



เซลล์และโปรตีนที่หลังจากท่อนำไข่ และรังไข่สุกรในรอบการเป็นสัตว์

โดย

นางวรรณ เมฆศาสตร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

เซลล์และโปรตีนที่หลังจากท่อนำไข่ และรังไข่สุกรในรอบการเป็นลัด

โดย

นางวรรณ เมฆศาสตร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**CELLS AND PROTEIN SECRETION FROM PORCINE OVIDUCT AND OVARY IN
ESTROUS CYCLE**

By

Wanna Mettasart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Biology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2009

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ เซลล์และโปรตีนที่หลง
จากท่อนำไข่ และรังไข่สุกรในรอบการเป็นสัด ” เสนอโดย นางวรรณมา เมธศาสตร์ เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุภา อารีกิจเสรี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา กาญจน์กมล)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนาพร ชื่นอิม)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุภา อารีกิจเสรี)

...../...../.....

48303204 : MAJOR : BIOLOGY

KEY WORD : PORCINE OVIDUCTAL EPITHELIAL CELLS/CUMULUS OOCYTE
COMPLEXES/ESTROUS CYCLE/SECRETORY PROTEINS

WANNA METTASART : CELLS AND PROTEIN SECRETION FROM PORCINE
OVIDUCT AND OVARY IN ESTROUS CYCLE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MAYUVA
AREEKIJSEREE., Ph.D. 118 pp.

Morphological investigation of ampulla and isthmic epithelial cells in estrous porcine at follicular and luteal phases revealed that they composed of simple columnar ciliated cells (about 7 to 10 μm in diameter) and round shaped non-ciliated (secretory) cells (about 4 to 5 μm in diameter). From the total of 110 ovaries of pigs at the age more than 210 days old, the ratio of cumulus-oocyte complexes (COCs) in follicular phase to luteal phase were found at 557:323. These COCs can be further classified into 5 types; intact-, multi-, partial-, and expanded-cumulus cell layers. After culturing of intact and multi cumulus cell layers (COCs types I and II) in M199 supplemented with 10% heat treated fetal calf serum (HTFCS), LH, FSH, and estrogen, and incubated at 37°C, 5%CO₂, high humidity for 24 to 48 h, the ultrastructure of cumulus cells was changed in that they separated from the ovaries. It was indicated that mature oocytes developed from COCs types I and II can be prepared by the cell culture media reported in this study.

Ampulla and isthmic epithelial cells from oviducts and cumulus cells (CC) and granulosa cells (GC) from follicles cultured in M199 supplemented with 10% HTFCS and incubated at 37°C with 5% CO₂ and high humidity for 48, 96, and 144 h. before performing SDS-PAGE were detected the protein secretion. The results showed that secretion protein band was not observed from any type of cultured cells. Utilization of LC/MS/MS technique for identifying selected proteins from secretory fluids of ampulla epithelial cells in follicular phase found that the >220 kDa and 240 kDa protein was probably trypsin or protease. For the secretory fluids of ampulla epithelial cells in luteal phase, the protein sized 95 kDa was found to be a 90kDa heat shock protein while the protein sized about 105 kDa may be glycogen phosphorylase, protein kinase, or oviductal glycoprotein. The proteins from secretory fluids of CC+GC in follicular phase at sized about 27 kDa, 45 kDa, 140 kDa, and > 220 kDa were found to be immunoglobulin, haptoglobin, complement component 3, apolipoprotein A-IV, ceruloplasmin, hemopexin and fibronectin respectively whereas the protein secretion of CC+GC in luteal phase at size of >220 kDa was alpha-2-macroglobulin.

Department of Biology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2009
Student's signature
Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรา อารีกิจเสรี เป็นอย่างสูงที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำเป็นที่ปรึกษาสนับสนุนช่วยเหลือและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ ประธานกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนิต พิวนิม ที่กรุณาให้คำแนะนำชี้แนะขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร ชื่นอ้อม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทนา กาญจน์กมล กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำปรึกษาถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทาและผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์นวลอนงค์ นาคคง ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ได้ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรที่กรุณาให้ความรู้ ความเอื้อเฟื้อและความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมีและสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณนงนุช กำลังแพทย์ คุณสุเนตร กู้ก้านทียะ และน้องๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าของโรงฆ่าแม่สุกรที่อนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ขอระลึกถึงพระคุณ คุณพ่อแก้ว ผู้ล่วงลับไปแล้ว และกราบขอบพระคุณ คุณแม่เง็กฮวย เย็นยวดี ที่คอยให้กำลังใจ ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์สุเมษ เมธศาสตร์ นายเมธิ เมธศาสตร์ นายวิสุทธิ เมธศาสตร์ และเด็กหญิงจุฑามาศ เมธศาสตร์ สามีและลูกๆที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
3 อุปกรณ์และสารเคมี.....	29
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	29
สารเคมี	30
อาหารเพาะเลี้ยง.....	32
ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	32
4 วิธีดำเนินการทดลอง.....	33
วิธีเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์	33
การเก็บและเตรียมตัวอย่าง	34
วิธีเตรียมเซลล์.....	34
การเตรียมตัวอย่างเซลล์ไข่ สำหรับศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน- แบบส่องผ่าน	35
การศึกษาปริมาณและรูปแบบสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงและเก็บรักษาโดยวิธี แช่แข็ง	37
ศึกษาลักษณะโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดหลังในอาหารเพาะเลี้ยง	37
การวิเคราะห์โปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิคLiquid chromatography/ Mass spectrometer/Mass spectrometer	38
5 ผลการทดลอง.....	39
6 อภิปรายผลการทดลอง	83

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	90
ภาคผนวก.....	101
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	109
ประวัติผู้วิจัย.....	118

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ระยะเวลาในการสืบพันธุ์ของแม่สุกร	21
2 จำนวนเซลล์ไข่ต่อรังไข่ในระยะฟอลลิคูลาร์จำนวน 73 รังไข่ แบ่งตามการเรียงตัวของ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่	40
3 จำนวนเซลล์ไข่ต่อรังไข่ในระยะลูทีลจำนวน 37 รังไข่ แบ่งตามการเรียงตัวของ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่.....	40
4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าระยะฟอลลิคูลาร์ขนาด น้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น	66
5 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าระยะฟอลลิคูลาร์ขนาด น้ำหนักโมเลกุล 240 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น	66
6 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าระยะลูทีลขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนที่ 95 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น.....	68
7 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าระยะลูทีลขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนที่ 105 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น.....	70
8 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนที่ 27 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น	74
9 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนที่ 45 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น	75
10 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนที่ 140 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น	76
11 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนมากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น .	78
12 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ระยะลูทีลขนาดน้ำหนัก โมเลกุลของโปรตีนมากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น .	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สุกรพันธุ์ดาร์จไวท์	6
2	สุกรพันธุ์แลนด์เรซ	7
3	สุกรพันธุ์คูร์ร็อกเจอร์ซี่	8
4	สุกรพันธุ์พื้นเมือง	9
5	กายวิภาคศาสตร์ของระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย	9
6	ท่อไข่ รังไข่และฟอลลิเคิลของสุกรสาวและสุกรที่อยู่ในรอบการเป็นสัด	10
7	ลักษณะของเหลวภายในฟอลลิเคิล	12
8	ฟอลลิเคิลระยะที่สาม	13
9	ภาพวาดการเจริญของฟอลลิเคิลระยะต่างๆ	14
10	ภาพวาดเซลล์ไข่ระยะกราเฟียน ฟอลลิเคิล	15
11	ภาพเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ขณะเกิดการตกไข่ทะลุผ่าน ผนังฟอลลิเคิล	16
12	ภาพวาดโครงสร้างภายในรังไข่แสดงให้เห็นระยะต่างๆ ของฟอลลิเคิล	16
13	ท่อไข่ส่วนแอมพูล่า อีสทมัส และรังไข่สุกรที่ใช้ในการทดลอง	18
14	รังไข่และท่อไข่ในระยะฟอลลิคูลาร์	22
15	รังไข่และท่อไข่ในระยะลูเตียล	23
16	กราฟจำนวนเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบ (COCs) ทั้ง 5 ชนิด ระยะฟอลลิคูลาร์และ ระยะลูเตียลในแม่สุกร	41
17	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ แสดงลักษณะของเซลล์ไข่ทั้ง 5 ชนิด	42
18	สัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อไข่บริเวณแอมพูล่าและอีสทมัสในระยะฟอลลิคูลาร์ ในสภาพธรรมชาติ แสดงเซลล์มีรูปร่างกลมไม่มีซีเลียอยู่เป็นกลุ่มๆ	44
19	สัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อไข่บริเวณแอมพูล่าและอีสทมัสในระยะฟอลลิคูลาร์ ในสภาพธรรมชาติ ในภาพแสดงเซลล์รูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบน	45
20	สัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อไข่บริเวณแอมพูล่าและอีสทมัสระยะลูเตียล ในสภาพธรรมชาติ	46

ภาพที่		หน้า
21	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงสัณฐานวิทยาของ COCs ใน รอบการเป็นสัคของเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ก่อนเพาะเลี้ยง.....	49
22	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงสัณฐานวิทยาของ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ก่อนเพาะเลี้ยง	50
23	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่ ชนิดที่ 1 และ 2 ระยะฟอลลิคูลาร์หลังเพาะเลี้ยง	51
24	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงสัณฐานวิทยาของ COCs ของเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ระยะฟอลลิคูลาร์หลังเพาะเลี้ยง	52
25	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงสัณฐานวิทยาของ COCs ของเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ระยะลูทีลหลังเพาะเลี้ยง	54
26	ภาพจาก Semi-Thin section แสดงสัณฐานวิทยาของ COCs ในรอบการเป็นสัค ระยะฟอลลิคูลาร์ของเซลล์ไข่ชนิดที่ 2 ในสภาพธรรมชาติ.....	55
27	ภาพจาก Semi-Thin section แสดงสัณฐานวิทยาของ COCs ในรอบการเป็นสัค ระยะลูทีลของเซลล์ไข่ชนิดที่ 2 ในสภาพธรรมชาติ.....	57
28	แถบโปรตีนของสารหลังจาก POEC ระยะฟอลลิคูลาร์	60
29	แถบโปรตีนของสารหลังจาก POEC ระยะลูทีล.....	62
30	แถบโปรตีนของสารหลังจาก CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีล	64
31	ตำแหน่งของโปรตีนจากสารหลัง POEC ระยะฟอลลิคูลาร์บริเวณแอมพูล่า.....	65
32	ตำแหน่งของโปรตีนจากสารหลัง POEC ระยะลูทีลบริเวณแอมพูล่า	67
33	ตำแหน่งของโปรตีนจากสารหลัง CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์	73
34	ตำแหน่งของโปรตีนจากสารหลัง CC+GC ระยะลูทีล.....	79

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเพื่อบริโภคและส่งออก โดยจังหวัดนครปฐมเป็นจังหวัดหนึ่งที่มีนิยมเลี้ยงสุกรมากเป็นอันดับ 2 ของประเทศจากรายงานข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี พ.ศ.2549 มีจำนวนสุกร 1,135,155 ตัว (กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) และมีโรงชำแหละสุกรหลายแห่ง ซึ่งมีทั้งโรงชำแหละสุกรสาวเพื่อนำเนื้อและอวัยวะภายในออกจำหน่ายเพื่อการบริโภค แยกออกจากโรงชำแหละแม่สุกรซึ่งแม่สุกรจะมีเนื้อค่อนข้างเหนียวไม่อ่อนนุ่มเหมือนสุกรสาว ดังนั้นจึงมักนำเนื้อและอวัยวะภายในไปทำผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กุนเชียง หมูแผ่น หมูหยอง เป็นต้น ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานและพบว่าอวัยวะบางส่วนของสุกรไม่ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์อื่นใด เช่น รังไข่ (ovary) และท่อนำไข่ (oviduct) อวัยวะเหล่านี้ไม่นิยมที่จะนำไปรับประทานหรือทำประโยชน์อื่นใดจึงถูกกำจัดทิ้งซึ่งก่อให้เกิดขยะเน่าเหม็น เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์เทคโนโลยี (cell technology) และการเรียนรู้ทางชีววิทยาของระบบสืบพันธุ์ Areekijserree และ Vejaratpimol (2006); Areekijserree และ Veerapraditsin (2008) ได้นำรังไข่และท่อนำไข่ของสุกรสาว ซึ่งเป็นสุกรที่ยังไม่ผ่านรอบการเป็นสัดมาศึกษาและวิจัยในห้องปฏิบัติการ จากผลการวิจัยพบว่าเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมียคือ เซลล์ไข่ (oocyte) เซลล์บุท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (cumulus cells: CC) และเซลล์แกรนูโลซ่า (granulosa cells: GC) สามารถนำมาเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (sterile technique) ได้เป็นอย่างดี

นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างและสัณฐานวิทยาของเซลล์ในขณะที่เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงนั้นเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางพิษวิทยา จึงมีความต้องการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแทนการใช้สัตว์ทดลอง เพราะปัญหาในการเลี้ยงสัตว์ทดลองนั้นมีหลายอย่างทั้งในด้านค่าใช้จ่ายที่สูงหรือการดูแลเพื่อป้องกันการป่วยตายของสัตว์ทดลองและในด้านจริยธรรม เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นและประกอบ

