บทที่ 2

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ และสารเคมี

พระบรมราชูปถัมภ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Rattus norvigicus) ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเลี้ยงในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 24±1°C และควบคุมให้แสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (6.00-20.00 น.) มืด 10 ชั่วโมง (20.00-6.00 น.) มีน้ำและอาหารให้ดื่มกินได้ตลอดเวลา

หนูขาวเพศเมียที่ใช้ในการทดลอง อายุ 3-6 เดือน น้ำหนัก 150-200 กรัม มีวงอีสตรัสเป็นปกติ (4-5 วัน) ติดต่อกันอย่างน้อย 2 cycles ก่อนนำมาใช้

หนูขาวเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง อายุ 3-9 เดือน

ห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

อุปกรณ์

1.	Laminar flow hood:	Bellco Glass, Inc. Vineland, New Jersy U.S.A.
2.	UN-I-TROL CO_2 Incubator:	Model 329 Forma Scientific marietta Ohio U.S.A.
3.	กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Bausch & Lomb stereomicroscope) :	Bausch & Lomb Incorporated Rochester, New York U.S.A.
4.	กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope):	C.K. Olympus Tokyo Japan
5.	pH meter:	Cole Parmer Instrument Company Chicago Illinoi U.S.A.

6. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด : Right A.Weigh, W.M. Aingworth & Son Inc. U.S.A.

7. Lab-Line Pyro-Magnestir : Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, Illinoi U.S.A.

8. Embryological watchglass : 4-cm-square glass block with a 3 mm. diameter cavity Griffin & George CO, HJL-630-S.

9. Millipore filter, plastic : swimney adaptor type และ Millipre membrane Filter type HA. Pore size, 0.45 micron. Millipore corporation Bedford Massachusetts U.S.A.

10. Plastic tissue culture dish #: 3001 Falcon Div. Becton. Dickinson and CO. Oxnard, California U.S.A.

11. Plastic syringe 1 ml. : Terumo corporation Tokyo Japan.

12. Hypodermic needles : size G 30x3/4" stainless steel Luer mounts England.

13. Mouth pieaces.

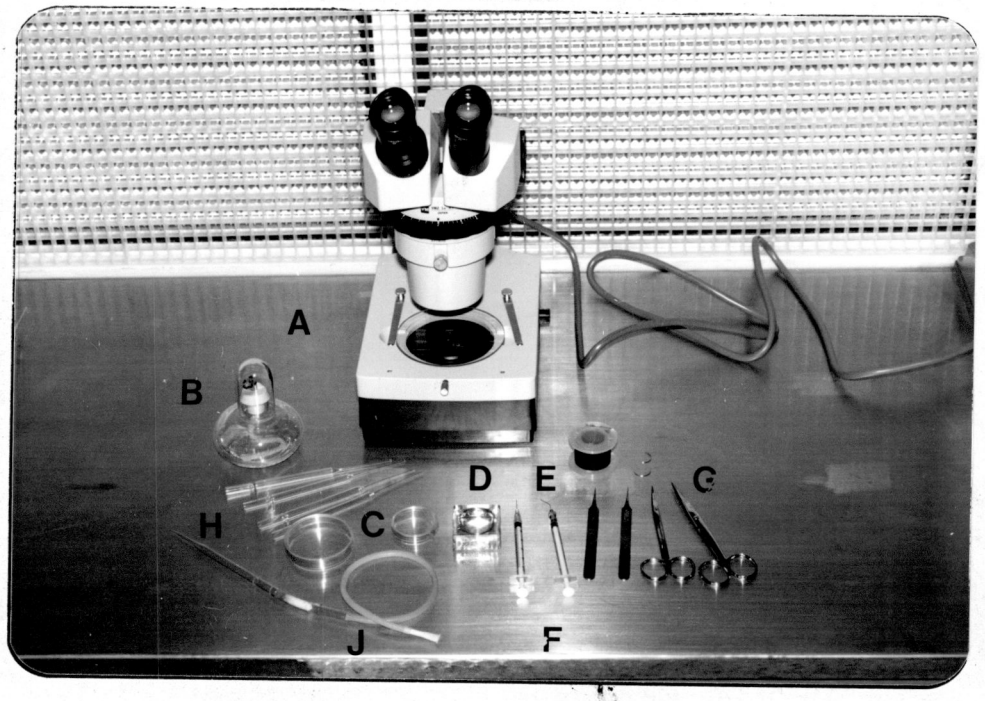
14. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง ประกอบด้วย

กรรไกรปลายมน	1 อัน
กรรไกรปลายตรง	1 อัน
กรรไกรปลายโค้ง	1 อัน
Forceps	2 อัน
Artery forceps	
เข็มเย็บแผล	

Pearsall's non-capillary waxed braided silk BPC 3/0 Surgical suture England.

15. ตะเกียงแอลกอฮอล์

16. Pasteur pipette



รูปที่ 2.1 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือผ่าตัดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและถ่ายฝากเอมบริโอ

A. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

B. ตะเกียงแอลกอฮอล์ซึ่งใช้ในการเตรียม capillary pipette

C. disposable plastic culture dishes

D. embryological watch glass

E. hypodermic needles size 30

F. plastic syringe 1 ml.

G. เครื่องมือผ่าตัด เข็มและไหมเย็บแผล

H. pasteur pipettes

J. mouth piece และ middle adapter

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ เครื่องมือผ่าตัดและเครื่องแก้วที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอทั้งหมดทำความสะอาดโดยใช้สารละลาย 7x 1% แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง อบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง 150°C นาน 2-3 ชั่วโมง

วิธีเตรียม capillary pipette ดังแสดงในภาพ 2.2

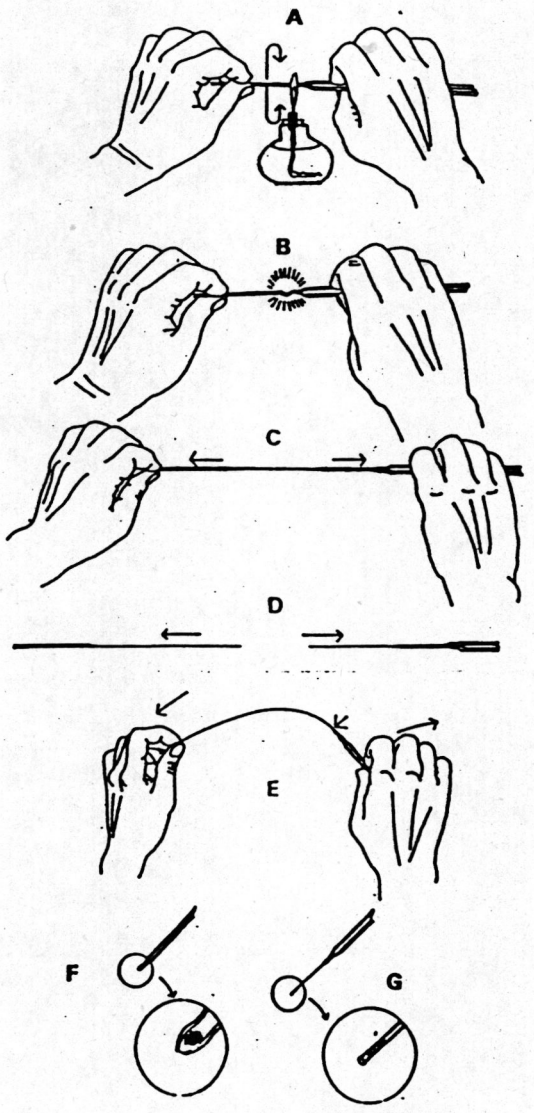
สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์

1. สารเคมีที่ใช้เตรียม M 16, T 6 และ PB 1
   1.1 sodium chloride (NaCl)
   1.2 potassium chloride (KCl)
   1.3 calcium chloride ($CaCl_2$)
   1.4 calcium chloride 2-hydrat krist ($CaCl_2.2H_2O$)
   1.5 potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
   1.6 sodium dihydrogen phosphate 2-hydrat reinst ($NaH_2PO_4.2H_2O$)
   1.7 disodium hydrogen phosphate 7-hydrat reinst ($Na_2HPO_4.7H_2O$)
   1.8 magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)
   1.9 magnesium chloride krist. reinst. ($MgCl_2.6H_2O$)
   1.10 sodiumbicarbonate ($NaHCO_3$)
   1.11 phenol red : Carlo Erba, Italy.
   1.12 glucose
   1.13 sodium lactate (Na lactate 60% syrup)
   1.14 sodium pyruvate (Na pyruvate)
   1.15 penicillin : Merck Sharp & Dohme Ltd., Samutprakarn Thailand.
   1.16 streptomycin sulfate : Dumex Bangkok Metropolis Thailand.

หมายเหตุ 1.1-1.10 สารเคมีจาก E. Merck, Darmstadt, Germany.

1.12-1.14 สารเคมีจาก Sigma Chemical Company, St. Louis Mo., U.S.A.



รูปที่ 2.2 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

2. Ham F-10 Nutrient Mixture F-10 : (Ham) cat. no. 430-1200 Gibco Laboratories Grand Island, New York U.S.A.

3. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): cat.no. 430-1600 Gibco Laboratories Life Technologies Inc. Chagrin Falls, Ohio U.S.A.

4. Liquid paraffin colourless : BDH chemicals Ltd. Poole England

5. Fetal bovine serum (FBS) : cat. no. 200-6140 Grand Island Biological Company Gibco Ltd. Newzealand.

6. Bovine serum albumin (BSA) : Fraction V. no. A-0153 Sigma Chemical Company St. Louis Mo. U.S.A.

7. Penicillin-Streptomycin solution : cat. no. 600-5140 Gibco Laboratories Life Technology Inc. Chagrin Falls, Ohio U.S.A.

8. Fungizone : cat. no. 500-5295 Grand Island Biological Company, New York U.S.A.

9. Hepes : no. H-3375 (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanes-sulfonic Acid) useful pH range 6.8-8.2 Sigma Chemical Company, St. Louis Mo. U.S.A.

<u>ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ของสัตว์ทดลอง</u>

1. Gonadotropin : Pregnant Mare's Serum (PMSG) no. G-4877 Sigma Chemical Company, st. Louis Mo. U.S.A.

2. Chroionic Gonadotropin : human pregnancy urine (hCG) stock no. CG-10 Sigma Chemical Company, St. Louis Mo. U.S.A.

วิธีการทดลอง

Natural ovulation และ Superovulation

หนูขาวเพศเมียเป็นสัตว์ประเภท polyoestrus species ซึ่งเหมือนกับสัตว์จำพวกหนูเมาซ์ (mouse) และหนูพุก (guinea pig) ที่พบว่า cycle ของสัตว์ประเภทนี้จะไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากเกิดการตั้งท้อง (pregnancy) หรือตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) ในหนูขาววงอีสตรัสปกติมีระยะเวลา 4-5 วัน แต่ช่วงเวลาดังกล่าวก็อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น แสงสว่าง อุณหภูมิ อาหาร และความสัมพันธ์ทางสังคม (social relationships)

วงอีสตรัสหนึ่งแบ่งออกเป็น 4 ระยะคือ

ระยะที่ 1 Oestrus เป็นช่วงที่เกิด heat หนูขาวเพศเมียจะยินยอมผสมพันธุ์กับหนูขาวเพศผู้ในระยะนี้เท่านั้น ช่วงระยะเวลานี้นาน 9-15 ชั่วโมง การตกไข่เกิดในช่วงนี้ ถ้าทำ vaginal smear จะพบเซลล์ชนิด cornified

ระยะที่ 2 Metaoestrus เป็นช่วงระยะเวลาหลังการตกไข่ คือระหว่างระยะ oesturs และ dioestrus เกิดต่อจากระยะที่ 1 ใช้เวลาประมาณ 10-14 ชั่วโมง ช่วงนี้หนูขาวเพศเมียจะไม่ยอมรับการผสม ถ้าทำ vaginal smear จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocyte) ปะปนกับเซลล์ชนิด cornified

ระยะที่ 3 Dioestrus เป็นช่วงยาวที่สุดของ cycle ระยะเวลา 60-70 ชั่วโมง ในช่วงนี้เมื่อทำ vaginal smear จะพบแต่เซลล์ leucocyte ทั้งหมด

ระยะที่ 4 Prooestrus เป็นระยะก่อนที่จะเกิด heat ใน cycle ต่อไป เมื่อทำ vaginal smear ดูจะพบ nucleated epithelial cells เป็นจำนวนมาก เริ่มต้นของระยะนี้หนูขาวจะยังไม่ยินยอมให้มีการผสมพันธุ์

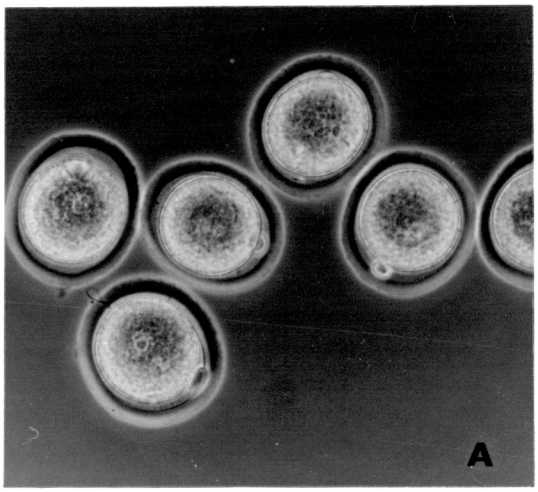
การตรวจวงอีสตรัสของหนูขาวโดยการทำ vaginal smear ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Long & Evan (1922) โดยใช้แท่งแก้วปลายมนที่สะอาดจุ่มใน 0.9% NaCl สอดเข้าภายในช่องคลอดให้ปลายแท่งแก้วแตะกับผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วเอาออกมาแตะบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นเซลล์ชนิดใดและบันทึกผล จะเลือกเฉพาะหนูขาวที่มีเซลล์จากช่องคลอดเป็น nucleated epithelial cell ซึ่งแสดงว่าหนูนั้นอยู่ในระยะ prooestrus เป็นระยะที่ใกล้จะมีการตกไข่และหนูขาวเพศเมียจะยินยอมให้หนูขาว

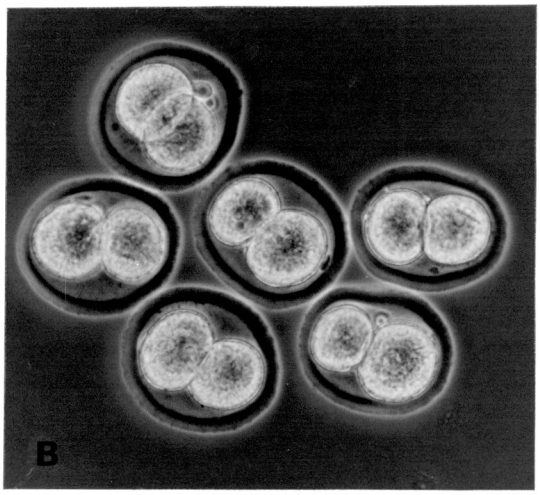
เพศผู้ผสมในเวลาต่อมา นำหนูดังกล่าวไปใส่ในกรงหนูเพศผู้ โดยใช้หนูขาวเพศผู้ : เพศเมีย 1:1 ทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้นตรวจหาสเปิร์มโดยการทำ veginal smear เช่นกัน ถ้าพบจะนับเป็นวันที่ที่ 1 ของการตั้งท้อง (P_1) วันต่อไปก็จะเป็นวันที่ 2, 3 ... ตามลำดับ (P_2, P_3 .....) ระยะและตำแหน่งที่จะพบเอมบริโอของหนูขาวในการเจริญ in vivo นั้น ดังตารางที่ 2.1

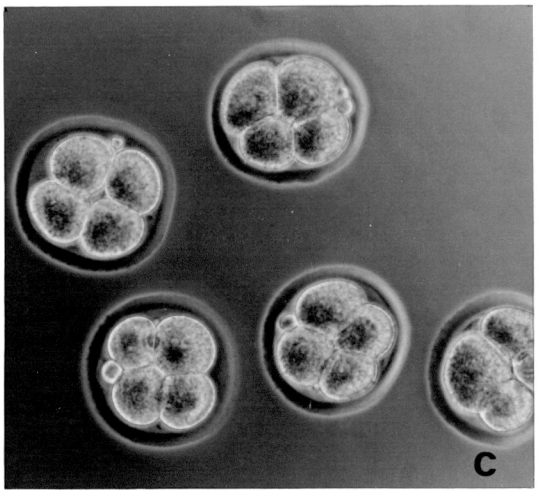
ตารางที่ 2.1 แสดงระยะและตำแหน่งที่จะพบเอมบริโอของหนูขาวในการเจริญ in vivo

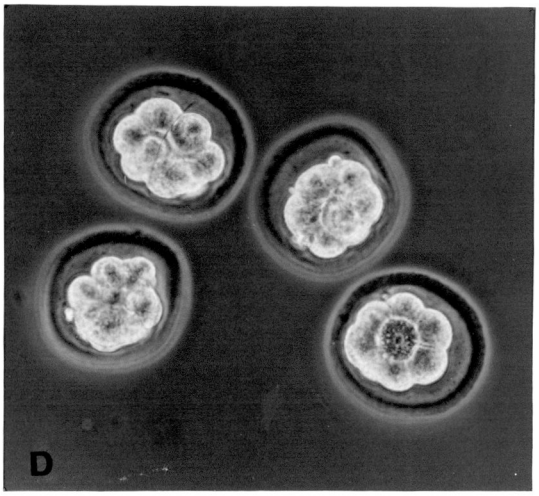
Day of pregnancy	Stage of embryo	Location
1	1 - cell	oviduct
2	2 - cell	oviduct
3	4-6 - cell	oviduct
4 (- 10.00 hr.)	8 - cell	oviduct
(10.00-16.00 hr.)	8 - cell	oviduct-uterus
(16.00-18.00 hr.)	morula	uterus
(18.00-22.00 hr.)	blastocyst	uterus

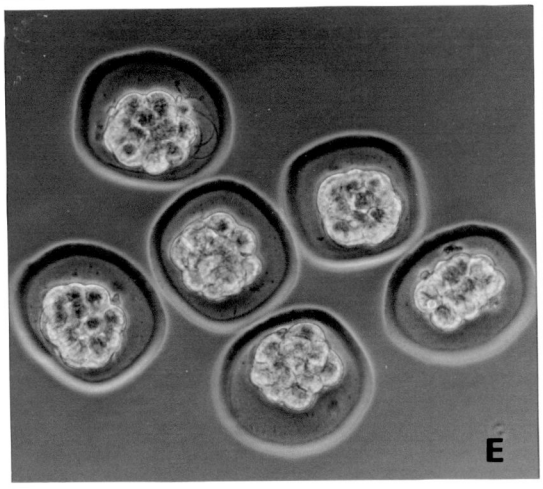
การกระตุ้นการตกไข่ (superovulation) ของหนูขาวใช้วิธีเดียวกันกับที่นักวิจัยอื่น ๆ ประสพผลสำเร็จมาแล้ว (Smith & Engle, 1927; Cole, 1937; Rowlands, 1944; Zarrow, Caldwell, Hafez & Pincus, 1958; Edwards & Austin, 1959) โดยฉีด PMSG 25 iu. เข้าช่องท้อง (peritoneal cavity) ในวันที่พบเซลล์ในช่องคลอดเป็นชนิด cornified ที่เวลา 15.00-17.00 น. หลังจากนั้นประมาณ 66 ชั่วโมง ที่เวลา 9.00-11.00 น. คือในวันที่ 4 ของวงอีสตรัส ฉีด hCG 25 iu. เข้าช่องท้องเช่นกัน ซึ่งจะตรงกับระยะ prooestrus พอดีหลังฉีด hCG นำไปขังรวมกับหนูเพศผู้เช้าวันรุ่งขึ้นทำ vaginal smear ถ้าพบสเปิร์มนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้อง

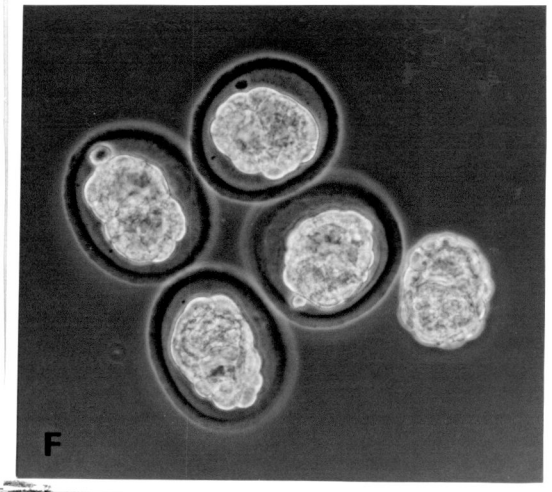












หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.3 แสดงเอมบริโอของหนูขาวระยะต่าง ๆ ก่อนการฝังตัว (ขยาย 200 เท่า)

A. ระยะ 1-เซลล์ วันที่ 1 ของการตั้งท้อง

B. ระยะ 2-เซลล์ วันที่ 2 ของการตั้งท้อง

C. ระยะ 4-เซลล์ วันที่ 3 ของการตั้งท้อง

D. ระยะ 8-เซลล์ วันที่ 4 ของการตั้งท้อง (10.00-16.00 น.)

E. ระยะโมรูลา วันที่ 4 ของการตั้งท้อง (16.00-18.00 น.)

F. ระยะบลาสโตซิส วันที่ 4 ของการตั้งท้อง (18.00-22.00 น.)

การเก็บเอมบริโอ

ฆ่าหนูขาวที่ตั้งท้องโดยวิธีดึงคอต่อ (cervical dislocation) เปิดหน้าท้อง แล้วตัดแยกท่อนำไข่ออกจากรังไข่ ด้วยการตัดเยื่อหุ้มรังไข่ (ovarian bursa) ตัดที่บริเวณช่วงต่อระหว่างท่อนำไข่กับมดลูก (utero-tubal junction) (รูปที่ 2.4) แยกท่อนำไข่จากมดลูกและตัดแยกมดลูกแต่ละข้างออกจากกันโดยการตัดที่บริเวณส่วนปลายของมดลูกที่ติดกับปากมดลูก (cervix) นำท่อนำไข่และมดลูกมาวางบนกระดาษซับที่สะอาด เพื่อแยกเอาเลือดและเนื้อเยื่อส่วนเกินออก แล้วนำไปใส่ในสเตอไรล์ embryological watchglass ที่มีสารละลาย modified Dulbecco's phosphate-buffered medium (PB1, Whittingham, 1971) อยู่ด้วย

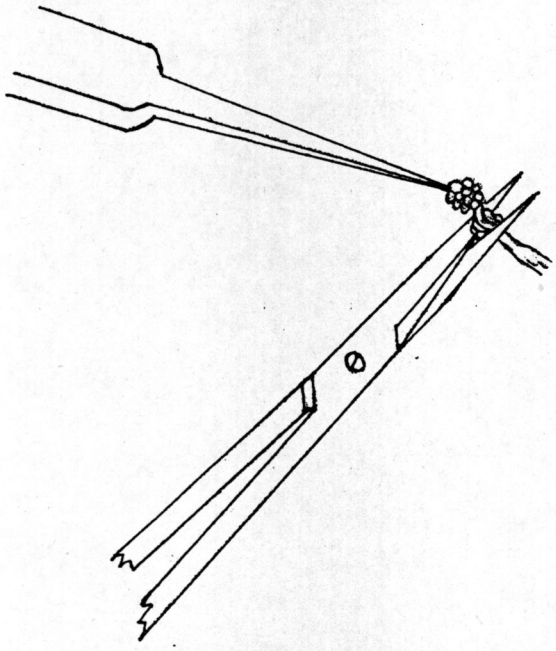
เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอจะเห็นท่อนำไข่ที่ได้คลายการขดพับกันบ้างแล้ว แบ่งออกเป็นส่วนของ fimbria, ampulla, isthmus และ uterotubal junction ดังรูปที่ 2.5 ใช้ PB1 ฉีดชับเอาองค์ประกอบภายในท่อนำไข่ และมดลูกลงใน watchglass โดยใช้ plastic syringe ขนาด 1 ซีซี ที่ส่วนปลายมีเข็มฉีดยาปลายตัดเบอร์ 30 สวมอยู่สอดเข้าทาง fimbria (รูปที่ 2.6) เก็บเอมบริโอโดยใช้สเตอโรล์ capillary pipette นำมาล้างในสารละลาย PB1 อีก 2 ครั้งเพื่อขจัดเซลล์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการแล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้

เมื่อต้องการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 1-, 2- และ 4- เซลล์ ให้เก็บจากท่อนำไข่ของสัตว์ทดลองในช่วงวันที่ 1, 2 และ 3 ของการตั้งท้องที่เวลา 15.00-17.00 น. ส่วนเอมบริโอระยะ 8- เซลล์เก็บจากมดลูกของสัตว์ทดลองในวันที่ 4 ของการตั้งท้องที่ช่วงเวลาเดียวกัน

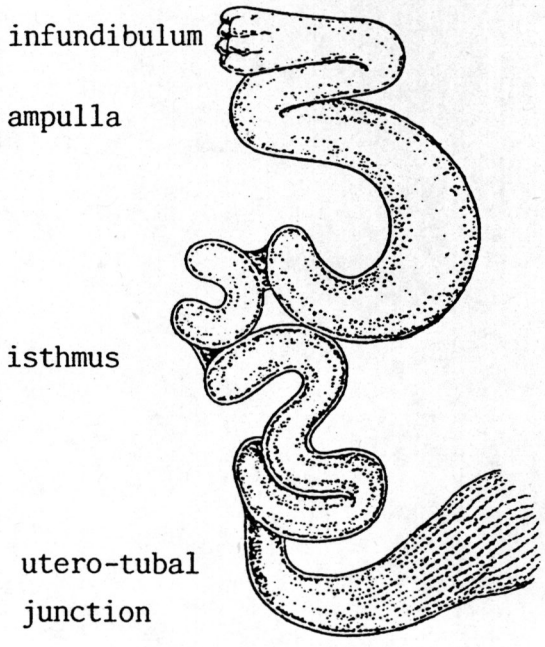
น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นน้ำยาที่นักวิจัยหลาย ๆ ท่านใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ ได้ผลดีมาแล้ว ได้แก่

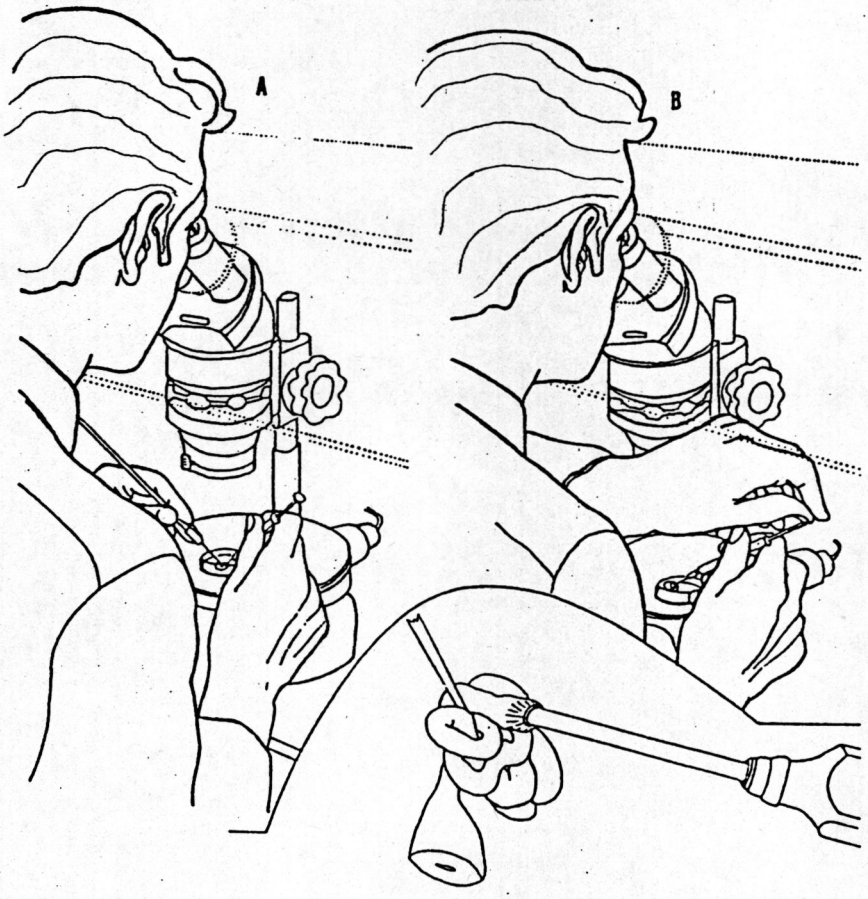
1. Medium 16 (a modified Krebs-Ringer medium, Whittingham, 1971) ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ (Whittingham, 1971; Roblero et al, 1981) เอมบริโอของสุกร (swine) (Robl & Davis, 1981) ใช้ในการผสมเทียม (in vitro fertilization) ไข่ของหนูขาว (Gaddum-Rosse et al,



รูปที่ 2.4 แสดงการตัดแยกท่อนำไข่ออกจากมดลูก โดยตัดที่บริเวณช่วงต่อระหว่างท่อนำไข่กับมดลูก



รูปที่ 2.5 แสดงแผนภาพท่อนำไข่ของหนูขาว



รูปที่ 2.6 แสดงการฉีดขับเอาองค์ประกอบภายในท่อนำไข่ ลงใน embryological watchglass โดยใช้ plastic syringe ขนาด 1 ซีซี. ที่ส่วนปลายมีเข็มฉีดยาปลายตัดเบอร์ 30 สวมอยู่

1984) ไข่ของแฮมสเตอร์และหนูเมาซ์ (Niwa et al, 1980)

2. T 6 medium (a modified Tyrode's medium, Whittingham, 1971) ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ของแฮมส์เตอร์ (Whittingham, 1974; Whittingham & Bavister, 1974; Bavister, 1981; Yodyingyuad, 1982; Bavister et al,1983) พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้มีส่วนประกอบของโซเดียม โปตัสเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ไอออน ในปริมาณใกล้เคียงกับที่มีในซีรัมของแฮมสเตอร์เอง นอกจากนี้ยังใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ (Gianaroli et al, 1985; Seracchioli et al, 1985) และใช้ในขบวนการคาพาซิเตชั่น (capacitation) สเปิร์มของแฮมสเตอร์ (Bavister, 1969)

3. Ham's F-10 medium (Ham, 1963) เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดที่มีเกลือแร่ โปรตีน และวิตามินต่าง ๆ รวมอยู่เป็นจำนวนมาก (complex medium) ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ เอมบริโอของหนูเมาซ์ (Saito et al, 1984; Shirley et al, 1985) เอมบริโอของกระต่าย (Kane, 1985) เอมบริโอของวัว (bovine) (Wright et al, 1976) เอมบริโอของสุกร (Shea et al, 1976) เอมบริโอของแกะ (Shea et al, 1976; Newcomb et al, 1978) ตลอดจนเอมบริโอของคน (Lopata et al, 1980; Leung et al, 1984) นอกจากนี้ยังใช้ Ham's F-10 ในขบวนการคาพาซิเตชั่นสเปิร์มของคนในหลอดทดลอง (in vitro capacitation) (Sher et al, 1984) และการผสมเซลล์สืบพันธุ์ของคนในหลอดทดลอง (in vitro insemination) (Lopata, 1983)

4. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Dulbecco, 1959) เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดที่มีโปรตีน เกลือแร่ และวิตามินต่าง ๆ รวมอยู่เป็นจำนวนมากเช่นกัน ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ (Spindle, 1980; Winkle & Campione, 1984) เอมบริโอของแกะ (Moore & Sory, 1972)

น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้นั้นมีการเติม FBS หรือ BSA ตลอดจนใช้ Hepes เป็นตัวปรับสภาพกรด-ด่าง (buffer) ในน้ำยาเพาะเลี้ยง (Abramczuk, 1985) และใช้ Pen-Strep (50 iu/ml) กับ Fungizone เป็นยาปฏิชีวนะป้องกันการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 และ DMEM ด้วย

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

Medium 16 และ T 6 medium นั้นเป็น simple medium เตรียมขึ้นเอง มีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.2 ส่วน Ham's F-10 medium และ DMEM นั้นเป็น complex medium ซึ่งทางบริษัท Gibco เตรียมเป็นลักษณะ powder ไว้แล้วมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.2 เช่นกัน นำสารเคมีเหล่านี้มาละลายในน้ำกลั่น 3 ครั้ง น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมขึ้นจะเก็บไว้ใช้ภายใน 10 วันเท่านั้น เนื่องจากน้ำยาเพาะเลี้ยงขณะที่เก็บไว้จะเกิด spontaneous decarboxylation ของสารไพรูเวททำให้น้ำยาเสียเร็ว (Wales & Whittingham, 1971) osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด มีดังนี้ M 16 และ T 6 อยู่ที่ระดับ 300 $\pm$ 5 mosmol/kg Ham's F-10 medium 310 $\pm$ 10 mosmol/kg ส่วน DMEM 340 $\pm$ 10 mosmol/kg เมื่อต้องการปรับระดับ osmolality ใช้น้ำกลั่น 3 ครั้ง และ NaCl ช่วยในการปรับระดับ ส่วน pH อยู่ที่ระดับ 7.2 $\pm$ 0.1 วัดหลัง equilibrate ด้วยอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% การปรับระดับ pH ใช้สารละลาย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมเสร็จนำมาสเตอไรล์ด้วยการกรองด้วย millipore filters ขนาด 0.45 ไมครอน เก็บน้ำยาดังกล่าวไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ $4^{o}C$

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีของ Brinster (1963) คือ microdrop method โดยแบ่งน้ำยาเพาะเลี้ยงออกเป็นหยดเล็ก ๆ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในจานพลาสติก (Falcon plastic tissue culture dishes) ขนาด 35 × 10 มิลลิเมตร และ/หรือ 60 × 15 มิลลิเมตร แล้วใช้พาราฟินเหลวราดคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าว ก่อนที่จะเตรียมหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีดังกล่าวนั้นต้อง equilibrate น้ำยาเพาะเลี้ยงด้วยอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ก่อนเพื่อให้ pH อยู่ในระดับที่ต้องการ (7.2$\pm$0.1) เมื่อเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงได้แล้วนำจานเพาะเลี้ยงเข้าเก็บในตู้เพาะเลี้ยง (incubator) ที่อุณหภูมิ $37^{o}C$ ความชื้นอยู่ในระดับอิ่มตัวและมีอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ตลอดเวลา เมื่อทำการเพาะเลี้ยงใช้สเตอไรล์ capillary pipette นำเอมบริโอที่ต้องการเพาะเลี้ยงซึ่งผ่านการล้างในสารละลาย PB1 เรียบร้อยแล้ว แบ่งใส่ลงในแต่ละหยดของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้โดยในแต่ละหยดของน้ำยาเพาะเลี้ยงจะใส่เอมบริโอไว้ไม่เกิน 20 ตัว

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (มิลลิแกรมต่อลิตร)

Component	Medium 16	T 6	Ham's F-10	DMEM	PB1
Salt					
NaCl	5534	5800	7400	6400	8000
KCl	356	200	285	400	356
$CaCl_2$	189	-	-	200	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	260	44.1	-	250
KH_2PO_4	162	-	83	-	162
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	-	124	-
$NaH_2PO_4.2H_2O$	-	56	-	-	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	-	-	290	-	1150
$MgSO_4.7H_2O$	294	-	152.8	-	-
$MgCl_2.6H_2O$	-	100	-	-	100
$FeSO_4.7H_2O$	-	-	0.834	-	-
$Fe(NO_3)_3.9H_2O$	-	-	-	0.1	-
$CuSO_4.5H_2O$	-	-	0.0025	-	-
$ZnSO_4.7H_2O$	-	-	0.0288	-	-
Buffer					
$NaHCO_3$	2106	2100	1200	3700	-
Phenol red	10.0	10.0	1.2	15.0	10
Hepes	5980	5980	5980	5980	-
Energy					
Glucose	1000	1000	1000	1000	1000
Na lactate (60% syrup)	3.5 ml	3.5 ml	-	-	-
Na pyruvate	36	27.5	110	110	27.5

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Component	Medium 16	T 6	Ham's F-10	DMEM	PB1
Hypoxanthine	-	-	4.0	-	-
Lipoic acid	-	-	0.2	-	-
Thymidine	-	-	0.7	-	-
Amino acids					
L-Alanine	-	-	9.0	-	-
L-Arginine HCl	-	-	211.00	84	-
L-Asparagine.H_2O	-	-	15.01	-	-
L-Aspartic acid	-	-	13.00	-	-
L-cysteine	-	-	25.00	-	-
L-cystine	-	-	-	48	-
L-Glutamic acid	-	-	14.70	-	-
L-Glutamine	-	-	146.00	584	-
Glycine	-	-	7.51	30	-
L-Histidine HCl	-	-	21.00	-	-
L-Histidine HCl. H_2O	-	-	-	42.0	-
L-Isoleucine	-	-	2.60	105.0	-
L-Leucine	-	-	13.0	105.0	-
L-Lysine HCl	-	-	29.0	146.0	-
L-Methionine	-	-	4.48	30.0	-
L-Phenylalanine	-	-	5.0	68.0	-
L-Proline	-	-	11.50	-	-
L-Serine	-	-	10.50	42.0	-
L-Threonine	-	-	3.57	95.0	-

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Component	Medium 16	T 6	Ham's F-10	DMEM	PB1
L-Tryptophane	-	-	0.60	16.0	-
L-Tyrosine	-	-	1.81	72.0	-
L-Valine	-	-	3.50	94.0	-
Penicillin	60	60	-	-	60
Streptomycin sulfate	50 µg/ml	-	-	-	-
Pen-Strep (50 iu/ml)	-	-	5 ml	5 ml	-
Fungizone	-	-	0.2 ml	0.2 ml	-
Fetal Bovine serum	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	-
Bovine serum albumin	-	-	-	-	3000
Vitamin					
Biotin	-	-	0.024	-	-
D-Calcium Pantothenate	-	-	0.238	4.0	-
Choline Chloride	-	-	0.698	4.0	-
Folic acid	-	-	1.32	4.0	-
i-Inositol	-	-	0.541	7.2	-
Niacinamide	-	-	0.651	-	-
Nicotinamide	-	-	-	4.0	-
Pyridoxal HCl	-	-	-	4.0	-
Riboflavin	-	-	0.376	0.4	-
Thiamine HCl	-	-	1.0	4.0	-
Vitamin B_{12}	-	-	1.36	-	-
pH	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1	7.2±0.1
Osmolarity (mosmol/kg)	300±5	300±5	310±10	340±10	300±5

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงนาน 6 ชั่วโมง นำจานเพาะเลี้ยงออกมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะและการแบ่งตัวของเอมบริโอภายหลังการเพาะเลี้ยงว่ามีการเจริญจากระยะ 8- เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซิสเป็นจำนวนเท่าไร แล้วบันทึกผลไว้ การที่ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวเพียง 6 ชั่วโมง นั้น เนื่องจากเอมบริโอเจริญจากระยะ 8- เซลล์ เป็นบลาสโตซิสแล้วในช่วงระยะเวลาที่เลี้ยงนี้ ถ้าเลี้ยงไว้นานเกิน 6 ชั่วโมง เอมบริโอส่วนใหญ่หยุดการเจริญและเริ่มเกิดการสลายตัว (degenerate) บางส่วนก็คงสภาพอยู่อย่างเดิม และมีเพียงส่วนน้อยที่เจริญต่อไป ส่วนเอมบริโอในระยะก่อน 8- เซลล์ จะเพาะเลี้ยงไว้ถึง 48 ชั่วโมง ภายหลังการเพาะเลี้ยงประมาณ 20-24 ชั่วโมง เอมบริโอระยะ 4-8 เซลล์จะตายหมด ส่วนพวกระยะ 2- เซลล์ อาจพบมีชีวิตอยู่ได้ถึง 36-48 ชั่วโมง โดยเซลล์หนึ่งเกิดการเสื่อมสลายในขณะที่อีกเซลล์หนึ่งยังมีสภาพดีอยู่ แต่ไม่พบการแบ่งตัวต่อและตายในที่สุด

<u>การถ่ายฝากเอมบริโอ</u>

<u>การเตรียมเอมบริโอเพื่อการถ่ายฝาก</u>

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นการตกไข่และผสมพันธุ์ตามวิธีดังกล่าวแล้วข้างต้น เมื่อตั้งท้องได้ 4 วัน ถึงเวลา 13.00-15.00 น. จึงเก็บเอาเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ออกมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงตามวิธีดังได้กล่าวมาแล้ว นำบลาสโตซิสที่เจริญเติบโตจากเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ in vitro มาใช้ในการถ่ายฝาก

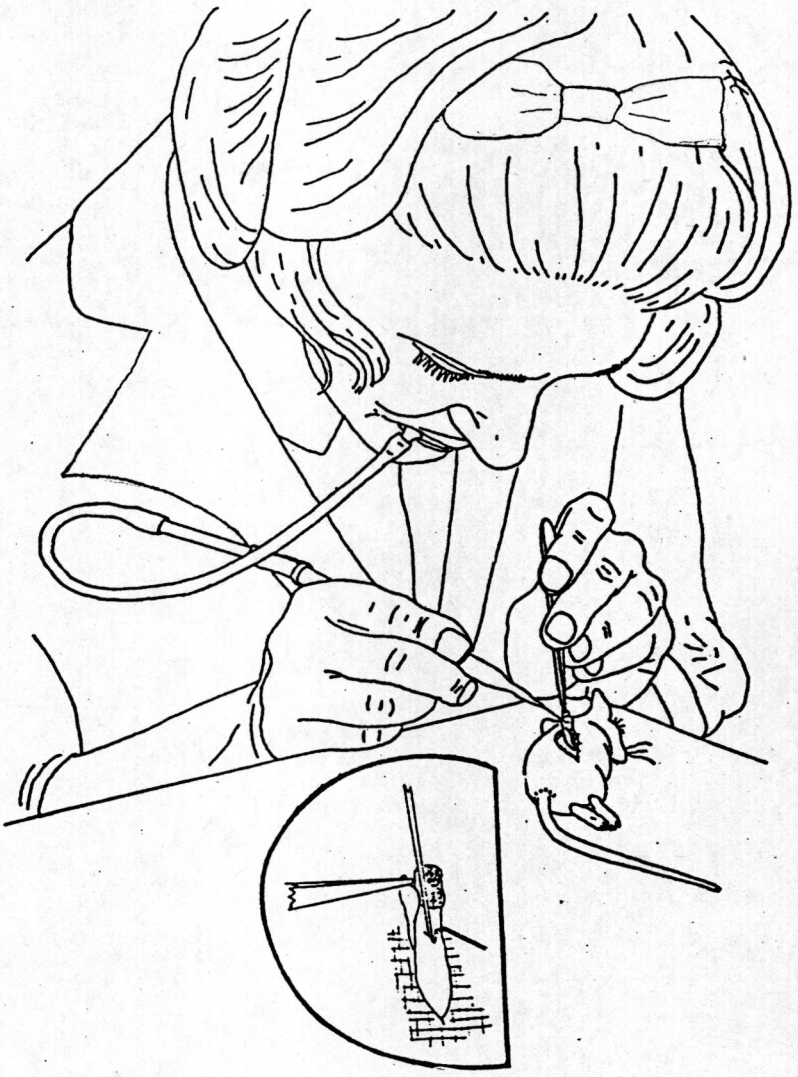
<u>วิธีการเตรียม pseudopregnant recipients</u>

