บทที่ 2

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

สุกรสาวผสมสามสายพันธุ์ (Large White + Landrace + Duroc) อายุประมาณ 28 สัปดาห์ หนักประมาณ 90 กิโลกรัม สำหรับเป็นแม่พันธุ์ให้เอมบริโอ

สุกรเพศผู้พันธุ์แท้ Duroc สำหรับเป็นพ่อพันธุ์ผสม ซึ่งผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแล้ว อายุประมาณ 1.5 ปี

คัดสุกรสาวจากโรงเรือนสุกรขุนที่ทำการเลี้ยงรวมแบบคละเพศผู้และเพศเมีย มาตรฐานการคัดดูจากความสมบูรณ์พันธุ์ สุขภาพและน้ำหนัก นำสุกรสาวดังกล่าวเข้าโรงเรือนทดลองของภาควิชาสูติศาสตร์เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 กิโลกรัม ในระดับโปรตีน 16 % ขังสุกรสาวรวมกัน ครั้งละ 3-4 ตัว โดยให้ได้ใกล้ชิดกับพ่อพันธุ์ที่โตเต็มที่ตลอดเวลา เพื่อเป็นการกระตุ้นการเป็นสัด

ทำการกระตุ้นสุกรให้เป็นสัดในการทดลองด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ซึ่งประกอบด้วย PMSG 400 IU. และ hCG 200 IU. (PG 600^{R} , Intervet,Holland) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหลังใบหูแก่สุกรสาว หลังนำเข้าโรงเรือนประมาณ 3 วัน สังเกตุอาการเป็นสัดโดยดูจาก อวัยวะเพศจะบวมแดง ทดสอบการเป็นสัดโดยกดหลังจะยืนนิ่ง ทำการผสมอย่างน้อย 2 ครั้ง เมื่อสุกรแสดงอาการเป็นสัดห่างกันประมาณ 12 ชม.

การเก็บเอมบริโอ

ทำการเก็บเอมบริโอด้วยวิธีการผ่าตัด ณ. ภาควิชาสูติศาสตร์เธนุเวชวิทยาฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลบ่อพลับ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม วิธีการเก็บเอมบริโอทำโดยการผ่าตัด เปิดช่องท้องและล้างมดลูกเพื่อเก็บ

เอมบริโอ 4-5 วัน หลังการผสมครั้งแรกซึ่งจะได้เอมบริโอระยะมอรูล่า และ5-6 วัน สำหรับการเก็บเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ดังวิธีที่รายงานโดย มงคลและวิชัย (2534) รายละเอียดสรุปได้ดังนี้

- อดอาหารและน้ำแก่สุกรเป็นเวลา 24 ชม ก่อนทำการผ่าตัดเก็บเอมบริโอ

- ฉีดยากล่อมประสาทชนิด Azaperone (Stresnil^{R}, Janssen, Belgium) เข้ากล้ามเนื้อหลังใบหูจำนวน 200 มก ต่อตัว หลังจากนั้นประมาณ 15 นาทีทำการฉีดยาชาเข้าไขสันหลังด้วย 2% xylocaine hydrochloride (Astra,Sweden) จำนวน 6 มล. เพื่อให้เกิดการชาบริเวณบั้นท้าย หลังจากนั้นให้ thiopental sodium (Thiopental, Research Institute of Antibiotics and Biotransformation, Szech Republic) เจือจาง 20% เป็นจำนวน 0.8 กรัมเข้าหลอดเลือดหลังใบหูแบบ knock down dose และต่อท่อพลาสติกให้น้ำเกลือ 0.9% ปล่อยให้ประมาณ 15 หยดต่อนาที ขณะทำการผ่าตัด

- นำสุกรขึ้นเตียงผ่าตัดและควบคุมโดยรัดบริเวณปลายขาทั้ง 4 ข้าง

- โกนขนบริเวณหน้าท้องในระดับเต้านม 4 คู่สุดท้ายและทำการฆ่าเชื้อด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนและแอลกอฮอล์ 90%

- กรีดเปิดช่องท้องบริเวณระหว่างเต้านม 3 คู่สุดท้าย เปิดชั้นผิวหนัง เยื่อหุ้มไขมัน กล้ามเนื้อ และเยื่อบุช่องท้อง

- หามดลูก ท่อนำไข่และรังไข่ ตรวจสอบการตกไข่โดยนับจำนวนคอร์ปัสลูเตียม

-ทำการเก็บเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิส ซึ่งตามปกติจะอยู่ในมดลูกโดยการล้างมดลูกด้วยน้ำยา PBS + 2% Fetal Caft Serum (FCS) ข้างละประมาณ 100 มล ลงในขวด (รูปที่2.1)

- เย็บแผลปิดที่ปีกมดลูกทั้งสองข้าง และเย็บแผลปิดหน้าท้อง

- สุกรแต่ละตัวจะเก็บเอมบริโอเพียงครั้งเดียวเท่านั้น

<u>วิธีการหาเอมบริโอและประเมินคุณภาพ</u>

นำน้ำยาที่ล้างปีกมดลูกมาเทลงในจานทดลอง ส่องหาเอมบริโอด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่าเพื่อหาเอมบริโอ ตลอดจนประเมินคุณภาพและระยะของเอมบริโอที่เก็บได้ เมื่อพบก็ใช้ปิเปตดูด และเก็บไว้ในจานแก้วขนาดเล็ก เพื่อสะดวกในการแยกตัดแบ่งหรือเลี้ยงเป็นกลุ่มควบคุมต่อไป

