หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

- หนูเมาซ์เพศเมียพันธุ์แท้ BALB/c สำหรับเป็นแม่พันธุ์
- หนูเมาซ์เพศผู้พันธุ์แท้ CD-1 สำหรับเป็นพ่อพันธุ์
- หนูเมาซ์เพศเมีย พันธุ์ผสม (F_1 hybrid) ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อพันธุ์ CD-1 และแม่พันธุ์ BALB/c

หนูเมาซ์ที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ ได้จากศูนย์เลี้ยงสัตว์ทดลอง SEATO นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนผสมพันธุ์ ภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองดังกล่าวมีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ระหว่าง 70-75^{0}F มีแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (06.00 น. - 20.00 น.) มืด 10 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำ โดยไม่จำกัดจำนวนตลอดเวลา

หนูเมาซ์เป็นสัตว์ประเภท polyoestrous เหมือนกับสัตว์จำพวกหนูขาว (rat) และหนูพุก (guinea pig) ธรรมชาติของการผสมพันธุ์ในหนูเมาซ์ มีดังนี้คือ หนูเมาซ์เพศเมียจะผสมพันธุ์กับเพศผู้ (mating) เวลาประมาณ 22.00 - 24.00 น. ของวันเกิด estrous หลังจากนั้นไข่จะตก ระหว่าง 22.00 - 02.00 น. การปฏิสนธิมักเกิดช่วงกึ่งกลางของเวลามืด (dark period) คาดว่าประมาณ 01.00 น. ระยะเวลาตั้งท้องประมาณ 21 วัน คลอดเวลาประมาณ 24.00 - 04.00 น.

เอมบริโออาจได้จากสัตว์ที่ตกไข่และผสมตามธรรมชาติ หรือหลังกระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมน เมื่อกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจะได้ไข่มากกว่าการตกไข่ธรรมชาติโดยเฉลี่ยประมาณ 20 - 30 ฟอง/ตัว การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจะใช้เวลาในการฉีด hCG เป็นจุดเริ่มต้น (Zero referrence time) สำหรับคาดคะเนระยะเวลาที่ไข่ตก (Edwards และ Gates 1959) คือ ภายหลังจากฉีด hCG 12 $\pm$ 3 ชั่วโมง ดังนั้น ในหนูเมาซ์ที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน เพื่อเก็บเอมบริโอใน

014484

ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ จึงคาดคะเนเวลาที่จะพบเอมบริโอได้ ดังตารางที่ 2.1 (โดยใช้การฉีด hCG เป็นจุดเริ่มต้น)

ตารางที่ 2.1 แสดงตำแหน่งที่พบเอมบริโอ และระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ภายหลังจากฉีด hCG (จาก Whittingham, 1971)

ระยะการเจริญเติบโตของเอมบริโอ	เวลาหลังจากฉีด hCG (ชั่วโมง)	ตำแหน่งที่พบ
1. 1 - เซลล์	0-24	ท่อนำไข่ (Ampulla)
2. 2 - เซลล์	24-38	ท่อนำไข่ (Ampulla & Isthmus)
3. 3-4 เซลล์	38-50	Isthmus
4. 8 - เซลล์	50-64	Isthmus & Uterus
5. มอรูล่าและบลาสโตซีสระยะแรก (Early blastocyst)	>60	มดลูก
6. บลาสโตซีสระยะสุดท้าย (Late blastocyst)	116-120	มดลูก

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบ (Water-jacketed incubator) : Model 3192, Forma scientific, U.S.A.
2. Microscope
   - Dissecting microscope : Olympus, Japan
     กำลังขยาย 80 เท่า
   - Inverted microscope : Nikon, Japan
     กำลังขยาย 400 เท่า
3. Laminar flow hood : Pravit Engineering, LTD. Part.
4. เครื่องมือตรวจสอบระดับความ : เข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในตู้อบ (Fyrite detector) Bacharach Co. Pittstburgh, PA., U.S.A.
5. pH meter : Model 39, Coleman, U.S.A.

6. Osmometer : Advanced Wide - Range osmometer 3W2, U.S.A.

7. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด : Sartorius 2004 MP

8. Embryological watchglass

9. Millipore filter (disposable) : Milles^{x} -GV, Millipore S.A.

10. Plastic tissue culture dish : Nunclon^{x}, Denmark

- 35 x 10 mm
- 4 - well multidish

11. Plastic syringe (disposable)

- 1 ml : Nipro, Tokyo
- 5 และ 20 ml : Ersta, Denmark

12. Plastic tube 12 x 75 mm : Falcon, U.S.A.

13. เครื่องแก้วสำหรับเตรียมน้ำยา : Pyrex, U.S.A.

14. Mouth pieces

15. Pasteur pipette

16. หัวเข็มปลายตัด เบอร์ 30

17. ตะเกียงแอลกอฮอล์

18. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง ประกอบด้วย

- กรรไกรปลายมน
- กรรไกรปลายโค้ง
- กรรไกรปลายตรง
- Forceps
- เข็มเย็บแผล และด้าย

สารเคมี

1. น้ำยาสำหรับล้างเครื่องแก้ว ใช้น้ำยา 7X (non-toxic neutral tissue culture detergents)
2. แอลกอฮอล์ 70%

3. สารเคมีสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์

3.1 Ham's F-10 : Seromed Germany

3.2 Phosphate Buffered Saline (PBS) : Seromed, Germany

3.3 Lyophilized Fetal Bovine Serum (FBS) : Sigma U.S.A.

3.4 Crystallized Bovine Serum Albumin (BSA) : fraction V

3.5 สารเคมีสำหรับเตรียม T6 และ HTF medium (Sigma, IVF grade)

- Sodium chloride (NaC1)
- Potassium chloride (KC1)
- Calcium chloride 2-hydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- Sodium dihydrogen phosphate 2 hydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
- Disodium hydrogen phosphate 7 - hydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)
- Magnesium sulfate hydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
- Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
- Phenol red
- Glucose
- Sodium lactate (Na lactate)
- Sodium pyruvate (Na pyruvate)
- Penicillin
- Streptomycin sulfate

4. ฮอร์โมนสำหรับใช้กระตุ้นการตกไข่ของหนูเมาซ์

- Pregnant Mare's Serum Gronadotropin (PMSG) : Sigma, U.S.A.
- Human chorionic gonadotropin (hCG) : Ayerst, Laboratory N.Y.

