

ระยะเวลาเจริญและวิธีการแบ่งครึ่งเอมบริโอสุกรที่เหมาะสม

นางสาวพรรณณี รัตน์แสง



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาลัทธิสุตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-311-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 174637-93

**APPROPRIATE STAGES AND METHODS FOR PIG EMBRYO BISECTION**

**Miss Phunee Ratanasaeng**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements**

**for the Degree of Master Science**

**Inter-Department of Physiology**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**1996**

**ISBN 974-633-311-9**

หัวข้อวิทยานิพนธ์    ระยะเวลาเจริญและวิธีการแบ่ง ครึ่งเอมบริโอสุกรที่เหมาะสม  
โดย                            นางสาวพรรณิ รัตนแสง  
ภาควิชา                        สรีรวิทยา  
อาจารย์ที่ปรึกษา        รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม   รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ดวงนฤมล ประชัญคดี

---

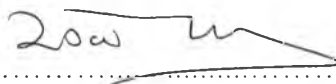
บัณฑิตวิทยาลัย    จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ฤงสูวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พญ.ดร. บังอร ชมเดช)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ดวงนฤมล ประชัญคดี)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทย์ ยศยิ่งยวด)



..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นพ. ประสงค์ ศิริวิริยะกุล)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

นางสาวพรรณณี รัตนแสง : ระยะการเจริญและวิธีการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอสุกร  
ที่เหมาะสม (APPROPRIATE STAGES AND METHODS FOR PIG EMBRYO  
BISECTION) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำฟู  
อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ดวงนฤมล ประชัญคดี,  
70 หน้า. ISBN 974-633-311-9

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อเปรียบเทียบความสำเร็จในการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอ  
สุกร ในระยะมอรูลาและระยะบลาสโตซิสต์ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของใบมีดและเข็ม  
แก้วในการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ หลังการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอ  
แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอ ในตู้บอ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 39 องศาเซลเซียส  
นาน 24 ชั่วโมง จากการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอ 202 เอ็มบริโอ ได้ครึ่งเอ็มบริโอ 404 ครึ่งเอ็มบริโอ  
โดยแบ่งเป็นครึ่งเอ็มบริโอระยะมอรูลา 196 ครึ่งเอ็มบริโอ และครึ่งเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์  
208 ครึ่งเอ็มบริโอ หลังการเลี้ยงในน้ำยาพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญ  
และรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ ที่ได้จากการแบ่งเอ็มบริโอด้วยใบมีด (63%) หรือเข็มแก้ว  
(61.4%) ในเอ็มบริโอระยะมอรูลาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (65% และ 78.6%) แต่อย่างไรก็ตาม  
ครึ่งเอ็มบริโอที่แบ่งด้วยเข็มแก้ว (31%) จะมีการเจริญและรอดชีวิตเป็นคู่มากกว่าครึ่ง  
เอ็มบริโอที่แบ่งด้วยใบมีด (4%)

เมื่อแบ่งเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ พบว่าครึ่งเอ็มบริโอที่ได้จากการแบ่งครึ่ง  
เอ็มบริโอโดยใช้ใบมีด (59%) หรือการใช้เข็มแก้ว (38%) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิต  
น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (92%และ90%) และครึ่งเอ็มบริโอที่แบ่งด้วยใบมีด (15%) จะมีการเจริญ  
และรอดชีวิตเป็นคู่มากกว่าครึ่งเอ็มบริโอที่แบ่งด้วยเข็มแก้ว (5%)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอระยะมอรูลาด้วยเข็มแก้วน่าจะ  
เป็นระยะและวิธีที่เหมาะสมในการนำมาแบ่งครึ่ง เพื่อเพิ่มผลผลิตเอ็มบริโอและผลิตครึ่ง  
เอ็มบริโอแฝด ในขณะที่การแบ่งครึ่งเอ็มบริโอ ระยะบลาสโตซิสต์ ใบมีดน่าจะเป็นเครื่องมือ  
ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า

ภาควิชา.....สหสาขาสรีรวิทยา.....  
สาขาวิชา.....สรีรวิทยา.....  
ปีการศึกษา.....2538.....

