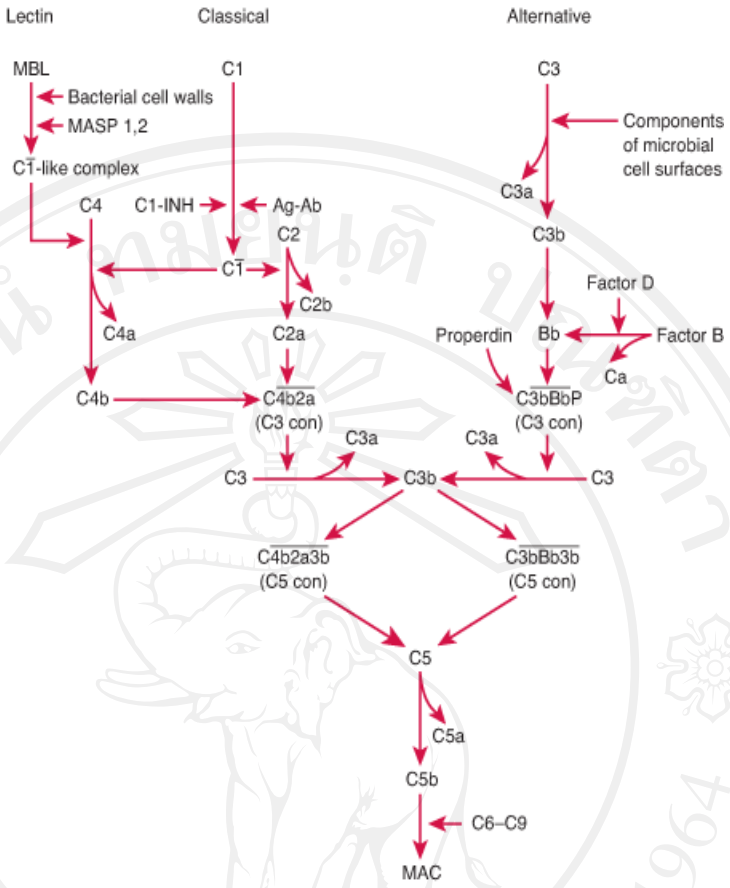
สิ่งที่สามารถกระตุ้นได้คือ สารแปลกปลอมพวกคาร์โบไฮเดรทเช่น ผิวของแบคทีเรียจะจับกับ MBL (mannan binding lectin) หรือโปรตีน ficolin ที่ประกอบด้วย คอลลาเจนและไฟบริโนเจน (Fujita et al, 2004) ซึ่งทำหน้าที่คล้าย C1q แต่ไม่ต้องการ Ca^{2+} เหมือนใน classic pathway และมีการกระตุ้นสารอีก 2 ชนิดซึ่งเป็น serine protease คือ MASP-1และ MASP-2 (MBL-associated plasma proteins) เช่น Salmonella, Listeria, Neisseria strains, Cryptococcus neoformans และ Candida albicans

การกระตุ้นจะไม่อาศัยแอนติบอดี แต่ถูกกระตุ้นโดย MBL (mannose binding protein) จะรับรู้และจับกับคาร์โบไฮเดรตหรือไกลโคโปรตีนบนผิวของเซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะ หลังการจับจะมีการกระตุ้น MBL-associated serine proteases (MASP) 2 ตัว คือ MASP-1 และ MASP-2 ได้ MBL/MASP complex, activated MASP-2 เป็นตัวย่อย C4 และเข้า classical pathway ตรงตำแหน่ง C4 ส่วน activated MASP-1 สามารถย่อย C3 จึงกระตุ้น alternative pathway ได้โดยตรง