รูปที่ 2.1 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือผ่าตัดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและถ่ายฝากเอมบริโอ

A. Disecting microscope

B. ตะเกียงแอลกอฮอล์สำหรับใช้เตรียม capillary pipette

C. disposable plastic culture dish (35x10 มม.)

D. disposable plastic culture dish (4 well multidish)

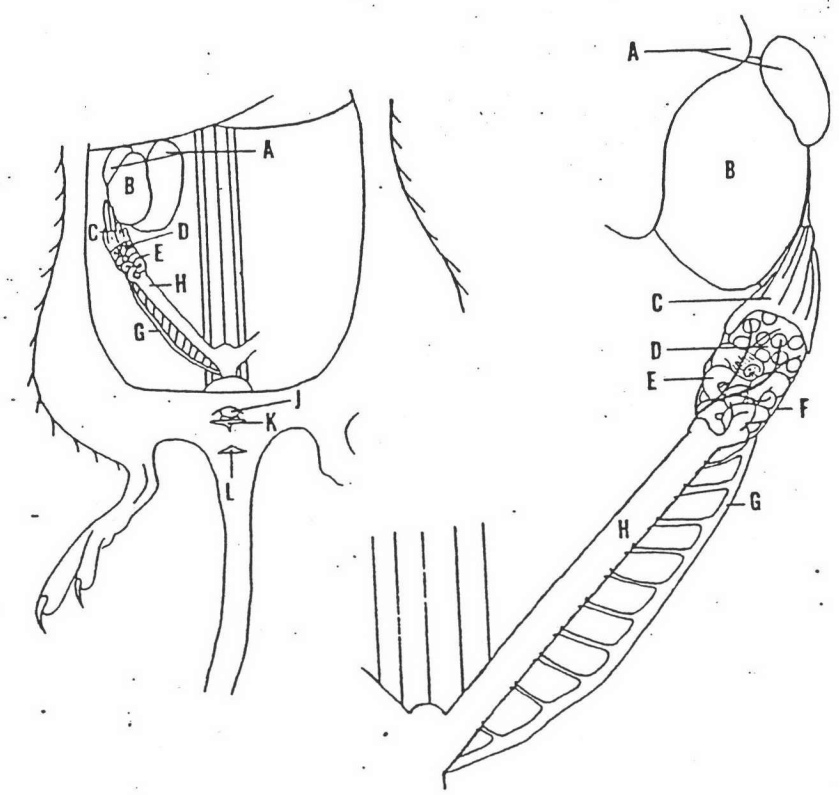
E. embryological watch glass

F. disposable syringe 1 มล. สวมติดกับหัวเข็มปลายติดเบอร์ 30

G. เครื่องมือผ่าตัด เข็มและไหมเย็บแผล

H. mouth piece

I. pasteur pipette



รูปที่ 2.2 แสดงอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูเมาซ์เพศเมีย

A. Perirenal fat ; B.Kidney ; C.Periovarial fat body

D. Ovary ; E. Oviduct ; F.Ovarian bursa ; G. Uterine blood vessels

H. Uterus ; J. Clitoris ; K. Vagina ; L. Anus

น้ำยาที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

น้ำยาที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่นักวิจัยหลายท่านใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ ได้ผลดีมาแล้ว เช่น

1. Ham's F-10 medium (Ham,1963b) เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีเกลือแร่ โปรตีน และวิตามินต่าง ๆ รวมอยู่เป็นจำนวนมาก (complex medium) นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เอมบริโอของหนูเมาซ์ (Saito et al, 1984; Shirley et al, 1985) เอมบริโอของกระต่าย (Kane, 1985), เอมบริโอของวัว (Wright et al, 1976 และ Shea et al, 1976) และเอมบริโอของคน (Lopata 1980; Leung et al, 1984)

2. น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบคล้ายของเหลวในท่อนำไข่ของคน (The medium base on the composition of human tubal fluid, HTF medium; Quinn et al, 1985)

เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงจากส่วนประกอบของของเหลวในท่อนำไข่ของคน และนำมาใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ และสำหรับขบวนการปฏิสนธิของคนในหลอดทดลอง ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก

3. T6 medium (A modified Tyrode's medium, Whittingham, 1971)

เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ได้ผลสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอมาแล้ว เช่น ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ของแฮมส์เตอร์ (Whittingham 1974; Whittingham และ Bavister, 1974; Bavister, 1981; Yodyingyuad, 1982; Bavister et al., 1983) เอมบริโอของหนูเมาซ์ (Gianaroli et al, 1985; Seracchioli et al , 1985) หนูขาว (เกศรินทร์ แสงจันทร์, 2530) และเอมบริโอของคน (Quinn et al, 1985) ตลอดจนใช้ในขบวนการคาพาซิเตชั่น (capacitation) สเปริมของแฮมสเตอร์ (Bavister, 1969) ด้วย

การเตรียม Fetal cord serum (FCoS)

เก็บเลือดโดยเจาะจากสายสะดือ (Umbilical veins) ของทารกที่คลอดปกติ มารดาไม่มีประวัติเป็นโรคเลือดหรือโรคทางกรรมพันธุ์ เลือดที่เจาะได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-7 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ซีรั่มที่ได้นำไป inactivated

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอทั้ง 3 ชนิด (มิลลิกรัมต่อลิตร)

ส่วนประกอบ	Ham's F-10	HTF	T6
Salt			
NaCl	7,400	5,937	5,808
KCl	285	349	105
$CaCl_2 .2H_2O$	-	299	261
$KH_2 PO_4$	83	50	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	290	-	51
$MgSO_4.7H_2O$	152.8	24	85
$FeSO_4.7H_2O$	0.834	-	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	-	-
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0288	-	-
Energy			
Glucose	1,000	500	1,001
Na lactate	-	3.120 ml	3.630 ml
Na pyruvate	110	300 ul	470 ul
Ca lactate	112.1	-	-
Hypoxanthine	4.0	-	-
Lipoic acid	0.2	-	-
Thymidine	0.7	-	-
Amino acids			
L-Alanine	9.0	-	-
L-Arginine HCl	211.0	-	-
L-Asparagine H_2O	15.01	-	-
L-Aspartic acid	13.00	-	-
L-Cystine	25.00	-	-

ส่วนประกอบ	Ham's F-10	HTF	T6
L-Glutamine	146.00	-	-
Glycine	7.51	-	-
L-Histidine HCl	21.00	-	-
L-Isoleucine	2.60	-	-
L-Leucine	13.0	-	-
L-Lysine HCl	29.0	-	-
L-Methionine	4.48	-	-
L-Phenylalanine	5.0	-	-
L-Proline	11.50	-	-
L-Serine	10.50	-	-
L-Threonine	3.57	-	-
L-Tryptophane	0.60	-	-
L-Tyrosine	1.81	-	-
L-Valine	3.51	-	-
Vitamins			
Biotin	0.024	-	-
D-Calcium Pento-Thenate	0.238	-	-
Choline Chloride	0.698	-	-
Folic acid	1.32	-	-
I-Inosital	0.542	-	-
Niacinamide	0.651	-	-
Riboflavin	0.376	-	-
Thiamine HCl	1.0	-	-
Vitamin B_{12}	1.36	-	-

ส่วนประกอบ	Ham's F-10	HTF	T6
Antibiotic			
Penicillin	100 IU/ml	100 IU/ml	100 IU/ml
Streptomycin sulfate	50 ug/ml	50 ug/ml	50 ug/ml
Buffer			
$NaHCO_3$	2,100	2,100	2,100
Phenol red	1.2	1	1

ด้วยอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จึงกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.45 และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ แล้วแยกเก็บในหลอดพลาสติก (Falcon) ขนาด 5 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 4 องศาเซลเซียส

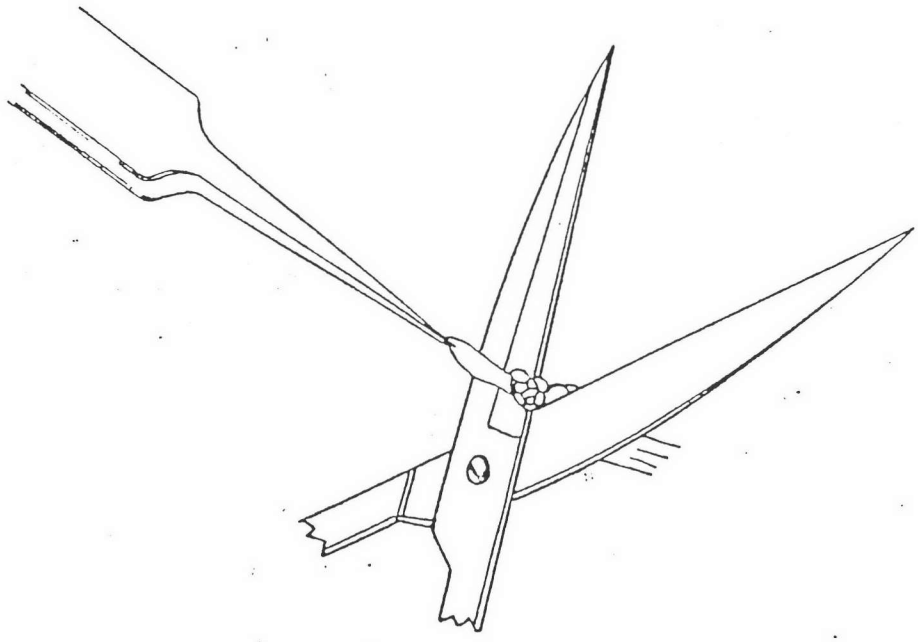
การเตรียม Fetal Bovine Serum (FBS)

FBS ใช้ชนิดสำเร็จรูป นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง แล้วกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน แยกเก็บที่อุณหภูมิลบ 4 องศาเซลเซียสเหมือน FCoS

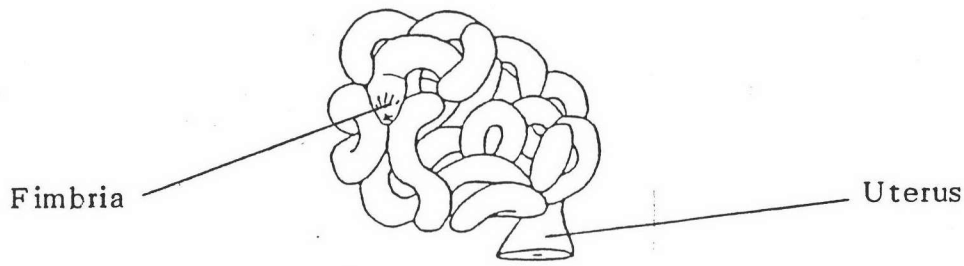
สำหรับ BSA มีลักษณะเป็นผงเมื่อจะใช้ละลายในน้ำยาเพาะเลี้ยง กรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน อีก 1 ครั้ง จึงใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอได้

การทำความสะอาดเครื่องแก้ว

1. แช่ในน้ำยา 7X 2% 24 ชั่วโมง
2. ต้มด้วยน้ำยา 7X 2% 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 3 ครั้ง จึงแช่ไว้ในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ตามด้วย Nanopure water (deionized water) 2-3 ครั้ง



รูปที่ 2.3 แสดงการตัดแยกท่อนำไข่จากมดลูก โดยตัดบริเวณช่วงต่อระหว่างท่อนำไข่กับมดลูก



รูปที่ 2.4 แสดงแผนภาพท่อนำไข่ของหนูเมาซ์

4. เข้าเตาอบแห้ง แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

น้ำกลั่นสำหรับใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง เป็นน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน มีความบริสุทธิ์ถึง 18 เมกะโอห์ม ซึ่งในห้องปฏิบัติการ เตรียมโดยใช้เครื่องกรอง Milli-Ro^{r} 4 water purification system และ Milli - Q Reagent Grade Water System

1. การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10

น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้ เป็นผงสำเร็จรูป มีกลูตามีน (glutamine) ปนอยู่แล้ว หนัก 9.88 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 250 มล. จึงเติมเพนนิซิลินและ สเตร็ปโตมัยซินลงไป เขย่าให้เข้ากันดี ละลายแคลเซียมแลกเตท (Calcium lactate) ในน้ำ 40 มล. แล้วเติมในสารละลาย Ham's F-10 ข้าง ๆ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 960 มล. (อีก 40 มล. ใช้สำหรับละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) กรองด้วยแผ่นกรอง ที่มีขนาดรูกรอง 0.20 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนโซเดียมไบคาร์บอเนต ละลายด้วยน้ำกลั่น 40 มล. แยกใส่หลอดพลาสติก ขนาด 5 มล. หลอดละ 4 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน เมื่อใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละครั้ง จะเตรียมน้ำยาครั้งละ 200 มล. โดยนำสารละลาย Ham's F-10 ที่ผสมแล้ว 192 มล. ผสมกับสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต 8 มล. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า osmolarity และปรับค่า osmolality ด้วยน้ำกลั่นจึงกรองด้วยแผ่นกรอง ที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน นำน้ำยาเพาะเลี้ยงใส่ใน tissue culture flask เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 สัปดาห์ เมื่อจะใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอ จึงนำสารละลายที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตอยู่ด้วยนี้นำมาปรับ pH ให้ได้ค่า pH ประมาณ 7.2-7.4 ด้วยแกสผสม (5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2) แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงเอมบริโอต่อไป

2. การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF และ T6

น้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิดนี้ เตรียมเองโดยชั่งสารตามน้ำหนักที่ต้องการ (ตามตารางที่ 2.2) แยกโซเดียมไบคาร์บอเนต แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 .2H_2O$) และ phenol red ละลายในน้ำกลั่น ไว้ต่างหากอย่างละ 10 มล. ละลายสารอื่นในน้ำกลั่น 120 มล. คนให้ละลายเข้ากัน จึงเติมสารละลาย 3 ชนิด ที่แยกละลายไว้ก่อน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มล.

ปรับค่า osmolality ด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 จึงกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน จะได้ stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง ปรับ pH ให้ได้ 7.2 - 7.4 ด้วยแก๊สผสม จึงเติมซีรั่มลงไป

น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมขึ้น จะเก็บไว้ใช้ภายใน 10 วัน เนื่องจากน้ำยาเพาะเลี้ยงขณะที่เก็บไว้ จะเกิด spontaneous decarboxylation ของสารไพรูเวททำให้น้ำยาที่เก็บไว้นาน ๆ ไม่เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (Wales และ Whittingham, 1970)

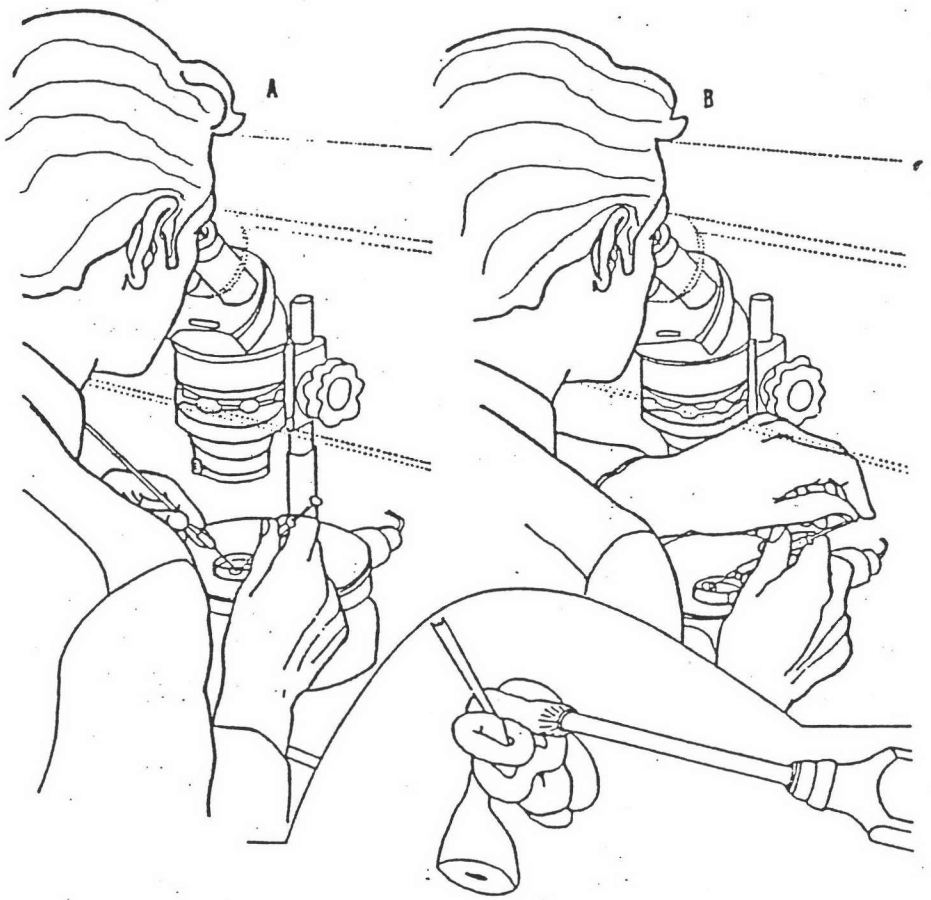
3. การเตรียมน้ำยา phosphate - buffered saline (PBS)

ใช้ผง PBS ชนิดสำเร็จรูปหนัก 9.55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มล. จึงผสมเพนนิซิลลิน และสเตร็ปโตมัยซิน คนให้ละลายเข้ากันดี แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มล. นำสารละลายไปวัดค่า osmolality และปรับค่า osmolality ให้ได้ 280 $\pm$ 5 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม จึงกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน น้ำยาที่เตรียมได้นี้เก็บไว้ใน tissue culture flask ได้นานประมาณ 1 เดือน

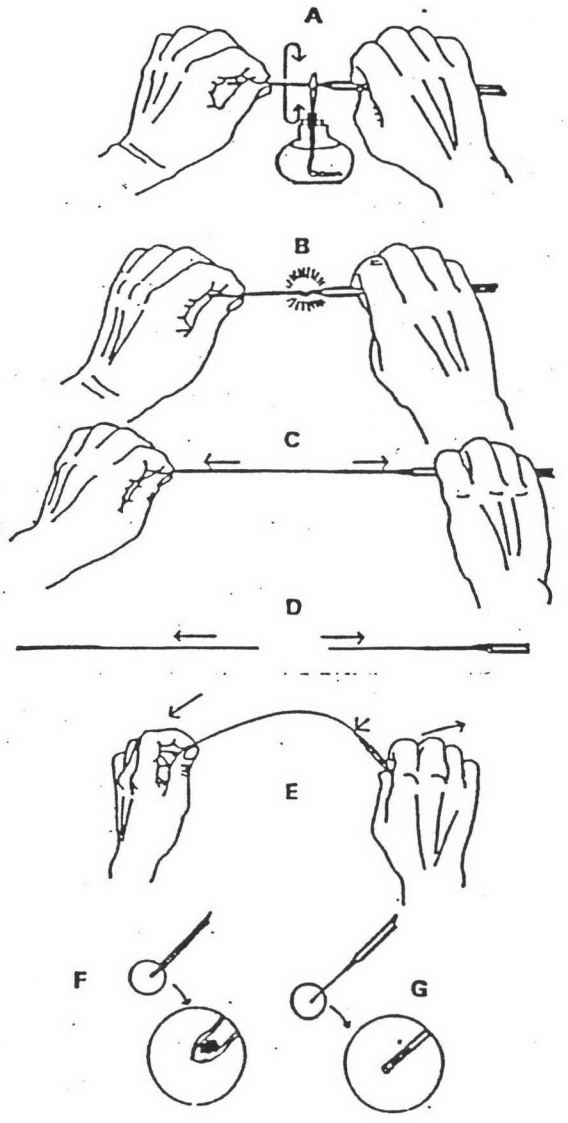
การเก็บเอมบริโอ

1. เอมบริโอระยะ 2 - เซลล์ สำหรับเพาะเลี้ยง

นำหนูเมาซ์เพศเมียพันธุ์ผสม (F_1 hybrid) อายุ 5-9 สัปดาห์ มากระตุ้นให้ตกไข่จำนวนมาก (Superovulation) โดยฉีด PMSG ซึ่งละลายในน้ำเกลือ 0.1-0.2 มล. เข้าช่องท้องตัวละ 10 ยูนิต เวลา 16.00 - 17.00 น. 48 ชั่วโมงต่อมา ฉีด hCG เข้าช่องท้องตัวละ 5 - 10 ยูนิต (0.1 - 0.2 มล.) แล้วแยกกรงผสมพันธุ์กับหนูเมาซ์เพศผู้พันธุ์ CD-1 ทันที เช้าวันรุ่งขึ้นตรวจดู vaginal plug ถ้าพบแสดงว่ามีการผสม ต่อมา 44 - 48 ชั่วโมงหลังจากฉีด hCG ทำให้หนูตายโดยวิธีดึงคอต่อ (cervical dislocation) ทำความสะอาดหน้าท้องหนูด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 เปิดหน้าท้องหนูด้วยกรรไกรและอุปกรณ์ผ่าตัด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ตัดแยกท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้าง (ดังรูป 2.3 และ 2.4) ใส่ใน embryological watchglass ซึ่งมีน้ำยา PBS อยู่แล้ว ประมาณ 1.5 มล. นำท่อนำไข่ (ดังรูป 2.4) ที่อยู่ในน้ำยามาส่องดูด้วยกล้องขยายชนิด dissecting โดยใช้กำลังขยาย 40-50 เท่าเก็บเอมบริโอจากท่อนำไข่ โดยใช้ปลายเข็มเบอร์ 30 ที่สวมติดกับ syringe ขนาด 1 มล. สอดเข้าทาง



รูปที่ 2.5 แสดงการฉีดขับเอาองค์ประกอบภายในท่อนำไข่ ลงใน embryological watchglass โดยใช้ plastic syringe ขนาด 1 ซีซี. ที่ส่วนปลายมีเข็มฉีดยาปลายตัดเบอร์ 30 สวมอยู่



รูปที่ 2.6 แสดงการเตรียม capillary pipette

A. ใช้ pasteur pipette ลนด้วยความร้อน

B. เมื่อ pasteur pipette เริ่มหลอมละลาย

C. ค่อย ๆ ดึง pipette ให้มีขนาดเล็กลง และ

D., E. หักแยกออกจากกันจะได้ capillary pipette ตามต้องการ

F. ลักษณะ capillary pipette ที่ขนาดกว้างเกินไป ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้

G. ลักษณะ capillary pipette ที่มีขนาดพอเหมาะในการนำมาใช้

fimbria (ดังรูป 2.5) แล้วฉีดน้ำยา PBS ผ่านทาง fimbria (flushing) จะได้เอมบริโอระยะ 2 - เซลล์ สำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป

2. <u>เอมบริโอระยะบลาสโตซิส</u> เก็บจากมดลูกของสัตว์ทดลองในช่วงเวลา 92-96 ชั่วโมง หลังจากฉีด hCG แล้วผสมพันธุ์กันหนูเพศผู้

<u>การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ</u>

ใช้ pasteur pipette ที่ลนไฟ แล้วดึงปลายให้เรียวเล็กดังรูป 2.6 ดูดเก็บเอมบริโอ ระยะ 2 - เซลล์ จากน้ำยา PBS ไปล้างอีก 2 ครั้ง ด้วยน้ำยา PBS และน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง จึงนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง แต่ละชนิดที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยง (4 well multidish) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว โดยแต่ละหลุมที่มีน้ำยาเพาะเลี้ยง 1 ซีซี จะใส่เอมบริโอไว้ไม่เกิน 20 ตัว แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบ ที่มีไอน้ำอิ่มตัว อุณหภูมิระหว่าง 37 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของแกสคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (ตรวจสอบระดับความเข้มข้นของแกสในตู้อบด้วย Bacharach Fyrite) สังเกตการเจริญเติบโตของเอมบริโอ เป็นระยะทุก 24 ชั่วโมง ด้วย Inverted microscope ซึ่งมีกำลังขยายถึง 400 เท่า บันทึกจำนวนเอมบริโอที่เจริญเติบโตจนถึงระยะบลาสโตซิส ซึ่งใช้เวลาประมาณ 72 - 76 ชั่วโมง หลังจากเริ่มต้นเพาะเลี้ยง (ดังรูป 2.7)

<u>การถ่ายฝากเอมบริโอ</u>

1. <u>การเตรียมหนูเมาซ์เพศผู้ที่เป็นหมัน (Vasectomy) สำหรับใช้กระตุ้นให้เกิดการตั้งท้องเทียมในหนูเมาซ์เพศเมีย</u>

ใช้หนูเมาซ์เพศผู้พันธุ์ CD-1 อายุ 3 - 12 เดือน ทำให้สลบด้วยอีเธอร์ (ether) ทำความสะอาดบริเวณถุงอัณฑะ (serotum) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 เปิดผิวหนังบริเวณถุงอัณฑะ (midline incision) ด้วยกรรไกรและปากคีบ ที่ได้รับการฆ่าเชื้อโรคแล้วเมื่อพบ vas deferens (ส่วนต่อจาก epididymis) ดังรูป 2.8 ผูกแล้วจึงตัดออก แล้วเย็บปิดผิวหนังบริเวณนั้นทำเช่นเดียวกันอีก 1 ข้าง หนูเมาซ์ที่ทำ vasectomy แล้ว จะแยกขังเดี่ยวไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้ sperm หมดก่อนนำไปผสมกับหนูเมาซ์เพศเมีย การตัด vas deferens ออกจะไม่มีผลกับการผสมพันธุ์ในหนูเพศผู้ ทั้งนี้เพราะอัณฑะ (testis) ยังคงมีอยู่และทำหน้าที่ได้ตามปกติ ตัวอสุจิที่สร้างขึ้นจะสลายตัวไปใน epididymis ส่วน 5 seminal vesicles,

รูปที่ 2.7 แสดงเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะก่อนฝังตัว (กำลังขยาย 200 เท่า)

A. ระยะ 1-เซลล์

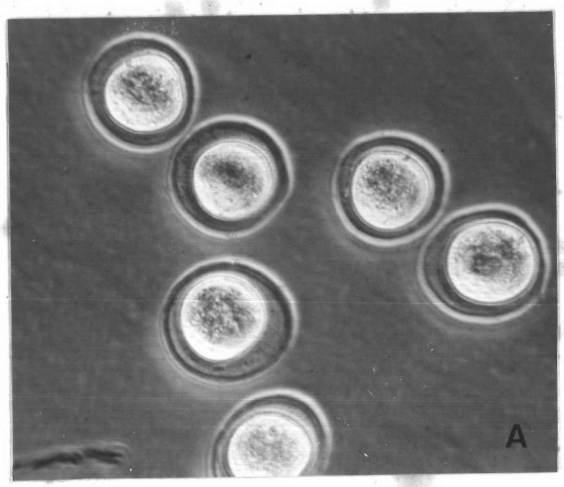
B. ระยะ 2-เซลล์ (เริ่มต้นเพาะเลี้ยง)

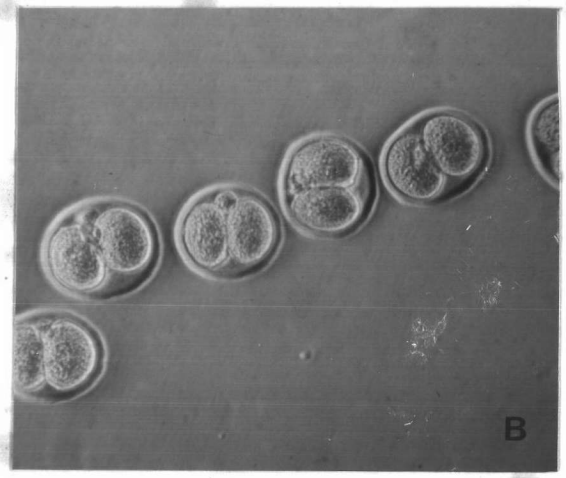
C. ระยะ 4-8 เซลล์ (24 ชั่วโมงภายหลังการเพาะเลี้ยง)

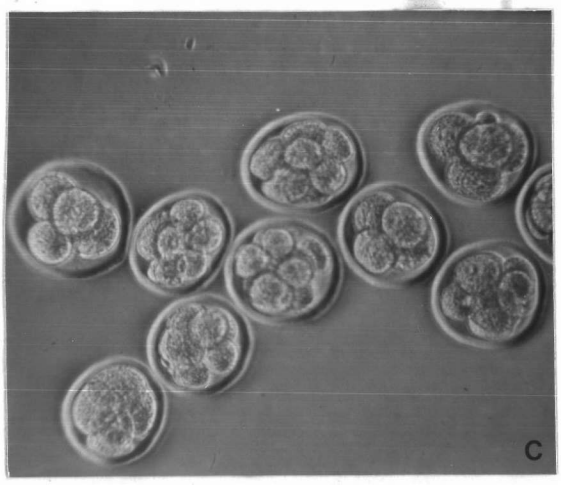
D. ระยะมอรูลา (48 ชั่วโมงภายหลังการเพาะเลี้ยง)

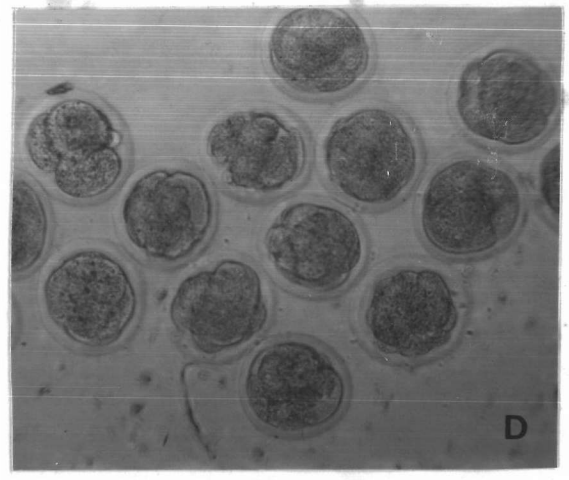
E. ระยะบลาสโตซีส (เริ่มแรก) (72 ชั่วโมงภายหลังการเพาะเลี้ยง)

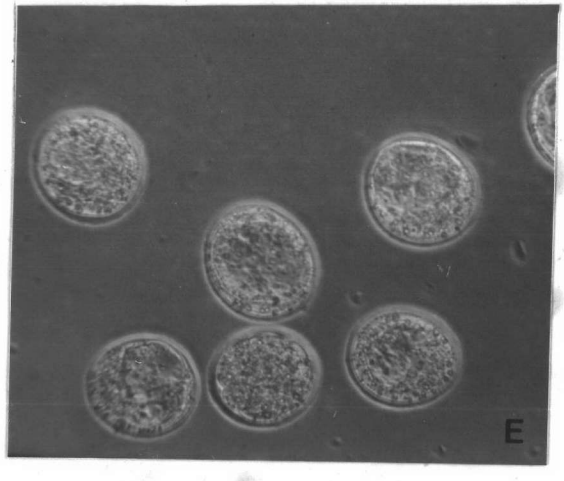
F. ระยะบลาสโตซีส (hatching) (72-76 ชั่วโมงภายหลังเพาะเลี้ยง)

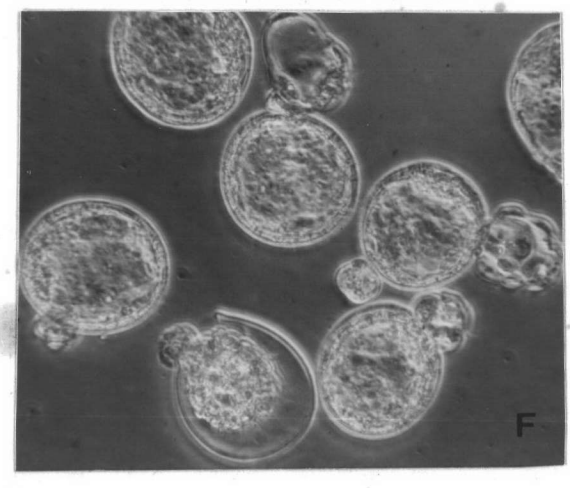

A

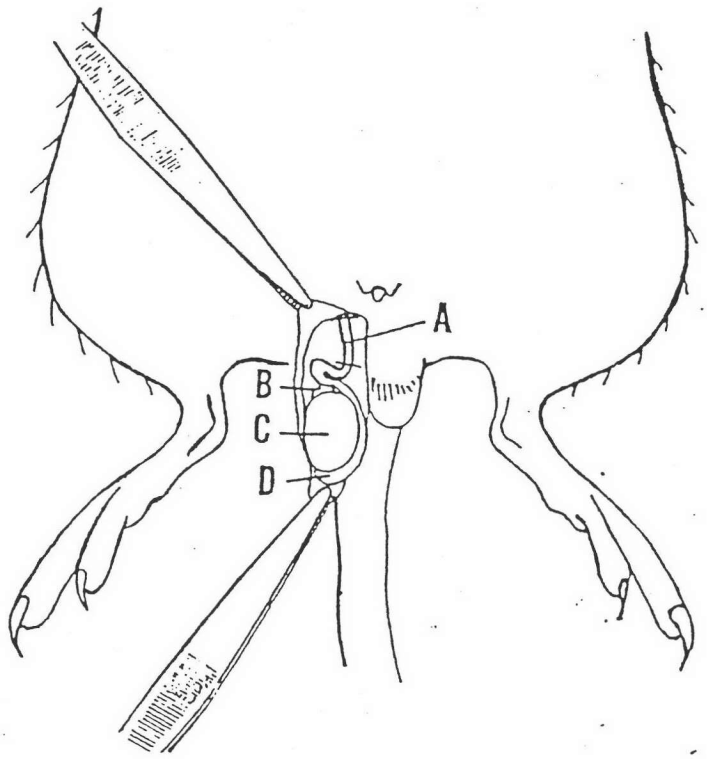

B


C


D


E


F



รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการทำ Male Vasectomy โดยผ่าเปิดบริเวณถุงอัณฑะเมื่อพบ vas deference จึงตัดออกเป็น 2 ส่วน ทำเช่นเดียวกันอีก 1 ข้าง

A. Vas deferens

B. Head of epididymis

C. Testis

D. Tail of epididymis

และ secretory gland อื่น ๆ ยังมีอยู่ ดังนั้น เมื่อนำหนูเพศเมียมาผสมจะพบ plug ได้ตามปกติ

2. การเตรียมหนูเมาซ์เพศเมียให้เกิดการตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) สำหรับเป็น recipient

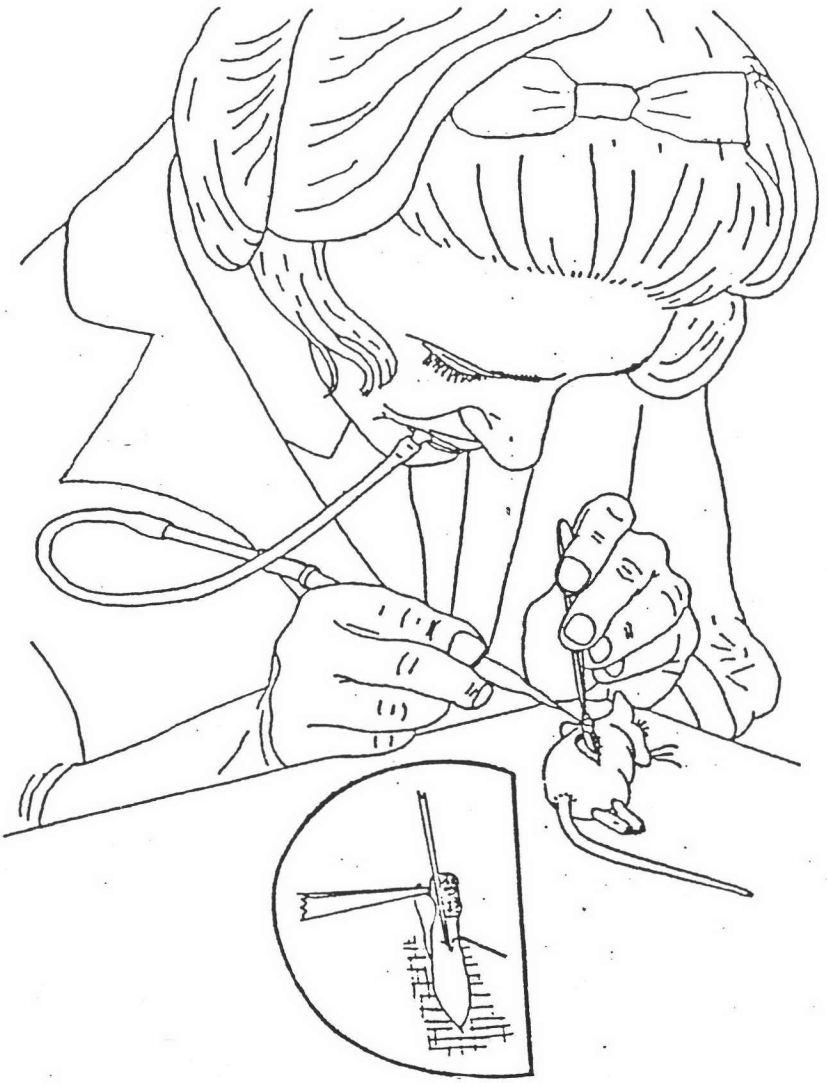
ใช้หนูเมาซ์เพศเมียพันธุ์ผสม (F_1 hybrid) อายุ 6 - 8 สัปดาห์ กระตุ้นให้เกิดการเป็นสัด พร้อมกันโดยฉีด PMSG เข้าช่องท้อง ตัวละ 5 ยูนิต 48 - ชั่วโมงต่อมาฉีด hCG เข้าช่องท้องตัวละ 5 ยูนิตเช่นเดียวกับตัวให้ แล้วนำไปผสมพันธุ์กับหนูเมาซ์เพศผู้ที่เป็นหมัน (vasectomized mouse) ในเช้าวันรุ่งขึ้นสังเกต vaginal plug ถ้าพบถือว่าเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียม บางครั้งหนูที่ไม่พบ plug ก็เกิดการตั้งท้องเทียมและใช้เป็นตัวรับได้เหมือนกัน การถ่ายฝากจะทำใน recipient ที่ตั้งท้องเทียมเป็นวันที่ 3

3. วิธีการถ่ายฝากเอมบริโอ (embryo transfer) (ดังรูปที่ 2.9)

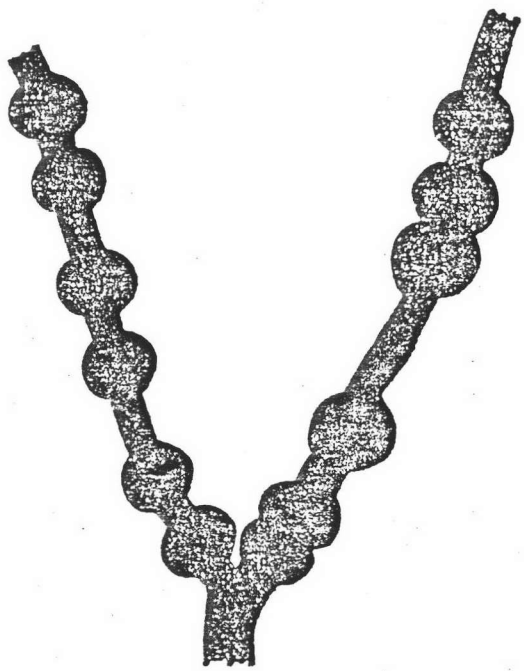
เก็บเอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากระยะ 2 - เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยง ล้างในสารละลาย PBS เพื่อล้างน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอออก แล้วนำไปถ่ายฝากไว้ในมดลูกของ recipient ที่ตั้งท้องเทียมเป็นวันที่ 3 โดยวางยาสลบ recipient ด้วยอีเธอร์ ผ่าเปิดด้านข้าง (dorsolateral incision) บริเวณต่ำจากชายโครงเล็กน้อย ใช้ปากคีบดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่ ท่อนำไข่และส่วนต้นของมดลูกออกมาใช้เข็มเบอร์ 26 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว เจาะที่บริเวณต่ำจาก utero - tubal junction เล็กน้อย จึงสอด capillary pipette ที่ดูดเก็บเอมบริโอระยะบลาสโตซิสไว้ภายใน ค่อย ๆ เป่าดันเอมบริโอออกจาก pipette เข้าสู่มดลูกโดยสังเกต จากการเคลื่อนที่ของฟองอากาศ ซึ่งทำไว้เป็นเครื่องหมายบริเวณส่วนปลายของ pipette เหนือตำแหน่งที่ดูดเก็บเอมบริโอทำเช่นนี้ทั้งปีกมดลูกซ้ายและขวา โดยถ่ายฝากเอมบริโอไว้ที่ปีกมดลูกข้างละ 6 ตัว หลังจากนั้นจึงเก็บมดลูกเข้าสู่ที่เดิมแล้วเย็บปิดแผล recipient ดังกล่าวจะแยกไว้ต่างหากเพื่อดูการตั้งท้องต่อไป

กลุ่มควบคุม ทำด้วยวิธีเดียวกันกับที่กล่าวแล้วข้างต้น แต่ใช้เอมบริโอระยะบลาสโตซิส ที่ได้จากการเจริญในร่างกาย (92 - 96 ชั่วโมง) ภายหลังจากฉีด hCG ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาใช้ถ่ายฝาก

ภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอ 5 วัน นำหนูเมาซ์ที่ถ่ายฝากเข้าไว้มาวางยาสลบ



รูปที่ 2.9 แสดงการถ่ายฝากเอมบริโอระยะบลาสโตซีสไปที่บริเวณปีกมดลูกของ recipient โดยใช้เข็มสเตอไลซ์เบอร์ 26 เจาะที่ปีกมดลูกบริเวณต่ำจาก uterotubal junction เล็กน้อย ใช้ capillary ที่ดูดเก็บเอมบริโอไว้ภายใน สอดผ่านรอยเจาะที่ทำไว้เข้าไปภายใน lumen ของมดลูก แล้วเป่าดันเอมบริโอออกจาก pipette เข้าสู่มดลูก



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะมดลูกของหนูเมาซ์ที่ตั้งท้อง 8 วัน แต่ละปุ่มคือบริเวณที่มีการฝังตัวของเอมบริโอ

ผ่าเปิดหน้าท้อง (mid - ventral incision) นับจำนวนฟีตัสในมดลูกแต่ละข้าง แล้วเย็บปิดแผลตามเดิม ตัวที่ตั้งท้องจะแยกไว้ต่างหาก รอจนครบอายุการตั้งท้อง เมื่อคลอดนับจำนวนลูก (young born) ที่เกิดขึ้นจากการถ่ายฝาก

สถิติวิเคราะห์

การเปรียบเทียบผลของน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดและชนิดของซีรั่ม ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาซ์จากระยะ 2 เซลล์ ถึงระยะบลาสโตซิสในแต่ละการทดลองนั้น ใช้ Z - test เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบในแต่ละการทดลอง

การเปรียบเทียบจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัว และจำนวนลูกที่คลอดภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยงกับเอมบริโอที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง (กลุ่มควบคุม) ไปยังมดลูกของ recipients ใช้ Unpaired t-test

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$