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#C645696: MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: PIG / EMBRYO BISECTION

PHUNEE RATANASAENG : APPROPRIATE STAGES AND METHODS FOR  
PIG EMBRYO BISECTION THESIS ADVISOR :  
ASSOC.PROF.MONGKOL TECHAKUMPHU, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR  
: ASSOC. PROF. DUANGNARUMON PRACHANKHADEE, Ph.D.  
70 pp. ISBN 974-633-311-9

The objective of this study was to compare the effectiveness of pig embryos bisection either at the morula (day4.5-5.0) or the blastocyst (day 5.0-5.5) stages by using either the microblade or the glass microneedle. The embryos were symmetrically divided under the inverted microscope and subsequently cultured *in vitro* in 5% CO<sub>2</sub> at 39°C and their development were assessed after 24 hr. .

There were no significant difference in the embryo survival after bisection at the morula stage using either the microblade (63%) or the glass microneedle (61.4%) when compare to those of the control (65% and 78.6% respectively). However, the development of the bisected embryo in pairs appeared to be higher in the group using glass microneedle (31%) than that of the group using microblade (4%). When the embryos at the blastocyst stage were bisected, the embryo survival in the control groups (92% and 90%) were significantly higher than in the group using microblade (59%) or using glass microneedle (38%), and the number of bisected embryos developed in pairs in the group bisected with microblade (15%) seemed to be higher than that of the group bisected with glass microneedle (5%)

This data may indicate that the embryo at the morula stages are appropriate for increasing production and producing identical demi- embryos and the glass microneedle favored the embryo bisection at the morula stage, whereas the microblade is a preferable tool at the blastocyst stage.

ภาควิชา สรีรวิทยา.....

สาขาวิชา สรีรวิทยา.....

ปีการศึกษา 2538.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาของ รศ.นส.พ.ดร.มงคล เตชะกำพุ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ และช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.สพ.ญ.ดร.ดวงนฤมล ประชัญญคดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในการทำวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะบางประการเกี่ยวกับการทำวิจัยไว้ ณ.ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนุเวช วิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความร่วมมือช่วยเหลือมาตลอดขณะทำการวิจัย โดยเฉพาะคุณวันเพ็ญ ศรีอนันต์ ที่ช่วยแนะนำการเตรียมน้ำยา ช่วยจัดหาอุปกรณ์ที่จำเป็นต้องใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ ทำให้การวิจัยสะดวกยิ่งขึ้น ขอขอบคุณคุณพรภิมล ตั้งชัยสิน ที่ช่วยสอนเทคนิคต่างๆเกี่ยวกับเอ็มบริโอ พร้อมทั้งให้คำแนะนำเพิ่มเติม ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ไอ.วี.เอฟ. ภาควิชาสัตวศาสตร์นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี และขอขอบคุณบริษัทแอ๊ดวานซ์ ฟาร์มา จำกัด ที่เอื้อเฟื้อ PG 600<sup>R</sup> สำหรับใช้ในการทดลอง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ญาติพี่น้อง ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อทุนบางส่วนในการทำวิจัยครั้งนี้ และท้ายที่สุด ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ให้กำลังใจ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

พรรณิ รัตนแสง

## ความหมายคำย่อ

มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
มก.	มิลลิกรัม
น.	นาฬิกา
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
mm.	มิลลิเมตร
ml.	มิลลิลิตร
mg.	มิลลิกรัม
$\mu$ l	ไมโครลิตร
mM	มิลลิโมล
Mol. Wt	น้ำหนักโมเลกุล
e.g.	อาทิเช่น
U	ยูนิต(หน่วย)
I.U.	ยูนิตสากล(หน่วย)
P	ความเข้มข้นทางสถิติ
$^{\circ}$ C	องศาเซลเซียส

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
ความหมายคำย่อ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
- เอ็มบริโอและการพัฒนาเอ็มบริโอ.....	4
- การเลี้ยงเอ็มบริโอในอกร่างกาย.....	6
- Micromanipulation ของเอ็มบริโอ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม .....	12
- การแบ่งเอ็มบริโอ .....	14
- ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเอ็มบริโอ .....	16
- การแบ่งเกร็ดครึ่งเอ็มบริโอ .....	21
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	22
2. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย .....	23
- การเตรียมสัตว์ทดลอง .....	23
- การเก็บเอ็มบริโอ .....	23
- วิธีการหาเอ็มบริโอและการประเมินคุณภาพ .....	25
- การแบ่งครึ่งเอ็มบริโอ .....	29
- การเลี้ยงเอ็มบริโอและครึ่งเอ็มบริโอในหลอดทดลอง.....	33
- เครื่องมือและอุปกรณ์ .....	33