ในการใช้เซลล์เป็นต้นแบบสำหรับศึกษาความเป็นพิษของยา สารเคมี โลหะหนัก (Sanmanee และ Areekijserree, 2009) และสารอื่นๆ ซึ่งในปัจจุบันความต้องการใช้เซลล์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารและโลหะหนักเพิ่มขึ้นมาก การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นการประเมินผลกระทบต่อเซลล์ได้เป็นอย่างดี (Reeves และคณะ, 1996; Takano และคณะ, 2002) ซึ่งให้ผลชัดเจนกว่าการใช้สัตว์ทดลองเพราะสามารถทดสอบโลหะหนักกับเซลล์ได้โดยตรง

การศึกษาเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์จากอวัยวะของสัตว์ที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด เช่น รังไข่และท่อไข่ในสุกร ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์เหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากในอนาคต ทั้งในเรื่องของการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว (in vitro fertilization) เช่น การทำมนุษย์หลอดแก้ว การทำสุกรหลอดแก้ว (Brussow, 2000) การนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาเป็นเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) เพื่อเสริมในอาหารเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ทำให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาจนถึงย้ายฝากได้ จากรายงานของ Kittayanant และคณะ (1993) พบว่าเซลล์บุท่อไข่ช่วยส่งเสริมการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนโคให้เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์บุท่อไข่ของตัวเอง

นอกจากนี้ประโยชน์จากการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงยังช่วยในการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิตัวก่อนผสมกับเซลล์ไข่ในการทำปฏิสนธิตัวหลอดแก้ว (White และคณะ, 1989; Park และ Sirard, 1996; Romar และคณะ 2001; Coy และคณะ, 2002) ตลอดจนการศึกษาสารหลังที่เกิดจากเซลล์เพาะเลี้ยงของ POEC และ CC+GC ที่หลั่งออกมาสู่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (condition medium) โดยเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 3 เดือน และพบว่าสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถชักนำให้อสุจิเข้าสู่วัยเซลล์ไข่ (oocyte) ได้ดีในเปอร์เซ็นต์ที่สูง (Areekijserree และ Veerapraditsin, 2008)

ดังนั้นเพื่อการพัฒนาในด้านชีววิทยาการเจริญพันธุ์และชีวเคมีของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่สมบูรณ์ขึ้น ผู้วิจัยจะทำการศึกษาและวิจัยโดยใช้ท่อไข่และรังไข่แม่สุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม (ซึ่งฆ่าแต่ละสุกรที่โตเต็มวัยที่มีอายุประมาณ 200 วันหรือมากกว่า) ที่ถูกตัดทิ้งมาศึกษา โดยคัดเลือกสุกรที่อยู่ในรอบการเป็นสัดทั้งในระยะก่อนการตกไข่ (pre-ovulation) และหลังการตกไข่ (post-ovulation) ซึ่งดูจากรังไข่และท่อไข่ของสุกรที่เปลี่ยนแปลงลักษณะของท่อไข่และฟอลลิเคิล (follicle) ฟอลลิเคิลจะมีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 5 ถึง 7 มิลลิเมตร มีสีชมพูหรือเป็นก้อนเนื้อเหลือง (corpus luteum) สำหรับสุกรสาวฟอลลิเคิลจะมีขนาดเล็กประมาณ 1.5 ถึง 3 มิลลิเมตร (มงคล เตชะกำพู, 2543) มีลักษณะใส หลังจากนั้นนำเซลล์จากท่อไข่และรังไข่สุกรมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและเพาะเลี้ยงเซลล์และวิเคราะห์โปรตีนที่เซลล์หลั่งลงสู่

อาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการที่จะนำเซลล์และสารหลังจากเซลล์ไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตสัตว์เศรษฐกิจต่อไปในอนาคต

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

เพื่อศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงจากเซลล์นุ่ท่อ นำไข่ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่และเซลล์เกรนูโลซ่าของแม่สุกรในรอบการเป็นสัดในช่วงระยะเวลาหนึ่งเพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์นุ่ท่อ นำไข่ที่อยู่ในรอบการเป็นสัดในส่วนแอมพูลล่า (ampulla) และอิสทมัส (isthmus) ศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตลอดจนศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์ไข่ และวิเคราะห์หาโปรตีนที่หลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย คือ ต้องการศึกษา โดยใช้ทรัพยากรที่มีจำนวนมากและสามารถหาได้จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม ได้แก่ ท่อ นำไข่และรังไข่สุกรในรอบการเป็นสัด แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อการศึกษาทางชีวเคมี และในทางชีววิทยาการเจริญพันธุ์ของสัตว์ เพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์หลักข้างต้น การศึกษาได้แยกเป็นวัตถุประสงค์ย่อย ๆ ดังนี้

1. ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์นุ่ท่อ นำไข่สุกร (Porcine oviductal epithelial cells: POEC) ที่อยู่ในรอบการเป็นสัดในส่วนอิสทมัสและแอมพูลล่า
2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาความสัมพันธ์ของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์ไข่ (Cumulus oocyte complexes: COCs) ในรอบการเป็นสัด
3. วิเคราะห์โปรตีนที่สนใจเพื่อจำแนกโปรตีนชนิดที่หลังในอาหารเพาะเลี้ยงจากเซลล์เพาะเลี้ยงของ POEC และ CC+GC
4. เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเซลล์เพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC ในรอบการเป็นสัดที่หลังสู่ออาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

ขอบเขตของการทำวิจัย

1. เป็นการศึกษาเซลล์ในห้องปฏิบัติการ
2. ใช้ท่อนำไข่และรังไข่สุกรที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐมเป็นตัวแทนในการศึกษาเซลล์และสารหลังโปรตีนจากท่อนำไข่และรังไข่
3. การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC ของสุกรนั้น ศึกษาทดลองในสูตรอาหารที่เหมาะสม
4. การศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงของสุกรในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยง โดยศึกษาในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
5. การแช่แข็งสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงจาก POEC ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลารีบริเวณแอมพูล่าและอีสทิมัส และสารหลังจาก CC+GC ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส
6. การวิเคราะห์โปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง ได้วิเคราะห์หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง
7. การวิเคราะห์โปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงหลังสู้อาหารเลี้ยงเซลล์โดยจำแนกชนิดของโปรตีนโดยเลือกจากแถบโปรตีนที่พบ

ประโยชน์ของงานวิจัยที่จะได้รับ

1. ได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของความสัมพันธ์เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์ไข่ (COCs) ของแม่สุกรในรอบการเป็นสัดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์
2. ได้ข้อมูลสารหลังโปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์เกรนูโลซา (จากแม่สุกรในรอบการเป็นสัดในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลารี) หลังลงในอาหารเลี้ยงเซลล์
3. ได้แหล่งโปรตีนจากการวิจัยไปทำการศึกษาต่อในอนาคต ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อเซลล์เทคโนโลยี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาของสุกร

1.1 อนุกรมวิธานของสุกร

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Mammalia

Order Artiodactyla

Genus Suidae

Species *Sus scrofa Linnaeus*

สุกร หรือ หมู เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในวงศ์ Suidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sus scrofa Linnaeus*, ค.ศ. 1758 เป็นสัตว์กีบคู่ ตัวอ้วน จมูกและปากยื่นยาว มีทั้งที่เป็นสัตว์เลี้ยงและที่เป็นสัตว์ป่า หาอาหารโดยใช้จมูกค้นพื้นดิน สุกรมีวิวัฒนาการทางสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงมาตลอด จากการคัดเลือกโดยธรรมชาติของมนุษย์ทำให้มีการผสมข้ามสายพันธุ์สุกร โดยใช้ความรู้ทางวิชาการในด้านพันธุศาสตร์ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้สามารถผลิตสุกรที่มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วเปลี่ยนสารอาหารที่ได้รับเป็นเนื้อได้ดี และเพื่อให้ได้คุณภาพซากที่ดีเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารมนุษย์มากยิ่งขึ้น

สุกรพันธุ์ในโลกมีประมาณ 87 พันธุ์ที่ถูกยอมรับว่าเป็นพันธุ์แท้ และอีก 225 ชนิดที่ยังไม่ได้ถูกยอมรับเป็นสุกรพันธุ์แท้ ซึ่งแตกต่างกันไปตามลักษณะของภูมิภาคที่อาศัยอยู่

2. การจัดแบ่งประเภทพันธุ์สุกร แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ

2.1 สุกรประเภทพันธุ์เนื้อ (meat type) ส่วนใหญ่เป็นสุกรพันธุ์ดั้งเดิมที่ถูกปรับปรุงคัดเลือกให้ผลิตเนื้อมากกว่ามัน ส่วนอีกพวกเป็นสุกรที่เกิดจากลูกผสมระหว่างพันธุ์เป็นสุกรพันธุ์ใหม่ โดย

ผสมระหว่างพันธุ์มันดั้งเดิมกับพันธุ์เบคอน ได้แก่ พันธุ์ดูร็อก (Duroc) แฮมเชียร์ (Hampshire) ยอร์กเชียร์ (Yorkshire) เชสเตอร์ไวท์ (Chester White) โปแลนด์ไชน่า (Poland China) เป็นต้น

2.2 สุกรประเภทพันธุ์เบคอน (bacon type) ส่วนใหญ่เป็นสุกรพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งปัจจุบันพบไม่กี่พันธุ์ พันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ลาร์จไวท์ (Large White) และพันธุ์แลนด์เรซ (Landrace) เป็นต้น

3. สุกรพันธุ์ที่เลี้ยงในประเทศไทย

3.1 สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์

สุกรพันธุ์นี้มีถิ่นกำเนิดในประเทศอังกฤษ นำเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2482 เป็นพันธุ์ผสมระหว่างยอร์กเชียร์ผสมข้ามกับสุกรไลเคสเตอร์ และได้ทำการคัดเลือกจนกระทั่งเป็นสุกรพันธุ์ใหม่และเรียกว่า ลาร์จไวท์จนปัจจุบัน ซึ่งเป็นสุกรพันธุ์เบคอนที่มีชื่อเสียงมากที่สุดพันธุ์หนึ่งลักษณะมีขนและหนังสีขาว หูตั้ง จมูกยาว ลำตัวยาว กระดูกใหญ่ โคนงใหญ่ หน้าสั้น หัวใหญ่ สะโพกไม่โต เป็นสุกรขนาดโต ตัวผู้โตเต็มที่น้ำหนัก 250 ถึง 300 กิโลกรัม ตัวเมีย 150 ถึง 220 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วมาก ลูกดก 10 ถึง 15 ตัว เป็นสุกรที่มีคุณภาพซากดีมากเหมาะในการทำลูกผสมเพื่อผลิตสุกรขุน



ภาพที่ 1 สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์

3.2 สุกรพันธุ์แลนด์เรซ

ถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเดนมาร์ก นำเข้ามาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2506 เป็นสุกรลูกผสมของพันธุ์ลาร์จไวท์และพันธุ์พื้นเมืองของเดนมาร์ก และได้คัดเลือกปรับปรุงพันธุ์จนเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในอังกฤษและยุโรป มีคุณภาพซากดี หลายประเทศนิยมนำไปทำลูกผสม ลักษณะของสุกรพันธุ์นี้มีสีขาว หูปรก ลำตัวยาว มีซี่โครงมาก 16 ถึง 17 คู่ (สุกรปกติมีกระดูกซี่โครง 15 ถึง 16 คู่) หนัวยาว หัวเล็ก สะโพกโต หลังไม่โค้งมากนัก บางครั้งดูแบนตรง ไหล่กว้างหนา เป็นสุกรขนาดโตเหมือนพันธุ์ลาร์จไวท์โตเต็มที่ 200 ถึง 250 กิโลกรัม ให้ลูกดกเฉลี่ย 9 ถึง 10 ตัว เติบโตเร็วมาก เปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อได้สูง เกษตรกรนิยมเลี้ยงเป็นสุกรพันธุ์เบคอนที่สมบูรณ์มาก มีข้อเสียคือ มักจะมีปัญหาเรื่องขาอ่อน ขาไม่ค่อยแข็งแรง แก้ไขโดยต้องเลี้ยงด้วยอาหารที่มีคุณภาพดี พันธุ์แลนด์เรซเหมาะที่ใช้เป็นสายแม่พันธุ์



ภาพที่ 2 สุกรพันธุ์แลนด์เรซ

3.3 สุกรพันธุ์คูรีค

มีถิ่นกำเนิดจากประเทศอเมริกา ไม่ทราบต้นตระกูลแน่นอนแต่ น่าจะมาจากสุกรสามพันธุ์ คือ สุกรพันธุ์เจอร์ซี่เร็ด (Jersey Reds) เร็ดคูรีค (Red Duroc) และเร็ดเบอร์คซาร์รี่ (Red Berkshire) ซึ่งครั้งแรกเรียกว่า คูรีคเจอร์ซี่ ถูกรับรองพันธุ์แท้เมื่อปี พ.ศ. 2428 สุกรพันธุ์นี้เป็นประเภทพันธุ์เนื้อ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์เบคอน ลักษณะของสุกรพันธุ์นี้มีสีแดง หูปรกเป็นส่วนใหญ่ ลำตัวสั้นกว่าพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ลำตัวหนา หลังโค้ง โตเต็มที่หนัก 150 ถึง 200 กิโลกรัม คุณภาพ

