บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การแช่แข็งและละลายโอโอไซท์

ทำการเก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการแล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดโอโอไซท์จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกโอโอไซท์ที่มีชั้นคิวมูลัสเซลล์ห่อหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 µl น้ำยาเลี้ยงโอโอไซท์ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG, 0.02 AU/ml FSH และ 1 µg/ml E_2 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 23 ชั่วโมง

โอโอไซท์สำหรับการปฏิสนธิในหลอดแก้ว: นำไข่ที่ผ่านการเลี้ยงมาแล้ว 20 ชั่วโมงมาย่อยเซลล์คิวมูลัส ออกให้เหลือ 1-2 ชั้น นำไข่ที่ได้ไปทำการแช่แข็งโดยวิธี Vitrification น้ำยาที่ใช้แช่แข็งประกอบด้วยน้ำยาหลักคือ TCM199-HEPES+20% FCS ซึ่งจะศึกษาถึงผลของการแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification โดยเปรียบเทียบการแช่แข็งด้วยวิธี Solid surface vitrification (SSV) และการแช่แข็งโดยใช้ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) ต่ออัตรารอดหลังจากละลาย การแช่แข็งทำโดยนำโอโอไซท์ 5-10 ใบ มาล้างในน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS (BM) จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Equilibration medium ที่ประกอบด้วย BM + 4% (v/v) Ethylene glycol (EG) นาน 12-15 นาที ที่ 38.5°C จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Vitrification ที่ประกอบด้วย BM + 35% (v/v) EG + 50 mg/ml Polyvinyl pyrrolidone (PVP) + 0.4M Trehalose นาน 30 วินาที จากนั้นจึงนำโอโอไซท์กลุ่มละ 5-10 ใบ ดรอปโดยตรงลงบนอลูมิเนียมฟลอยลอยที่ลอยอยู่บนไนโตรเจนเหลว (SSV) หรือนำไปวางไว้บนแผ่นพลาสติกของ Cryotop แล้วจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายโอโอไซท์ทำโดยการนำโอโอไซท์จากกลุ่ม SSV และ Cryotop ไปจุ่มลงในน้ำยาละลายโอโอไซท์ซึ่งประกอบด้วย BM + 0.3M Trehalose ที่อุณหภูมิ 38.5°C จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา BM ที่มี 0.15M, 0.075M และ 0.0375M Trehalose ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 38.5° C นานน้ำยาละ 1 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ไปล้างในน้ำยา BM แล้วจึงนำไปเลี้ยงในตู้อบในน้ำยา IVM ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 2 ชั่วโมง

โอโอไซท์สำหรับการโคลนนิ่ง: นำโอโอไซท์ที่ผ่านการเลี้ยงมาแล้ว 23 ชั่วโมงมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกให้หมด โดยนำไข่ที่ได้ไปแช่แข็งโดยเปรียบเทียบการแช่แข็งระหว่าง Cryotop และ Microdrop การแช่แข็งทำโดยนำโอโอไซท์กลุ่มละ 5 ใบ มาล้างในน้ำยา BM จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Equilibration medium ที่ประกอบด้วย BM + 10% (v/v) EG + 10% DMSO นาน 1 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Vitrification ที่ประกอบด้วย BM + 20% (v/v) EG + 20%

DMSO + 0.5M Sucrose นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 22-24°C จากนั้นจึงนำโอโอไซท์และน้ำยาประมาณ 2 µl ดรอปลงไปตรงๆ ในไนโตรเจนเหลว (Microdrop) หรือนำไปวางไว้ที่ปลายพลาสติกของ Cryotop จากนั้นจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

สำหรับการละลายโอโอไซท์ทำโดยการนำโอโอไซท์จากกลุ่ม Microdrop และ Cryotop ไปจุ่มลงในน้ำยาละลายโอโอไซท์ซึ่งประกอบด้วย BM + 0.5M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา BM ที่อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ไปล้างในน้ำยา BM แล้วจึงนำไปเลี้ยงในตู้อบในน้ำยา IVM ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 1 ชั่วโมง