การกระตุ้นทั้ง 3 pathway จะให้ปฏิกิริยาช่วงท้ายคล้ายกันคือก่อให้เกิดการสร้างสารโมเลกุลใหญ่ที่จะเข้าทำลาย เซลล์เมมเบรนเรียกว่า macromolecular membrane attack complex (MAC) ทำให้เกิดการแตกสลาย (lysis) ของเซลล์ แบคทีเรียหรือไวรัสได้ เนื่องจากการกระตุ้นทั้งสามระบบของการทำงานจะได้ active C5 convertase ซึ่งย่อย C5 ได้ C5a และ C5b , C5a จะถูกปล่อยออกสู่กระแสโลหิต มีคุณสมบัติ anaphylatoxin ที่แรงที่สุด และยังมีความสามารถในการดึงดูด neutrophils และ monocytes ส่วน C5b จะจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย ถ้ามี C6 อยู่ด้วยจะเกิดการรวมตัวกันเป็น C5b6 ขึ้น ซึ่งจะมีความคงตัว แล้วตามด้วย C7 ได้ C5b67 complex ซึ่งจะเปลี่ยนสถานะจาก hydrophilic เป็น hydrophobic ม้วนตัวแทรกไปในชั้นของ lipid bilayer ต่อมา C8 เข้ามาจับเริ่มเกิดรูเล็กๆขนาด 10oA จากนั้น C9 ประมาณ 10-17 โมเลกุลมารายล้อม การเกิดรูจะใหญ่ขึ้น (70-100oA) ของเหลวเริ่มไหลเข้าเซลล์ทำให้เซลล์แตก (lysis) เพราะเสียสมดุล osmosis ของน้ำและ ion balanceของพวก Na และ K ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาดังภาพ 2-2

การรวมตัวของ C5b678 อย่างละ 1 โมเลกุล กับ C9 หลายโมเลกุลเรียก Membrane-Attack Complex (MAC) (Fujita, 2004) โดยที่ alternative pathway และ lectin pathway เป็นกลไกการตอบสนอง (effector mechanism) ของ innate immunity ในขณะที่ classical pathway จัดเป็นกลไกการตอบสนองของ humoral immunity และMAC นี้ไม่พบในไส้เดือน หนอน และแมลง (Nonaka and Yoshizaki, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2-2 แสดงภาพรวมการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ผ่านทาง Classical pathway, Alternative pathway, MBLectin pathway

Flexner and Noguchi (1902) ได้รายงานว่าซีรั่มของงูสามารถทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสัตว์เลือดอุ่นได้ การทำงานนี้จะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 56 ^{O}C นาน 6 นาที แต่กระบวนการทำลายเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมให้แตกนั้น ถูกจำกัดโดยจำนวนแอนติบอดีในซีรั่มของสัตว์เลือดอุ่น ส่วนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมีการป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกายด้วยระบบภูมิคุ้มกัน โดยอาศัยการทำงานของแอนติบอดีและระบบคอมพลีเมนต์ที่ทำหน้าที่ด้วยศักยภาพที่สูง Norcross and Poppensiek (1961) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ระบบคอมพลีเมนต์ต่อการทำงานเชื้อในโรคปากและเท้าเปื่อย โดยแอนติบอดีมาจาก โค สุกร หนูตะเภา และกระต่าย ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ต่อต้านต่อโรคปากและเท้าเปื่อย ส่วนแอนติเจนใช้เซลล์จากไตของโคที่ติดเชื้อจากโรคนี้ และใช้แหล่งคอมพลีเมนต์จากซีรั่มของม้า ได้มีการหาอัตราเจือจางของแอนติบอดีต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอนติเจนที่เหมาะสมในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายให้แตก จากผลการทดลองแอนติบอดีจาก หนู ตะเภา กระต่าย สุกรและโค แอนติบอดีของโคจะมี%การแตกสลายของเซลล์ที่มาก

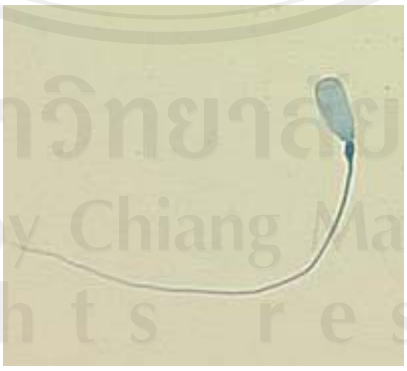
2.3 น้ำเชื้อโค (Semen)

ประกอบด้วย ตัวสเปิร์ม (spermatozoa) คือเซลล์สืบพันธุ์ที่แบ่งตัวด้วยกระบวนการไมโอซิส (miosis) จากร่างกายของสัตว์เพศผู้ในวัยเจริญพันธุ์ และไม่สามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีก ตัวสเปิร์มถูกสร้างและหลั่งออกมาพร้อมกับน้ำเลี้ยงหรือ เซมินัล พลาสมา(Seminal plasma) ซึ่งเป็นสารซึ่งหลั่งจากต่อมเพศผู้ (Accessory glands) ต่อมเพศผู้ โดยเป็นแหล่งอาหารสำหรับสเปิร์ม สารนี้จะปนออกมากับตัวสเปิร์มในขณะที่พ่อพันธุ์หลั่งน้ำเชื้อ ตัวสเปิร์มจะสามารถอยู่ได้ประมาณ 3 วันในร่างกายของสัตว์เพศเมียโดยไม่สัมผัสอากาศหรือของเหลวอื่น

ส่วนหัว (head) เป็นที่อยู่ของนิวเคลียสและเอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังหุ้มเซลล์ไข่ โครโมโซมสืบพันธุ์จะบรรจุอยู่ในนิวเคลียส โดยส่วนหน้าของส่วนหัวเป็นส่วนที่เรียกว่าอะโครโซม (Acrosome) ซึ่งเปลี่ยนมาจาก กอลจิคอมเพล็กซ์ มีหน้าที่ในการเจาะผนังของเซลล์ไข่ โดยบรรจุเอนไซม์ไฮโดรไลซิสไว้หลายชนิด เช่น ไฮอาลูโรนิเดส อะโครซิน โปรทีเอส

ส่วนคอและลำตัว (neck) ต่อจากส่วนหัว มีลักษณะเป็นแท่ง ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่เซลล์

ส่วนหาง (tial) แกนกลางพัฒนามาจากไมโครทูบูล ตอนบนมีกลุ่มไมโทคอนเดรียซึ่งใช้เป็นพลังงานในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ตอนล่างสามารถโบกพัดได้เพื่อว่ายไปหาเซลล์ไข่



ภาพ 2-3 แสดงลักษณะตัวสเปิร์มโค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 เทคนิค Real Time PCR

Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) เป็นวิธีที่นำเอาเทคนิคการตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนต์ มาผสมผสานกับเทคนิค PCR โดยการเพิ่ม probe ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์หรือ สารฟลูออเรสเซนต์เข้าไปในหลอดปฏิกิริยา PCR โดย PCR product ที่เพิ่มขึ้นจะผกผันตามความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งเครื่อง real-time จะมีส่วนของ detection unit วัดความเข้มของแสง และ analysis software สำหรับคำนวณและวิเคราะห์ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ จากทุกตัวอย่างออกมาเป็นรูปกราฟหรือตัวเลขที่แสดงค่าความเข้มของแสงในแต่ละรอบของปฏิกิริยา รวมทั้งแสดงค่า cut-off ในกรณีของการอ่านผลแบบ qualitative dataในขณะที่กำลังเกิดขึ้นจริงๆ ทำให้สามารถติดตาม PCR ในช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งนำไปสู่การวัดปริมาณได้ โดยมีสมการของ PCR ดังนี้

$$Xn = X0(1 + E)n$$

โดย Xn คือ ปริมาณ PCR product ที่ cycle ที่ n

X0 คือ ปริมาณเริ่มต้นของ template

E คือ Amplification efficiency

n คือ cycle number

ตรวจสอบโดย SYBR Green I DYE

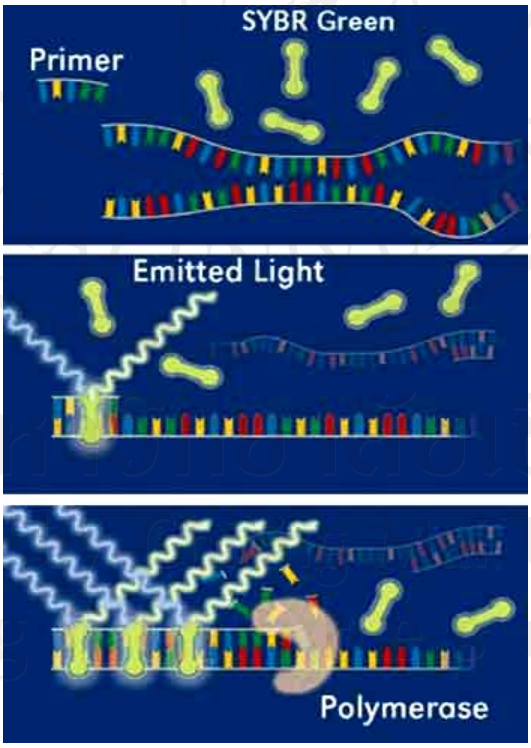
SYBR Green I Dye เป็นสารเรืองแสงประเภท Fluorochrome ชนิดหนึ่ง ที่สามารถเข้าจับกับ miner groove ของดีเอ็นเอสายคู่ได้ เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้นด้วยแสง UV จะมีการคายพลังงานออกมาเป็นแสงของ fluorescence จากภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ในช่วงของการ denature เพื่อคลายสายดีเอ็นเอจากสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวนั้น SYBR Green I จะยังไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ แต่เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ SYBR Green I จะเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV เมื่อรอบของ PCR กลับมาถึงช่วงการ denature อีกครั้ง SYBR Green I ก็จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอทำให้การเรืองแสงลดลงอีกครั้ง ในกรณีที่มีดีเอ็นเอหลายชนิดปนกันอยู่ในตัวอย่าง เราสามารถแยกสัญญาณของ fluorescence ได้จากการเปรียบเทียบค่า Tm (melting temperature เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าคู่กันของสายดีเอ็นเอที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีหมู่เบสเป็นคู่สมกัน) เพราะ Tm เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย ซึ่งแปรผันตรงกับเปอร์เซนต์ของเบส G และ C ที่อยู่ในสายดีเอ็นเอ (% GC content)