ซากดีมากเช่นเดียวกับพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ เป็นสุกรที่ให้ลูกไม่ตกเฉลี่ย 8 ถึง 9 ตัว เลี้ยงลูกไม่เก่ง ลูกสุกรหลังจากอายุ 2 เดือนไปแล้ว เจริญเติบโตเร็ว มีความแข็งแรงทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศทุกชนิด นิยมใช้เป็นสายพ่อพันธุ์เพื่อผลิตลูกผสมที่สวยงาม แผ่นหลังกว้าง เจริญเติบโตเร็ว



ภาพที่ 3 สุกรพันธุ์คูร์ร็อกเจอร์ซี่

3.4 สุกรพันธุ์พื้นเมือง

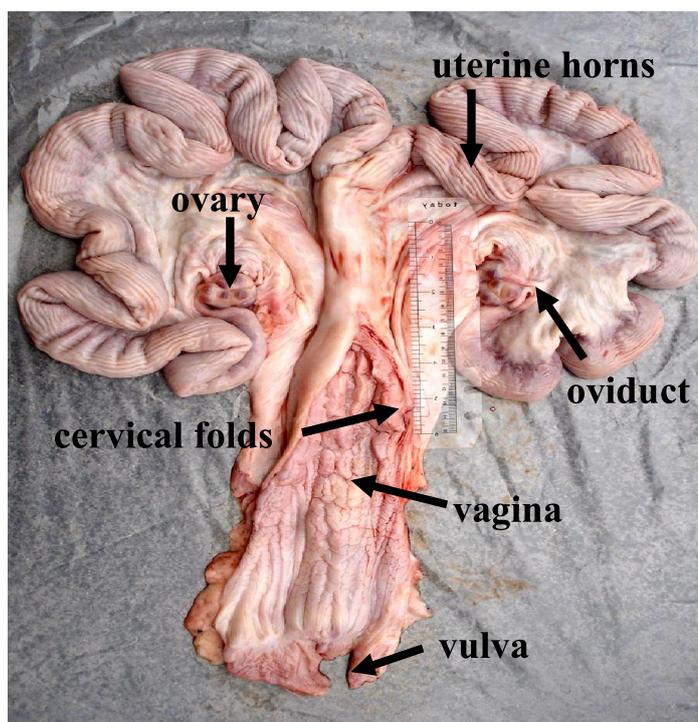
สุกรพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่เลี้ยงอยู่ตามหมู่บ้านชนบทพวกชาวเขาไม่เคยได้รับการปรับปรุงพันธุ์แต่อย่างใดจึงยังคงมีรูปร่างลักษณะที่ไม่ดีหลายประการ เช่น อัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำมาก และคุณภาพซากไม่ค่อยดีมีเนื้อน้อยมันมาก ลักษณะโดยทั่วไป มีขนสีดำ พื้นท้องขาว ลักษณะสีไม่ค่อยแน่นอนหนักสำหรับบางพันธุ์ ท้องยาน มีขนาดเล็ก หลังแอ่น การเจริญเติบโตช้า น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ระหว่าง 60 ถึง 70 กิโลกรัม ให้ลูกตกจะมีชื่อเรียกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น สุกรพันธุ์ไหล่ดำ พันธุ์ควาย พันธุ์ราด พันธุ์พวง และพันธุ์กระโดน เป็นต้น



ภาพที่ 4 สุกรพันธุ์พื้นเมือง (<http://www.dld.go.th/service/pig/p2.html>)

4. กายวิภาคศาสตร์ของระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย

ระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมียประกอบด้วย รังไข่ (ovaries) ท่อนำไข่ (oviducts) ปีกมดลูก (horn of uterus หรือ uterine horns) ปากมดลูก (cervix) ช่องคลอด (vagina) และปากช่องคลอด (vulva)



ภาพที่ 5 กายวิภาคศาสตร์ของระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย



ภาพที่ 6 (ก) ท่อนำไข่ รังไข่และฟอลลิเคิลของสุกรสาว (ข) ท่อนำไข่ รังไข่และฟอลลิเคิลของสุกรที่อยู่ในรอบการเป็นสัดที่ใช้ในงานวิจัย

รังไข่ (Ovary)

รังไข่เป็นอวัยวะที่สำคัญของระบบสืบพันธุ์เพศเมียในสุกร อยู่ทางด้านข้างของช่องเชิงกราน (pelvic inlet) รังไข่สามารถขยับได้ตามผนังพังพืดในช่องท้อง (broad ligament) ลักษณะขนาดของรังไข่จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะ จำนวน และสภาพของถุงหุ้มไข่ และคอร์ปอูเลีย (corpora lutea) ตามปกติรังไข่มีลักษณะคล้ายพวงอุ้งน (อรรรณพ คุณาวงกต, 2545) ขนาดและน้ำหนักของรังไข่นั้นผันแปรได้ขึ้นอยู่กับระยะของวงจรการสืบพันธุ์ จากการสำรวจรังไข่ของสุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 1,000 ตัว Kunavongkrit และคณะ (1987) รายงานว่ารังไข่ด้านซ้ายมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากกว่าด้านขวา แสดงถึงการทำงานมากกว่าด้านขวา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Einarsson และ Gustafsson (1970); Kunavongkrit และ Larsson (1982) สำหรับสุกรสาวที่ไม่เคยเป็นสัดจะมีรังไข่หนักในช่วง 3.00 ถึง 3.30 กรัม โดยมีขนาด 1.8 x 2.5 x 1.1 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) และสุกรที่เคยเป็นสัดแล้วจะมีรังไข่หนัก 6.20 ถึง 6.50 กรัม Kunavongkrit และคณะ (1987) รอบๆ รังไข่จะมีถุงหุ้มรังไข่ (ovarian bursa) โดยเฉพาะช่วงเป็นสัดถุงหุ้มนี้มักจะคลุมรังไข่เอาไว้

รังไข่ทำหน้าที่หลักด้วยกัน 2 อย่าง คือ

1. ผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gametogenic function) ที่เรียกว่าโอโอไซต์ หรือ เซลล์ไข่ โดยกระบวนการสร้างโอโอไซต์ (oogenesis) รังไข่เป็นแหล่งสะสมของเซลล์ไข่ตั้งแต่แรกเกิด รวมทั้งการสร้างถุงไข่หรือฟอลลิเคิลด้วย

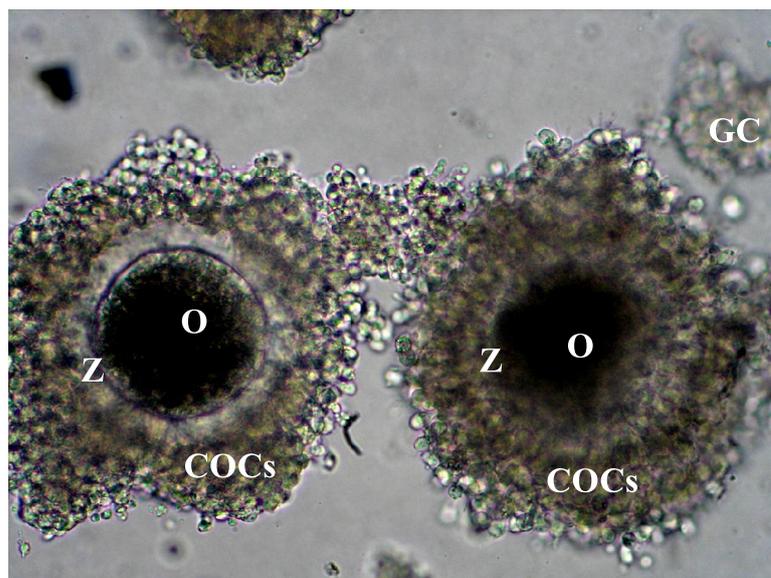
2. ผลิตฮอร์โมนเพศ (endocrine function) ที่สำคัญ คือ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และแอนโดรเจน (androgen) ฮอร์โมนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างฟอลลิเคิล (folliculogenesis) การเจริญของเซลล์ไข่พร้อมการปฏิสนธิ (fertilization) ซึ่งอยู่ในระยะ secondary oocyte การตกไข่ (ovulation) และการปฏิสนธิ

นอกจากนี้รังไข่ยังผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ซึ่งเซลล์ไข่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนหลายตัวที่ผลิตมาจากสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และต่อมใต้สมอง (pituitary gland) โดยผ่านมาทางกระแสเลือด ซึ่งต่อมใต้สมองมีหน้าที่ในการผลิตฟอลลิเคิล สติมูเลตติง ฮอร์โมน (เอฟเอสเอช: Follicle Stimulating Hormone: FSH) และลูติไนซิง ฮอร์โมน (แอลเอช: Lutinizing Hormone: LH) ฮอร์โมนสองชนิดนี้มีหน้าที่สำคัญคือ เป็นตัวกระตุ้นให้รังไข่ในสุกรสาวเริ่มทำงาน ตามวงจรของระบบสืบพันธุ์

เซลล์ไข่ซึ่งอยู่ในฟอลลิเคิลเมื่อเจริญเต็มที่ที่จะเกิดการตกไข่ ฟอลลิเคิลจะกลายเป็นคอร์ปัส ลูเทีย ซึ่งผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สำหรับเตรียมผนังมดลูกและควบคุมการตั้งท้อง ส่วนเซลล์ไข่ที่ตกจากรังไข่จะเข้าสู่ท่อ นำไข่เพื่อรอการปฏิสนธิต่อไป

เยื่อชั้นนอกสุดที่หุ้มรังไข่ เรียกว่า germinal epithelium ประกอบด้วยเซลล์รูปลูกบาศก์ ชั้นเดียว เยื่อนี้จะหุ้มรังไข่ทั้งหมด ถัดเข้าไปเป็นชั้น tunica albuginea ส่วนที่เหลือของรังไข่แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกเรียก คอร์เทก (cortex) และเนื้อเยื่อชั้นในเรียก เมดัลลา (medulla) ส่วนคอร์เทกเป็นส่วนที่มีฟอลลิเคิลหรือคอร์ปัส ลูเทียม ในระยะต่างๆ ภายในฟอลลิเคิลนั้นจะมีเซลล์ไข่อยู่ภายใน การเจริญของฟอลลิเคิลจะอยู่ภายใต้อิทธิพลของฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอช จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) เนื้อเยื่อประสานในส่วนนี้ ประกอบด้วย fibroblast, collagen และ reticular fiber นอกจากนี้ยังมีเส้นเลือด เส้นประสาทมาเลี้ยงด้วย ส่วนเมดัลลาเป็นส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด fibro elastic และเป็นที่ยึดของเส้นประสาทและเส้นเลือดที่มาเลี้ยงรังไข่ โดยผ่านทางรอยต่อระหว่างรังไข่กับเยื่อยึด mesovarium ที่เรียกว่า hilus

บริเวณเปลือกนอกกรอบๆ เซลล์ไข่ เป็นสารพวกไกลโคโปรตีนที่เรียกว่า โซนา เพลลูซิดา (zona pellucida) และมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หลายชั้น เรียกว่า เซลล์คมูลัส ซึ่งในสุกรเมื่อเซลล์ไข่อยู่ในระยะเซกันดารี ฟอลลิเคิล จะมีเซลล์คมูลัสหนาประมาณ 10 ชั้น มีขนาดเท่ากับ 300 ไมโครเมตร (มกคด เตชะกำฟู, 2543) ส่วนเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบไข่ เรียกว่า เซลล์เกรนูโลซ่า ซึ่งสามารถผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนได้



ภาพที่ 7 ลักษณะของเหลวภายในฟอลลิเคิล น้ำในถุงไข่ (follicular fluid) โชน้ำ เพลลูซิต้า (Z) เซลล์ไข่สุกร (O) ความสัมพันธ์เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์ไข่ (COCs) และ เซลล์แกรนูโลซ่า (GC)

โครงสร้างของรังไข่จะมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ตามอายุ และระยะวงจรการเป็น สัตว์ ซึ่งรังไข่สุกรมักจะมีรูปร่างค่อนข้างกลมกว่าสัตว์อื่นๆ รังไข่เป็นบริเวณที่มีการเจริญของ ฟอลลิเคิล ทำให้รังไข่มีรูปร่างคล้ายพวงองุ่น (อรณพ คุณาวงกฤต, 2545) เยื่อชั้นนอกสุดที่หุ้ม รังไข่มีลักษณะเป็นเซลล์แบนๆ ชั้นเดียว (simple squamous epithelium) และเปลี่ยนแปลงเป็น เซลล์รูปลูกบาศก์ชั้นเดียว (simple cuboidal epithelium) ตามอายุ เรียกชั้นนี้ว่า germinal epithelium เยื่อนี้จะหุ้มรังไข่ทั้งหมด ถัดเข้าไปเป็นชั้นของ dense connective tissue เรียก tunica albuginea

การเจริญของฟอลลิเคิล แบ่งเป็น

1. ไพรมอเดียล ฟอลลิเคิล (primordial follicles) ภายในฟอลลิเคิลชนิดนี้มีไพรมารี โอโอไซต์ (primary oocyte) ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิลแบบเซลล์แบนๆ ชั้นเดียว (single layer of flattened follicular cells)

2. ฟอลลิเคิลระยะแรก (primary follicles) เป็นฟอลลิเคิลที่พบมากที่สุดในการรังไข่ ประกอบด้วย เซลล์ไข่อ่อนคือ ไพรมารี โอโอไซต์ ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิลแบบเซลล์รูปลูกบาศก์หรือเซลล์ รูปทรงกระบอกชั้นเดียว (single layer of cuboidal หรือ columnar follicular cells)

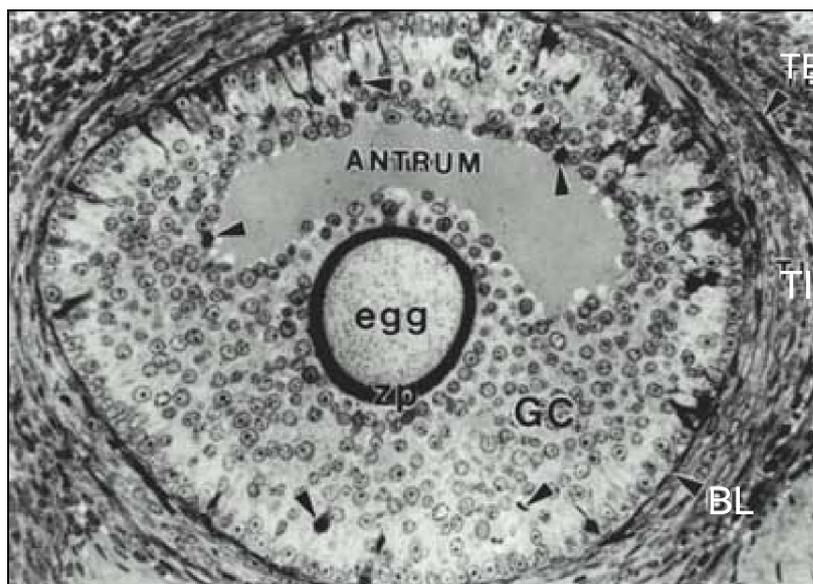
3. ฟอลลิเคิลระยะที่สอง (secondary follicles หรือ maturing follicles หรือ growing follicles) พัฒนาจากฟอลลิเคิลระยะแรก พบว่าภายในประกอบด้วยเซลล์ไข่ที่มีโซมาเพลลูซิदा (เป็นไกลโคโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ฟอลลิคูลาร์) ถัดออกมามีเซลล์ฟอลลิเคิลแบบเซลล์หลายชั้นล้อมรอบเซลล์ไข่อยู่

4. ฟอลลิเคิลระยะที่สาม (tertiary follicles : vesicular follicles) ระยะนี้พบว่าการเจริญของฟอลลิเคิล โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์แกรนูโลซ่าสร้างน้ำในถุงไข่ (follicular fluid) ทำให้เกิดมีช่องน้ำที่เรียกว่าแอนตรัม (antrum) ปรากฏขึ้นเมื่อฟอลลิเคิลมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 200 ถึง 400 ไมโครเมตร ช่องว่างภายในฟอลลิเคิลเป็นผลของการหลั่งของเหลวจากเซลล์แกรนูโลซ่าทำให้แยกเซลล์แกรนูโลซ่าเป็น 2 ส่วน คือ

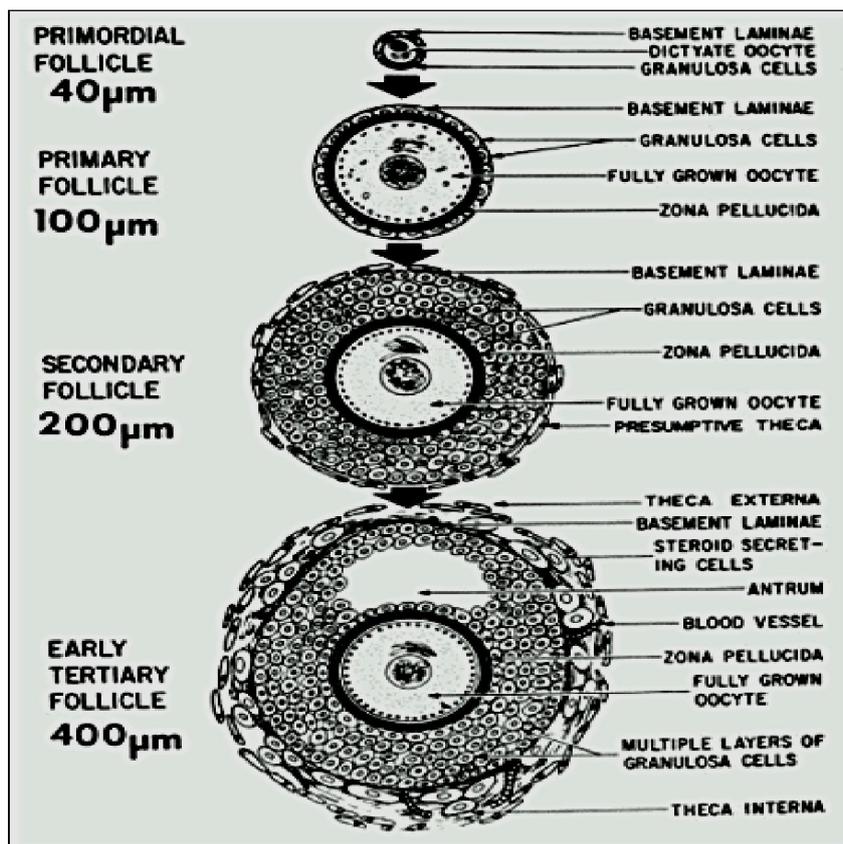
- ชนิดแรกอยู่รอบ ๆ ผนังด้านในฟอลลิเคิลเป็นเซลล์แกรนูโลซ่าที่แท้จริง (true granulosa cells)

- ชนิดที่สองอยู่รอบๆ เซลล์ไข่ เรียกว่า คิวมูลัส โอโอพอรัส (cumulus oophorus)

นอกจากนี้ยังมีเซลล์ชั้นรอบนอกเรียกว่า เซลล์ที่กำ (theca cells) แบ่งออกเป็นทีกำชั้นใน (theca interna) และทีกำชั้นนอก (theca externa) หุ้มรอบเซลล์แกรนูโลซ่าอีกทีหนึ่ง



ภาพที่ 8 ฟอลลิเคิลระยะที่สามพบช่องน้ำภายในเซลล์แกรนูโลซ่าที่มีการเจริญ (→) เมซัลลามินา (basal lamina : BL) ทีกำชั้นใน (TI) ทีกำชั้นนอก (TE) (Bloom W, Fawcett DW In A Textbook of Histology. Philadelphia, WB Saunders Company, Philadelphia 1975. With permission from Arnold.)

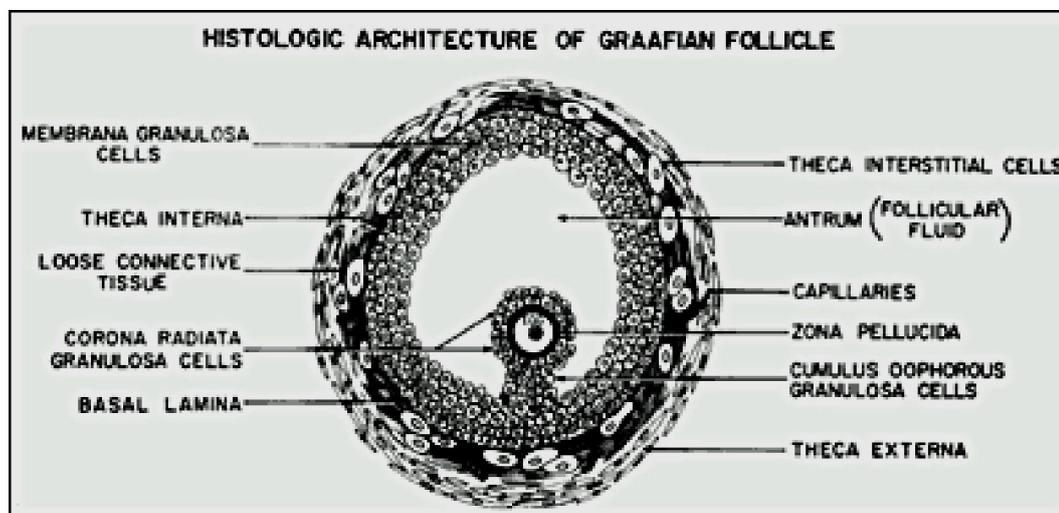


ภาพที่ 9 ภาพวาดการเจริญของฟอลลิเคิลระยะต่างๆ

(<http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm>)

5. กราฟิอัน ฟอลลิเคิล (Graafian follicle) หรือ แอนทรัล ฟอลลิเคิล (Antral follicle) หรือ ฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่ (mature follicle) หรือ follicle de DE Graff (มงคล เตชะกำพูน, 2543) เป็น ฟอลลิเคิลขนาดใหญ่และมีช่องว่างอยู่ภายในซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่จนใกล้จะตก โดยฟอลลิเคิลนี้จะ อยู่บริเวณริมส่วนขอบของรังไข่เป็นฟอลลิเคิลระยะที่สามที่ได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนเอสโตรเจน และแอนโดรเจน จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าทำให้ฟอลลิเคิลระยะที่สามพัฒนาไปเป็นกราฟิอัน ฟอลลิเคิล ซึ่งเซลล์ไข่ระยะแรกภายในขณะนี้พัฒนาเป็นเซลล์ไข่ระยะที่สอง และ primary polar body โดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 1 (meiosis I) พร้อมทั้งจะตกไข่ ขณะที่เซลล์ membrana granulosa ทำหน้าที่หลั่งเอสโตรเจนสู่น้ำในถุงไข่ เพิ่มมากขึ้นและยังส่งผ่านสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยคือ ion nucleotides และกรดอะมิโน ไปสู่เซลล์ไข่ระยะแรกของสัตว์เพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์ สารนี้มีผลยับยั้งการสุกของเซลล์ไข่จึงถูกเรียกว่า oocyte maturation inhibitor (OMI) ผลคือ เซลล์ไข่จะหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะไมโอซิส กล่าวคือ เซลล์ไข่หยุดการพัฒนาอยู่ที่ระยะ diplotene ของโปรเฟส 1

(prophase I) มีผลให้เซลล์ไข่ไม่สามารถพัฒนาสู่เซลล์ไข่ระยะที่สองได้ (Campbell และ Reece, 2002)

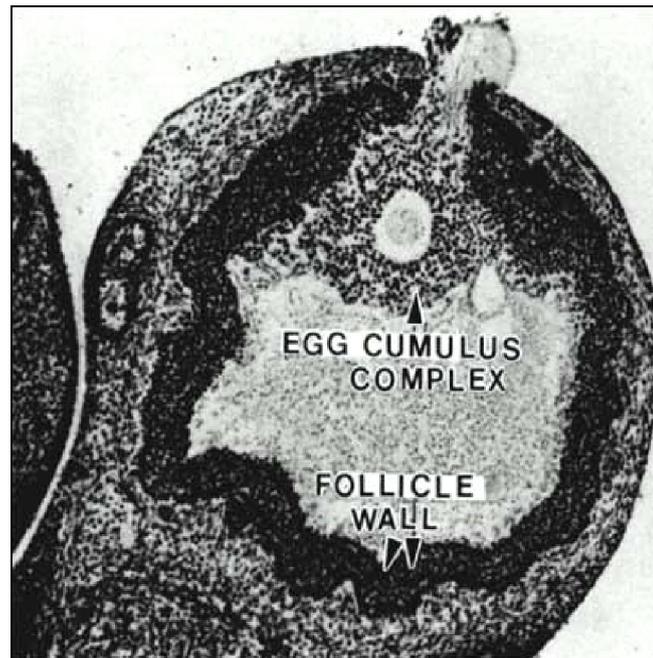


ภาพที่ 10 ภาพวาดเซลล์ไข่ระยะกราฟเฟียน ฟอลลิเคิล

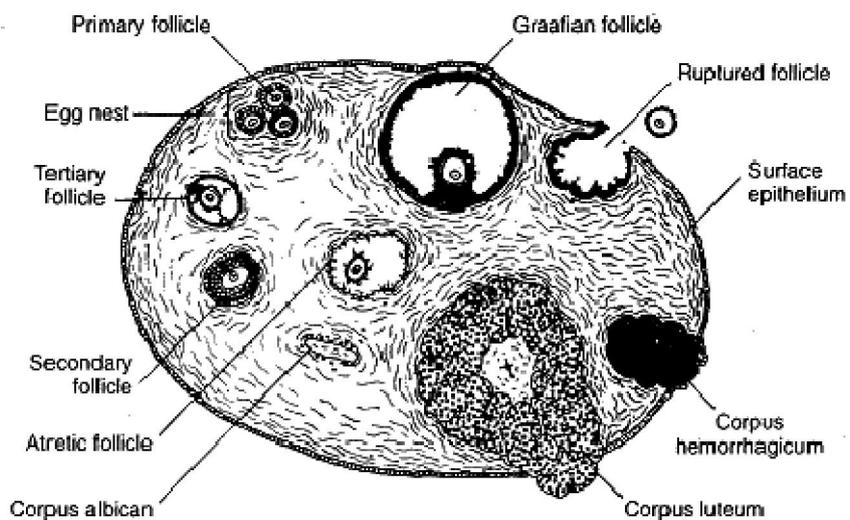
(<http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm>)