2.2 การประเมินการรอดของโอโอไซท์

หลังจากละลายโอโอไซท์มาแล้ว 1-2 ชั่วโมง จะทำการตรวจประเมินการรอดของโอโอไซท์โดยการย้อม Fluorescein diacetate (FDA) โดยนำโอโอไซท์แช่ในน้ำยา PBS ที่มี 2.5 µg/ml FDA + 5 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายในห้องมืด นาน 2 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ไปล้างในน้ำยา PBS + 5 mg/ml BSA แล้วจึงนำไปประเมินการรอดภายใต้แสง UV ภายใต้กล้อง Epifluorescene microscope โอโอไซท์ที่เรืองแสงสีเขียวภายใต้แสง UV จะประเมินว่ามีชีวิตรอดหลังการแช่แข็งและละลาย แล้วจึงนำโอโอไซท์ดังกล่าวไปใช้ในการทดลอง IVF หรือโคลนนิ่งต่อไป

2.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำน้ำเชื้อโคที่ถูกแช่แข็งครั้งละ 1 หลอด ออกจากถังไนโตรเจนเหลว นำไปละลายในอากาศนาน 10 วินาที และนำไปละลายต่อในน้ำที่มีอุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ดูดน้ำเชื้อไปไว้ที่ก้นหลอดทดลองที่มีน้ำยา TALP อยู่ 2 ml จากนั้นนำไปบ่มในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 30 นาที โดยวางหลอดให้อยู่ในลักษณะเอียง 45 องศา เพื่อแยกอสุจิมีชีวิตออกจากอสุจิที่ตาย โดยอสุจิมีชีวิตว่ายขึ้นบนผิวน้ำยา จากนั้นจึงดูดส่วนใสด้านบนของน้ำยาออกมา 1.8 ml แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2100 rpm นาน 7 นาที แล้วจึงดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่สะกอนอสุจิ แล้วจึงเติมน้ำยา TALP ลงไปอีก 1 ml แล้วจึงนำไปตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยปรับให้อสุจิมีความเข้มข้น 8-10 ล้านตัว/ml แล้วนำไปทำ microdrop (50 µl/drop) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil จากนั้นนำไข่อ่อนที่เลี้ยงไว้แล้ว 23 ชั่วโมง และไข่ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว microdrop ตัวอสุจิที่เลี้ยงรอไว้แล้วในสัดส่วน 20 ใบ/drop แล้วนำตัวอสุจิและไข่ไปเลี้ยงร่วมกันในตู้อบภายใต้ 5% CO_2 in air ที่อุณหภูมิ 38.5° C นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไข่มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออก แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

2.4 การทำโคลนนิ่ง

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างใบหูโคพันธุ์ดีไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนัง

ด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร แล้วนำไปแล้วนำไปวางบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร แล้วปิดทับด้วยกระจกสไลด์ ก่อนเติมน้ำยา α MEM +10% FBS ปริมาณ 5 ml แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO_2 in air โดยเปลี่ยนน้ำยาทุก 3 วัน เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสเจริญออกมาแล้วจะทำการ Passage โดยใช้สารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04%EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) แล้วนำเซลล์ไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM +10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงใหม่ในน้ำยา α MEM+10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37° C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air แล้ว passage ทุกๆ 3-4 วัน จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

นำไข่สดที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้ว 23 ชั่วโมงมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกและนำไข่ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว มาคัดเลือกโอโอไซท์ที่สุกแล้ว (มี first polar body) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5 µg/ml cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 µg/ml Hoecht 33342

การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai และคณะ, 2000) โดยใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline space ของไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไข่ครั้งละใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า จ่ายกระแสไฟ 25 V/ใบ ระยะเวลานาน 15 µsec 2 ครั้งต่อเนื่องกัน แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199 + 20% FCS นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted microscope คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 10% FCS ที่เติมด้วย10 µg/ml cycloheximide (CHX) และ 1.25 µg/ml cytochalasin D(CD) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa (Gardner และคณะ, 1994) + 0.6% BSA ใน

สัดส่วน 10-20 ใบ/100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O_2, 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา SOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 10ใบ/100 µl แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

2.5 การย้อมนับเซลล์ตัวอ่อน

การย้อมนับเซลล์ตัวอ่อนจะทำโดยวิธี Differential staining เพื่อแยกนับเซลล์ ICM และ TE โดยนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสมาใส่ในน้ำยาที่มี 0.1 mg/ml propidium iodide (PI) และ 0.2% Triton X-100 ที่ละลายในน้ำยา PBS นาน 60 วินาที จากนั้นนำไปไว้ในน้ำยาที่มี 25 µg/ml Hoecsht 33342 ที่ละลายใน 99.5% Ethanol นาน 5 นาที แล้วจึงนำตัวอ่อนไปวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วหยด Glycerol หยดลงบนตัวอ่อน แล้วปิดทับตัวอ่อนด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วจึงนำไปตรวจภายใต้กล้อง Epifluorescene microscope โดยตรวจสอบตัวอ่อนภายใต้แสง UV โดยนิวเคลียสของ TE จะถูกย้อมด้วยทั้งสีของ PI และ Hoecsht ซึ่งจะพบสีชมพูหรือแดง แต่สีนิวเคลียสของ ICM โดนย้อมด้วยสีของ Hoecsht เท่านั้นซึ่งจะมองเห็นเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นจึงทำการถ่ายรูปและบันทึกผลย้อมนับเซลล์ ICM และ TE

2.6 รูปแบบการดำเนินการวิจัย

การทดลองแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว จะแบ่งเป็น 4 กลุ่มเปรียบเทียบ คือ กลุ่มโอโอไซท์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (Fresh control), กลุ่มที่สองคือกลุ่มโอโอไซท์ที่ผ่านน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็งแต่จะไม่นำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลว แต่จะนำไปผ่านน้ำยาละลายเพื่อดูความเป็นพิษของน้ำยาแช่แข็งต่ออัตรารอดของโอโอไซท์ (Solution control), กลุ่มที่สามจะเป็นกลุ่มที่แช่แข็งโอโอไซท์ด้วยวิธี SSV (SSV), กลุ่มที่สี่จะเป็นกลุ่มที่แช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Cryotop (Cryotop) หลังจากการประเมินการมีชีวิตของโอโอไซท์ด้วย FDA แล้วจะนำโอโอไซท์ที่มีชีวิตไปผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว แต่ละซ้ำของการทดลองของแต่ละกลุ่มจะใช้ตัวอ่อนระยะ Zygote จำนวน 10 ตัวอ่อน โดยวิธีการคัดเลือกแบบสุ่ม

การทดลองแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนโดยวิธีโคลนนิ่ง โอโอไซท์จะถูกแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification แบบหยด (Microdrop) และแบบที่ใช้ Cryotop หลังการละลายโอโอไซท์จะถูกย้อมด้วย FDA เพื่อแยกเฉพาะโอโอไซท์ที่มีชีวิตมาทำการโคลนนิ่งและทำ Parthenogenetic จากนั้นจะทำการบันทึกผลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิส

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลอัตราการปฏิสนธิ การเจริญเติบโตของตัวอ่อน และจำนวนเซลล์ตัวอ่อนจะถูกคิดค่าสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA โดยใช้ KyPlot package (Ver. 4.0, KyensLab, Tokyo, Japan) โดยใช้จำนวนการทดลองจำนวน 5 ครั้ง ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

หมายเหตุ

1. สูตรของน้ำยาแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์สำหรับการปฏิสนธิในหลอดแก้ว เป็นน้ำยาสูตรเดียวกับรายงานที่มีก่อนหน้าคือในปี 2000 Dinnyes และคณะได้ทำการแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วยวิธี SSV พบว่าโอโอไซท์มีอัตรารอดหลังการละลายสูงถึง 86% (Dinnyes และคณะ, 2000) ในการทดลองครั้งนี้จึงมุ่งไปในการเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง

2. สูตรน้ำยาแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์สำหรับการโคลนนิ่ง เป็นสูตรน้ำยาเดียวกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้คือ Laowtammathron และคณะ, 2005 ซึ่งประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ได้จากการโคลนนิ่ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้น้ำยาตัวเดียวกัน