ใช้หนูขาวเพศเมียที่มีวงอีสตรัสปกตินำไปผสมพันธุ์กับหนูขาวเพศผู้ที่ทำหมัน (vasectomized rat) แล้วในตอนเย็นวันที่ 4 ของ cycle ทิ้งไว้ด้วยกัน 1 คืน รุ่งเช้าตรวจดู plug สีขาวที่ช่องคลอดของหนูเพศเมีย ถ้าพบ plug นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียม ส่วนมากแล้วเมื่อพบ plug ที่ช่องคลอดหนูขาวจะตั้งท้องเทียมทุกตัว บางครั้งไม่พบ plug แต่ก็เกิดการตั้งท้องเทียมขึ้นก็มี นอกจากการตรวจดูจาก plug ที่ช่องคลอดแล้ว บางครั้งสามารถดูจากรอยเลือดที่บริเวณช่องคลอดของหนูขาวที่ผสมพันธุ์ก็นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียมได้ แต่ลักษณะนี้ไม่ค่อยแน่นอนเพราะบางตัวก็ไม่พบรอยเลือดอาจใช้เป็นเพียงองค์ประกอบย่อยในการสังเกตร่วมกับการตรวจดู plug

วิธีการถ่ายฝาก

นำบลาสโตซิสที่เจริญจากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ in vitro มาล้างในสาระลาย PB1 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างน้ำยาเพาะเลี้ยงและป้องกันไม่ให้มีพาราฟินเหลวติดไปในการถ่ายฝาก แล้วจึงนำไปถ่ายฝากไว้ในมดลูกของ recipient ที่มีการตั้งท้องเทียม เป็นวันที่ 4 โดยวางยาสลบ recipient ด้วยอีเทอร์ (diethylether) ผ่าเปิดด้านข้าง (dorsolateral incision) บริเวณต่ำจากชายโครงเล็กน้อย ใช้ปากคีบดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่ ท่อนำไข่ และส่วนต้นของมดลูกออกมาใช้เข้มสเตอไรล์เบอร์ 27 เจาะที่ปีกมดลูกบริเวณต่ำจาก utero-tubal junction เล็กน้อย นำ capillary pipette ที่ดูดเก็บเอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ล้างด้วย PB1 ไว้เรียบร้อยแล้วสอดผ่านรอยเจาะที่ทำไว้เข้าไปใน lumen ของมดลูกลึกประมาณ 5 มิลลิเมตร เป่าดันเอมบริโอออกจาก pipette เข้าสู่มดลูก (รูปที่ 2.7) การประเมินว่าเอมบริโอเข้าสู่มดลูกของ recipient จริงโดยดูการเคลื่อนของฟองอากาศที่ใช้เป็นเครื่องหมายซึ่งทำไว้ที่ส่วนหลายของ pipette เหนือตำแหน่งที่ดูดเก็บเอมบริโอ ทำเช่นนี้ทั้งปีกมดลูกซ้ายและขวา โดยแต่ละปีกมดลูกถ่ายฝากเอมบริโอไว้จำนวน 6 ตัว เมื่อทำการถ่ายฝากเสร็จเก็บมดลูกเข้าไว้ในช่องท้องดังเดิม ปิดแผลด้วยการเย็บกล้ามเนื้อและผิวหนังตามลำดับ แยก recipient ไว้ต่างหากเพื่อดูการตั้งท้องต่อไป นำเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงมาถ่ายฝากทันทีที่เก็บมาได้ด้วยวิธีเดียวกัน เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

ภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอ 5 วัน (วันที่ 9 ของการตั้งท้อง) นำหนูขาวที่เป็น recipient มาวางยาสลบ ผ่าเปิดหน้าท้อง (mid-ventral incision) ตรวจนับจำนวนและสภาพของฟีตัสในมดลูกแต่ละข้าง recipient ที่มดลูกไม่มีการฝังตัวของฟีตัส จัดเป็น non-pregnant recipient ส่วนตัวที่ตั้งท้องจะแยกเลี้ยงเดี่ยวอยู่กรงตามลำพัง เพื่อรอให้ครบอายุการตั้งท้องจนคลอด นับจำนวนลูก (young born) ที่เกิดขึ้นจาก recipient แต่ละตัวแล้วบันทึกผลไว้



รูปที่ 2.7 แสดงการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ และบลาสโตซิสไปที่บริเวณปีกมดลูกของ recipient โดยใช้เข็มสเตอไลซ์เบอร์ 27 เจาะที่ปีกมดลูกบริเวณต่ำจาก uterotubal junction เล็กน้อย ใช้ capillary pipette ที่ดูดเก็บเอมบริโอไว้ภายในสอดผ่านรอยเจาะที่ทำไว้เข้าไปภายใน lumen ของมดลูก แล้วเป่าดันเอมบริโอออกจาก pipette เข้าสู่มดลูก

สถิติวิเคราะห์

การเปรียบเทียบผลของน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด ปริมาณซีรัม ระดับ pH ตลอดจนระดับ osmolality ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในแต่ละการทดลองนั้น ใช้การทดสอบสมมุติฐานเกี่ยวกับสัดส่วน (Test of Hypothesis on Population Proportion) เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบในแต่ละการทดลอง

ส่วนการเปรียบเทียบจำนวนเอมบริโอที่มีการฝังตัว และจำนวนลูกอ่อนที่คลอดภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง กับเอมบริโอของกลุ่มควบคุม ไปยังมดลูกของ recipients ใช้ Unpaired t-test

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$