สัตว์แต่ละชนิดจะใช้เวลาในการเจริญของฟอลลิเคิลแตกต่างกัน เช่น ในสุกรใช้เวลาประมาณ 84 วัน จากระยะโพรมอติคัล ฟอลลิเคิลจนถึงระยะแอนทรัล ฟอลลิเคิลและอีกประมาณ 21 วันจึงได้ขนาดของไข่พร้อมที่จะตก (มงคล เตชะกำพูน, 2543) ซึ่งฟอลลิเคิลระยะที่สองพบว่าขนาดของเซลล์ไข่จะเพิ่มมากขึ้น ในสุกรมีขนาด 90 ไมโครเมตร การเจริญของฟอลลิเคิลเหล่านี้ นอกจากมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์แกรนูโลซ่าและการสะสมของน้ำในถุงไข่แล้ว โครงสร้างของเซลล์ต่าง ๆ ยังถูกสร้างเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการสร้างเปลือกไซน่า เพลลูซิเดียมหุ้มเซลล์ไข่อีกด้วย

หลังจากเกิดการตกไข่เซลล์แกรนูโลซ่าภายในแอนทรัล ฟอลลิเคิลจะกลายเป็นเซลล์ลูทีนัล เปลี่ยนลักษณะของฟอลลิเคิลเป็นคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม (corpus haemorrhagicum) ในเวลาต่อมา กลายเป็นคอร์ปัส ลูทีนัม และคอร์ปัส อัลบิคัน (corpus albicans) โดยเฉพาะคอร์ปัส ลูทีนัมหรือที่เรียกว่า “ก้อนเนื้อเหลือง” มีความสำคัญต่อช่วงลูทีนัลของวงจรการเป็นสัดและการตั้งท้องโดยทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (มงคล เตชะกำพูน, 2543)



ภาพที่ 11 ภาพเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ขณะเกิดการตกไข่ทะลุผ่านผนังฟอลลิเคิล
 (<http://www.endotext.org/female/female1/femaleframe1.htm>)



ภาพที่ 12 ภาพวาดโครงสร้างภายในรังไข่แสดงให้เห็นระยะต่างๆ ของฟอลลิเคิล
 (<http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap2.html>)

ท่อนำไข่

ท่อนำไข่ (oviduct หรือ fallopian tubes หรือ uterine tubes) ของสุกร (ไพศาล เทียนไทย, 2004) มีความยาวประมาณ 15 ถึง 30 เซนติเมตร (Sisson และ Grossman, 1970) ท่อนำไข่เป็นอวัยวะคู่ที่แขวนอยู่ในช่องท้องโดยมีเยื่อ mesosalpinx ยึดท่อนำไข่กับผนังลำตัว ท่อนำไข่จะถูกขดเป็นวงโดย mesosalpinx ทำให้เกิดกระพุ้งของเยื่อยึดเรียกว่า Ovarian bursa โดยมีรังไข่อยู่ที่ปากกระพุ้ง

แบ่งเป็น 3 ชั้น คือ

1. ชั้นนอก (serous membrane)
2. ชั้นกลางเป็นชั้นกล้ามเนื้อเรียบ (muscular layer)
3. ชั้นใน (mucous membrane)

ผนังด้านในประกอบด้วยเซลล์บุท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells) 2 ชนิด ชนิดแรกคือ เซลล์ทรงกลมที่ไม่มีซีเลีย (non-ciliated round shape epithelial cells) ทำหน้าที่ในการหลั่งของเหลวและปรับสภาพแวดล้อมภายในให้เหมาะสมเพื่อการปฏิสนธิ ชนิดที่สองคือ เซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย (ciliated columnar epithelial cells) ทำหน้าที่คอยพัดโบกเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิที่ผ่านในท่อนำไข่และส่งผ่านตัวอ่อนไปยัง uterine horns ท่อนำไข่สามารถยืดและหดตัวได้มากแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ

1. อินฟันดิบูลัม (infundibulum) เป็นส่วนที่มีผนัง tunica mucosa หนาที่สุด ด้านปลายเป็นพริมเบรีย (frimbriae) หรือปากแตร มีลักษณะคล้ายนิ้วมือเปิดอยู่เป็นทางเข้าใหญ่ และมีส่วนแคบติดอยู่กับปลายของปีกมดลูกในปลายอีกด้านหนึ่ง ซึ่งทำหน้าที่พัดโบกให้เซลล์ไข่ระยะคราเฟียนฟอลลิเคิล ตกลงสู่ช่องว่างของท่อนำไข่

2. แอมพูล่า มีลักษณะค่อนข้างตรง เป็นส่วนที่มี tunica mucosa หนาและยาวมากที่สุด ด้านปลายติดกับอิสทมัส เรียกส่วนนี้ว่า แอมพูลารี อิสทมัส จังก์ชัน (ampullary - isthmus junction: AIJ) การปฏิสนธิเกิดขึ้นที่ส่วนนี้

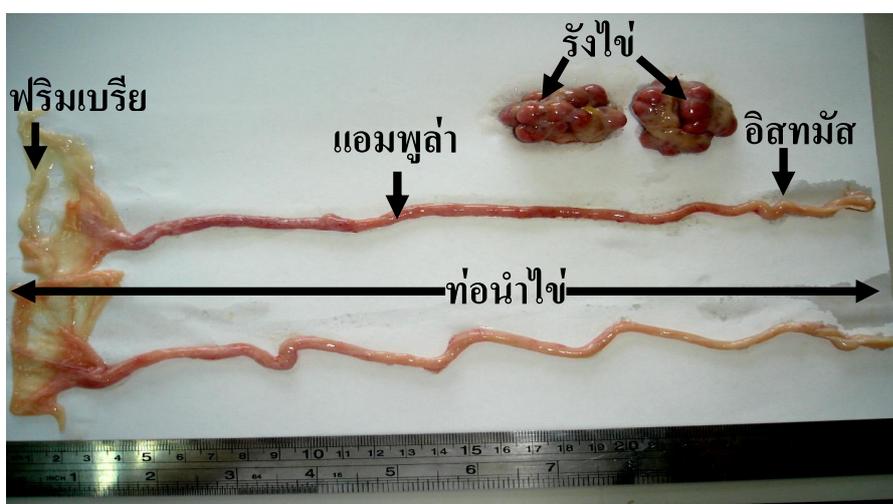
3. อิสทมัส เป็นส่วนที่ต่อจากแอมพูล่าโดยมีปลายอีกด้านเชื่อมกับปีกมดลูกตรงส่วนที่เรียกว่า Uterotubal junction ท่อมีขนาดเล็กและมีผนัง tunica muscularis ที่หนา ท่อส่วนนี้เป็นทางผ่านของตัวอ่อนหลังจากที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วผ่าน uterine horns ไปยังมดลูก (Campbell และ Reece, 2002)

ถ้าหากมีการอุดตันของท่อนำไข่หรือเกิดการงอและปิดกั้นทางส่งผ่านแล้วอาจจะทำให้การผสมติดต่ำ Kunavongkrit และคณะ (1987) รายงานความผิดปกติของท่อนำไข่จากสุกรสาวส่งโรงฆ่าจำนวน 1,000 ตัว พบว่า ร้อยละ 4 มีความผิดปกติพบถึง ร้อยละ 3.9 มีการงอและติดกันของ

ท่อนำไข่ และร้อยละ 0.1 ท่อนำไข่มีสภาพเป็นถุงน้ำ (hydrosalpinx) ใน 2 กรณี ดังกล่าวจะทำให้สภาพการผสมติดต่ำลงด้วย

หน้าที่ของท่อนำไข่

นำเซลล์ไข่ที่ตกจากรังไข่และอสุจิมาพบกันที่ท่อนำไข่ในทิศทางที่ตรงกันข้ามกัน ฟริมเบรียจะเป็นส่วนที่โบกพัดให้เซลล์ไข่ตกลงในอินฟินิตูบลัมจากนั้นไข่จะถูกส่งต่อไปยังแอมพูล่าซึ่งเป็นส่วนที่ต่อกับอีสทมัสและจะเกิดการปฏิสนธิกับอสุจิที่ส่วนแอมพูล่า



ภาพที่ 13 ท่อนำไข่ส่วนแอมพูล่า อีสทมัส และรังไข่ของสุกรที่ใช้ในงานวิจัย

มดลูก (uterus)

มดลูกสุกรประกอบด้วยส่วนตัวมดลูก ซึ่งมีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตรและปีกมดลูก มีความยาวและยืดหยุ่นได้ยาวประมาณ 1.0 ถึง 1.5 เมตร แต่ปีกมดลูกมักจะขดกันอยู่ลักษณะคล้ายกับลำไส้ที่มีผนังหนา ด้านนอกของมดลูกจะติดอยู่กับผนังพังผืดในช่องท้อง มีต่อมน้ำเหลืองติดอยู่ มีหลอดเลือดแดงและดำมากมาย ซึ่งเป็นหลอดเลือดขนาดเล็ก น้ำหนักของมดลูกมีตั้งแต่ 153 ถึง 263 กรัม ในสุกรสาว ซึ่งแล้วแต่ระยะของวงจรการสืบพันธุ์ในสุกรตัวนั้น

หน้าที่ของมดลูกคือ เป็นที่ฝังตัวของตัวอ่อน (embryo) ในบริเวณปีกมดลูกและมีการควบคุมทำให้มีการตั้งท้องโดยสมบูรณ์ ส่งผ่านอาหารมาเลี้ยงลูกในท้องระยะฟิตัส (fetus) จนครบ

กำหนดการตั้งท้องนอกจากนี้ปีกมดลูกทั้งสองข้างยังมีการส่งสลับตัวอ่อน จากด้านซ้ายและขวา สลับไปมาได้อีกด้วย ขึ้นกับจำนวนลูกอ่อนของการปฏิสนธิในปีกมดลูกแต่ละด้าน (Kunavongkrit และ Larsson, 1982)

ปากมดลูก (cervix)

เป็นส่วนที่ต่อจากมดลูก มีความยาวประมาณ 10 ถึง 15 เซนติเมตร และต่อไปยังช่องคลอด โดยไม่มีส่วนยื่นเข้าไปในส่วนช่องคลอดเลย ซึ่งส่วนของปากมดลูกจะแยกได้จากส่วนของช่องคลอด โดยคูที่ผนังจะมีผนังหนากว่าและมีปุ่มกลมอยู่ในผนังด้านใน ซึ่งจะเป็นตัวที่คอยกระชับปลายลิ้นค้ำของสุกรเพศผู้ เมื่อทำการผสมพันธุ์และทำให้มีการหลั่งน้ำเชื้อได้ โดยการกระชับให้ปลายลิ้นค้ำเข้าที่หรือติดแน่นได้ มักจะพบในช่วงระยะการเป็นสัดเท่านั้นที่ทำให้ปากมดลูกมีการแข็งตัว ซึ่งเป็นอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Rigby, 1967; Kunavongkrit และคณะ, 1983)

หน้าที่ของปากมดลูกในสุกร นอกจากจะป้องกันเชื้อโรคไม่ให้เข้าไปในมดลูกแล้ว ยังเป็นจุดที่ปล่อยน้ำเชื้อของพ่อสุกรเมื่อผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ และเป็นที่กักไม่ให้น้ำเชื้อมีการไหลกลับด้วยในขณะที่ผสมพันธุ์

ช่องคลอด (vagina)

เป็นต่อต่อจากส่วนของปากมดลูกมีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งประกอบด้วยกล้ามเนื้อหนา 2 ชั้น ส่วนผนังด้านในเป็นเยื่อเมือก (mucous membrane) เป็นประเภทไม่มีต่อม (nonglandular epithelium) (อรรถนพ คุณาวงกต, 2545)

หน้าที่ของช่องคลอด เป็นอวัยวะที่ใช้ในการผสมพันธุ์และเป็นทางออกของลูกสุกรเมื่อคลอด

ปากช่องคลอด (vulva)

เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า อวัยวะเพศภายนอก (external genitalia) (กัมพล แก้วเกษ, 2548) ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นต่อต่อกับช่องคลอดยาวประมาณ 7 ถึง 8 เซนติเมตร มีส่วนที่มีต่อมขับน้ำหล่อลื่น (vestibular glands) ซึ่งจะมีการทำงานมากในช่วงการเป็นสัด นอกจากส่วนที่เป็นต่อแล้ว

ยังมีอีก 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นแคม (labia) ซึ่งมักจะหนาและยื่น และในแอ่งของแคมด้านล่างจะมี ปุ่มคลิโตริส (clitoris) อยู่ในแอ่ง

หน้าที่ เป็นปากทางเปิดของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย มีการหลั่งน้ำหล่อลื่นบ้าง เพื่อให้สะดวกในการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติเมื่อสัตว์เพศเมียเป็นสัด

5. วงจรการสืบพันธุ์ของสุกร

วงจรการสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียเริ่มมีการพัฒนาโดยรังไข่ของลูกสุกรจะสร้างถุงหุ้มไข่เป็นแบบปฐมภูมิตั้งแต่อยู่ในท้องแม่ หลังจากนั้น 70 วัน รังไข่จะเป็นแบบทุติยภูมิ หลังจากคลอดลูกสุกรที่มีอายุ 2 เดือนรังไข่จะเป็นแบบตติยภูมิ และจะเริ่มพัฒนาอย่างรวดเร็ว เมื่อลูกสุกรอายุได้ 70 ถึง 100 วัน แต่ถุงหุ้มไข่ยังมีขนาดเล็ก 1 ถึง 3 มิลลิเมตร และจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ เป็นสัดส่วนกับน้ำหนักตัว จนกระทั่งโตเต็มวัยขนาดของมดลูกจะใหญ่ขึ้นตามอายุ ภายหลังจากสุกรเจริญเติบโตเต็มที่จนเข้าสู่การเป็นหนุ่มเป็นสาวแล้ว จะถูกควบคุมโดยการทำงานของฮอร์โมนจากสมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งผลิตฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอช ในขณะที่สัตว์ยังเล็กอยู่สมองส่วนนี้จะมีการพักตัว เมื่อร่างกายเจริญเติบโตขึ้นและอายุเข้าเกณฑ์ สมองส่วนนี้จะผลิตฮอร์โมนทั้งสองตัวเข้าควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้การผลิตฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอชเพิ่มขึ้น ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้จะเข้าควบคุมการทำงานของรังไข่และลูกอันทะทันที ซึ่งฮอร์โมนเอฟเอสเอชจะกระตุ้นให้มีการสร้างถุงหุ้มไข่และการตกของไข่ในที่สุด การเพิ่มของฮอร์โมน แอลเอชจะเพิ่มตั้งแต่ 4 สัปดาห์ก่อนการเป็นสัด (heat) ครั้งแรกอย่างต่อเนื่องที่ละน้อย จนกระทั่งเป็นสัด (Anderson และคณะ, 1983) และระดับของเอสโตรเจนจะเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ถึง 6 วัน ก่อนเป็นสัดครั้งแรกเท่านั้น ซึ่งไม่มีการขึ้นลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนมาก่อน ถ้ามีการผสมพันธุ์จะทำให้รังไข่ผลิตฮอร์โมน เพศเมีย เพื่อแสดงอาการเป็นสัดและเตรียมมดลูกให้พร้อมตามปกติสุกรเพศเมียจะเริ่มมีการตกของไข่และเป็นสัดรวมทั้งมีการยอมรับเพศผู้ เมื่อโตเต็มวัยอายุประมาณ 180 ถึง 200 วัน หรือ 6 ถึง 7 เดือน แต่ไม่ควรทำการผสมก่อนอายุ 6 เดือน (ควรมีน้ำหนัก 90 กิโลกรัม) เพราะการเป็นสัดครั้งที่ 2 และ 3 จะมีการตกของไข่เพิ่มขึ้นกว่าครั้งแรก หลังจากนั้นจะคงที่ (16 ถึง 18 ฟอง) ในระยะนี้ถ้ามีการสังเกตดูอวัยวะภายนอกของอวัยวะสืบพันธุ์ สำหรับเพศเมียจะพบว่ามีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกและเต้านมมีขนาดเติบโตได้รูปร่างและสัดส่วน แสดงว่ามีการทำงานของฮอร์โมนในการสืบพันธุ์เป็นไปโดยปกติส่วนแม่สุกรมักจะเป็นสัดภายใน 1 สัปดาห์หลังหย่านมลูก สำหรับรอบการเป็นสัด (estrous cycle) ของสุกรเฉลี่ย 21 วัน (ช่วง 19 ถึง 23 วัน) อรรถพ คุณาวงกต (2545) รายงานว่ามีสุกรบางตัวแสดงการเป็นสัดเกือบ

หรือไม่เป็นสัดในฤดูกาลที่ร้อน การให้อาหารและการจัดการดีไม่สามารถย่นระยะวงจรการเป็นสัดลงได้ ในรอบการเป็นสัดจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศ พบว่ารังไข่ผลิตฮอร์โมนที่แตกต่างกันในแต่ละช่วง ซึ่งฮอร์โมนเพศที่เกี่ยวข้องมีโปรเจสเตอโรน เอสโตรเจน เอพเอสเอช แอลเอช และโปรสตาแกลนดิน (prostaglandin) ฮอร์โมนเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในรังไข่ในแต่ละช่วงของการเป็นสัด

ระยะการเป็นสัดในสุกรนั้นขึ้นอยู่กับว่าเป็นสุกรสาวหรือแม่สุกร ในสุกรสาวมักจะสั้นคือประมาณ 1 วันเท่านั้น ส่วนในแม่สุกรประมาณ 2 ถึง 3 วัน (24 ถึง 72 ชั่วโมง) (Wrathall, 1980) แม่สุกรอาจจะแสดงอาการเป็นสัดหลังคลอด (postpartum estrus) โดยไม่มีการตกไข่ ซึ่งพบหลังคลอด 2-5 วัน การเป็นสัดหลังคลอดนี้ เนื่องจากการลดระดับของโปรเจสเตอโรนในขณะที่ระดับของเอสโตรเจนในกระแสเลือดเพิ่งจะลดลง เนื่องจากการขับรกออก (Kunavongkrit และคณะ, 1983a)

กรณีผสมไม่ติดสุกรจะกลับเป็นสัดใหม่ทุก 21 วัน เรียกว่า วงรอบของการเป็นสัด ถ้าตั้งท้องหลังคลอดแล้วประมาณ 9 วัน จะเริ่มวงรอบของการเป็นสัดใหม่ ในการผสมพันธุ์สุกรเพศเมียต้องการน้ำเชื้อสูงถึง 50 มิลลิลิตร เป็นอย่างน้อยต่อการผสม เนื่องจากปีกมดลูกของสุกรเพศเมียใหญ่และยาว รวมทั้งมีการตกไข่คราวละมาก ๆ จึงทำให้อัตราการผสมติดสูง ไม่ควรใช้พ่อพันธุ์ผสมมากกว่าสัปดาห์ละ 2 ถึง 3 ครั้ง เพราะจะทำให้น้ำเชื้อลดปริมาณลง รวมทั้งความหนาแน่นด้วย

ตารางที่ 1. แสดงระยะเวลาในการสืบพันธุ์ของแม่สุกร

เหตุการณ์	ระยะเวลา (วัน)
รอบการเป็นสัด	21
เป็นสัดครั้งแรก	210 หรือระยะ 180-250
ผสมพันธุ์ครั้งแรก	260
ระยะเวลาอุ้มท้อง	114
ระยะเวลาในการให้นมลูก	28
ระยะจากหย่านมถึงผสมติด	15

วงจรการเป็นสัดแบ่งเป็นระยะต่างๆ มีการเจริญของฟอลลิเคิลตามลำดับซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนชนิดในกระแสเลือดที่สร้างมาจากต่อมใต้สมอง ได้แก่ ฮอร์โมนเอสโตรเจน เอพเอสเอช และแอลเอช ทำให้การเจริญของฟอลลิเคิล แบ่งเป็น 2 ระยะ

1. ระยะเวลาฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) เป็นช่วงที่โกสติกไข่คอร์ปัส ลูเทียมสลาย ทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอยู่ในระดับต่ำ ฮอร์โมนแอลเอชมีการหลั่งออกมาในลักษณะของความถี่สูงมาก (high frequency) ช่วยให้ฟอลลิเคิลเจริญจนเกิดการตกไข่ได้ นอกจากนี้ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตจากฟอลลิเคิลมีขนาดเพิ่มขึ้นมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิด preovulatory LH surge ทำให้เกิดการตกไข่



ภาพที่ 14 รังไข่และก่อนไข่ในระยะฟอลลิคูลาร์

2. ระยะเวลาลูเทียล (luteal phase) จะมีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่ปรากฏตัวขึ้นมาแต่ไม่สามารถเจริญต่อไปจนตกไข่จึงเกิดการเสื่อมลง เนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่หลั่งจากคอร์ปัส ลูเทียมในระดับสูง ในระยะลูเทียลไปลดความถี่ของ LH pulses และ GnRH pulses ทำให้ไม่มีฮอร์โมนแอลเอชในความถี่ที่สูงเพียงพอ (low frequency) ที่จะกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ได้



ภาพที่ 15 รังไข่และท่อนำไข่ในระยะลูติเยล

รอบการเป็นสัด (Estrous Cycle) ในสุนัข แบ่งเป็น 4 ระยะ

1. ระยะก่อนการเป็นสัด (Proestrous) มีระยะเวลาประมาณ 4 วัน โดยที่คอร์ปัส ลูติเยมจะสลายตัว ระดับโปรเจสเตอโรนลดลง เอพเอสเอสและแอลเอสเอสมีการหมุนเวียนมากขึ้น ทำให้เซลล์ไข่เจริญเติบโตซึ่งขึ้นอยู่กับฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้ เซลล์ที่กำขึ้นในจะผลิตฮอร์โมนเพศเมียมากขึ้น ทำให้สุนัขเข้าสู่ระยะที่ 2

2. ระยะเป็นสัด (Estrous or heat) มีระยะเวลาประมาณ 2 ถึง 4 วัน เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อระบบประสาท ทำให้เพศเมียแสดงอาการยอมรับเพศผู้ในการผสมพันธุ์ อวัยวะเพศบวมแดงเนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์และการคั่งของโลหิตเกิดการตกไข่ ในตอนปลายๆ ของการเป็นสัด (ครึ่งหลังของการเริ่มเป็นสัดไปแล้ว 18 ถึง 36 ชั่วโมง) ในการผสมควรผสม 2 ครั้งห่างกัน 12 ถึง 24 ชั่วโมง

3. ระยะหลังการเป็นสัด (Metestrous) มีระยะเวลานานประมาณ 5 ถึง 7 วัน เป็นระยะเวลาที่เกิดการขยายตัวของคอร์ปัส ลูติเยม การผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนลดระดับลง ทำให้อวัยวะเพศหายบวมแดง แต่มีการเจริญของเซลล์เยื่อบุผนังมดลูกภายใน โดยอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพื่อเตรียมรับตัวอ่อน และการบีบตัวของมดลูกลดลง

4. ระยะพักตัว (Diestrous) มีระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 10 วัน คอร์ปัส ลูติเยมคงอยู่ในระยะต้นๆ เมื่อไข่ไม่ได้รับการผสมคอร์ปัส ลูติเยมจะสลายตัวในวันที่ 15 ถึง 16 ของวงรอบ และภายหลังจากนั้น

วงรอบใหม่จะเริ่มขึ้น ถ้าไข่มีการผสมพันธุ์และตัวอ่อนของไข่มีการเจริญเติบโตต่อไปคอร์ปัสคูลูเทียมจะคงสภาพอยู่ ซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของรกและตัวอ่อน ตัวอ่อนก็สามารถพัฒนาตัวเองต่อไป เซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะตายภายใน 8 ชั่วโมงหลังตกไข่ และสลายตัวไปในที่สุด

ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ (time for breeding) การเป็นสัดเกิดขึ้นประมาณ 2 ถึง 3 วันหลังคลอดแต่ไม่ควรผสม เพราะถ้าสุกรให้นมจะไม่มีการตกของไข่ ยกเว้นแต่ลูกสุกรตายหมด ซึ่งก็ไม่ควรผสม ควรรอให้มดลูกได้พักตัวก่อน ประมาณ 28 ถึง 45 วันหลังคลอด

การตกไข่

ในสุกรเป็นการตกไข่ตามธรรมชาติ (spontaneous ovulation) (มงคล เตชะกำพูน, 2543) ซึ่งเกิดขึ้นก่อนหมดการเป็นสัด ประมาณช่วงปลายของการเป็นสัดประมาณ 24 ถึง 30 ชั่วโมง เวลาในการตกไข่มีความสำคัญมากต่อการผสมพันธุ์สัตว์ การผสมในช่วงที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการผสมไม่ติดหรือไม่มีตัวอ่อนหรือตัวอ่อนที่ได้มีคุณภาพไม่ดี (มงคล เตชะกำพูน, 2543) การตกไข่จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนออกมาจากฟอลลิเคิลในปริมาณที่สูง ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดปริมาณแอลเอสสูง ซึ่งพบได้ประมาณ 36 ถึง 42 ชั่วโมง ก่อนที่จะเกิดการตกไข่เกิดขึ้น ช่วงระยะเวลาทั้งหมดตั้งแต่เกิดการตกไข่ (duration of ovulation) ไข่แรกจนถึงไข่สุดท้ายใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ระยะเวลาในการตกไข่เริ่มตั้งแต่สุกรเริ่มขึ้นนิ่ง (onset of estrous) จนถึงเกิดการตกไข่มีความแตกต่างกันระหว่าง สุกรสาวและแม่สุกร คือ ในสุกรสาวจะใช้เวลาประมาณ 32 ชั่วโมง และแม่สุกรใช้เวลาประมาณ 40 ชั่วโมง นอกจากนี้ระยะเวลาในการตกไข่ในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัดจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่โดยทั่วไปประมาณกันว่าการตกไข่เกิดขึ้น 2 ใน 3 ของระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการขึ้นนิ่ง (duration of estrous) (กัมพล แก้วเกษ, 2548) และระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการขึ้นนิ่งนั้นแปรผันตามระยะเวลาตั้งแต่หย่านมจนถึงสุกรเริ่มแสดงอาการขึ้นนิ่ง กล่าวคือ สุกรตัวโตมีอาการขึ้นนิ่ง (ประมาณ 3 วัน) จะแสดงอาการเป็นสัดนาน (long estrous duration) และทำให้ระยะเวลาในการตกไข่ (เกิดขึ้น 2 ใน 3 ของ duration of oestrus) นานกว่ากลุ่มสุกรที่มีอาการนี้ยาว (5 ถึง 7 วันมี short duration of oestrus) ดังนั้นจะเห็นว่าระยะเวลาในการตกไข่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเซลล์ไข่มีอายุสั้น เพียง 8 ถึง 12 ชั่วโมง (อาจถึง 18 ชั่วโมง) หลังการตกไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอสุจิที่มีอายุได้ประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากเข้าไปในโพรงมดลูก เพราะฉะนั้นถ้าระยะเวลาที่ทำการผสมสุกรไม่เหมาะสมจะทำให้ไม่เกิดการปฏิสนธิหรือเกิดขึ้นได้แต่ตัวอ่อนไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ (อาจมีอายุได้แค่ประมาณ 11 วัน) หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ตายไป ดังนั้นเวลาจะผสมสุกรควรทำการผสมอย่างน้อยหนึ่งครั้ง ก่อนที่จะเกิดการตกไข่

(24 ชั่วโมงก่อนการตกไข่) เนื่องจากตัวอสุจิของสุกรต้องใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 6 ชั่วโมง จึงจะมีความสามารถในการที่จะปฏิสนธิกับโอโอไซต์ได้ อัตราการตกไข่ของสุกรเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดขนาดของขนาดครอก (litter size) ในรังไข่ของสุกรมีฟอลลิเคิลหลายร้อยใบในวงรอบของการเป็นสัด แต่จะมีฟอลลิเคิลเพียง 10 ถึง 20 ใบเท่านั้น ที่จะเติบโตไปเป็น pre-ovulatory follicles (เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 ถึง 10 มิลลิเมตร) ในสุกรสาวจะมีอัตราการตกไข่น้อยกว่าในแม่สุกร (8 ถึง 10 กับ 10 ถึง 20) ซึ่งตรงกับ Anderson และคณะ (1983) รายงานว่าสภาพการตกไข่ไม่เท่ากัน โดยการตกไข่มีมากขึ้นเมื่อเป็นสัดครั้งหลังๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ การตกไข่ครั้งแรก

6. การเลี้ยงเซลล์ไข่และเซลล์บู่ท่อนำไข่ในห้องปฏิบัติการ

Yoshimura และคณะ (1989) พบว่าฮอร์โมนโพรแลคติน (prolactin) เอฟเอสเอช แอลเอช และเอสโตรเจน มีผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่กระต่าย ในการทำเซลล์ไข่ให้สุกในจานแก้วได้มากขึ้น

Saeki และคณะ (1991) พบว่าการเสริมฮอร์โมนเอฟเอสเอช แอลเอชและเอสโตรเจน ในอาหารเพาะเลี้ยงสำหรับเลี้ยงเซลล์ไข่มีผลทำให้เซลล์ไข่วัวเจริญพัฒนามากขึ้นและมีผลไปเพิ่มการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst) เพิ่มขึ้นด้วย

มงคล และคณะ (1993) รายงานว่าในการผลิตตัวอ่อนสุกรด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยการเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เก็บจากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาว สามารถอยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงได้โดยเลี้ยงในน้ำยา TCM 199 + NaHCO_3 ใน 10% FCS ที่มีฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอช 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 17 β Estradiol 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ GC และ CC นาน 40 ชั่วโมง ทำให้เซลล์ไข่สุกพร้อมที่จะปฏิสนธิภายนอกกับตัวอสุจิได้เป็นตัวอ่อน

Mori และคณะ (2000) รายงานว่า COCs ของสุกรชนิดที่หนึ่งและสองที่นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ TCM-199 ที่เสริมด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอชสามารถพัฒนาเซลล์ไข่ให้สุกได้สูงขึ้น

Suzuki และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ CC ขณะที่มีการสุกของเซลล์ไข่ที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยง พบว่าในชั่วโมงที่ 44 (อยู่ในช่วง M-I และ M-II stage) ของการเพาะเลี้ยง เซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่แยกตัวออกจากเซลล์ไข่ ซึ่งเซลล์ไข่อยู่ในช่วงกำลังจะเจริญสมบูรณ์ และพบว่ายัง

มีการเกาะกันอยู่ระหว่างเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไขเอง (cumulus – cumulus communications) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ทางชีวภาพของเซลล์ที่เกาะกันนี้

Funahashi และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของโซน่า เพลลูซิดำในเซลล์ไขของสุกรหลังการปฏิสนธิในสภาพธรรมชาติและในสภาพเพาะเลี้ยง โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไขในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เสริมด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอช

Lucidi และคณะ (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสเตียรอยด์ของ CC ซึ่งมีอิทธิพลต่อการสุกของไข โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไขในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอชมีวิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่าเซลล์ไขที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไขที่มีคุณภาพดีมีความสามารถในการสร้างสเตียรอยด์ได้ดีจะลดความล้มเหลวในการทำเซลล์เทคโน โลยีในเรื่องการถ่ายฝากตัวอ่อนเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิของเซลล์เพื่อพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน

Wetscher และคณะ (2005) ศึกษาการย้ายฝากตัวอ่อนระยะแรกของโคเพื่อนำมาเลี้ยงต่อในสภาพธรรมชาติ โดยเลือก COCs ของโคขนาด 2-8 มิลลิเมตรมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร M199 สามารถทำให้เซลล์ไขของโคสุกพร้อมที่จะปฏิสนธิได้ในสภาพเพาะเลี้ยงจนพัฒนาอยู่ในระยะบลาสโตซิสพร้อมที่จะถ่ายฝากตัวอ่อนได้

Romar และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของท่อนำไขและเซลล์คัมมูลัสที่อยู่บริเวณโซน่า-เพลลูซิดำและเนื้อเยื่อบริเวณรอบเซลล์ไข (cortical granules) ต่อการปฏิสนธิของอสุจิในสภาพเพาะเลี้ยง ในการศึกษาได้นำเซลล์บุท่อนำไขของสุกรมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 ในเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองซึ่งมีเซลล์ไขที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโซน่า เพลลูซิดำและเนื้อเยื่อบริเวณรอบเซลล์ไข

Somfai และคณะ (2005) ศึกษาการพัฒนาระยะบลาสโตซิสในเซลล์ไขสุกรที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิเหนี่ยวรั้งก่อนเข้าสู่ระยะเมทาเฟส II และปฏิสนธิในสภาพเพาะเลี้ยง ซึ่งได้เลือกเซลล์ไขสุกรที่มี CC ล้อมรอบขนาด 3 ถึง 6 มิลลิเมตรเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 ซึ่งพบว่าให้ผลดีเซลล์ไขสามารถสุกและปฏิสนธิได้ดี

Areekijserree และ Vejaratpimol (2006) ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ ฐานานวิทยา และลักษณะโปรตีนที่หลังจากเซลล์บูท่อนำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร พบว่า การเพาะเลี้ยง เซลล์ในอาหาร M199, RPMI 1640 และ DMEM ที่เสริมด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอส แอลเอส และเอสโตรเจน ให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ดีมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์สูง สามารถทำได้จริงไม่ สิ้นเปลืองเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย

Vannucchi และคณะ (2006) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่และเซลล์บูท่อนำไข่ของสุนัข ร่วมกับการใช้อาหารเพาะเลี้ยงผสมฮอร์โมนในสภาพเพาะเลี้ยง โดยนำเซลล์ไข่และเซลล์บูท่อนำไข่ ของสุนัขมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เป็นกลุ่มควบคุม อีก 3 กลุ่มเพาะเลี้ยงด้วย อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 และเสริมฮอร์โมน กลุ่มที่ 2 เสริมฮอร์โมนเอสโตรเจน กลุ่มที่ 3 เสริม ด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน กลุ่มที่ 4 เสริมทั้งฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน จาก การศึกษาพบว่าเซลล์ไข่นำมาเพาะเลี้ยงสามารถสุกพร้อมปฏิสนธิได้ในอัตราสูงสุดในกลุ่มที่ 2 ในช่วง 72 ถึง 96 ชั่วโมง แต่เปอร์เซ็นต์การเสื่อมของเซลล์ไข่ก็มีอัตราสูงกว่าในกลุ่มอื่นอย่างมี นัยสำคัญ ซึ่ง Vannucchi และคณะ ได้ให้ความเห็นว่าความแตกต่างของวงจรการเป็นสัดในสุนัขที่ นำเซลล์ไข่มาร่วมการศึกษาก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีความแตกต่างกันได้

Bogliolo และคณะ (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ฐานานวิทยาและชีวเคมีของเซลล์ไข่แกะที่ยังโต ไม่เต็มวัยที่เปลี่ยนแปลงซึ่งมีและไม่มี CC ได้ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ไข่แกะโดยใช้อาหาร เพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง หลังจากเซลล์ไข่แกะสุกเต็มที่พร้อมที่จะผสมได้ ช่วงเวลา 0, 2 และ 6 ชั่วโมง ต่อมาจึงแยก CC ออกเป็นเซลล์ไข่ชนิดไม่มีคูมัลล์ล้อมรอบกลุ่มหนึ่ง อีกกลุ่มหนึ่งยังคงมี CC ล้อมรอบ ในกลุ่มแรกเซลล์ที่ไม่มีคูมัลล์ล้อมรอบจะถูกเลี้ยงร่วมกับ CC ที่ แยกจาก COCs ใหม่ ๆ จำนวน 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M 199 สามารถทำให้เซลล์ไข่ของแกะสุกได้

Chen และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกรังไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไข่ สุกในสภาพเพาะเลี้ยงจนเซลล์ไข่สุกสามารถปฏิสนธิและมีการพัฒนาของตัวอ่อนได้ ซึ่งใน การศึกษาได้เลี้ยงเซลล์ไข่สุกในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 ที่ไม่มีฮอร์โมนและที่มีฮอร์โมนนาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกรังไข่นาน 44 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้ พบว่าการเลี้ยงร่วมกับเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกรังไข่ช่วยเพิ่มการสุกของเซลล์ไข่สุกร

Mossa และคณะ (2007) ศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่จากจำนวนรังไข่ที่มี فولลิเคิลมากมีผลต่อการเพิ่มตัวอ่อนของแพะในสภาพเพาะเลี้ยง โดยการตัด فولลิเคิลจากรังไข่ของแพะให้บางลงเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 ที่เสริมด้วยฮอร์โมนเอเอสเอชและแอลเอช ซึ่ง فولลิเคิลมี COCs ที่เพาะเลี้ยงถูกทำให้สุกพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ ผลจากการศึกษาพบว่ารังไข่ที่มีจำนวน فولลิเคิลมากทำให้มีการเพิ่มของตัวอ่อนของแพะในหลอดทดลอง แต่ไม่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์

Gomez และคณะ (2008) ศึกษาเกี่ยวกับอาหารเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ไม่มีซีรัมจะปรับปรุงการรอดชีวิตของตัวอ่อน โคระยะบลาสโตซิสต์ให้เปลี่ยนแปลง โดยได้นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เลี้ยงเซลล์ไข่ที่มีคูมูลัสล้อมรอบนาน 48 ชั่วโมงจนเซลล์ไข่สุกสามารถปฏิสนธิได้

Pereira และคณะ (2008) ศึกษาผลของโปรเจสเตอโรน โดยใช้ตัวอ่อนและการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นแบบจำลองการเรียนรู้ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด คือ GC และเซลล์บุท่อนำไข่ของโคโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 ซึ่งเสริมด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ใน GC และไม่เสริมฮอร์โมนในการเลี้ยงเซลล์บุท่อนำไข่โคซึ่งเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนโค ผลจากการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าไม่มีอันตรายต่อการพัฒนาของตัวอ่อน

McElroy และคณะ (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ กับการถ่ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์และการแสดงออกของ mRNA ก่อนการฝังตัวอ่อนของสุกร ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์ล้อมรอบโดยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วยสารอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีสารอาหารที่แตกต่างกัน มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในสภาพเพาะเลี้ยงและมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในระดับยีนเมื่อเปรียบเทียบกับบลาสโตซิสต์ในสภาพธรรมชาติ

บทที่ 3

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 1.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
- 1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereomicroscope)
- 1.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope: TEM)
- 1.4 เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ XCell SureLock™ Mini-Cell (invitrogen)
- 1.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดัน (autoclave)
- 1.6 ตู้อบ (hot air oven)
- 1.7 ตู้ป้อน (incubator)
- 1.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.9 กระบอกฉีดยา (syringe)
- 1.10 เข็มฉีดยาเบอร์ 18 (disposable needle)
- 1.11 ชุดเครื่องมือผ่าตัด
- 1.12 พาราฟิล์ม (parafilm)
- 1.13 จานเพาะเลี้ยง (falcon dish)
- 1.14 จานแก้ว (petri dish)
- 1.15 พาสเจอร์ปิเปต (paster pipette)
- 1.16 แคปซูลบีม (BEEM capsule)
- 1.17 บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 200 มิลลิลิตร
- 1.18 กระจกปิดสไลด์ (cover slips)
- 1.19 กระจกสไลด์ (slide)
- 1.20 ผ้าก๊อซ (gauze)
- 1.21 ที่วางตัวอย่าง (stub)
- 1.22 ปากคีบ (tweezer) ปลายแหลม

- 1.23 ไมโครปิเปต (micro pipette)
- 1.24 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- 1.25 เครื่องชั่งสารแบบละเอียด
- 1.26 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 1.27 ตู้ดูดความชื้น (desiccator)
- 1.28 เครื่องตัดกระจก (knife maker)
- 1.29 มีดแก้วหรือมีดกระจก (glass knife)
- 1.30 กริด (grid)
- 1.31 เครื่องฉาบผิวด้วยโลหะ (ion sputter)
- 1.32 เครื่องตัดตัวอย่างให้บาง (ultramicrotome)
- 1.33 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
- 1.34 เครื่องวิเคราะห์มวลสาร (Mass spectrometer)
- 1.35 เทปคาร์บอน (carbon tape)
- 1.36 แคปทิวป์ (cap tube)
- 1.37 ตู้เย็น (Freezer -20° C)
- 1.38 เครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer: Model 7800, Jasco Ltd., Japan)
- 1.39 เครื่องเขย่าผสมสารเคมี (Vortex mixer: Science Industries)
- 1.40 ท่วงโลหะ (loop)