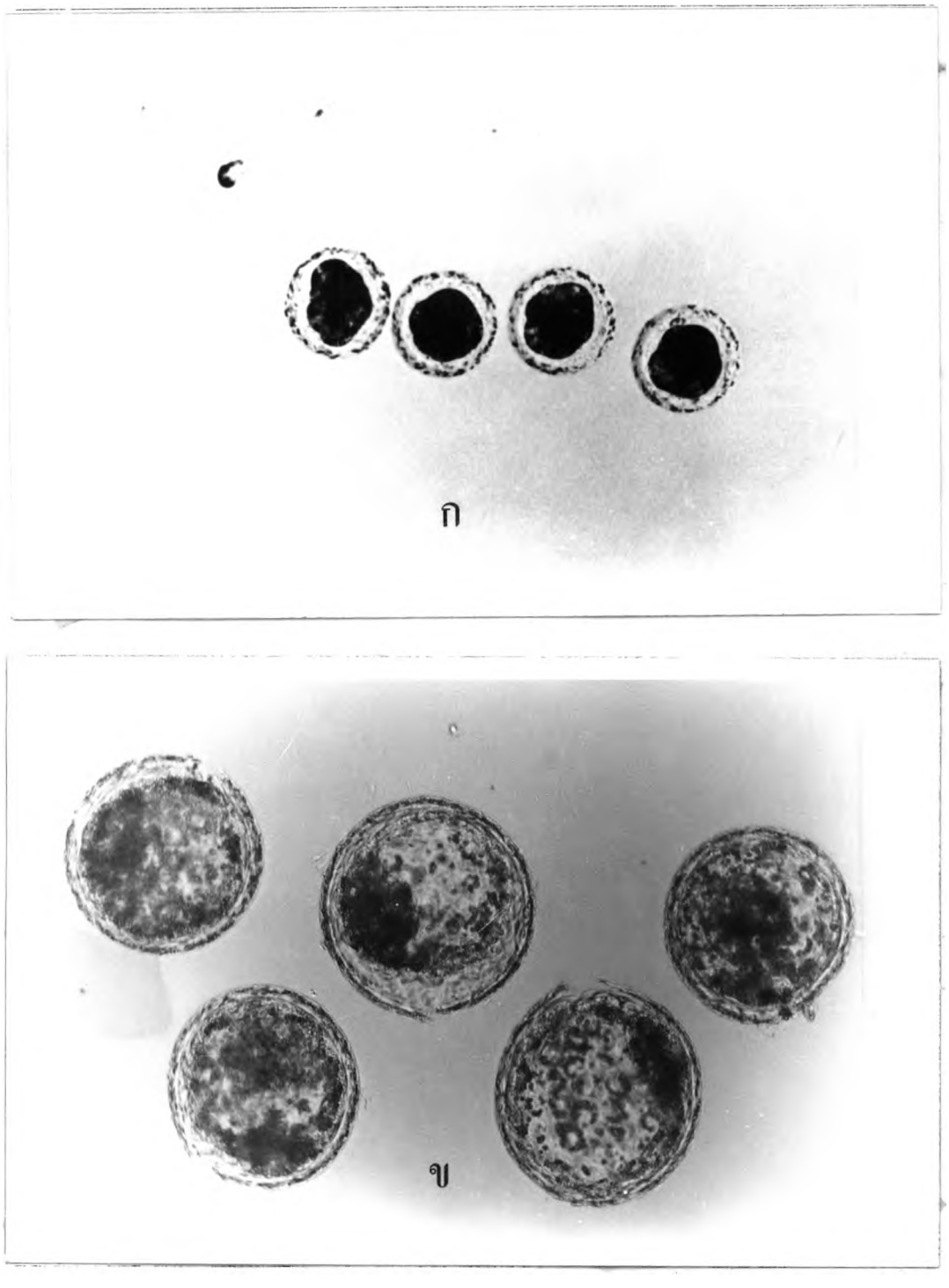
การตรวจสอบคุณภาพของเอมบริโอมีความจำเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะในช่วง 4-5 วันหลังการผสม ควรจะตรวจก่อนว่าไข่นั้นได้รับการผสมหรือไม่ และเป็นไข่ที่เริ่มมีการแบ่งตัวแล้วหรือยัง ถ้ามีการแบ่งตัวแล้วเอมบริโอที่ได้อยู่ในระยะไหน ตามปกติแล้วเอมบริโอที่เก็บได้ระหว่างวันที่ 4-5 จะอยู่ในระยะมอรูล่า ส่วนระยะบลาสโตซิสจะอยู่ระหว่างวันที่ 5-6 หลังการผสม (รูปที่ 2.2)

รูปที่ 2.1 แสดงการผ่าตัดเก็บเอมบริโอ

ก. รังไข่

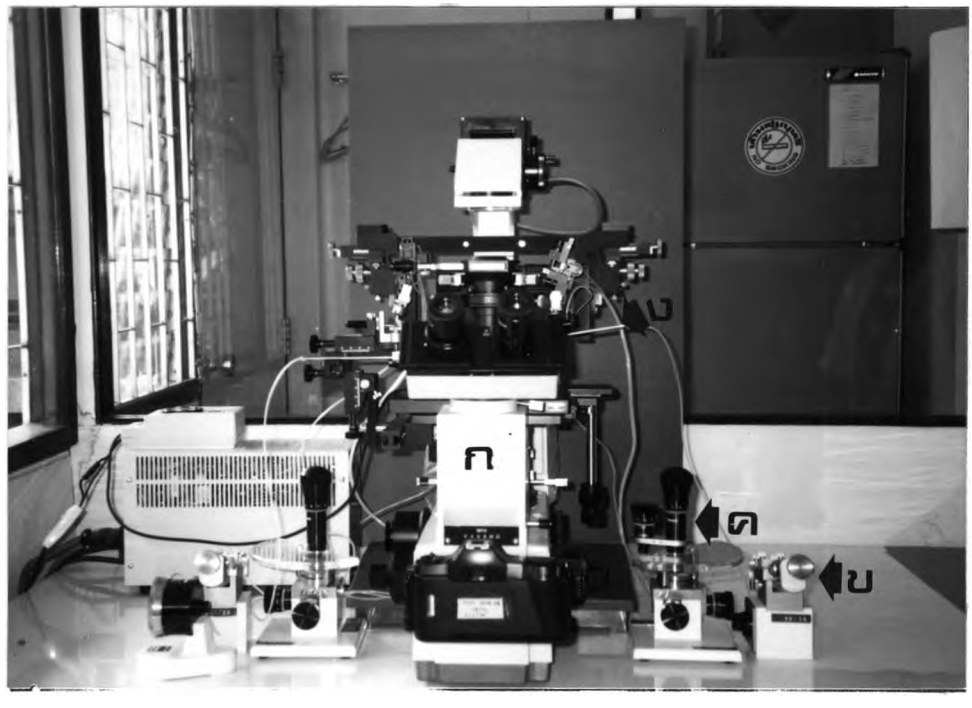
ข.ฉีดน้ำยาชะล้างเอมบริโอ เข้าทางสายยางที่สอดเข้าทาง ostium ถึง มดลูก

ค.รองรับน้ำยาชะล้างมดลูก ผ่านสาย foley ด้วยขวดแก้ว



รูปที่2.2 แสดงเอมบริโอคุณภาพดีที่เก็บได้

ก. ระยะมอรูลา (วันที่ 4-5) ข. ระยะบลาสโตซิส (วันที่ 5-6)



รูปที่ 2.3 ชุด micromanipulator พร้อมกล้อง (Olympus, Japan)

ก. Inverted microscope ข. Microinjection

ค. Joystrick ง. ด้ามจับใบมีดหรือเข็มแก้ว

วิธีแบ่งครึ่งเอมบริโอ

เอมบริโอที่จะทำการแบ่งจะถูกย้ายเข้าไปในหยดของ PBS+2 % FCS ปริมาณ 0.1-0.2 มล. ที่ปิดผิวด้วยน้ำมัน (mineral oil:Sigma, USA) ซึ่งอยู่ใน petridish การแบ่งใช้ชุด Micromanipulation (รูปที่2. 3) ซึ่งประกอบด้วย inverted microscope และ mechanical micromanipulator ทำการแบ่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยใช้วิธี 2 วิธี คือ

ก) การแบ่งด้วยใบมีด (microblade)

แบ่งครึ่งเอมบริโอด้วยการใช้ใบมีด (มีความหนาของหน้าตัดใบมีดประมาณ 20 ไมครอน) ที่เตรียมจากใบมีดโกนหนวด (Gillette) ชนิดบาง ใช้กรรไกรตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำการตกแต่งใบมีดทั้งใบให้เรียบด้วยการนำใบมีดไปเจียนส่วนที่บิดเบี้ยวหรือโค้งงอออกด้วยการใช้เครื่องเจียน ใบมีดจะถูกยึดด้วยตัวจับที่ทำจาก micropipette ทำมุมกับคมมีดประมาณ 45 ° (รูปที่ 2.4) จากนั้นนำมีดที่มีตัวจับไปยึดกับแขนด้านขวาของเครื่อง micromanipulator ซึ่งต่อเข้ากับ joy stick ที่สามารถควบคุมให้แขนของ micromanipulator เคลื่อนที่ได้ในสามทิศทางคือ ซ้าย-ขวา บน-ล่าง และขึ้น-ลง เอมบริโอที่จะแบ่งจะถูกยึดติดระหว่างการแบ่ง โดยการทำรอยขูดสองรอยขนานกันที่ก้นของ plastic petri dish ด้วยใบมีดเล็ก ๆ ใบมีดจะอยู่เหนือเอมบริโอที่อยู่ระหว่างรอยขูด 2 รอยที่ขนานกันกับใบมีด จากนั้นใบมีดจะถูกเลื่อนลงมาอย่างช้า ๆ ด้วยการหมุน joy stick จากนั้นเอมบริโอจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน (รูปที่ 2.5)

ข) การแบ่งด้วยเข็มแก้ว

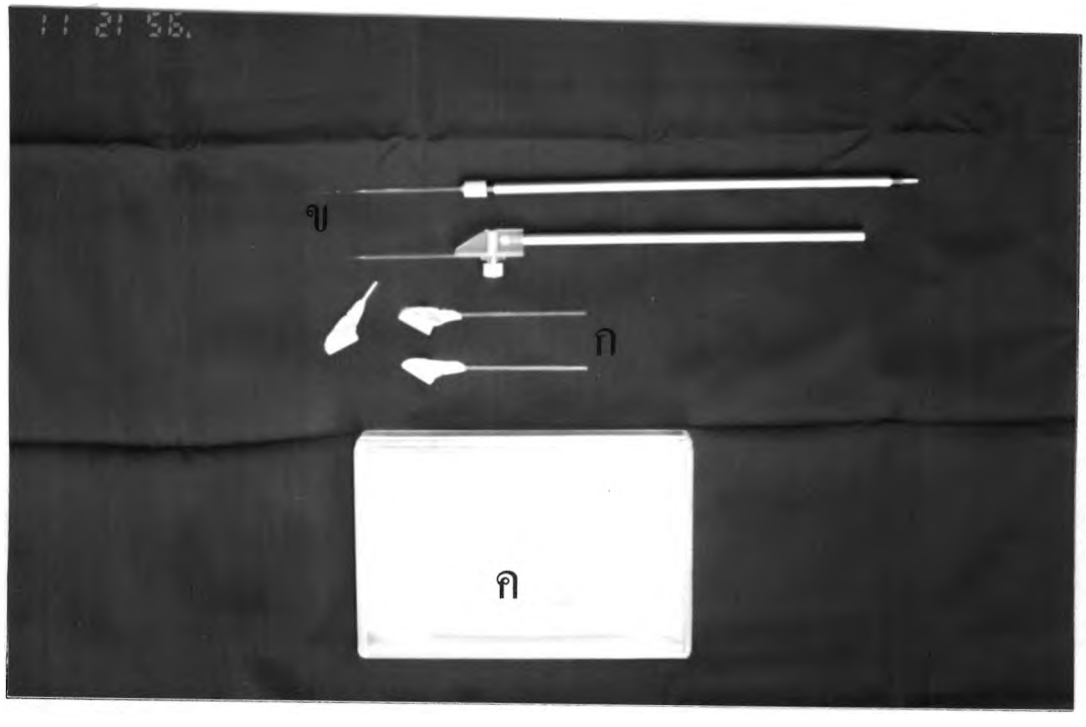
เอมบริโอจะถูกเอาออกมาจากจานเลี้ยง เพื่อทำให้โซนาเพลลูซิดานิ่ม โดย incubate เอมบริโอ ใน 0.3% pronase (sigma,USA) นาน 30 วินาทีที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยการล้างเอมบริโอด้วยน้ำยา เพาะเลี้ยง 4 ครั้ง จากนั้นนำเอมบริโอมา incubate ในหยดของน้ำยา Hanks' balanced salt solution (HBSS) นาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลของเอมบริโอหลุดจากกันหรือเกาะกันอย่างหลวม ๆ (decompaction) ทำให้สะดวกต่อการ

แบ่ง (Nagashima et al., 1989; Ponzilius et al.,1987) จากนั้นจึงย้ายเอมบริโอเข้าไปในหยด PBS+2%FCS

แบ่งเอมบริโอภายใต้เครื่อง micromanipulator โดยใช้เข็มแก้วซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 10 ไมครอน 2 อัน ที่ทำจาก micropipette (Narishige, Japan) ดึง micropipette ให้เป็นเข็มด้วยการใช้เครื่อง micropipette puller จากนั้นทำปลายเข็มให้โค้งงอประมาณ 30° ด้วย microforge ซึ่งเป็นกล้อง microscope ต่อกับเครื่องหลอมแก้ว ซึ่งปลายเป็นขดลวดทองคำขาว (platinum) เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าไปที่ขดลวด จะทำให้ลวดร้อนแดงและสามารถที่จะดึง งอ หรือตัดเข็มแก้วได้ นำเข็มที่เตรียมไว้ไปยึดกับแขนทั้งสองข้างของใต้เครื่อง micromanipulator ซึ่งต่อเข้ากับ joy stick ให้ส่วนโค้งงอของเข็มขนานกับพื้น เข็มจะถูกเลื่อนลงมาอย่างช้า ๆ ทั้งสองข้าง วางเข็มขนานกันกดลงที่เอมบริโอแล้วแยกเข็มทั้งสองอันออกจากกัน (รูปที่ 2.6)

หลังแบ่งครึ่ง นำเอมบริโอทั้งหมดไปเลี้ยง โดยปราศจากโซนาเพลลูซิดา เอมบริโอที่ถูกตัดแบ่งเป็น 2 ส่วน จะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงหยดเดียวกัน

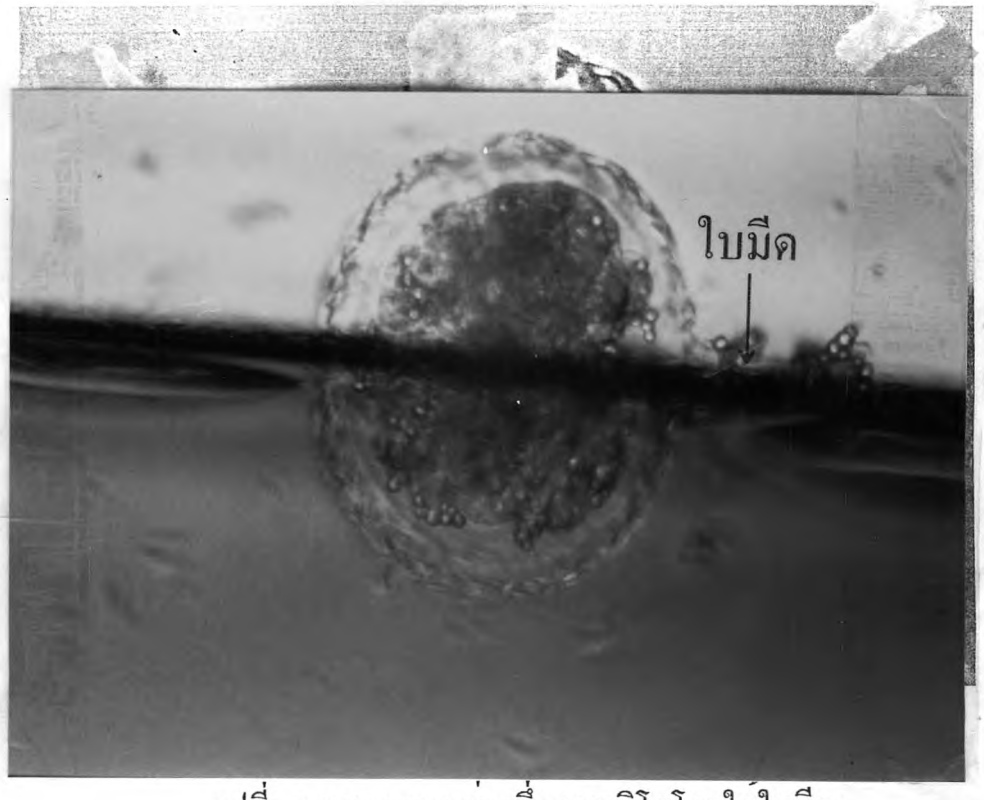
<u>หมายเหตุ</u> ในการแบ่งเอมบริโอจำเป็นต้องแบ่งแบบให้สองส่วนเท่ากัน (symmetry) โดยหากเป็นเอมบริโอระยะมอรูล่าจะแบ่งในแนวไหนก็ได้ แต่ถ้าเป็นระยะบลาสโตซิสจะต้องให้แต่ละครึ่งประกอบด้วยปริมาณของ inner cell mass และ trophoblast cell ครึ่งละเท่า ๆ กัน (รูปที่ 2.7)



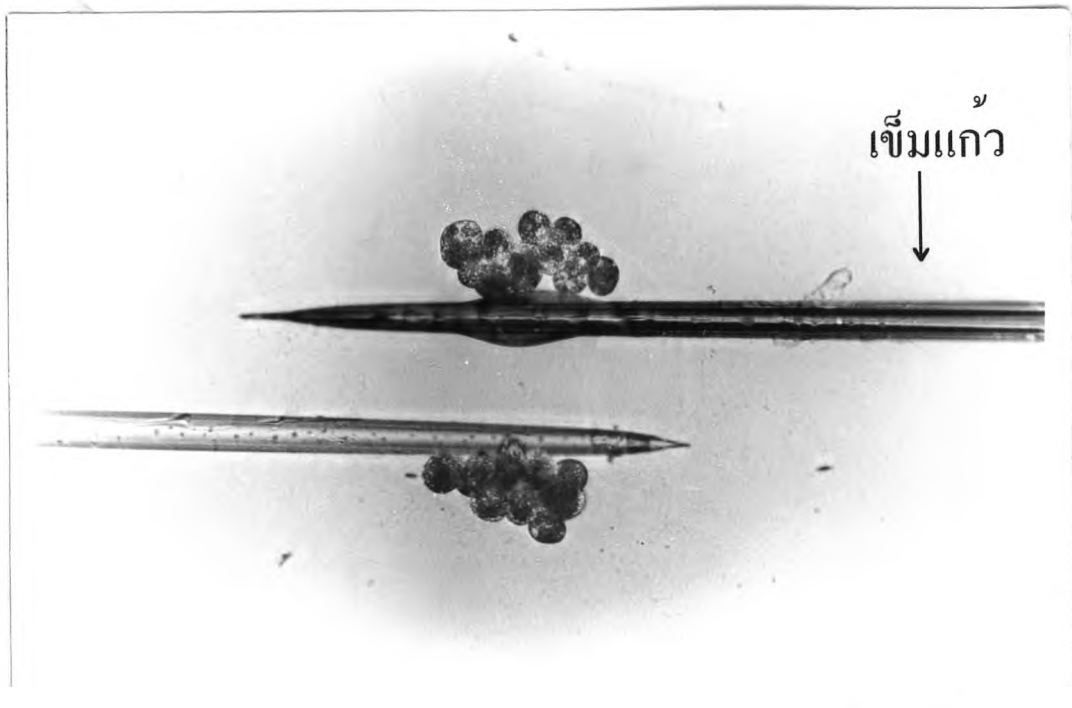
รูปที่ 2.4 แสดงใบมีดและเข็มแก้วที่ใช้แบ่งเอมบริโอ

ก. ใบมีด ข. เข็มแก้ว

ค. Micropipette (Narishige,Japan)



รูปที่2.5 แสดงการแบ่งครึ่งเอมบริโอโดยใช้ใบมีด



รูปที่2.6 แสดงการแบ่งครึ่งเอมบริโอโดยใช้เข็มแก้ว

การเลี้ยงครึ่งเอมบริโอและเอมบริโอในหลอดทดลอง

เอมบริโอจากสุกรแต่ละตัวที่เก็บได้ในแต่ละครั้งจะเลี้ยงไว้เป็นกลุ่มควบคุม โดยไม่ถูกแบ่งครึ่ง จะสุ่มมาประมาณ 20% ของเอมบริโอที่เก็บได้ เอมบริโอที่เหลืออีก 80 % ซึ่งอยู่ในระยะเดียวกันและคุณภาพที่เหมือนกันจะนำมาแบ่งครึ่ง เอมบริโอและครึ่งเอมบริโอจะถูกเลี้ยงในหยด mKRB ภายใต้น้ำมันที่มีไอน้ำอิ่มตัว อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของ 5% CO_2 สังเกตการเจริญเติบโตของเอมบริโอและครึ่งเอมบริโอหลังการเลี้ยง 24 ชม.ด้วย Inverted microscope กำลังขยายถึง 100 เท่า โดยใช้เกณฑ์ทาง morphological เช่น การรวมตัวกันเป็นก้อนกลมของครึ่งเอมบริโอ การก่อรูปของ blastocoel และขอบเขตของการเสื่อมสลายของเซล ซึ่งการเจริญของครึ่งเอมบริโอหลังเลี้ยง ถูกจัดเป็น 3 กลุ่มตามวิธีการของ Nagashima และคณะ (1989) คือ

1.เป็นบลาสโตซิสและมีเซลเสื่อมสลายเล็กน้อย (<10%) และมองเห็น inner cell mass ชัดเจน (grade A)

2.เป็นบลาสโตซิสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่ากลุ่ม 1 โดยมีจำนวนเซลเสื่อมสลายมากขึ้น (10-20 %) และมองเห็น inner cell mass ไม่ชัดเจน (grade B)

3.บลาสโตซิสเล็กๆ โดยปราศจากการมองเห็น inner cell mass และมีจำนวนการเสื่อมสลายของเซลมาก (>20%) หรือมีเซลก้อนใหญ่บางอันไม่รวมกลุ่มกัน หรือมีการเสื่อมสลายของครึ่งเอมบริโออย่างสมบูรณ์ (grade C)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบ CO_2 (Water-jacketed incubater): Model 3192,Forma scientific, U.S.A.

2.Microscope

- Dissecting microscope :Olympus,Japan
- Inverted microscope : Olympus,Japan

3.Laminar flow

4.pH meter

5.เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด

6.Millipore filter (disposable)

7.Plastic syringe (disposable)

- 1 ml

- 5 และ 10 ml

8.Plastic tissue culture dish : Nonclon^{x}, Denmark

9.Plastic tube

10. อุปกรณ์สำหรับเตรียมน้ำยา

11. ชุดสายดูด

12. เครื่องมือสำหรับผ่าตัดชุดใหญ่

13. ใบมีด (รูปที่ 2.4)

14. เข็มแก้ว (รูปที่ 2.4)

15. ชุด Micromanipulation

<u>สารเคมี</u>

1. น้ำยาสำหรับล้างเครื่องแก้ว ใช้น้ำยา 7X (non-toxic neutral tissue culture detergents, ICN Biomedicals, USA)

2. แอลกอฮอล์ 70%

3. Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Gibco, USA)

4. สารเคมีสำหรับใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอและครึ่งเอมบริโอ

4.1 Crystallized Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma,USA)

4.2 Fetal Caft Serum (FCS)

4.3 สารเคมีสำหรับเตรียม mKRB และ PBS

- Sodium chloride (NaCl)

- Potassium chloride (KCl)
- Calcium chloride ($CaCl_2$)
- Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4)
- Magnesium sulfate hydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
- Magnesium chloride ($MgCl_2.6H_2O$)
- Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
- di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
- Sodium pyruvate (Na pyruvate)
- Glucose
- Penicillin G
- Streptomycin Sulfate

5.. ฮอร์โมนใช้กระตุ้นการเป็นสัด

- PG 600^R: Intervet,Holland

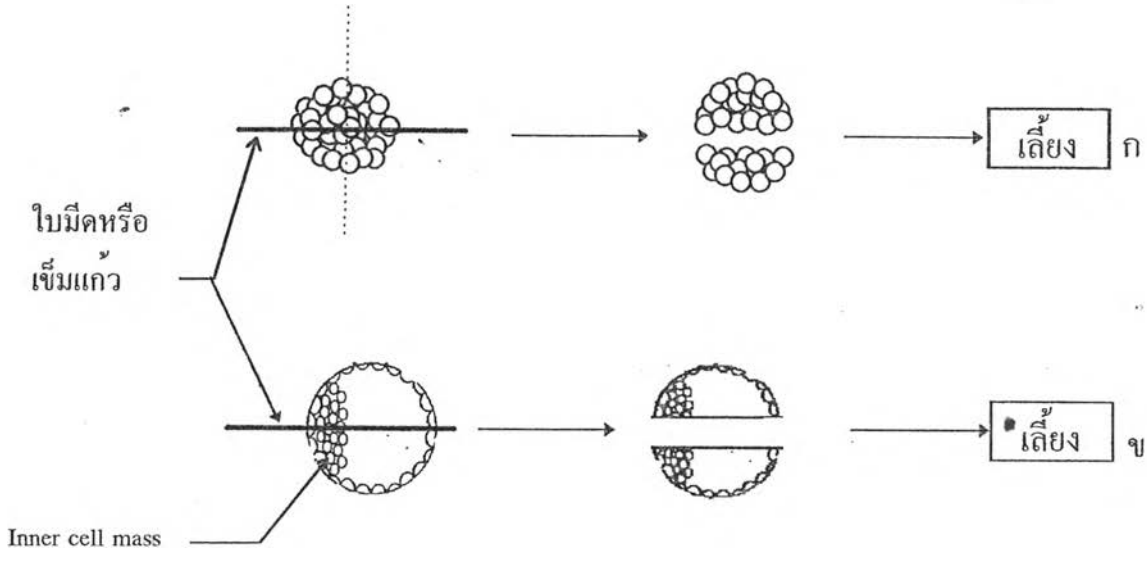
6. ยาใช้ผ่าตัด

- Stresnil^R
- 2% xylocaine hydrochloride
- Thiopental sodium

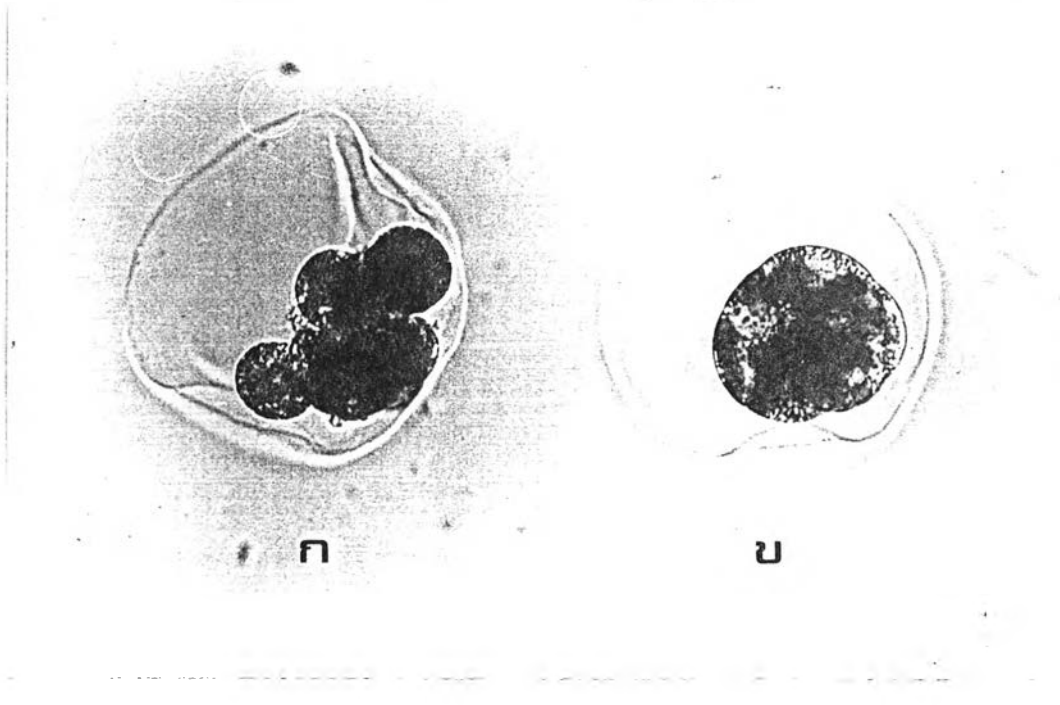
<u>น้ำยาที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอ</u>

mKRB เป็น simple salt medium (ตารางที่ 2.1) ซึ่งใช้เลี้ยงเอมบริโอของสุกรเป็นผลสำเร็จมาแล้ว เช่นใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะสองเซลถึงบลาสโตซิส (มงคล และคณะ, 2532; Davis and Day, 1978; Saito et al., 1991; Reichelt and Niemann, 1994)

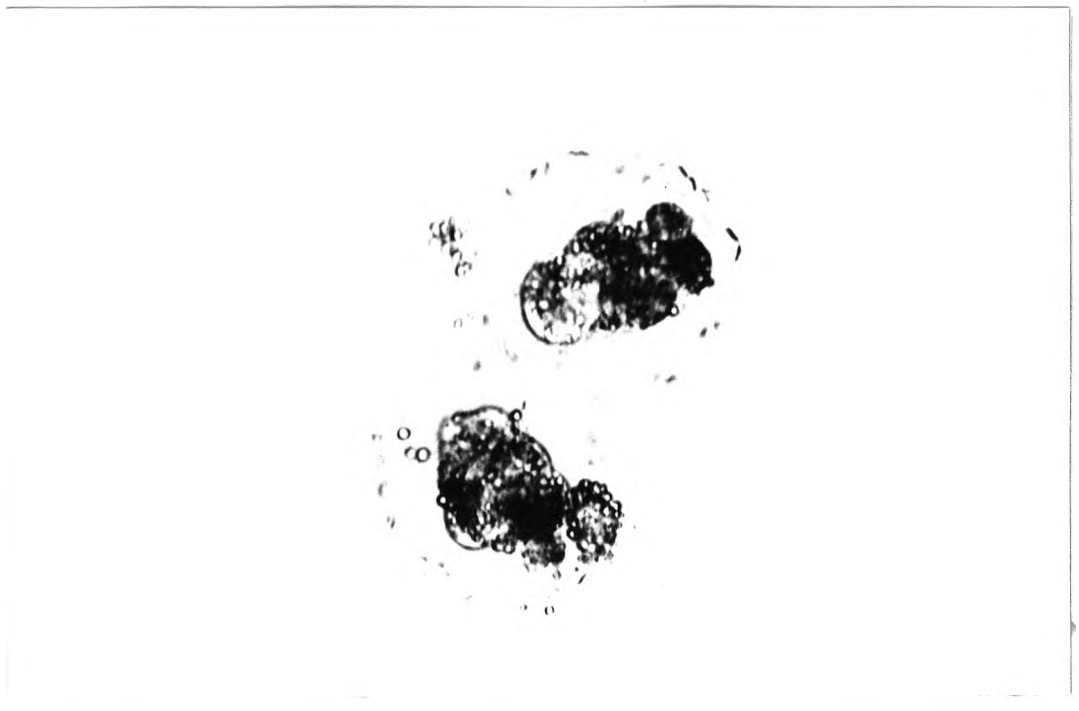
I 1705 7413



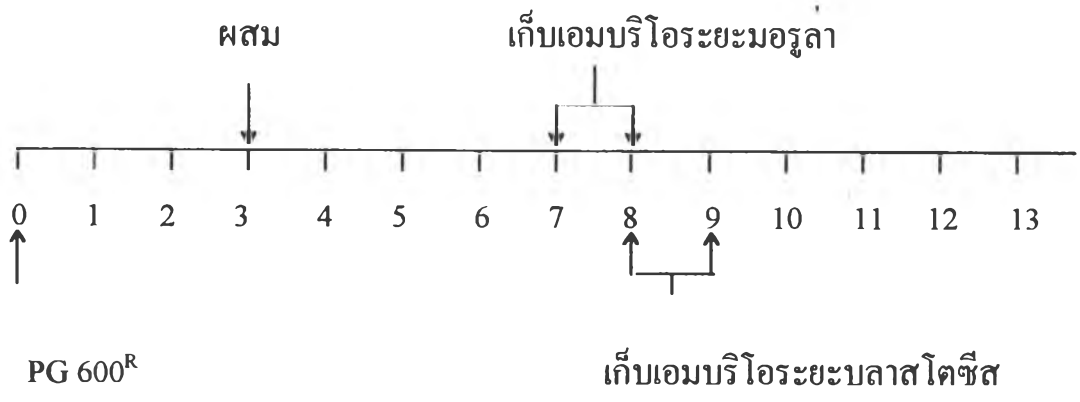
รูปที่ 2.7 ไดอะแกรมแนวการแบ่งเอมบริโอ
ก. ระยะมอรูล่า ข. ระยะบลาสโตซิส



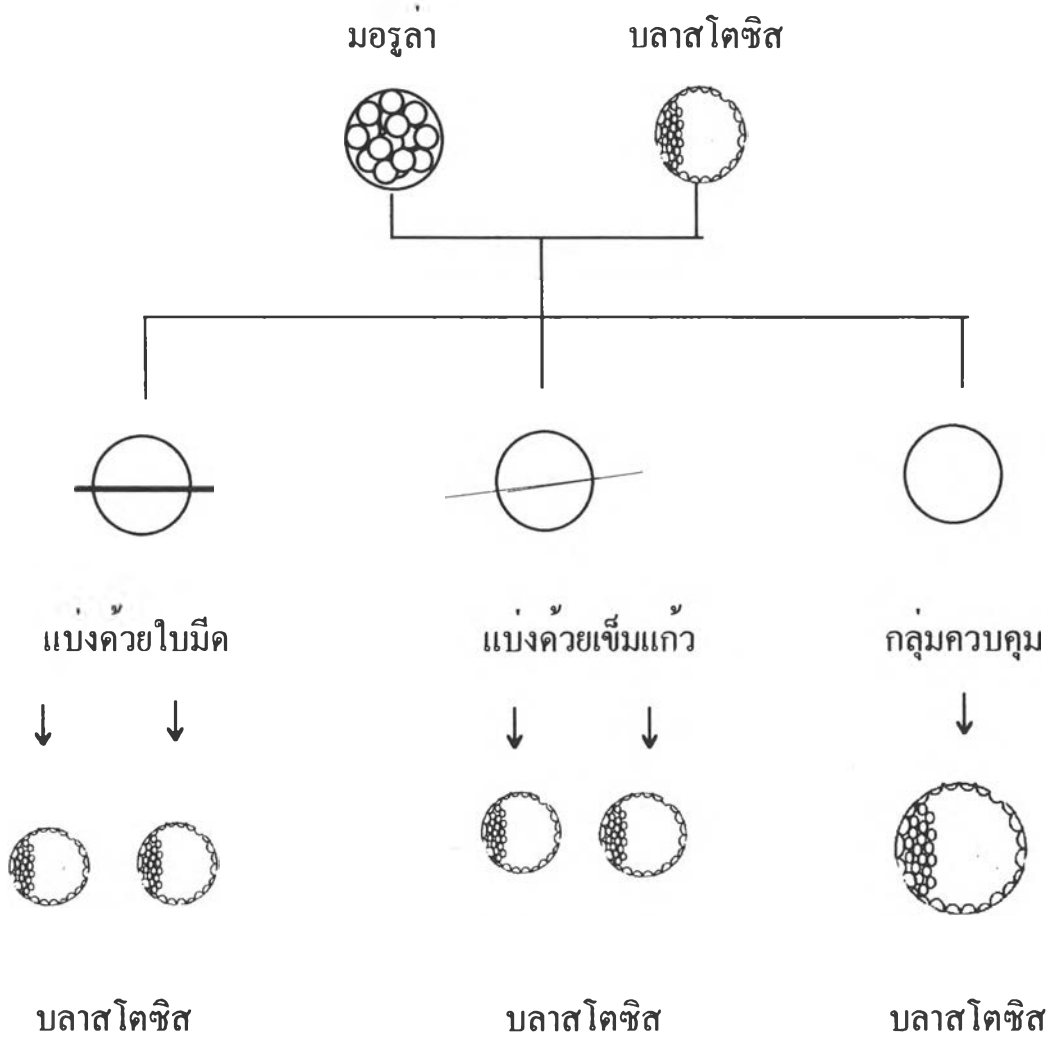
รูปที่ 2.8 แสดงเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสหลังจาก incubate ด้วย 0.3% pronase และHanks' balanced salt solution ก่อนการแบ่ง
ก. ระยะมอรูล่า ข. ระยะบลาสโตซิส



รูปที่ 2.9 แสดงครึ่งเอมบริโอหลังการแบ่งด้วยใบมีด (ก่อนเลี้ยง)



รูปที่ 2.10 โปรแกรมการตกไข่ การผสม และการเก็บเอมบริโอ (วัน)



รูปที่ 2.11 ไดอะแกรมการแบ่งเอมบริโอ

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอชนิด mKRB (Davis and Day, 1978)

ส่วนประกอบ	gm/l
NaCl	7.021
KCl	0.10
Na_2HPO_4	1.15
CaCl2.2H2O	0.1325
Na-pyruvate	0.036
glucose	1.0
Penicillin G	0.06
Streptomycin	0.05

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของน้ำยาล้างเอมบริโอชนิด PBS

ส่วนประกอบ	gm/l
NaCl	8.0
KCl	0.2
KH2PO4	0.2
MgCl2	0.1
Na2HPO4	1.15
CaCl2.2H2O	0.1325
Na-pyruvate	0.036
glucose	1.0
Penicillin G	0.06
Streptomycin	0.05

การทำความสะอาดเครื่องแก้ว

1. แช่ในน้ำยา 2% 7X เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 24 ชม.

2. เข้าเตาอบแห้ง แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 180 °C นาน 2 ชม.

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

น้ำกลั่นสำหรับใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง เป็นน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน มีความบริสุทธิ์ถึง 18 เมกะโอห์ม และต้องปราศจากไพโรเจน โดยเตรียมน้ำยานี้จากน้ำประปาผ่านเครื่องกรอง ระบบน้ำมิลลิอาร์โอ (Milli-RO^{r} 4 water purification system) แล้วเก็บในภาชนะที่ทำจากพลาสติกนอนทอกซิค โพลีเอทธีลิน สตอเรจแท้งค์ แล้วผ่านเครื่องกรองระบบน้ำ มิลลิคิว (Milli-Q Reagent Grade Water System)

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง modified Kreb-Ringer Bicarbonate Solution(mKRB)

น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้ เตรียมโ ดยชั่งสารตามน้ำหนักที่ต้องการ (ตารางที่ 2.1) แยกโซเดียมไบคาร์บอเนต แคลเซียมคลอไรด์และ phenol red ละลายในน้ำกลั่นไว้ต่างหาก อย่างละ 10 มล ละลายสารอื่นในน้ำกลั่น 120 มล คนให้ละลายเข้ากันจึงเติมสารละลาย 3 ชนิดที่แยกละลายไว้ก่อน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มล. จากนั้นจึงกรองด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน จะได้ stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 ด้วย 10% HCl และ 10% NaOH ก่อนใช้อย่างน้อย 6 ชม จึงเติม fetal caft serum ลงไป

การเตรียมน้ำยา phosphate - buffered saline (PBS)

เตรียมโดยชั่งสารตามน้ำหนักที่ต้องการ (ตารางที่ 2.2) แยกโซเดียมไบคาร์บอเนต แคลเซียมคลอไรด์และ phenol red ละลายในน้ำกลั่นไว้ต่างหากอย่างละ

10 มล ละลายสารอื่นในน้ำกลั่น 120 มล คนให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย 3 ชนิดที่แยกละลายไว้ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล กรองด้วยแผ่นกรอง ขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน จะได้ stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.4 ด้วย 10% HCl และ 10% NaOH ก่อนใช้อย่างน้อย 6 ชม จึงเติม fetal caft serum ลงไป

สถิติวิเคราะห์

การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเจริญของครึ่งเอมบริโอในทั้งสองระยะและวิธีการทั้งสองวิธี กับกลุ่มควบคุม โดยใช้ chi-square เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบกำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$