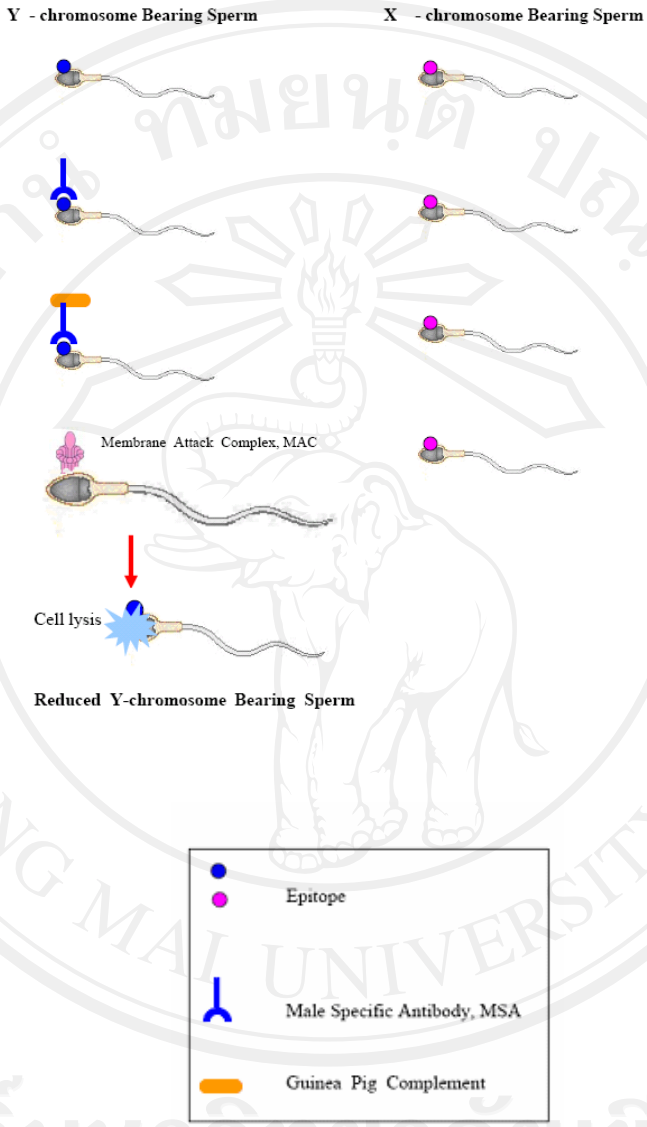
ข้อดีหลักของ Real-time PCR

- สามารถติดตามผลได้ในขณะที่เกิดขึ้นจริง
- ไม่ต้องมีขั้นตอนหลัง PCR (ได้ผลลัพธ์มากขึ้น ลดโอกาสการปนเปื้อน)
- การทำงานแต่ละรอบมักจะเร็วกว่าแบบธรรมดา
- วัดได้มากขึ้นจนถึง 1010 เท่า (wider dynamic range)
- สามารถตรวจวัดความแตกต่างได้ถึงขั้นที่ต่างกันเพียง 1 เท่า
- สามารถตรวจยืนยัน product ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting point
- มีความจำเพาะสูงที่สุด ไวที่สุดและ reproducible ที่สุด
- สำหรับงานทาง RNA จะใช้ปริมาณตั้งต้นของ RNA น้อยกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 1000 เท่า



ภาพ 2-4 การตรวจสอบโดย SYBR Green I Dye
(ที่มา: www.thaiscience.com/lab)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2-5 แสดงการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเนื้อในปฏิกิริยาไซโตทอกซิก เพื่อให้ทำลายสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายอย่างจำเพาะเจาะจง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved