บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และ สารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

การจัดเก็บรังไข่โคโดยการสุ่มเก็บรังไข่ของโคพันธุ์ที่ถูกฆ่าในโรงฆ่าสัตว์ และเก็บภายในกระติกที่ควบคุมอุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส ซึ่งมีสารละลาย 0.9% NaCl โดยนำกลับห้องทดลองภายในเวลา 2 - 3 ชั่วโมง

2. ห้องปฏิบัติการ

ในการจัยครั้งนี้ได้ใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ 3 แห่ง ได้แก่ 1) ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2) ห้องปฏิบัติการ Embryo Culture Laboratory, Department of Animal Health and Biomedical Science, University of Wisconsin ด้วยความอนุเคราะห์จาก Proferssor Barry D. Bavister ในการเพาะเลี้ยง และทดลองต่าง ๆ และ 3) ห้องปฏิบัติการของ Department of Meat and Animal Science, University of Wisconsin ด้วยความอนุเคราะห์จาก Proferssor First N.L. ในงานทดลองทางเทคนิค Micromanipulator และเทคนิคทาง PCR

3. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วยเครื่องมือต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. Carbon Dioxide Incubator : Forma Scientific, USA
2. Laminar Flow Hood : Model GLM - 48
   Gensa Company Limited
   Bangkok, Thailand
3. Interference Phase Contrast Microscope
   : Model IMT-2 Olympus
   Tokyo, Japan

4. Advanced Osmometer : Model $3D_2$, 1000 Highland Avenue, Massachusetts USA
5. pH Meter : Cole Parmer, Digi pH ase, Medico, Bangkok, Thailand
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด : JP-160 Chyo Balance Corporation, Tokyo, Japan
7. Millipore filter : ขนาด 0.22 µm Dikinson and Co., California, USA.
8. Petri Dishes Plastics No. 1007: ขนาด 60 x 15 mm และ 100 x 15 mm Falcon Div. Becton, Dikinson and Co., California, USA.
9. Hemocytometer : Carvo Scientific Instrument, California, USA.
10. Heminton Syringe : ขนาด 1,000 µl, Carvo Scientific Instrument, California, USA.
11. Plastic Syringe 5, 10 ml : USA./ Scienctific plastics, P.O. Box 3565, Ocala, USA.
12. Mouth Pieces
13. ตะเกียงบุนเซน
14. Pasteur Pipette
15. 18- gauge Needle
16. Microcentrifuge tube : ขนาด 0.5 - 2.0 ml, Dikinson and Co., California, USA.
17. Minifuge : Mid West Scientific, 228 Maramee Station Rd. Valley Park, MD, USA
18. Maxi mix I Type 16700 : Mid West Scientific, 228 Maramee Station Rd. Valley Park, MD, USA
19. Programmable Thermal Controller : Coy Model 5D Coy Manufacturing, Ann Arbor, MI., USA

20. Transilluminator (UV light box)
: Fotodyne incorporat, 950 Walnut Ridge Drive, Hartland, WI., USA.
21. Safety glasses with UV protection
22. Pipetters
0.5 - 10 µl : Eppendort NJ Research, inc. serial No. 1478
20 - 200 µl : Oxford
200 - 1000 µl : Pipetman
23. เครื่องมือ Joystick-type Micromanipulator
: de fronbrune, St. louis, MO
24. PCR Instrument : Coy Model 50 หรือ 60 thermal cyclers, Coy Manufacturing, Ann Arbor, MI.
25. Gel Chamber
26. Power Supply Instrument
27. กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม
28. ที่ตักเจลออกจากแชมเบอร์
29. กล่องพลาสติก

4. สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง modified-Tyrode's solution (fertilization medium), Sperm TL, TL-Hepes, mHECM-3 และ PBS-PVA (จาก Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA.)
1.1 Sodium chloride (NaCl)
1.2 Potassium chloride (KCl)
1.3 Calcium chloride 2-hydrate krist ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
1.4 Sodium dihydrogen Phosphate-2-hydrate krist ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
1.5 Magnesium chloride krist ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
1.6 Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
1.7 Disodium hydrogen phosphate 7-hydrate krist ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)

1.8 N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (Hepes acid)

1.9 N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic sodium salts] (Hepes salt)

1.10 Sodium lactate (Na lactate 60% syrup) : No. L-1375 (DL-Latic Acid)

1.11 Polyvinyl alcohol : No. P-8135

1.12 Hydrochoric acid (HCl)

1.13 Sodiumhydroxide (NaOH)

2. Bovine serum albumin : Fraction V. No. A-9647, Hyclon Laboratories, Logan, UT.

3. Penicillin, streptomycin และ amphotericin B : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

4. TCM-199 with Earle's salts : Gibco, Grand Island, NY. Cat. no. 400-1100EB

5. Sodium pyruvate : Sigma Chemical Co., St. Louis. MO.

6. Epidermal growth factor : Catalog no. E-4127, Lot No. 42H8800, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

7. Parafin oil : grade USP No. 21, Amoco Oil Co., Whiting Lubriconts Plant, Whiting, IN

8. Fatty acid-free bovine serum albumin : Catalog No. A-7511, Lot. No. 50H9329, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

9. Gentamycin : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

10. Semen : American Bruders Service, DeForest WI

11. Heparin sulfate : Catalog No. H-3125, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

12. ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการเจริญของไข่ในจานทดลอง

12.1 Luiteinizing hormone (LH)

: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Baltimore, MO.

12.2 Follicle stimulating hormone (FSH)

: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Baltimore, MO.

12.3 17 β-estradiol : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

13. กรดอะมิโนที่ใช้ในการทดลอง : แสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3

: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

14. 2% Agarose gels : FMC Bioproducts Rockland, ME.

15. 10X tris - borate buffer pH 8.0

: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

16. Tracking dye (Bromphenol blue)

: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

17. DNA Staining solution (ethidium bromide 2.5 μg/ml)

: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

18. PCR primers : DNA International Lake Oswego, OR.
(0.5 μmol/l each primer)

19. DNA Makers (pGem) : Size 50 μg Cat G 1741 USA.

20. dNTP'S (A, C, G, T,) : Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN.

21. 1.5 mmol/L $MgCl_2$; 50 mmol/L; 0.001% Gelatin

: G 2500 : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

22. Taq polymerase : Perkin-Elmer, Branchburg, NJ.

23. Mineral oil : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

น้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 น้ำยาปฏิสนธิ TL-stock น้ำยา Sperm-TL และน้ำยา TL-Hepes เป็น simple medium ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ มีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยนำสารเคมีเหล่านี้ยกเว้น BSA, gentamycin และ PSA มาละลายในน้ำกรองจากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ซึ่งผ่านการกรอง 4 ครั้งในระบบ Milli-Q system (Milipore Corporation , New Bedford, MA.) นอกจากนี้น้ำที่ผ่านการกรอง ก่อนนำไปใช้ยังต้องนำมาทดสอบโดยวิธี Hamster sperm motility assay (Bavister และ Andrews, 1988) น้ำที่เตรียมขึ้นใช้เพียง 2 อาทิตย์ ปรับความเข้มข้นของสารละลาย (Osmolality) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับ 275 $\pm$ 5 mOsmol/kg; 290-300 mOsmol/kg; 290 - 300 mOsmol/kg และ 255 - 265 mOsmol/kg ตามลำดับ การปรับความเข้มข้นใช้น้ำกรองบริสุทธิ์และ NaCl ช่วยในการปรับระดับ ส่วนระดับ pH ของน้ำยาทุกชนิดจะปรับให้อยู่ในระดับ 7.2 - 7.4 การปรับระดับ pH ใช้สารละลาย 1 N ของ NaOH หรือ 1 N ของ HCl เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว จึงนำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วมาทำให้ปลอดเชื้อ ด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (millipore filters) ขนาด 0.22 ไมครอน (ทำให้สารละลายปลอดเชื้อ) บรรจุลงในภาชนะสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 อาทิตย์เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บน้ำยาเพาะเลี้ยงไว้นานกว่านี้จะมีผลเสียต่อเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในจานทดลอง (Bavister and Andrews, 1988)

ในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 ซึ่งใช้สำหรับเพาะเลี้ยงไข่และเอ็มบริโอ เตรียมจากผงสำเร็จรูปมาละลายในน้ำกรองบริสุทธิ์ 1 ลิตร พร้อมกับเติมสารไบคาร์บอเนต น้ำยาเพาะเลี้ยงนี้เตรียมขึ้นมาใช้เพียง 2 อาทิตย์เท่านั้น ปรับความเข้มข้นของสารละลาย (Osmolality) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับ 290 - 300 m Osmol/kg การปรับความเข้มข้นของสาร และการปรับส่วนระดับ pH ทำเช่นเดียวกับการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอื่น ๆ เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรมฟิลเตอร์ (millipore filters) ขนาด 0.22 ไมครอน บรรจุลงในภาชนะสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ส่วน BSA, gentamycin และ antibiotics/antimycotics จะเติมลงไปในน้ำยาเมื่อต้องการใช้ ส่วนน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 เมื่อจะใช้แต่ละครั้งให้เติม 10% BCS (Bovine calf serum), 0.25 mM sodium pyruvate, antibiotics/ antimycotic (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml

I17227185

streptomycin และ 0.25 µg/ml amphotericin B; PSA), 50 ng/ml epidermal growth factors และฮอร์โมน (5 µg/mlLH, 0.5 µg/ml FSH และ 1 µg/ml 17β-estradiol) สำหรับน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 เติมกรดอะมิโนต่าง ๆ ตามส่วนประกอบดังตารางที่ 2.2 และ 2.3 (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก) จากนั้นจึงทำตาม microdrop method ของ Brinster (1963) โดยแบ่งน้ำยาเพาะเลี้ยงออกเป็นหยดเล็ก ๆ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานพลาสติก (culture dishes) ขนาด 35 x 10 มิลลิเมตร และ/หรือ 60 x 15 มิลลิเมตร และใช้พาราฟินเหลวราดคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าว เมื่อเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงได้แล้ว นำจานเพาะเลี้ยงเข้าเก็บในตู้เพาะเลี้ยง (incubator) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ความชื้นอยู่ในระดับอิ่มตัว และมีอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในอากาศอย่างน้อย 2 - 4 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง

ตารางที่ 2.1 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของโค (กรัม/มิลลิลิตร)

Components	TL-Stock solution		Sperm-TL stock solution		TL-Hepes stock solution		mHECM-3	
	mM	g/100ml	mM	g/100ml	mM	g/100ml	mM	g/100ml
NaCl	114.0	0.6660	100.00	0.5840	114.00	0.6660	113.80	0.6649
KCl	3.20	0.0235	3.20	0.0235	3.20	0.0235	3.00	0.0225
$NaHCO_3$	25.00	0.2100	25.00	0.2100	2.00	0.0168	25.00	0.2100
Lactic acid (60% syrup)	10.00	0.185ml	21.60	0.368ml	10.00	0.185ml	3.50	0.0648ml
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.50	0.0068	0.29	0.0044	0.40	0.0055		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.00	0.0300	2.10	0.0310	2.00	0.0300	1.90	0.0272
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.50	0.1020	1.50	0.0300	0.50	0.0100	0.46	0.0092
Hepes (acid)			10.00	0.2380	5.00	0.1194		
Hepes (salt)					5.00	0.1306		
PVA							(0.1 mg/ml)	0.0100
1M HCl								0.14 ml
Na-pyrate	0.25	5µl/ml	1	20µl/ml	0.25	5µl/ml		
BSA	6mg/ml		3mg/ml					
Gentamycin	50µg/ml		50µg/ml					
PSA*					100µl/10ml			
BCS					10%			
pH	7.2-7.4		7.2-7.4		7.2-7.4		7.2-7.4	
Osmolality	290-300		290-300		255-265		275 ±5	

* PSA = 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin และ 0.25 µg/ml amphotericin B

ตารางที่ 2.2 mHECM-3 Non-essential Amino Acids (NEA)

Component	M.W.	mM	10 x (mM)	g/10ml
Alanine	89.09	0.56	5.6	0.0050
Aspatate (acid)	133.1	0.45	4.5	0.0060
Cysteine $HCl \cdot H_2O$	175.6	0.0006	0.6 (1000x)	0.0011
Glutamate (acid)	169.1	0.89	8.9	0.0150
Glutamine	146.1	0.68	6.8	0.0099
Glycine	75.07	0.67	6.7	0.0050
Proline	115.1	0.35	3.5	0.0040
Serine	105.1	0.48	4.8	0.0050
Tyrosine $2NaH_2O$	225.2	0.26	2.6	0.0059
Cystine 2HCl	313.2	0.08	0.8	0.0025
Hydroxy proline	131.1	0.08	0.8	0.0010

ตารางที่ 2.3 mHECM-3 Essential Amino Acids (EA)

Component	M.W.	mM	10 x (mM)	g/10ml
Arginine	210.7	0.33	3.3	0.0070
Histidine $HCl \cdot H_2O$	209.6	0.10	1.0	0.0021
Isoleucine	131.2	0.31	3.1	0.0041
Leucine	131.2	0.92	9.2	0.121
Lysine HCl	182.6	0.38	3.8	0.0069
Methionie	149.2	0.20	2.0	0.0030
Phenylalanine	165.2	0.30	3.0	0.0050
Threonine	119.1	0.50	5.0	0.0060
Tryptophan	204.2	0.10	1.0	0.0020
Valine	117.1	0.43	4.3	0.0050

2. การเพาะเลี้ยงไข่โคในจานทดลองให้ถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ

(*In vitro* maturation, IVM)

ดำเนินการตาม Pinyopumintr and Bavister (1991) การเจาะไข่ (oocyte) จากรังไข่ จะเลือกเจาะไข่จาก small antral follicles ที่มีขนาด 2 - 7 มม. โดยใช้เข็มขนาด 18-G ที่ต่อกับหลอดฉีดยาขนาด 10 มล. ดูดของเหลว (follicular fluid) ที่ได้ลงในหลอดทดลองก้นกรวยขนาด 50 มล. ปล่อยให้ของเหลวนั้นตกตะกอน นำตะกอนที่ก้นหลอดมาตรวจหาไข่และ คัดเลือก cumulus oocyte complex (COCs) โดยใช้กล้อง stereomicroscope กำลังขยายต่ำ (x 20 - 30) นำไข่ที่ได้มาล้าง 2 ครั้งในน้ำยา TL-Hepes (Bavister และคณะ, 1983) ที่มี 10% BCS, 0.25 mM sodium pyruvate และ PSA นำไข่ที่คัดเลือกได้ 10 - 12 ใบใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง maturation ซึ่งมีพาราฟินเหลวปกคลุมด้านบนของหยดน้ำยาในจานทดลอง น้ำยาเพาะเลี้ยง maturation ของไข่โคได้แก่ TCM-199 ที่มี Earle's salt และ 10% BCS, 0.25 mM sodium pyruvate, PSA; 50 ng/ml epidermal growth factors; 5 μg/ml LH และ 0.5 μg/ml FSH และ 1 μg/ml 17β-estradiol จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ในอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของโคในจานทดลอง

(*In vitro* fertilization, IVF and *In vitro* culture, IVC)

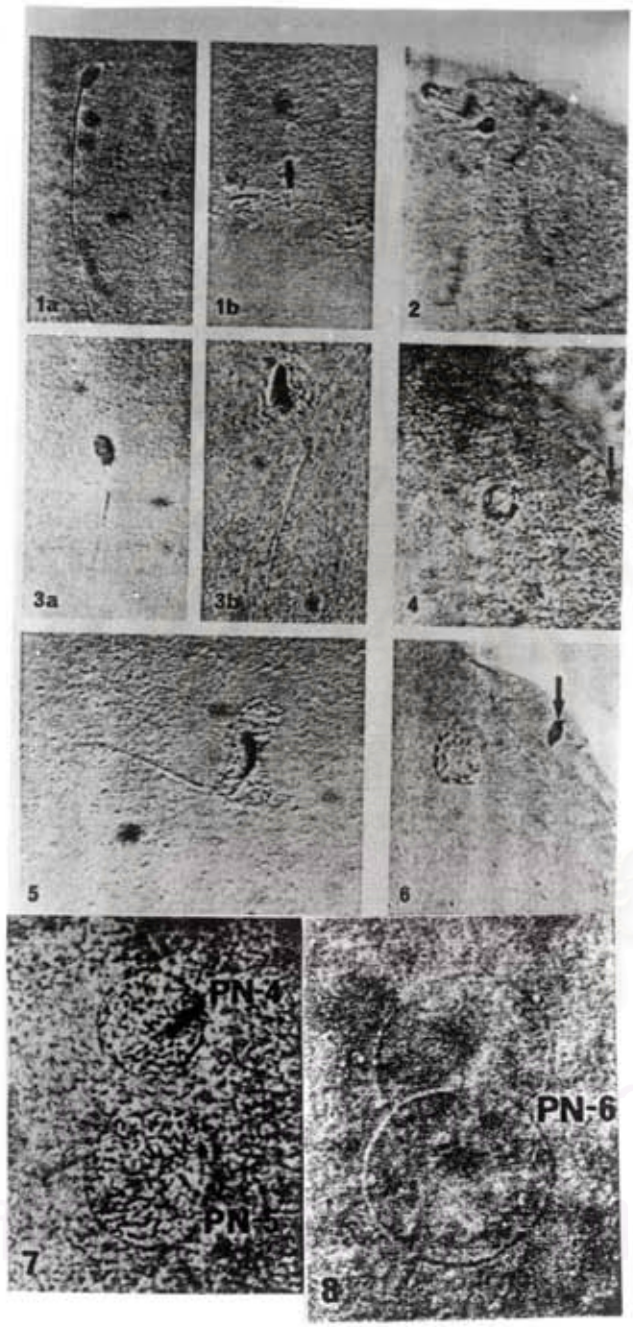
ในขั้นตอนของการปฏิสนธิเริ่มด้วยการดูดเอา COCs ในแต่ละหยดของ maturation medium นำมาล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำยา TL-Hepes ซึ่งมี 10 % BCS และ PSA จากนั้นดูด COCs ที่ล้างแล้วด้วย pipette ใส่ในหยดน้ำยาปฏิสนธิ modified Tyrode's medium (Parrish และคณะ, 1988) ที่มี 6 มิลลิกรัม/มล. ของ BSA ซึ่งปราศจาก fatty acid; 0.25 mM sodium pyruvate และ 50 ไมโครกรัม/มล. gentamycin อยู่ 10 - 12 oocytes/หยด นำไปไว้ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้ 5% CO_2 ในอากาศ

การเตรียมอสุจิ ใช้วิธี swim up (Parrish และคณะ, 1986) จัดเป็นความก้าวหน้าในการเตรียมอสุจิที่มีคุณภาพดีต่อความสำเร็จในขั้นตอนการปฏิสนธิ นิยมใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพราะมีความสะดวกในการใช้และการเก็บรักษาน้ำเชื้อโค รวมทั้งทำให้ทราบคุณภาพและปริมาณน้ำเชื้อโคที่นำมาใช้ (น้ำเชื้อแช่แข็งได้รับจาก American Bruders Service, DeForest, WI.) ขั้นตอนในการเตรียมน้ำเชื้ออสุจิด้วยวิธีนี้มีดังต่อไปนี้

1. นำ frozen semen 1-2 หลอดมาละลายที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสในเวลา 1 นาที ทำให้ได้ semen เหลว 1 มล.
2. ดูด semen เหลว 0.25 มล. ใส่ในหลอด 1 มล. ของสารละลาย sperm-TL จำนวน 4 หลอด
3. นำไปวางในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ดูดของเหลวส่วนบน (ประมาณ 0.85 มล.) จากแต่ละหลอดใส่ใน centrifuge tube ที่มี sperm-TL 5 -10 มล. และปั่นที่ 250 rpm เป็นเวลา 10 - 15 นาที ปั่น 2 ครั้ง
5. ดูดของเหลวส่วนบนออกให้หมด
6. นำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 1.06 - 1.6 x 10^6 อสุจิ/มล.

ดูดอสุจิที่เตรียมได้จากการ swim up จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำยาปฏิสนธิ TL-stock ที่มีไข่อยู่และใส่ Haparin sulfate (2 ไมโครกรัม/มล.) ในจานทดลอง เพื่อให้อสุจิผ่านขบวนการคาพาซิเตชันและปฏิกิริยาอะโครโซม (Parrish และคณะ, 1986) ทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้ 5% CO_2 ในอากาศ

ภายหลังเพาะเลี้ยงอสุจิและไข่ทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง แล้วจึงดูดไข่ด้วย pipette ล้างด้วย mHECM-3 (McKiernan และคณะ, 1991) ที่ไม่มี glutamine แต่มีอะมิโนที่ไม่จำเป็นอยู่ (non-essential amino acid, NEA) โดยล้าง 3 ครั้ง ในระหว่างการล้างไข่ ใช้ปลาย pipette ดูดไข่เข้า-ออกหลายๆ ครั้งมีผลให้ cumulus cells ที่อยู่ล้อมรอบ zona pellucida หลุดออกจากตัวไข่ เพื่อแยกอสุจิส่วนเกินออกจากไข่ก่อนจะเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 (no glutamine) + NEA ประมาณ 10 - 12 ใบต่อ 1 หยดของน้ำยาเพาะเลี้ยง บันทึกผลการปฏิสนธิของไข่และตัวอสุจิจากการทดลองที่ได้ มีการทดสอบปริมาณความเข้มข้นของอสุจิที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิ โดยเจือจางความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 1.06 - 1.6 x 10^6 อสุจิ/มล. และใส่ 2 ไมโครกรัม Haparin sulfate ต่อหยดของน้ำยาปฏิสนธิ ภายหลังการปฏิสนธิแล้ว บันทึกผลการปฏิสนธิจากการย้อมสี 1% aceto-orecein หลังจาก fix ในน้ำยา methanol: acetic (3 : 1 โดยปริมาตร) และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูจากเกณฑ์ดังต่อไปนี้ (ดูรูปที่ 2.1 ประกอบ)



รูปที่ 2.1 แสดงขั้นตอนการปฏิสนธิระหว่างไข่โคและอสุจิในจานทดลอง

1. เห็น spermatozoa ส่วนหัวติดสีย้อมชัดเจน ไม่มี decondensation หางยังติดหรือไม่ติดกับส่วนหัว และเห็นโครโมโซมของไข่อยู่ในระยะการแบ่งนิวเคลียสที่เมตาเฟส II หรือ ana-telophase II

2. เห็นส่วนหัวอสุจิมีการ decondenzation และขยายใหญ่ การติดสีจางลง ส่วนหางแยกออกแล้ว และเห็น polar body อันที่ 2

3. เห็น male pronuclei และ female pronuclei ชัดเจน

4. เห็น male pronuclei และ female pronuclei ซ้อนกันอยู่จากการเคลื่อนที่รวมกัน

นำไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ 5% CO_2 ในอากาศ บันทึกการเจริญของเอ็มบริโอในระยะ 2- ถึง ≥ 7-เซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ต่อมาเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์มากพอสำหรับการวิเคราะห์หาเพศของเอ็มบริโอและให้ได้เอ็มบริโอสำหรับการถ่ายฝากในโอกาสต่อไป ได้ทำการทดลองหาวิธีเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอโคหลังจากที่เพาะเลี้ยงมาแล้ว 72 ชั่วโมง ให้เจริญต่อไปจนถึงระยะบลาสโตซีส ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดที่สนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอดีที่สุด โดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> ผลของกรดอะมิโนต่อการสนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอโคในจานเพาะเลี้ยงจากระยะ 72 ชั่วโมง ถึง 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ หลังจากบันทึกการแบ่งตัวของ เอ็มบริโอเมื่อครบ 72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ นำเอ็มบริโอที่ได้มาเลี้ยงต่อใน 50 ไมโครลิตรของหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ในจานทดลองดังต่อไปนี้

1. mHECM-3 + NEA
2. mHECM-3 + EA
3. mHECM-3 + NEA + EA
4. mHECM-3 + 10% BCS
5. TCM-199 + 10% BCS

(รายละเอียดน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดอยู่ในภาคผนวก)

หลังจากเลี้ยงเอ็มบริโอไว้ในตู้เพาะเลี้ยงครบ 120 ชั่งโมง นำเอ็มบริโอออกมาตรวจดูการเจริญด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด interference phase contrast เพื่อศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอในภาวะที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มที่เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีกรดอะมิโน

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการสนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอโคในจานเพาะเลี้ยงจากระยะ 72 ชั่งโมง ถึง 192 ชั่งโมงหลังการปฏิสนธิ โดยหลังจากบันทึกการแบ่งตัวของเอ็มบริโอเมื่อครบ 72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ นำเอ็มบริโอที่ได้มาเลี้ยงต่อใน 50 ไมโครลิตรของหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของกลูโคสระดับต่างๆ (0.2 mM, 2.0 mM และ 5.56 mM) และมีกรดอะมิโนที่สนับสนุนการเจริญดีที่สุดตามผลการทดลองที่ 1 ทั้งที่ไม่มีและมีฟอสเฟต 0.35 mM ดังต่อไปนี้

1. mHECM-3 + NEA + 0.2 mM Glucose
2. mHECM-3 + NEA + 2.0 mM Glucose
3. mHECM-3 + NEA + 5.56 mM Glucose
4. mHECM-3+ NEA + 0.35 mM NaH_2PO_4 + 0.2 mM Glucose
5. mHECM-3 + NEA + 0.35 mM NaH_2PO_4 + 2.0 mM Glucose
6. mHECM-3 + NEA + 0.35 mM NaH_2PO_4 + 5.56 mM Glucose
7. mHECM-3 + 10% BCS
8. TCM-199 + 10% BCS

(รายละเอียดน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดอยู่ในภาคผนวก)

หลังจากเลี้ยงเอ็มบริโอไว้ในตู้เพาะเลี้ยงครบ 120 ชั่งโมง นำเอ็มบริโอออกมาตรวจดูการเจริญด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด interference phase contrast เพื่อศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอในภาวะที่มีกลูโคสระดับต่าง ๆ ทั้งที่ไม่มี และมีฟอสเฟต เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอกลุ่มที่เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีแต่ 10 % BCS

4. <u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR</u>

<u>4.1 การเตรียม 2X Master Mix</u> ใส่น้ำบริสุทธิ์ 60 ไมโครลิตรใน heat sterilized microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 20 หลอด นำหลอดทั้งหมดที่เตรียมเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

เตรียม 2X Master Mix จำนวน 2 มิลลิลิตร ใน heat sterilized micro-centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารเคมีเหล่านี้ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบของสารเคมีใน 2X Master Mix

สารเคมี	ปริมาตรของสารละลาย (ไมโครลิตร)
น้ำบริสุทธิ์	670
10X Taq Buffer (Standard Mg^{+2} concentration)	1000
dNTP's (20µl each of A, C, G, T; 200 µmol)	80
3′ Medrano Primer	100
5′ Medrano Primer	100
Taq DNA Polymerase (0.6 unit/reaction)	50
Total Volume	2000

ปิดฝาหลอดของ 2X master mix ปั่นเบา ๆ นาน 10 - 15 วินาที เพื่อลดปริมาณฟองอากาศ จากนั้นเติม 2X master mix จำนวน 40 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดของน้ำบริสุทธิ์ 60 ไมโครลิตร ที่เตรียมแช่แข็งไว้ มีผลให้แต่ละหลอดมีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ตลอดเวลาที่เตรียมสารละลาย 2X master mix ทำบนถาดน้ำแข็ง

4.2 <u>การเตรียม 1X Master Mix</u> ใส่น้ำบริสุทธิ์ 60 ไมโครลิตรใน heat sterilized microcentrifuge tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดทั้งหมดที่เตรียมเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

เตรียม 1X Master Mix จำนวน 2 มิลลิลิตร ใน heat sterilized micro-centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารเคมีเหล่านี้ ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ส่วนประกอบของสารเคมีใน 1X Master Mix

สารเคมี	ปริมาตรของสารละลาย (ไมโครลิตร)
น้ำบริสุทธิ์	1235
10X Taq Buffer (Standard Mg^{+2} concentration)	500
dNTP's (10µl each of A, C, G, T; 200µmol)	40
3′ X Primer	50
5′ X Primer	50
3′ Y Primer	50
5′ Y Primer	50
Taq DNA Polymerase (0.6 unit/reaction)	25
Total Volumne	2000

ปิดฝาหลอดของ 1X master mix ปั่นเบา ๆ นาน 10 - 15 วินาที เพื่อลดปริมาณฟองอากาศ จากนั้นเติม 1X master mix จำนวน 40 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดของน้ำบริสุทธิ์ 60 ไมโครลิตร ที่เตรียมแช่แข็งไว้ มีผลให้แต่ละหลอดมีปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ตลอดเวลาที่เตรียมสารละลาย 1X master mix ทำบนถาดน้ำแข็ง

4.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis

4.3.1 การเตรียม 10X Buffer :

ส่วนประกอบ : - 300 ml น้ำกลั่นบริสุทธิ์
- 108 g Tris Base
- 55 g Boric Acid
- 7.44 g EDTA

โดยละลายสารเคมีให้เข้ากันดี เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปวัด pH = 8

4.3.2 เตรียม 1X Buffer โดยการเจือจาง 10X Buffer ให้เป็น 1X Buffer ด้วยการเติมน้ำกลั่น 2700 มิลลิลิตรลงใน 10X Buffer จำนวน 300 มิลลิลิตร

4.3.3 การเตรียม DNA markers (pGem)

ส่วนประกอบ : - 25 ไมโครลิตร ของ น้ำกลั่นบริสุทธิ์
- 2 ไมโครลิตร pGem
- 3 ไมโครลิตร 10X Taq buffer
- 6 ไมโครลิตร Bromophenol blue

นำสารละลายที่เตรียมได้ปั่นเบา ๆ ด้วย mini mix นาน 10 - 15 วินาที

4.3.4 การเตรียมสี Bromophenol Blue (tracking dye solution) ใช้ 50% ของสารละลาย glycerol รวมกับสารละลาย glycerol ที่อิ่มตัวด้วย Bromophenol blue

4.3.5 การเตรียมสีย้อม DNA ใช้ ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร

5. <u>การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ biopsy ของเอ็มบริโอโค</u> มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 ที่มี 10% Bovine calf serum หยดในจานเพาะเลี้ยง (ขนาด 60 x 15 มิลลิลิตร) หยดละ 25 ไมโครลิตร ประมาณ 25 - 30 หยด ซึ่งมีพาราฟินเหลวปกคลุมด้านบน พร้อมทำหมายเลข เพื่อนำเอ็มบริโอมาใส่ตามหมายเลขหลังจากทำ biopsy นำจานเพาะเลี้ยงนี้เก็บในตู้เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ที่ 39 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลาย OSA (Ovine serum albulmin) ใน TL-Hepes โดยชั่ง 3 มิลลิกรัม sheep albumin ต่อ 1 มิลลิลิตรของ TL-Hepes นำสารละลายนี้หยดบนจานเพาะเลี้ยง ขนาด 60 x 15 มิลลิลิตร หยดละ 125 ไมโครลิตร ประมาณ 3 หยด ซึ่งมีพาราฟินเหลวปกคลุมด้านบนของน้ำยาเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องไว้สำหรับใส่บลาสโตเมียร์ ที่ได้จากการทำ biopsy และใช้ล้างบลาสโตเมียร์ 3 ครั้ง ก่อนเก็บลงในหลอดวิเคราะห์ (microcentrifuge tube)

3. ใช้จานเพาะเลี้ยงขนาด 100 x 15 มิลลิลิตร หยดน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-Hepes ที่มี sheep albumin อยู่ หยดละ 160 ไมโครลิตร จำนวน 3 หยด ซึ่งมีพาราฟินเหลวปกคลุมด้านบนของน้ำยาเพาะเลี้ยง วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้สำหรับเอ็มบริโอที่จะทำ biopsy โดยวิธี micromanipulation

4. เตรียมหลอดวิเคราะห์ (microcentrifuge tube) สำหรับเก็บบลาส-โตเมียร์ เพื่อวิเคราะห์หาเพศทาง PCR โดยนำ 20 ไมโครลิตรของน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปั่นด้วย mini mixer นาน 10- 15 วินาที พร้อมทำหมายเลขให้ตรงกับเอ็มบริโอ นำไปเก็บในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

6. <u>วิธีการทำ biopsy ของเอ็มบริโอโค เพื่อการตรวจเพศ</u>

ในการตรวจหาเพศใช้เอ็มบริโอโครยะ compact morulae (วันที่ 5 - 6) จำนวน 50 ตัว ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลองตั้งแต่ขั้นตอน *In vitro* maturation และ *In vitro* fertilization โดยคัดเลือกเอ็มบริโอที่มีลักษณะดีที่สุดมาทำ biopsy ด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำเอ็มบริโอที่คัดเลือกแล้ว (จัดเรียงดังรูปที่ 2.2(ก)) วางในน้ำยา TL-Hepes ที่มี sheep albumin ใช้แขนข้างหนึ่งของ micromanipulator จับโดยการดูดเอ็มบริโอไว้ (holding pipette) ส่วนแขนอีกข้างหนึ่งเป็นแขนที่มีปิเปตปลายแหลม (finely drawn glass pipette) ใช้แทงผนัง Zona pellucida ให้เป็นช่อง (รูปที่ 2.3)

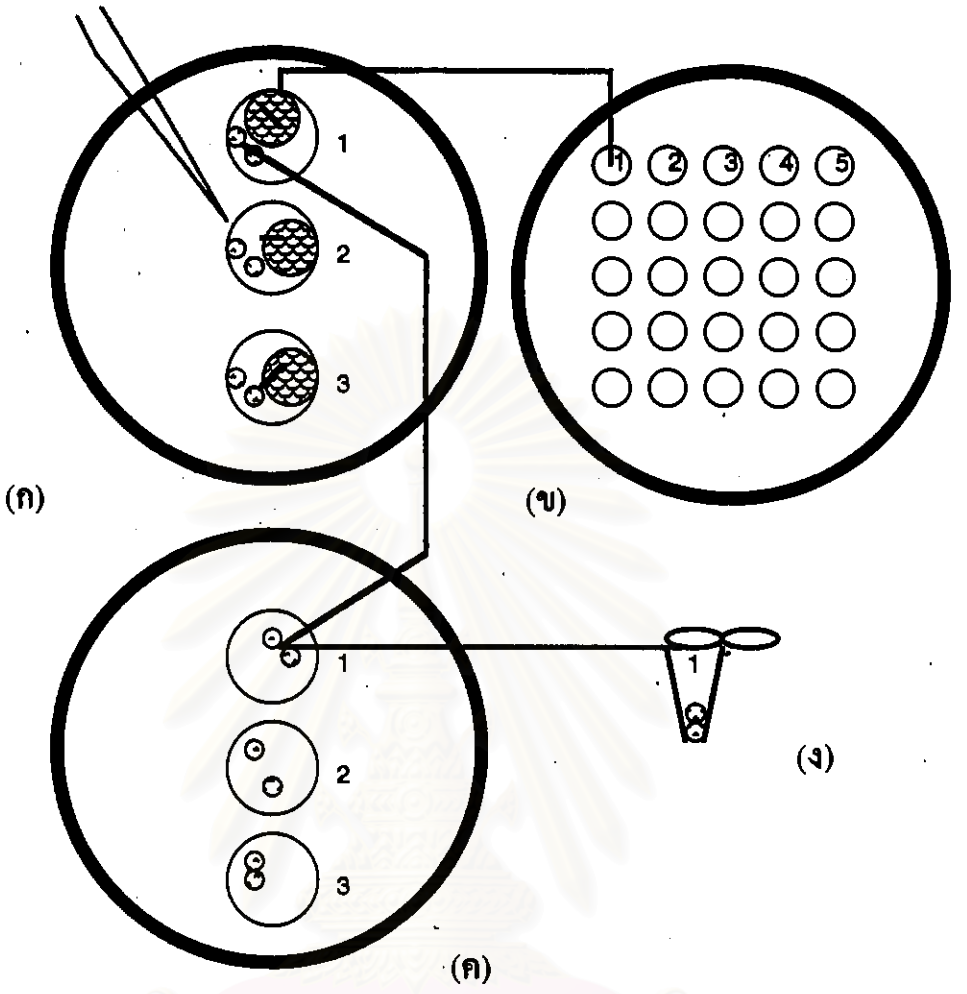
2. จากนั้นใช้ aspiration pipette สอดเข้าไปในช่องบนผนัง Zona pellucida แล้วดูดบลาสโตเมียร์ออกมา 3-4 บลาสโตเมียร์ แล้วนำไปวางไว้ด้านซ้ายของหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงดำเนินการแทงผนัง Zona pellucida ของเอ็มบริโอ และดูดเอาบลาสโตรเมียร์ตามวิธีการข้อ 1 และ 2 จนครบ 50 ตัว (แสดงในรูปที่ 2.3)

3. นำเอ็มบริโอที่ทำ biopsy แล้วไว้ในหยดน้ำยา TCM-199 ที่มี 10 % BCS ที่เตรียมไว้ในตู้เพาะเลี้ยง ตามหมายเลขเอ็มบริโอจนครบจำนวน (รูปที่ 2.2(ข)) นำเอ็มบริโอกลับไปเพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้ 5% CO_2 ในอากาศ

4. บลาสโตเมียร์ที่ได้ล้างในน้ำยา TL-Hepes ที่มี sheep albumin 3 ครั้ง (รูปที่ 2.2 (ค)) นำบลาสโตเมียร์ 3 - 4 เซลล์ พร้อมทั้ง 5 ไมโครลิตรของน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-Hepes ใส่ในหลอดวิเคราะห์ซึ่งมีน้ำกลั่นบริสุทธิ์ไร้เชื้อ 20 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ (รูปที่ 2.2(ง))

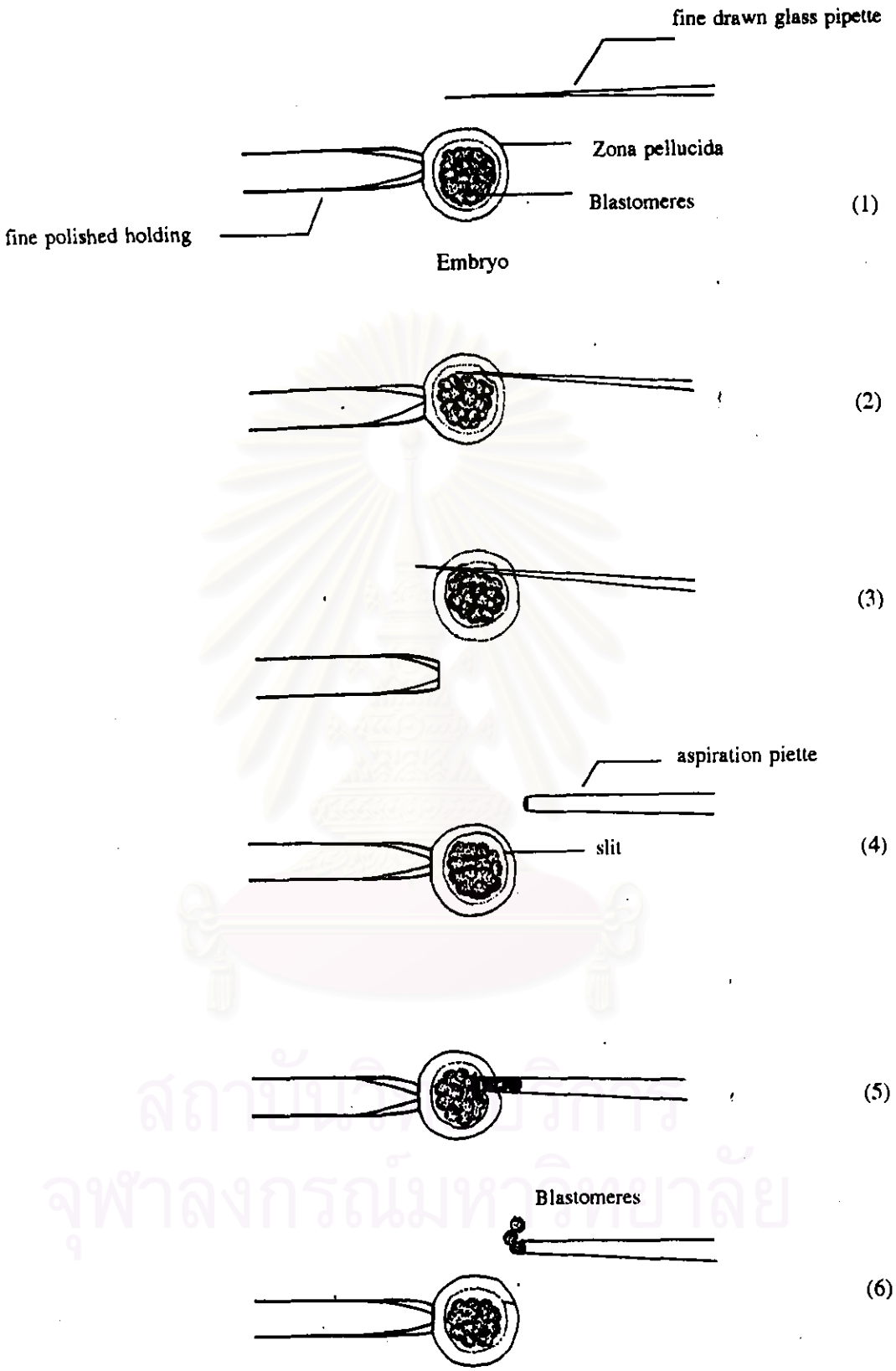
5. นำหลอดวิเคราะห์ทั้งหมดเก็บในแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 แสดงขั้นตอนการเก็บเอ็มบริโอและบลาสโตเมียร์หลังทำ micromanipulation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 แสดงขั้นตอนที่ 1-6 ในการทำ biopsy ของเอมบริโอในระยะ compact morula โดยวิธี micromanipulation

7. การตรวจวิเคราะห์หาเพศในเอ็มบริโอโค โดย PCR

ในการทดลองนี้จัดเป็นวิธีตรวจวิเคราะห์เพศของตัวอย่างต่าง ๆ ที่ให้ผลวิเคราะห์อย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยการตรวจหาส่วนของยีน X และ Y โดยวิธีเพิ่มจำนวนส่วนของยีน X และ Y ด้วย polymerase chain reaction (PCR) ด้วยการเพิ่มจำนวนยีนที่เรียกว่า nested จาก zfx, zfy spcecific primer และ allele specific primer ตามวิธีของ Aasen และ Medrano (1990)

7.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้วิเคราะห์เพศ ในการทดลองตัวอย่างที่จะนำมาใช้เพื่อการวิเคราะห์เพศมีเซลล์ lymphocyte ของเลือดโค เลือดคน (มีเซลล์ lymphocyte) และเอ็มบริโอโครยะมอรูลาร์

7.1.1 Lymphocyte ของเลือดโค ได้จากการเจาะที่ Jacular Vein ตรงบริเวณลำคอโค ด้วยเข็มเบอร์ 18 ที่ต่อกับหลอดฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร นำเลือดประมาณ 20 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกเอาส่วนของเม็ดเลือดขาว และนำไปสกัด DNA ตามวิธีของ Strauss (1990)

7.1.2 เลือดคน ได้จากการเจาะเลือดจาก peripheral ด้วยเข็มเบอร์ 18 ที่ต่อกับหลอดฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร นำเลือดประมาณ 20 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกเอาส่วนของเม็ดเลือดขาว และนำไปสกัด DNA ตามวิธีของ Strauss (1990)

7.1.3 เอ็มบริโอโค ได้จากการเพาะเลี้ยงไข่ ซึ่งได้จากรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 + 10% BCS เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งไข่จะอยู่ในระยะการเจริญอย่างสมบูรณ์ มีโพลาบอดีระยะที่ 1 และโครโมโซมอยู่ในระยะเมตาเฟส II นำไข่ในระยะนี้และอสุจิมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับการปฏิสนธิ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่มี 5 % CO_2 ในอากาศ ต่อมานำเอ็มบริโอทั้งหมดลงในหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับการเจริญที่ 1 (mHECM-3 + NEA) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่มี 5% CO_2 ในอากาศ ได้เอ็มบริโอในระยะ 2- ≥ 7- เซลล์ ย้ายเอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 + 10% BCS ในตู้เพาะเลี้ยงที่มี 5% CO_2 ในอากาศ แล้วได้เอ็มบริโอเจริญถึงระยะมอรูลา (อายุ 5 - 6 วันหลังผสม) ซึ่งเป็นระยะที่นำไปใช้ในการตรวจเพศของเอ็มบริโอโค

7.2 การเตรียมและการสกัด DNA จากเลือดโคและเลือดคนในการตรวจวิเคราะห์เพศ

7.2.1 วิธีแยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

1. นำเลือด 20 ml ผสมกับ CPD (citrate phosphate dextrose) 6 ml เป็นน้ำยากันเลือดแข็ง

2. ค่อย ๆ หยดส่วนผสมของเลือดกับ CPD ลงบนสารละลาย lymphoprep ในอัตราส่วนเลือด : lymphoprep = 4 : 3 (v/v)

3. นำหลอดที่มีเลือดและ lymphoprep นี้ไปปั่นแยกในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีหัวปั่นแบบ swinging-out bucket ตั้งความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลานาน 15 นาที

4. เมื่อครบเวลา นำหลอดออกจากเครื่องปั่น จะมีวงสีขาวปรากฏให้เห็น ซึ่งเป็น PBMCs ที่แยกออกจากเซลล์ชนิดอื่น ๆ ในเลือด ใช้ sterile disposable pasteur pipet ดูดวงสีขาวนำมาใส่ในหลอด sterile microtube ขนาด 1.5 ml

5. เติม Solution A 1 ml ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เพื่อทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ดูดปนมาแตก (lyse) กำจัดออกจาก PBMCs ได้ จะสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง

6. นำหลอดนั้นไปปั่นในเครื่อง microcetrifuge ด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดส่วน supernatant ออกจากตะกอนซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs

7. ถ้ายังมองเห็นเม็ดเลือดแดง ปนเปื้อนอยู่ในตะกอน PBMCs ให้ปฏิบัติตามข้อ (5-6) ซ้ำอีก 1-2 ครั้ง

8. ปั่นล้าง PBMCs ด้วย PBS 1 ml ด้วยเครื่อง microcetrifuge ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลานาน 2 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วดูดส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป

7.2.2 การสกัด DNA ดำเนินตามวิธีของ Strauss (1990) มีตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำส่วนที่ตกตะกอนมาเติม 6 มิลลิลิตรของ ice-cold PBS ในหลอดได้ตะกอนแขวนลอย นำไปปั่นเป็นเวลา 5 นาทีที่ 500 rpm เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2. เติม digestion buffer (ดูภาคผนวก) ในปริมาตร 1 volume ให้ตะกอนแขวนลอย (ใช้ 0.3 มิลลิลิตรของ digestion buffer / 3 x 10^7 เซลล์ และถ้าเซลล์จำนวนมาก ใช้ 1 มิลลิลิตร digestion buffer/ 10^8 เซลล์)

3. สลายเซลล์และย่อยเซลล์จากข้อ 2 โดยปิดฝาให้สนิท และนำไปเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 18 ชั่วโมง

4. สกัดเอากรดนิวคลีอิคออก โดยเติม phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol เท่ากับปริมาตรของตัวอย่างในหลอดทดสอบ

5. ปั่นเป็นเวลา 10 นาทีที่ 1,700 rpm ใน swinging bucket rotor

6. ทำให้ DNA บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยรินของเหลวส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 7.5 M ammonium acetate จำนวน 1 : 2 ของปริมาณตัวอย่าง ลงในหลอดทดสอบ จะเห็น DNA เป็นเส้นตกตะกอน และเติม 100 % ethanol ในจำนวน 2:1 ของปริมาณตัวอย่าง นำไปปั่นที่ 1,700 rpm เป็นเวลา 2 นาที

7. รินส่วนของ ethanol ในข้อ 6 ทิ้ง ให้เหลือ ethanol ในปริมาณน้อยในหลอดตัวอย่าง

8. ให้เติม 70 % ethanol ในหลอดตัวอย่าง และค่อย ๆ ริน ethanol ทิ้งโดยไม่ให้เส้น DNA กระเทือน ปล่อยให้เส้น DNA แห้งในอากาศ

9. เติม TE buffer ในหลอดตัวอย่างให้เส้น DNA แขวนลอย เขย่าเบา ๆ เส้น DNA จะละลายหมดใน TE buffer ทำที่อุณหภูมิห้อง

10. ได้ DNA ประมาณ 1 mg/ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.3 <u>การใช้ PCR เพิ่มจำนวนยีนของส่วนจำเพาะ zfx และ zfy</u> zfx และ zfy เป็นส่วนที่แสดงยีน X และยีน Y ของยีนเพศบนสาย DNA ของไค นำมาใช้สร้างไพรเมอร์ที่จำเพาะและเพื่อนำมาเพิ่มจำนวนสาย ตรงบริเวณยีน X และยีน Y โดยวิธีทาง PCR ตามวิธีของ Aasen และ Medrano (1990) ไพรเมอร์นี้เรียกว่า Nested primers

Nested PCR ไพรเมอร์ (แสดงในตารางที่ 2.6) เป็นไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบให้เหมาะสมและจำเพาะต่อส่วนของยีนบริเวณ zfx หรือ zfy ซึ่งมีลักษณะของไพรเมอร์ดังนี้

5′,combined zfx, zfy	ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT
3′, combined zfx, zfy	GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT

ส่วนไพรเมอร์อีกชนิดซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ allele ของ zfx และ zfy เรียกว่า zfx, zfy allele-specific มีลักษณะของไพรเมอร์ดังนี้

5′, zfx, allele-specific	GACAGCTGAACAAGTGTTACTG
5′, zfy allele-specific	GAAGGCCTTCGAATGTGATAAC

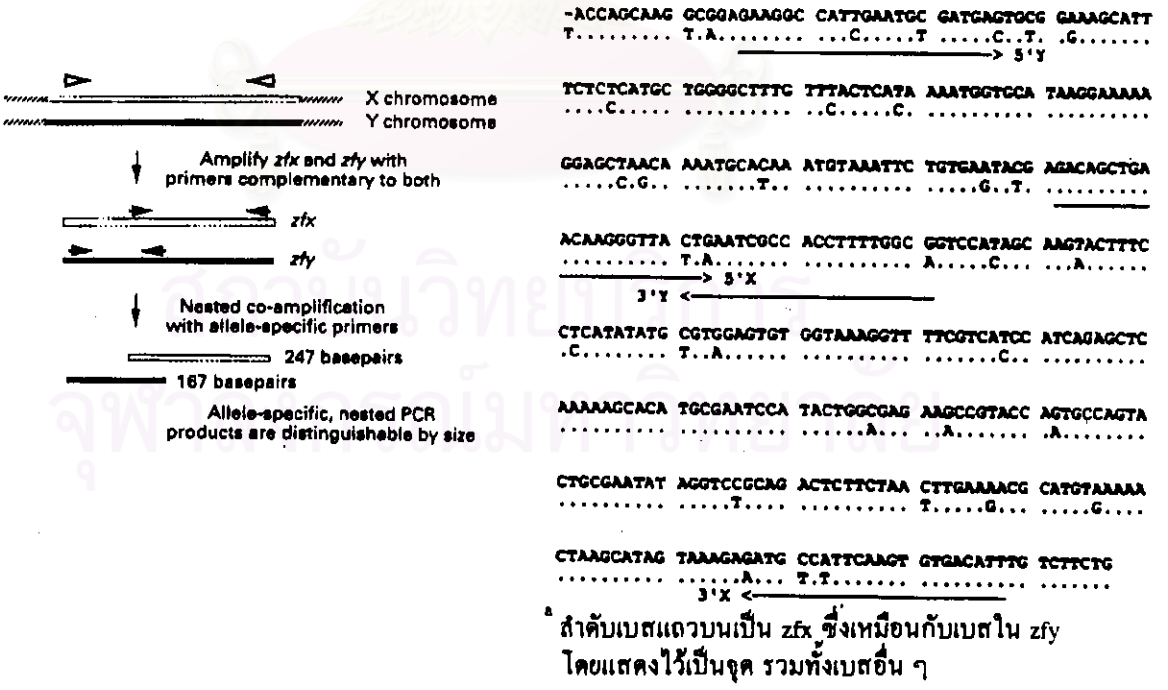
3′, zfx, allele-specific AATGTCACACTTGAATCGACTC

3′, zfy, allele-specific CTGACAAAAGGTGGCGATTTCA

ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ ให้ความจำเพาะในระหว่างคู่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน zfx และ zfy (แสดงในรูปที่ 2.4) การเลือกไพรเมอร์ให้เหมาะสมต้องคำนึงถึงความจำเพาะเจาะจงของคู่ลำดับและเป็นสายนิวคลีโอไทด์ที่สั้น เพื่อความถูกต้องและแน่นอนต่อการวิเคราะห์ในการเพิ่มจำนวน DNA โดย PCR DNA ที่เพิ่มขึ้นสามารถตรวจสอบขนาดที่แตกต่างได้ชัดเจนจากการทำ agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 2.6 ลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพศ

Primer	Derivation	Sequence
1. 5', combined zfx, zfy	Aasen and Medrano (1990)	ATAATCACATGGAGCCACAAGCT
2. 3', combined zfx, zfy	Aasen and Medrano (1990)	GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT
3. 5', zfx, allele -specific	Kirkpatrick and Monson (1993)	GACAGCTGAACAAGTGTTACTG
4. 5', zfy, allele -specific	Kirkpatrick and Monson (1993)	GAAGGCCTTCGAATGTGATAAC
5. 3', zfx, allele -specific	Kirkpatrick and Monson (1993)	AATGTCACACTTGAATCGCATC
6. 3', zfy, allele -specific	Kirkpatrick and Monson (1993)	CTGACAAAAGGTGGCGATTTCA



[a] ลำดับเบสแถวบนเป็น zfx ซึ่งเหมือนกับเบสใน zfy โดยแสดงไว้เป็นจุด รวมทั้งเบสอื่น ๆ

รูปที่ 2.4 ลำดับยีน zfx และ zfy และตำแหน่งของ allele - specific primers[a]

การเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนจำเพาะของยีน zfx และ zfy ในหลอดทดลองได้มาจากพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากขึ้นถึง 10 ล้านเท่า จากปฏิกิริยา 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการให้ความร้อนแก่สารละลาย DNA ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที เพื่อให้ DNA เกลียวคู่คลายเกลียวออกเป็นสายเดี่ยว เรียกว่า Denaturation ขั้นที่สองเป็นการลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสมสำหรับการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับสาย DNA แม่พิมพ์ ซึ่งเป็น DNA สายสั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับบริเวณของ DNA แม่พิมพ์ที่ต้องการทำการศึกษาเข้าจับกับ DNA ต้นแบบ ปฏิกิริยานี้เรียกว่า Primer annealing ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ขั้นที่สามเป็นการเติมเอนไซม์ลงไป และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ เพื่อต่อขยายสาย DNA (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที

หลังจบ PCR ครั้งแรกแล้ว จะมีการทำ PCR ชุดที่ 2 ต่อไปโดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR จากชุดแรกเป็น DNA ต้นแบบ ส่วน nested primers นั้น ได้แก่ 5′,combined zfx, zfy และ 3′, combined zfx, zfy เมื่อเริ่มปฏิกิริยารอบที่สอง ขั้นตอนที่หนึ่งเริ่มจากการเพิ่มอุณหภูมิให้กับสารละลายถึง 95 องศาเซลเซียส พบว่าปฏิกิริยาการทำงาน ในขั้นตอนที่สองที่เรียกว่า annealing เมื่อเริ่มรอบการทำงานของ PCR ดำเนินไปได้ใน 5 รอบ อุณหภูมิในช่วงนี้ลดลงถึง 52 องศาเซลเซียส ต่อมาอีก 25 รอบอุณหภูมิกลับสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิจำเพาะที่ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA เป้าหมาย (target DNA) ได้เพียงบริเวณเดียว และเป็นการลดการจับกันเองระหว่าง zfx ที่สร้างใหม่กับ zfy ไพรเมอร์ (zfx amplification by zfy specific primers) ปริมาณ DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ก็จะเป็น nested ซึ่งจะจับคู่ลำดับกับ specific primers ซึ่งเป็นผลให้ปริมาณ DNA เพิ่มต่อไป ในขั้นตอนสุดท้ายมีผลให้เอนไซม์ทำงานได้ดีจนสิ้นสุดปฏิกิริยาในรอบการทำงานของ PCR ขั้นตอนการทำงานของ PCR มี 2 โปรแกรมที่เรียกว่า RMA และ BWKB

ภาวะของ PCR/Thermocycler สำหรับการตรวจหาเพศของเอ็มบริโอด้วยวิธี Kirkpatrick/Monson (PCR/Thermocycler conditions for Kirkpatrick/Monson embryo sexing assay) การทำงานของ PCR/Thermocycler เป็นไปตามโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งไว้ การทำงานแบ่งเป็นสองโปรแกรม ได้แก่ โปรแกรมแรก (RMA) เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อใช้ประโยชน์ทำเป็น DNA ต้นแบบ (DNA template) เพื่อนำไปใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณที่ผลิตแบบต่อเนื่องในโปรแกรมที่สอง (BWKB) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

โปรแกรมแรก : RMA

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ขั้นตอน
95	1.30	(1)
94	0.45	(2)
55	0.45	(3)
72	1.00	(4)
หมุนเวียนซ้ำไป 34 รอบ		(5)
72	5.00	(6)
80	HOLD	(7)
END		(8)

หลังจากปฏิกิริยาตามโปรแกรมแรกเสร็จสมบูรณ์ ใส่ 2 ไมโครลิตรของ DNA ที่ได้จากโปรแกรมแรกในหลอดไมโครทิวซึ่งมี 1X Master Mix แล้วเริ่มดำเนินโปรแกรมสองตามภาวะควบคุมดังนี้

โปรแกรมที่สอง : BWKB

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ขั้นตอน
95	1.30	(1)
94	0.45	(2)
55	0.45	(3)
72	1.50	(4)
หมุนเวียนซ้ำต่อเนื่องไป 34 รอบ		(5)
94	0.45	(6)
60	0.45	(7)
72	0.50	(8)
หมุนเวียนซ้ำต่อเนื่องไป 24 รอบ		(9)
72	5.00	(10)
80	HOLD	(11)
END		(12)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.4 <u>ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หาเพศโดย PCR</u> การวิเคราะห์หาเพศ นำตัวอย่าง DNA ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคทั้งเพศผู้และเพศเมีย DNA จากเซลล์เม็ดเลือดของคนทั้งเพศผู้และเพศเมีย และเซลล์บลาสโตเมียร์จากระยะ compact morula ของเอ็มบริโอโคมาวิเคราะห์ด้วย PCR ในโปรแกรมปฏิกิริยารอบแรก ที่เรียกว่า RMA ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำตัวอย่าง DNA (ได้แก่ DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของโคทั้งเพศผู้และเพศเมีย DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนทั้งเพศผู้และเพศเมีย และเซลล์บลาสโตเมียร์) มาวางไว้จนอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง ปั่นเบา ๆ ด้วย microcentrifuge (อัตราเร็ว 250 รอบต่อนาที) เป็นเวลาประมาณ 10-15 วินาที

2. นำตัวอย่างต้มในน้ำเดือด 15 นาที

3. ในระหว่างที่รอ นำ 2X master mix ที่เตรียมไว้ (100 ไมโครลิตรต่อหลอด) วางบนถาดน้ำแข็ง (หนึ่งหลอดของ 2X master mix แบ่งใส่หลอดตัวอย่างได้ 4 หลอด) นำ Taq polymerase วางในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. เมื่อต้มหลอดตัวอย่างครบ 15 นาที นำหลอดตัวอย่างมาวางไว้ให้เย็น เตรียมนำ 2X master mix อยู่บนถาดน้ำแข็งและ Taq polymerase ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. เติม Taq polymerase 4 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด 2X master mix นำไปปั่นด้วย vortex ให้รวมเข้าด้วยกัน

6. จัดหลอดตัวอย่างเป็นแถว ๆ ละ 4 หลอด เพื่อให้สะดวกในการเติม 2X master mix (2X master mix / 4 หลอดตัวอย่าง) 25 ไมโครลิตรในแต่ละหลอดตัวอย่าง (3 Blastomere, 0.5 µmol/L, แต่ละไพรเมอร์, 1.5 mmol $MgCl_2$/L, 50 mmol KCl/L, 0.001 gelatin) ปั่นด้วยอัตราเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ด้วยเครื่อง microcentrifuge

7. เติม 2 - 3 หยดของ mineral oil ในหลอดตัวอย่างที่วิเคราะห์

8. เปิดเครื่อง Thermocycle โดยเลือกใช้โปรแกรมแรก ที่เรียกว่า RMA ให้หยุดชั่วขณะที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส

9. ก่อนนำหลอดตัวอย่างวางในเครื่อง Thermocycle เติม glyceral ที่ฐานในแต่ละช่องว่างที่วางหลอดตัวอย่าง จัดเรียงหลอดตัวอย่างในเครื่อง Thermocycle

10. เปิดเครื่องให้ทำงานนานประมาณ 3 - 4 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ตัวอย่างในโปรแกรมแรกที่เรียกว่า RMA แล้ว ให้เตรียมการวิเคราะห์ในโปรแกรมของปฏิกิริยาการวิเคราะห์โปรแกรมสอง ที่เรียกว่า BWKB ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ 1X master mix วางในถาดน้ำแข็ง ปั่นด้วย vortex เบา ๆ นาน 10 - 15 วินาที

2. เติม 1X master mix จำนวน 25 ไมโครลิตร ในหลอดเปล่าที่มีหมายเลขตามจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์

3. นำตัวอย่างที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยารอบแรกมาดำเนินการสังเคราะห์ต่อในปฏิกิริยารอบสอง โดยนำ 2 ไมโครลิตรของแต่ละหลอดตัวอย่างเติมในหลอดตัวอย่างในข้อ 2 ตรงกันตามหมายเลขของตัวอย่าง นำไปปั่นด้วย vortex ให้รวมเข้ากันนาน 10 - 15 ครั้ง

4. เติม 2 - 3 หยดของ mineral oil ในแต่ละหลอดตัวอย่าง

5. เปิดเครื่อง Thermocycle โดยเลือกใช้โปรแกรมที่สองที่เรียกว่า BWKB และให้หยุดการทำงานชั่วขณะที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส

6. ปล่อยให้เครื่องดำเนินการวิเคราะห์อย่างสมบูรณ์ในปฏิกิริยา โดยทิ้งไว้ข้ามคืน

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ เพื่อเพิ่มจำนวนของยีน X และ Y โดยการทำงานของ PCR แล้วจึงนำส่วนที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละหลอดตัวอย่างไปตรวจทางผลิตภัณฑ์ของ PCR

7.5 <u>การตรวจขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR</u> การตรวจหาขนาดของ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มจำนวนส่วนของยีน X (zfx) และ Y (zfy) ด้วย PCR ทำโดยการวิเคราะห์หาขนาด DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งมีวิธีการโดยละเอียดดังต่อไปนี้

7.5.1 <u>การเตรียม agarose gel electrophoresis</u> ความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมได้ประกอบด้วย 2 % agarose gel 1% Nusieve และ 1% Seakem เทเจลลงในบัฟเฟอร์ แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำจนเดือด (ไม่ควรต้มสารละลาย agarose บนเตาโดยตรงเพราะจะไหม้หรือเดือดล้นภาชนะได้ง่าย) ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำไปเทในเจลแชมเบอร์

การเทเจลลงในเจลแชมเบอร์เริ่มโดยใส่แถบพลาสติกปิดด้านปลายเปิดทั้งสองข้างของฐานรองเจล (รูปที่ 2.5 (ก,ข)) ยาขอบรอบ ๆ บริเวณที่จะเทเจลด้วยเจลจำนวน

น้อยแล้วทิ้งให้เจลแข็งตัว (รูปที่ 2.6 (ก)) ใส่หวีโดยให้ปลายซี่หวีสูงจากฐานประมาณ 2 มิลลิเมตร (รูปที่ 2.5 (ค)) แล้วจึงเท agarose ที่อุ่นลงไปให้มีความสูงประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร (รูปที่ 2.6 (ข)) หลังทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว จึงค่อยๆ ดึงหวีและแถบพลาสติกออกจากเจลแชมเบอร์ ถึงขั้นตอนนี้จะได้ agarose gel ที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลาย DNA ที่ต้องการแยก (รูปที่ 2.6 (ค)) ก่อนที่จะหยอดสารตัวอย่าง DNA ลงในหลุมที่เตรียมไว้ เทบัฟเฟอร์ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1 - 3 มิลลิเมตร

7.5.2 <u>การหยอดสารตัวอย่าง DNA ใน agarose gel</u> เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่าง DNA ที่หยอดลงในหลุมฟุ้งขึ้นมา และเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุลบและมีขนาดโมเลกุลเล็กในสนามไฟฟ้าระหว่าง electrophoresis จึงผสมสารตัวอย่าง DNA กับสีบรอมฟีนอลบลู ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำ 20 ไมโครลิตรของ DNA marker (pGem) ผสมกับ 5 ไมโครลิตรของบรอมฟีนอลบลู ผสมให้เข้ากัน 3 - 4 ครั้ง แล้วนำไปหยอดลงในหลุมที่หนึ่งบน agarose gel ด้วยไมโครปิเปตต์

2. นำ 20 ไมโครลิตรของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย PCR มาผสมกับ 5 ไมโครลิตรของบรอมฟีนอลบลู ผสมให้เข้ากัน 3 - 4 ครั้งแล้วนำไปหยอดลงในหลุมบน agarose gel ที่เตรียมไว้ตามแบบของตัวอย่างจนครบทุกหลุมบน agarose gel โดยใช้ไมโครปิเปตต์ (รูปที่ 2.4 (ค))

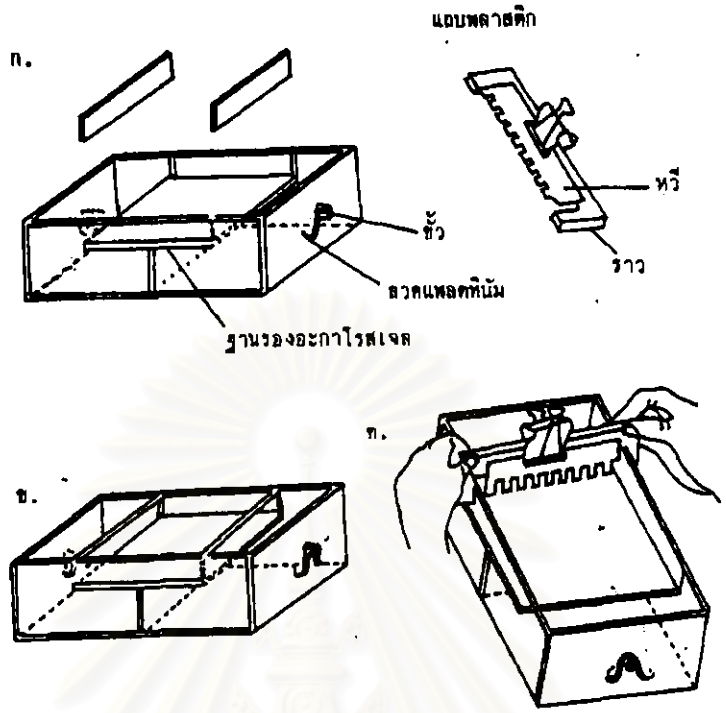
3. ต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยจัดให้ความต่างศักย์ของแหล่งจ่ายไฟคงที่ที่ 120 โวลต์ ทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง หรือจนสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนมาใกล้ถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง (ห่างจากขอบประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร)

4. ปิดกระแสไฟฟ้า ตัก agarose gel ออก แล้วนำไปใส่ลงในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำยาย้อม DNA (ethidium bromide 2.5 μg/ml) ตั้งทิ้งไว้นานประมาณ 20 นาที แล้วนำ agarose gel ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แต่ละครั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว

5. ตรวจดูแถบ DNA บน agarose gel โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

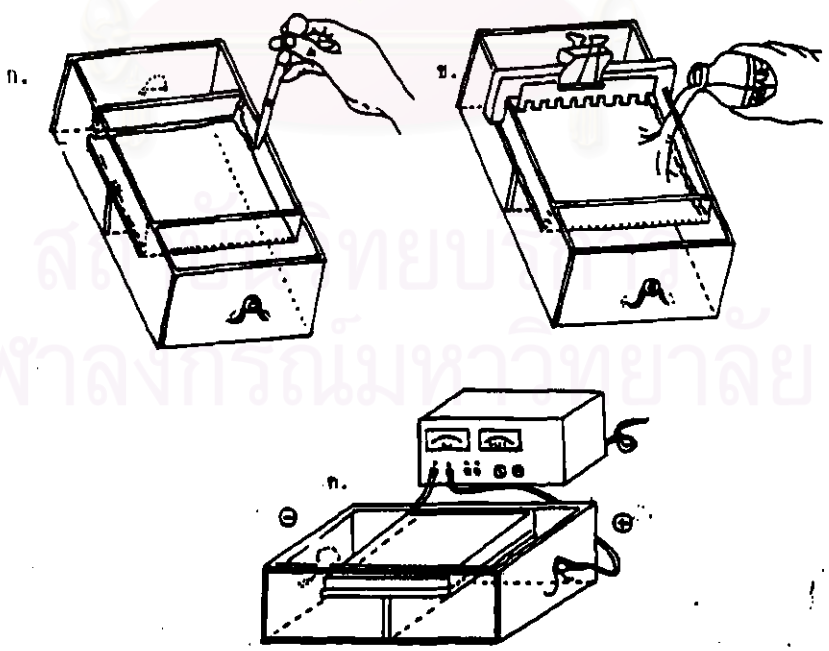
ข้อควรระวัง : เพื่อป้องกันอันตรายจากแสงอัลตราไวโอเลตที่จะเกิดกับตา ควรสวมแว่นตาหรือใช้แผ่นแก้วปิดขณะดูผลการทดลอง agarose gel

6. บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ



รูปที่ 2.5 ภาพแสดง (ก) ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเจลแชมเบอร์ (ข) การประกอบแถบพลาสติก (ค) การประกอบราวและหวี

(จาก หนังสือการประชุมปฏิบัติการ "เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม" ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)



รูปที่ 2.6 ภาพแสดงการเท agarose gel ลงในเจลแชมเบอร์

(จาก หนังสือการประชุมปฏิบัติการ "เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม" ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

<u>การทดลองที่ 8</u> การวิเคราะห์เพศโคจากเซลล์บลาสโตเมียร์ด้วยวิธีทาง PCR

นำเอ็มบริโอโคมาจากการเพาะเลี้ยงไข่โคที่เจริญอย่างสมบูรณ์และปฏิสนธิในจานทดลอง (IVM และ IVF) ตามวิธีของ Pinyopumintr และ Bavister (1991) ไซโกตนำมาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยา mHECM-3 + NEA เอ็มบริโอเจริญและแบ่งเซลล์จนถึงระยะ ≥ 7 เซลล์ นำเอ็มบริโอเปลี่ยนใส่ในหยดน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 + 10% BCS จนถึงระยะ compact morula (5- ถึง 6- วันหลังผสม) นำเอ็มบริโอระยะนี้มาแทงเซลล์ที่ผนังของ zona pelucida ให้เป็นช่องด้วย fine - glass pipett และนำบลาสโตเมียร์จำนวน 3 - 4 เซลล์ออกจากเซลล์เอ็มบริโอตรงช่องของ zona pelucida ด้วย Aspirated tube ของ micromanipulator ในเอ็มบริโอโคจำนวน 50 ตัว เซลล์บลาสโตเมียร์นำมาล้างด้วยน้ำยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งมี OSA อยู่ 0.1 - 0.6 % ต่อมานำเซลล์บลาสโตเมียร์เก็บในไมโครทิว ที่มีน้ำบริสุทธิเป็นน้ำแข็งอยู่ 20 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน (เตรียมตามวิธีในหัวข้อ 6) นำเซลล์บลาสโตเมียร์มาดำเนินการวิเคราะห์ตรวจหาเพศตามวิธีทาง PCR (ตามขั้นตอนในข้อ 7.2.3, 7.3 และ 7.4) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะที่เหมาะสมในการตรวจเพศที่เรียกว่า nested primers มี 5′, combined zfx, zfy และ 3′, combined zfx, zfy (Aasen and Medrano, 1990) และ allele-specific primers มี 5′, zfx, allele-specific และ 3′, zfy, allele-specific และ 5′, zfy, allele-specific และ 3′, zfx, allele-specific (Sequence data, specific allele) แสดงในตารางที่ 2.6 และรูปที่ 2.4 ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาทาง PCR นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทาง PCR ไปตรวจหาขนาดโดยวิธีทาง agarose gel electrophoresis และนำ DNA ที่ได้ไปย้อมสีด้วย ethidium bromide ดูแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต (ดำเนินตามขั้นตอนในข้อ 7.5) เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐานบน agarose gel

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญและการแบ่งตัวเป็นระยะบลาสโตซีสของเอ็มบริโอโคแต่ละการทดลอง และการเปรียบเทียบผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญและการแบ่งตัวเป็นระยะบลาสโตซีสของเอ็มบริโอโคแต่ละการทดลอง ใช้ ANOVA analysis of variance และใช้ Mutiple Comparison Test โดยใช้ค่า F (F_{crit}) เป็นค่าสถิติใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบค่าเปอร์เซนต์ของสองกลุ่มทดลอง ถ้าค่าที่ได้สูงกว่าค่า F_{crit} แสดงว่าให้ผลต่อค่าทางสถิติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มอื่น ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

ส่วนในการตรวจสอบเพศในเอ็มบริโอโคที่ได้มาจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro*) ใช้ DNA ของโคเพศเมียและเพศผู้ (โคที่ทราบเพศแน่นอน) เพื่อทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ทาง PCR และทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อยีน zfx และ zfy ใช้ DNA ของคน (เพศผู้และเพศเมีย) โดยเปรียบเทียบกับ DNA ของโค (เพศผู้และเพศเมีย) ก่อนที่จะดำเนินการวิเคราะห์เพศของ embryo biopsies จำนวน 50 ตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย