

**การทดลองที่ 3 การเจริญในหลอดแก้วของไข่กระบือปลักที่แช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากทำ
parthenogenetic activation และ intracytoplasmic sperm injection
In vitro development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic
activation and intracytoplasmic sperm injection**

คำนำ

การแช่แข็งไข่เป็นวิธีที่มีความสำคัญในการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์สัตว์เพศเมีย เพื่อใช้ประโยชน์ในอนาคต การแช่แข็งไข่ที่มีประสิทธิภาพจะทำให้สามารถพัฒนาการทดลองเทคโนโลยีระบบสืบพันธุ์ในกระบือปลัก การแช่แข็งไข่โดยวิธี vitrification ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าได้ผลดีในการเก็บรักษาตัวอ่อนและไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ ได้แก่ Cryotop, Cryoloop, Open pulled straw, Glass micropipette, Microdrop, Electron microscope grid และ Solid surface vitrification ซึ่งในจำนวนนี้วิธี Microdrop เป็นวิธีที่มีผู้สนใจใช้กันมาก เนื่องจากไม่ต้องการอุปกรณ์พิเศษราคาแพง เป็นวิธีที่ทำงานง่ายและสะดวกโดยการหยดไข่ที่อยู่ในน้ำยาลงในไนโตรเจนเหลว การทำ Microdrop vitrification ยังไม่มีรายงานการทำในกระบือปลัก การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลักที่แช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification และการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสหลังจากทำ parthenogenetic activation (PA) หรือ intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

วิธีการทดลอง

การเตรียมไข่

เก็บรังไข่กระบือจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 21G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ L น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/mL HCG, 0.02 AU/mL FSH และ 1 μ g/mL E_2 นำไปเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไข่กระบือที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้วมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออก แล้วคัดเลือกเฉพาะใบที่สุกแล้ว (มี 1st PB) เก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลอง ซึ่งแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อยคือ

การทดลองที่ 3.1. การทำ toxicity test โดยนำไข่สุกมาไว้ในน้ำยา equilibration solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 10% DMSO + 10% EG) นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 23-24 °C แล้วนำไปไว้ในน้ำยา vitrification solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M Sucrose) ที่อุณหภูมิ 23-24 °C นาน 30 (1min+30s), 45 (1min+45s) หรือ 60 วินาที (1min+60s) แล้วนำไปล้างในน้ำยา TCM199-Hepes

+ 20% FCS + 0.5 M Sucrose นาน 5 นาที และในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที ใช้ไข่สุกที่ไม่ถูก CPA เป็นกลุ่มควบคุม แล้วนำไปไว้ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไข่ไปตรวจสอบการอยู่รอดด้วยการนำไปไว้ใน 2.5 µg/mL Fluorescein diacetate (FDA) ซึ่งละลายใน PBS+5 mg/mL BSA ที่ 38.5 °C นาน 2 นาทีในที่มืด แล้วนำไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS+5 mg/mL BSA แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence ภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวแสดงว่ามีชีวิตรอด นำไข่ที่มีชีวิตรอดของแต่ละกลุ่มไปทำ PA ด้วยการนำไปไว้ในน้ำยา Emcare holding มี 7% EtOH นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 10 µg/mL cycloheximide + 1.25 µg/mL cytochalacin D ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 5 ชั่วโมง นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 µL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O₂, 5% CO₂ และ 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อไข่โค ในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/100 µL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ผลการทดลองนี้พบว่าไข่ในกลุ่ม 1min+30s ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ไม่แตกต่างทางสถิติกับไข่ในกลุ่มควบคุม ส่วนไข่ในกลุ่ม 1min+45s ได้ตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนไข่ในกลุ่ม 1min+60s ไม่ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ จากผลการทดลองนี้แสดงว่านำไข่ไปไว้ในน้ำยา vitrification solution นาน 30 วินาที ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษ แต่ความเป็นพิษจะเพิ่มมากขึ้นตามเวลาที่นำไปไว้ในน้ำยานี้

การทดลองที่ 3.2. ทำการทดลองแช่แข็งไข่สุก โดยวิธี Microdrop vitrification ซึ่งทำโดยนำไข่สุกมาไว้ในน้ำยา equilibration solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 10% DMSO + 10% EG) นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 23-24 °C แล้วนำไปไว้ในน้ำยา vitrification solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M Sucrose) ที่อุณหภูมิ 23-24 °C นาน 30 (1min+30s) หรือ 45 (1min+45s) (โดยได้ตัดกลุ่ม 1min+60s ออกเนื่องจากผลการทดลองที่ 3.1. แสดงว่ากลุ่มนี้มีความเป็นพิษสูงมากจนไม่สามารถได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์) โดยใช้ปิเปตแก้วปลายเล็กดูดน้ำยา 2-3 µL พร้อมไข่ 5 ใบ ไปหยดลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งอยู่ในกระถาง aluminum foil ที่ลอยอยู่ในไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม จากนั้นนำ Microdrop ของน้ำยาที่แข็งแล้วไปไว้ใน cryotube แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ใช้ไข่สุกที่ไม่ถูก CPA เป็นกลุ่มควบคุม การทำละลายไข่ทำโดยใช้ปากคิบคิบ Microdrop จากไนโตรเจนเหลวไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS + 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที แล้วนำไปไว้ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไข่ไปตรวจสอบความอยู่รอดด้วยการนำไปไว้ใน 2.5 µg/mL FDA ซึ่งละลายใน PBS+5 mg/mL BSA ที่ 38.5 °C นาน 2 นาทีในที่มืด แล้วนำไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS+5 mg/mL BSA แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence ภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวแสดงว่ามีชีวิตรอด นำไข่ที่มีชีวิตรอดของแต่ละกลุ่มไปทำ PA ด้วยการนำไปไว้ในน้ำยา Emcare holding มี 7% EtOH นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา

mSOFaa + 10 µg/mL cycloheximide + 1.25 µg/mL cytochalacin D ในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 5 ชั่วโมง นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 µL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O₂, 5% CO₂ และ 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อไข่โค ในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10ใบ/100 µL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การทดลองที่ 3.3. ทำการทดลองแช่แข็งไข่สุก โดยวิธี Microdrop vitrification ซึ่งทำโดยนำไข่สุกมาไว้ในน้ำยา equilibration solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 10% DMSO + 10% EG) นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 23-24 °C แล้วนำไปไว้ในน้ำยา vitrification solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M Sucrose) ที่อุณหภูมิ 23-24 °C นาน 30 (1min+30s) หรือ 45 (1min+45s) (โดยได้ตัดกลุ่ม 1min+60s ออกเนื่องจากผลการทดลองที่ 3.1. แสดงว่ากลุ่มนี้มีความเป็นพิษสูงมากจนไม่สามารถได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์) โดยใช้ปิเปตแก้วปลายเล็กดูดน้ำยา 2-3 µL พร้อมไข่ 5 ใบ ไปหยดลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งอยู่ในกระถาง aluminum foil ที่ลอยอยู่ในไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม จากนั้นนำ Microdrop ของน้ำยาที่แข็งแล้วไปไว้ใน cryotube แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ใช้ไข่สุกที่ไม่ถูก CPA เป็นกลุ่มควบคุม การทำละลายไข่ทำโดยใช้ปากคีบ Microdrop จากไนโตรเจนเหลวไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS + 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที แล้วนำไปไว้ในตู้บัพที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไข่ไปตรวจสอบความอยู่รอดด้วยการนำไปไว้ใน 2.5 µg/mL FDA ซึ่งละลายใน PBS+5 mg/mL BSA ที่ 38.5 °C นาน 2 นาทีในที่มืด แล้วนำไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS+5 mg/mL BSA แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence ภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวแสดงว่ามีชีวิตรอด นำไข่ที่มีชีวิตรอดของแต่ละกลุ่มไปทำ ICSI โดยนำน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งครั้งละ 1 หลอดมาละลายใน 7 mL น้ำยา BO ที่เดิมด้วย 10 mM Caffeine และปั่นที่ 500xg นาน 5 นาที แล้วนำ sperm pellet มาไว้ก้นหลอด conical tube ที่มีน้ำยา BO อยู่ 1.5 mL นำหลอดน้ำยาไปตั้งเอียง 45 องศาที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 30 นาที เพื่อทำ swim up จากนั้นใช้ปิเปตดูดน้ำยาส่วนบน 1 mL ไปผสมกับน้ำยา BO 7 mL และปั่นที่ 500x g นาน 5 นาที นำ sperm pellet มาเติมด้วยน้ำยา BO เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นตัวอสุจิ 8 x 10⁶/mL นำไข่ครั้งละ 10 ใบไว้ในน้ำยา Emcare holding ที่ทำหยุดไว้ 50 µL ที่ปิดคลุมด้วย mineral oil เพื่อใช้สำหรับฉีดอสุจิ โดยทำ ICSI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า นำตัวอสุจิที่เตรียมไว้แล้วผสมในสัดส่วน 1:1 ด้วย 12% PVP ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding โดยจะเตรียมหยดน้ำยาสำหรับฉีดอสุจิ 1 หยด และน้ำยาที่มี PVP ที่มีอสุจิอยู่ 2 หยดๆละ 10 µL บนฝาจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. ใช้ปิเปตฉีดอสุจิที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 8-10 ไมครอน ทำ immobilize อสุจิแต่ละตัว ด้วยการกดลงตรงกลางหาง แล้วดูดอสุจิให้เข้าไปในปิเปตโดยให้ส่วนหางเข้าก่อน ใช้ holding pipette ดูดไข่ให้ตำแหน่ง 1" PB อยู่ที่ 6 หรือ 12 นาฬิกา และปรับให้ปิเปตฉีดอสุจิอยู่ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา ระหว่างที่ใช้ปิเปตแทงเข้าไปในไซโตพลาสซึมจะดูดไซโตพลาสซึมเล็กน้อยเพื่อยืนยันว่าแทงผ่านเยื่อหุ้มไข่แล้ว ทำการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของ

ไข่โดยมีน้ำยาเข้าไปให้น้อยที่สุด (<5 μL) นำไข่ที่ทำ ICSI แล้วเก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding แล้วนำไข่ไปกระตุ้นโดยการนำไปไว้ในน้ำยา Emcare holding มี 7% EtOH นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide + 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cytochalacin D ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงต่อด้วยน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ไข่/100 μL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 , 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10ไข่/100 μL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

ผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้ได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร *Theriogenology* เมื่อวันที่ 31 ธันวาคม 2553 (Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Pampai, R. 2010. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* Submitted 21 September 2010; Revised and re-submitted 28 December 2010) ดังรายละเอียดในเอกสารแนบหมายเลข 3