- สารเคมีที่ใช้ .....	34
- สถิติวิเคราะห์ .....	41
3. ผลการทดลอง .....	42
- ผลการเปรียบเทียบความสำเร็จในการแบ่งครึ่งเอมบริโอ จากเอมบริโอ ระยะมอรูลาและบลาสโตซิส .....	43
- ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของใบมีดและเข็มแก้วในการ แบ่งครึ่งเอมบริโอ .....	45
4. วิจัยและสรุปผล .....	58
รายการอ้างอิง .....	64
ประวัติผู้เขียน .....	70

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 แสดงระยะเวลาหลังการตกไข่ซึ่งแสดงพัฒนาการ ของเอมบริโอในสัตว์ species ต่างๆ	7
3.1 แสดงจำนวนเอมบริโอที่เก็บได้	42
3.2 แสดงการเจริญของเอมบริโอและครีเอมบริโอของสุกรที่แบ่ง ในระยะมอรูล่า และระยะบลาสโตซิสต์ด้วยไข่มืด	46
3.3 แสดงการเจริญของเอมบริโอและครีเอมบริโอของสุกรที่แบ่ง ในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสต์ด้วยไข่มแก้ว	47
3.4 เปรียบเทียบการเจริญของครีเอมบริโอสุกร ระยะมอรูล่าที่แบ่งด้วยไข่มืด และไข่มแก้ว	50
3.5 เปรียบเทียบการเจริญของครีเอมบริโอสุกร ระยะบลาสโตซิสต์ที่แบ่งด้วยไข่มืดและไข่มแก้ว	51

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงขบวนการ compaction ของเอ็มบริโอ	9
1.2 แสดงรูปร่างลักษณะเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ	10
1.3 แสดงการเจริญของเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ ในสุกร	11
1.4 แสดงการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอด้วยมีดแก้ว โดยการ แทงมีดแทงเข้าทางด้านข้างของเอ็มบริโอ	19
1.5 แสดงการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอโดยใช้เข็มโลหะ แทงเอ็มบริโอจากแนวบนลงล่าง	20
2.1 แสดงการผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอ	26
2.2 แสดงเอ็มบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสคุณภาพดีที่เก็บได้	27
2.3 ชุด Micromanipulator พร้อมกล่อง	28
2.4 แสดงใบมีดและเข็มแก้วที่ใช้แบ่งเอ็มบริโอ	31
2.5 แสดงการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอโดยใช้ใบมีด	32
2.6 แสดงการแบ่งครึ่งเอ็มบริโอโดยใช้เข็มแก้ว	32
2.7 ไลอะแกรมแนวการแบ่งเอ็มบริโอ	36
2.8 แสดงเอ็มบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสหลังการ Incubate ด้วย 0.3% pronase และ HBSS ก่อนการแบ่ง	36
2.9 แสดงครึ่งเอ็มบริโอหลังการแบ่งด้วยใบมีด	37
2.10 โปรแกรมการเร่งการตกไข่ การผสม และการชะล้างเอ็มบริโอ	38
2.11 ไลอะแกรมแสดงการทดลอง	38

3.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ หลังการแบ่งควยไบนีคในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส แบ่งเป็น เกรด เอ และบี	52
3.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ หลังการแบ่งควยเข็มแก้ว ในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส แบ่งเป็นเกรด เอ และบี	52
3.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ เกรดเอและบี หลังการแบ่งควยไบนีคในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส	53
3.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ เกรดเอและบี หลังการแบ่งควยเข็มแก้ว ในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส	53
3.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิต ของครึ่งเอ็มบริโอ หลังการแบ่งควยไบนีคและเข็มแก้ว ในระยะมอรูล่าแบ่งเป็น เกรด เอ และบี	54
3.6 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิต ของครึ่งเอ็มบริโอ เกรดเอและบี หลังการแบ่งควยไบนีคและเข็มแก้วในระยะมอรูล่า	54
3.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอหลังการแบ่ง ควยไบนีคและเข็มแก้วในระยะบลาสโตซิส แบ่งตามเกรด เอ และบี	55
3.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ เกรดเอและบี หลังการแบ่งควยไบนีคและเข็มแก้วในระยะบลาสโตซิส	55
3.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตของครึ่งเอ็มบริโอ ที่เจริญและ รอดชีวิตเป็นคู่	56
3.10 แสดงครึ่งเอ็มบริโอที่เจริญและรอดชีวิตหลังเลี้ยงในหลอดทดลอง	57