การศึกษาชีเตทอสุจิและวิธีการศึกษาโครโมโซม อสุจิของกระบือปลัก (Bubalus bubalis Linn.)

นายสัมภาษณ์ คุณสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาพฤกษศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2534

ISBN 974-578-711-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

01[illegible]95 i17305263

Sperm Capacitation and Study of Sperm Chromosome of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis* Linn.)

Mr. Sumpars Khunsook

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-578-711-6

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคาพาซิเตทอสุจิและวิธีการศึกษาโครโมโซมอสุจิของกระบือปลัก (Bubalus bubalis Linn.)
โดย	นายสัมภาษณ์ คุณสุข
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะ
	รองศาสตราจารย์ ชาญ อาภาสัตย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ พัฒนผลไพบูลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ชาญ อาภาสัตย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์พรรณี ชินรักษ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. กันยารัตน์ ไชยสุต)

สัมภาษณ์ คุณสุข : การคาพาซิเดทอสุจิและวิธีการศึกษาโครโมโซมอสุจิของกระบือปลัก (Bubalus bubalis Linn.) (SPERM CAPACITATION AND STUDY OF SPERM CHROMOSOME OF SWAMP BUFFALO (Bubalus bubalis Linn.) อ.ที่ปรึกษา ศ.มณีวรรณ กมลพัฒนะ และ รศ.ชาญ อาภาสัตย์ 126 หน้า ISBN 974-578-711-6

จากการศึกษาการคาพาซิเดทอสุจิของกระบือปลัก โดยนำอสุจิแช่แข็งของกระบือปลักมาละลายในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 37°C และปั่นแยกในสารละลายเปอร์คอล (30%และ 45% เปอร์คอลในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW อสุจิที่ได้นำมาละลายในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW 5 มล. (0.5 mM Hypotaurine, 10 mM Cafeine, 0.6% BSA, pH 7.4) และปั่นแยกอีกครั้งที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที นำอสุจิมาปรับความเข้มข้นด้วย BWW และคาพาซิเดทในหลอดแก้วด้วยเฮปารินความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 µg/ml ในเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 38°C ตรวจสอบ อสุจิที่ผ่านการคาพาซิเดทและอะโครโซมรีแอ็คชั่น โดยการให้อสุจิปฏิสนธิกับไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดา จำนวน 6,949 ใบ ผสมอสุจิกับไข่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใน 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 38°C และเลี้ยงไข่ในน้ำยา Ham's F-10 (10% FCS) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในการตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิ ซึ่งดูจากโปรนิวเคลียส พบว่า ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการคาพาซิเดทอสุจิ เมื่อเฮปารินความเข้มข้น 10 ถึง 25 µg/ml ในเวลา 15-45 นาที (69.2-73.3%)

จากการทดสอบใช้รูปแบบการหยดน้ำยาเพาะเลี้ยงแบบต่าง ๆ จำนวน 6 แบบ พบว่า หยดน้ำยามีอิทธิพลต่ออัตราการปฏิสนธิ หยดน้ำยาที่มีปริมาตร 25 µl ต่อไข่ 5 ใบ จำนวน 6 หยดต่อจานเพาะเลี้ยง จัดวางตามแนวรัศมี มีศักยภาพในการเกิดการปฏิสนธิดีที่สุด

ส่วนการศึกษาโครโมโซมอสุจิของกระบือปลัก ศึกษาจากไข่แฮมสเตอร์จำนวน 3,722 ใบ เมื่อเลี้ยงไข่ครบ 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 38°C ใน 5% CO_2 ใส่ podophyllotoxin และ vinblastine อย่างละ 0.06 µg/ml และเลี้ยงต่ออีก 12 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วนำไข่มาใส่ hypotonic solution (1% trisodium citrate) เป็นเวลา 3-6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใน fixative ที่เย็น (ethanol : glacial acetic acid; 3:1) บนสไลด์ และย้อมสีโครโมโซมด้วย 20% Giemsa นาน 10 นาที ตรวจสอบโครโมโซม พบว่า มีเพียง 2 โอโอไซต์ (0.05%) ที่สามารถเห็นโครโมโซมของอสุจิกระบือปลัก ไม่สามารถตรวจสอบโครโมโซมได้ละเอียดเพาะโครโมโซมไม่กระจาย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีก เพื่อที่จะนำมาใช้ในการปฏิสนธิในหลอดแก้วของกระบือจริง ๆ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า อสุจิกระบือปลักสามารถเกิดการคาพาซิเดทได้ โดยใช้เฮปารินและสามารถเจาะผ่านไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดาได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

SUMPARS KHUNSOOK : SPERM CAPACITATION AND STUDY OF SPERM CHROMOSOME OF SWAMP BUFFALO (BUBALUS BUBALIS LINN.) THESIS ADVISER : PROF. MANEEWAN KAMONPATANA AND ASSO. PROF. CHAN APASATAYA, M.S. 126 pp.

Attempts have been made to assess optimum condition for fertilization rate of sperm from swamp buffalo frozen semen to penetrate hamster free zona pellucida. Optimum heparin concentration was varried in serial dilution of 100, 50, 25, 12.5 and 10 µg/ml accordingly to the variation of incubation time in each concentration for 0, 15, 30, 45 and 60 mins. The findings suggested that heparin concentration of 10, 12.5 and 25 µg/ml for 15-45 mins incubation time inwhich the highest sperm penetration rate were achieved (69.2-73.3%). The procedure of such assessment was illustrated to prepare the sperm before insemination, frozen semen was thawed and dipped into 37 C incubated water, then washed once with a percoll gradient solution (30% and 45% percoll in BWW medium). Sedimented spermatozoa were resuspended in 5 ml BWW (0.5 mM Hypotaurine, 10 mM Cafeine, 0.6% BSA, pH 7.4) and centrifuged at 500 g 10 min. The sperm pellet was diluted with BWW and capacitated in vitro with heparin dosage 10, 25, 50 and 100 µg/ml for 15, 30, 45 and 60 min in 5% CO_2 in air at 38°C. Sperm capacitation and acrosome reaction were tested by using zona-free hamster eggs fertilized with treated sperm in BWW for 2 hr in 5% CO_2 in air at 38°C and subsequent cultured in Ham's F-10 (10% FCS) for 8 hr. The total 6,949 hamster eggs were examined th the pronuclei formation for checking fertilization rate. It was also found that the pattern of dropping culture media due to the space and volume per oocyte was influenced the success penetration rate. It may be a pattern of 5 oocytes per 25 µl of media in six drops of radius angle to allow equally equilibrated space to 5% CO_2 atmosphere was the optimum condition.

After 8 hr of incubation at 38°C in 5% CO_2 in air 0.06 µg/ml podophyllotoxin and vinblastine were added and continue cultured for 12 hr. When finished incubation the eggs were put into hypotonic solution (1% trisodium citrate) for 3-6 min at room temperature. The eggs were fixed in a cold fixative (ethanol : glacial acetic acid; 3:1) on a slide and stained with 20% Giemsa solution for 10 min. A total of 3,722 hamster eggs were examined the chromosome, only 2 eggs (0.05%) can be seen the swamp buffalo sperm chromosome but could not indentify because the chromosome did not spread.

This preliminary report of swamp buffalo sperm capacitation suggesting further research in finding the procedure of sperm capacitation for in vitro ferlization. The method used to prepare chromosome of buffalo sperm in zona-free hamster egg in this study was poorly success. It might due to the mechanical approach to develop the testing materials was not fine enough and irregularable procedure. Research further may be needed in this area of buffalo biology.

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลายฝ่ายด้วยกัน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีรายนามต่อไปนี้

ศาสตราจารย์มณีวรรณ กมลพัฒนะ และรองศาสตราจารย์ชาญ อาภาสัตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ พัฒนผลไพบูลย์ รองศาสตราจารย์พรรณี ชิโนรักษ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. กันยารัตน์ ไชยสุต ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่อง จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

คุณรังสรรค์ พาลพ่าย และคุณอุบล ช่วงสูงเนิน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของโครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและให้ความสะดวกในการทำวิจัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนการสนับสนุนการวิจัยบางส่วน และขอขอบคุณโครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ร.อ.ศักดิ์ณรงค์ สมาธิวัฒน์ ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย

ขอขอบคุณคณะกรรมการบริหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ต่อเวลาในการศึกษา เนื่องจากผู้จัยประสบอุบัติเหตุ ต้องพักรักษาตัวเป็นเวลา 1 ปี ในระหว่าง ทำการวิจัย

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่ ๆ ที่สนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฆ

กิตติกรรมประกาศ..... ง

สารบัญตาราง..... จ

สารบัญรูป..... ช

คำอธิบายคำย่อ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์และสารเคมี..... 24

3. วิธีการเตรียมสารที่ใช้ในการศึกษา..... 29

4. วิธีดำเนินการศึกษา..... 46

5. ผลการศึกษา..... 68

6. อภิปรายผลการศึกษา..... 91

7. สรุปผลการศึกษา..... 108

เอกสารอ้างอิง..... 110

ประวัติผู้เขียน..... 126

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW.....	30
3.2	แสดงส่วนประกอบของ BWW Stock I	31
3.3	แสดงส่วนประกอบของ supplement สำหรับการคาพาซิเตทอสุจิ และปรับความเข้มข้นของอสุจิ.....	32
3.4	แสดงส่วนประกอบของ supplement สำหรับเตรียมไข่ และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว.....	33
3.5	แสดงส่วนประกอบของน้ำยา BWW Stock I ความเข้มข้น 10 เท่า....	35
3.6	แสดงส่วนประกอบของ supplement ความเข้มข้น 100 เท่า.....	36
3.7	แสดงการเตรียมเฮปาริน ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	40
4.1	แสดงวัน เวลา การปฏิบัติงานในการทดลองแต่ละครั้ง.....	48
4.2	แสดงวงรอบการเป็นสัดของแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย.....	50
4.3	แสดงปริมาตรของอสุจิที่ใช้ผสมกับไข่ในแต่ละรูปแบบของการหยดน้ำยา...	64
5.1	แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 1, 2 และ 3.....	71
5.2	แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอสูงสุดในการหยดน้ำยารูปแบบต่าง ๆ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น และเวลาที่ต่างกัน.....	72
5.3	แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3.....	73
5.4	แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3.....	76

ตารางที่ หน้า

5.5 แสดงเปอร์เซนต์โปรทรอมบินเมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3..... 78

5.6 แสดงเปอร์เซนต์โปรทรอมบินเมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4..... 80

5.7 แสดงเปอร์เซนต์โปรทรอมบินเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อใช้รูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 5 82

5.8 แสดงเปอร์เซนต์โปรทรอมบินเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามการหยดน้ำยารูปแบบที่ 6..... 84

5.9 แสดงเปอร์เซนต์โปรทรอมบินเมื่อใช้เฮปารินที่เสื่อมสภาพ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที... 85

5.10 แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ ในการทดลองบางส่วนก่อนที่จะนำมาผสมกับไข่..... 87

5.11 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือปลัก..... 88

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1.1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารพวกไกลโคซามิโนไกลแคน..... 8

รูปที่ 1.2 แสดงสูตรโครงสร้างของเฮปารินที่ไม่มีซัลเฟต..... 10

รูปที่ 1.3 แสดง Oocyte meiosis..... 15

รูปที่ 1.4 แสดงการเกิด tandem fusion ของโครโมโซม คู่ที่ 4 และ 9 ของกระบือแม่น้ำ 17

รูปที่ 1.5 แสดงการแยกตัวของโครโมโซม ในระหว่าง Oogenesis ในกระบือ F1 เพศเมีย 4/9T เป็นผลมาจาก tandem fusion ระหว่างโครโมโซมแท่งที่ 4 และ 9 ของกระบือแม่น้ำ 20

รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา..... 47

รูปที่ 4.2 แสดงการแยก egg yolk ออกจากอสุจิด้วยวิธีการปั่นแยกในเบอร์คอล 45% และ 30% 53

รูปที่ 4.3 แสดง sperm pellet ที่ก้นหลอดหลังการปั่นแยกด้วยเบอร์คอล 45% และ 30% ที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที และปั่นแยกอีกครั้งหนึ่งด้วย BWW ที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที 54

รูปที่ 4.4 แสดงวิธีฆ่าแฮมสเตอร์ด้วยวิธีดึงคอ (cervical dislocation)..... 56

รูปที่ 4.5 แสดงแฮมสเตอร์ เมื่อผ่าท้องแล้ว เพื่อแยกเอาท่อนำไข่ออก..... 57

รูปที่ 4.6 ก. แสดงการตัดท่อนำไข่ออกจากรังไข่และปีกมดลูก ข. ส่วนขยายภาพ ก. 58

รูปที่ 4.7 แสดงการแยก cumulus mass ออกจากท่อนำไข่ 59

รูปที่ 4.8 บน แสดงบริเวณ ampulla ของท่อนำไข่
ล่าง แสดง cumulus mass ที่ไหลออกมาจากบริเวณ ampulla เมื่อกรีดด้วยเข็มเบอร์ 27 ซึ่งจะมีไข่อยู่..... 60

รูปที่ 5.1 บน แสดงไข่แฮมสเตอร์ที่มีโซนาเพลลูซิดา
ล่าง แสดงไข่แฮมสเตอร์ที่ย่อยโซนาเพลลูซิดาออกแล้ว ด้วยทริปซิน..... 69

หน้า

รูปที่ 5.2 แสดงไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิและเลี้ยงต่ออีก 8 ชั่วโมง 70
รูปที่ 5.3 แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เปรียบเทียบเฮปาริน เก่าและเฮปารินใหม่..... 74
รูปที่ 5.4 แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที..... 75
รูปที่ 5.5 แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นเฮปาริน 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30 45 และ 60 นาที..... 77
รูปที่ 5.6 แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที..... 79
รูปที่ 5.7 แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้เฮปาริน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เปรียบเทียบการหยดน้ำยา แบบที่ 4 และแบบที่ 6..... 81
รูปที่ 5.8 แสดงเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง..... 83
รูปที่ 5.9 แสดงไข่แฮมสเตอร์ ซึ่งไม่เกิดปฏิสนธิ (กำลังขยาย 450 เท่า)..... 89
รูปที่ 5.10 แสดงโครโมโซมสองกลุ่มที่พบในเซลล์เดียวกัน ก. (กระบือปลัก) ข (แฮมสเตอร์) 90
รูปที่ 6.1 แสดงโครโมโซมของกระบือปลักที่เลี้ยงจากเม็ดเลือดขาว..... 104
รูปที่ 6.2 แสดงคารีโอไทป์ของแฮมสเตอร์สีทอง..... 105

คำอธิบายคำย่อ

นนก.	=	นาโนกรัม
มคก.	=	ไมโครกรัม
mM	=	milli molar
μM	=	micro molar
nM	=	nano molar
MΩ - cm	=	mega Ohms centimetre