2. สารเคมี

- 2.1 เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol)
- 2.2 น้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (0.9 % normal saline solution)
- 2.3 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)
- 2.4 น้ำกลั่น (distilled water)
- 2.5 กลูตาราลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (2.5% glutaraldehyde)
- 2.6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M phosphate buffered pH 7.2)
- 2.7 ออสเมียมเตตรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (1% osmium tetroxide : OsO₄)
- 2.8 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin)
- 2.9 สารละลายฟีนอล (Folin phenol reagent)

- 2.10 สารละลายอัลคาไลน์ คอปเปอร์ (alkaline copper)
- 2.11 โซเดียม คาร์บอเนต (sodium carbonate)
- 2.12 กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ (10% w/v glycerol)
- 2.13 โบรโมฟีนอล บลู 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% w/v Bromophenol blue)
- 2.14 เลดซิเตรท 0.5 เปอร์เซ็นต์ (0.5% lead citrate)
- 2.15 สเปร์เรซิน (Spurr's resin)
- 2.16 โทลูอิดีน บลู 1 เปอร์เซ็นต์ (1 % toluidine blue)
- 2.17 ยูรานิล อะซิเตท 2 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ (2% uranyl acetate in 50 % methanol)
- 2.18 อะซีโตน (acetone)
- 2.19 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ต่อลิตร (NaOH 0.1 M/l)
- 2.20 โพแทสเซียม 1 เปอร์เซ็นต์ (1% w/v potassium)
- 2.21 คูมัสซี บริลเลียน บลู (COOMASSIE BRILLIANT BLUE R[®]-250)
- 2.22 แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B)
- 2.23 เพนนิซิลิน จี โซเดียม (penicillin G sodium)
- 2.24 สเตรปโตไมซิน (streptomycin)
- 2.25 โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein Ladder (invitrogen) บริษัทกิ๊ปไทย จำกัด
- 2.26 นูเพจ โนวเอก บิส ทริส เจล NuPAGE[®] Novex Bis-Tris Gels (invitrogen)
- 2.27 นูเพจ แอลเอสดี แซมเปิล บัฟเฟอร์ NuPAGE[®] LSD Sample buffer (4X) (invitrogen)
- 2.28 นูเพจ รีดิวซิ่ง เอเจนต์ NuPAGE[®] Reducing Agent (10X) (invitrogen)
- 2.29 กราเซียล อะซีติก แอซิด (glacial acetic acid)
- 2.30 คอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ (1% w/v CuSO₄)
- 2.31 น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

3. อาหารเพาะเลี้ยง (medium)

- 3.1 M199 มี Earle's salts (Sigma Company, St Louis MO)
- 3.2 10% heattreated fetal calf serum (HTFCS)
- 3.3 โซเดียมไบคาร์บอเนต 2.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2.2 mg/ml NaHCO₃; Sigma Company, St Louis MO)
- 3.4 ทาลิป เฮปเนส 1 โมลาร์ (1 M TALP HEPES; Sigma, St Louis MO)
- 3.5 ไพรูเวต 0.25 มิลลิโมล (0.25 mM pyruvate)
- 3.6 ฟอลลิคูล่า สติมูเลติงฮอร์โมน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (15 µg/ml follicular stimulating hormone: FSH)
- 3.7 ลูทีไนซิงฮอร์โมน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1 µg/ml lutinizing hormone: LH)
- 3.8 เอสตราไดโอดซึ่งละลายในเอทานอล 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (1 µg/ml estradiol with ethanol)
- 3.9 เจนตั้มายซิน ซัลเฟต 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (50 mg/ml gentamycin sulfate)

4. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

- 4.1 ท่อนำไข่แม่สุกร
- 4.2 รังไข่แม่สุกร

บทที่ 4

วิธีดำเนินการทดลอง

1. วิธีเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ ประกอบด้วย M 199 เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยง endothelium cells ต่าง ๆ ที่มี Earle's salts (Sigma Company, St Louis MO) เพิ่ม 10% heattreated fetal calf serum (HTFCS), NaHCO_3 2.2 mg/ml (Sigma Company, St Louis MO), 1 M HEPES (Sigma, St Louis MO), 0.25 mM pyruvate, 15 $\mu\text{g/ml}$ FSH, 1 $\mu\text{g/ml}$ LH, 1 $\mu\text{g/ml}$ estradiol ซึ่งละลายในเอทานอล และ gentamycin sulfate 50 mg/ml โดยกรองอาหารเพาะเลี้ยงและปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7.2 ถึง 7.4 แบ่งอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ยังไม่ได้ใช้เก็บแช่ที่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงแบ่งใส่ cap tube ประมาณ 2 มิลลิลิตร ก่อนนำมาเลี้ยงเซลล์ควรบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เพื่อดูว่าเมื่อนำอาหารเพาะเลี้ยงมาใช้ อาหารนั้นขุ่นหรือมีตะกอนหรือไม่ ซึ่งถ้าพบเช่นนั้นแสดงว่ามีสิ่งปลอมปนเกิดขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยง ไม่ควรนำอาหารนั้นมาเลี้ยงเซลล์

1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไข่ อาจใช้ hepes buffered tyrodes medium (TALP-HEPES) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์บุท่อไข่ชั่วคราวที่ใช้เมื่ออยู่นอกตู้บ่มในระยะเวลาสั้นๆ สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไข่ที่ใช้เพื่อเลี้ยงเซลล์ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย M 199 ที่มี Earle's salts (Sigma Company, St Louis MO) เพิ่ม 10% heat treated fetal calf serum (HTFCS), NaHCO_3 2.2 mg/mL (Sigma Company, St Louis MO), 0.25 mM pyruvate, 1 M HEPES (Sigma, St Louis MO) และ gentamycin sulfate 50 mg/ml โดยกรองอาหารเพาะเลี้ยงและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 ถึง 7.4 แบ่งอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ยังไม่ได้ใช้เก็บแช่ที่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงแบ่งใส่จานเพาะเลี้ยงจานละ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำมาเลี้ยงเซลล์ควรทำวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่

2. การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างท่อนำไข่ และรังไข่สุกรจากโรงฆ่าแม่สุกรในจังหวัดนครปฐม โดยใช้กรรไกรตัดตัวอย่างออกจากซากแม่สุกรที่เพิ่งตายบรรจุใส่ถุง ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมยาปฏิชีวนะ 2 ถึง 3 ครั้ง นำถุงใส่กระติกที่หล่อด้วยน้ำกลั่น ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างกลับห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง

3. วิธีเตรียมเซลล์

การเลือกและเตรียมเซลล์บุท่อนำไข่ เซลล์ไข่ที่มีคุณสมบัติเซลล์ล้อมรอบและเซลล์เกรนูโลซา

3.1 การเลือกท่อนำไข่ และรังไข่

นำท่อนำไข่ และรังไข่จำนวน 110 ชิ้นของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ ที่เก็บมาจากโรงฆ่าแม่สุกร แยกตัวอย่างเป็น 2 ระยะ คือระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติล โดยคุณลักษณะที่แตกต่างของรังไข่และท่อนำไข่ในการแยกระยะแล้วล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ penicillin 100 IU/ml streptomycin 100 µg/ml และ amphotericin-B 250 µg/ml ตัดแยกท่อนำไข่และรังไข่ออกจากกันเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ท่อนำไข่ออก ล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือที่ผสมยาปฏิชีวนะซ้ำอีก 2 ถึง 3 ครั้ง

3.2 การเตรียมเซลล์บุท่อนำไข่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์

เตรียมเซลล์บุท่อนำไข่ในตู้ปลอดเชื้อโดยนำท่อนำไข่ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อแล้ว แยกตัดบริเวณแอมพูล่าและอิสทมัส ชูดเซลล์บุท่อนำไข่ของสุกรทั้ง 2 ส่วน ด้วยกระจกสไลด์ที่ฆ่าเชื้อ จะได้เซลล์เยื่อบุผิวจากภายในท่อนำไข่ แล้วนำไปใส่ใน cap tube ที่ฆ่าเชื้อขนาด 12 มิลลิลิตร โดยบรรจุน้ำยาล้างเซลล์ washing medium จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วทำการล้างเซลล์ซ้ำอีก 5 ถึง 7 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 (ใส่เซลล์ 200 ไมโครลิตร) ในจานเพาะเลี้ยงที่บ่มอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้แล้ว 24 ชั่วโมง ซึ่งมีอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่จำนวน 10 มิลลิลิตรและเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

3.3 การเตรียมเซลล์ไข่ที่มีเซลล์คูมิลต์ล้อมรอบ (COCs) และเซลล์แกรนูโลซา (GC) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์

รังไข่ที่แยกจากท่อนำไข่ทั้งระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียล ล้างด้วยน้ำยาล้างเซลล์ (TALP-HEPES ผสมกับ 10% HTFCS และ gentamycin 50 µg/ml) 3 ครั้ง ใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ต่อด้วยเข็มเบอร์ 18 ฉีดน้ำในถุงไข่ (follicular fluid) แล้วนำไปใส่ในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นดูดเซลล์ไข่โดยใช้ปิเปตแก้วที่ยืดปลายให้มีขนาดเล็กเหมาะสมกับการดูดเซลล์ไข่ ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แบ่งกลุ่มตามความแตกต่างขึ้นอยู่กับจำนวนชั้นของ CC ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่โดยการเตรียมอาหารเป็นหยดๆ ละ 25 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงหนึ่งอาจเตรียม 4 ถึง 5 หยด เท mineral oil ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงที่เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงไว้แล้ว หลังจากนั้นหยดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 25 ไมโครลิตรลงในตำแหน่งเดิมที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่ก่อนแล้ว เลือกเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 เพื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งก่อนเลี้ยงเซลล์ควรล้างเซลล์ไข่ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 ครั้ง แล้วจึงดูดเซลล์ไข่ที่เลือกไว้ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยแต่ละหยดควรมีเซลล์ไข่ประมาณ 7 ถึง 10 เซลล์ หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง

ส่วนที่เหลือในถุงไข่ ซึ่งมีเซลล์แกรนูโลซา นำใส่ใน cap tube ที่ฆ่าเชื้อขนาด 12 มิลลิลิตร รอให้ตกตะกอนแล้วดูดส่วนบนทิ้ง นำน้ำยาล้างเซลล์จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน cap tube ที่มีเซลล์แกรนูโลซาทำการล้างเซลล์ซ้ำ 5 ถึง 7 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ล้างแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ใส่ในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งมีอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อยู่จำนวน 10 มิลลิลิตรและเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

4. การเตรียมตัวอย่างเซลล์ไข่ สำหรับศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4.1 นำเซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยงและที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง มาคงเพื่อคงสภาพตัวอย่าง (pre-fix) ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมอยู่ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ถึง 7.4 ให้แช่ชิ้นตัวอย่างในน้ำยาคงสภาพนาน 2 ถึง 24 ชั่วโมง

4.2 ใช้ปิเปตคูดน้ำยาคงสภาพเก่าทิ้ง แล้วปั่นล้างตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่ 900 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หลังจากนั้นคองตัวอย่างครั้งที่ 2 (post-fix) ด้วยออสเมียม เตตรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ถึง 7.4 ต้องทำในที่มืด และทำในตู้ดูดไอสารเคมี ให้แช่ชิ้นตัวอย่างในน้ำยาคงสภาพนาน 2 ชั่วโมง

4.3 ครบเวลาให้ใช้ปิเปตคูดออสเมียม เตตรอกไซด์ออกแล้วปั่นล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

4.4 คึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยอะซีโตน จากความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ตามลำดับ

4.5 แทนที่อะซีโตน (infiltration) โดยผสมอะซีโตนต่อพลาสติก (Spurr's resin) อัตราส่วน 2 ต่อ 1 ทิ้งไว้ข้ามคืน ผสมอะซีโตนต่อพลาสติก อัตราส่วน 1 ต่อ 2 นาน 8 ชั่วโมง (ก่อนใช้พลาสติก ควรแช่ในช่องทำน้ำแข็ง ซึ่งพลาสติกชนิดนี้มีคุณสมบัติ คือ ถ้าเย็นจะเหลว ถ้าร้อนจะแข็งตัว)

4.6 คูดตัวอย่างใส่ลงในพลาสติก โดยใช้ pure resin ครั้งที่ 1 ทิ้งไว้ข้ามคืน คูดตัวอย่างใส่ในพลาสติก ครั้งที่ 2 ทิ้งไว้ 8 ชั่วโมง

4.7 เจียชิ้นตัวอย่างนำมาฝัง (embedding) ใน pure resin ที่อยู่ใน beam capsule ซึ่งทำด้วย polyethylene ทำตัวอย่างให้แข็ง (polymerization) ในตู้อบตั้งอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง

4.8 เมื่อ pure resin แข็งตัว ให้แกะชิ้นตัวอย่างในแม่พิมพ์ออก และตัดแต่ง block ให้ได้ขนาด จึงนำตัวอย่างไปตัดให้บาง

4.9 นำ block ตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่างให้บาง โดยตัดจากด้านบน (apical plane) ฐานล่าง (basal plane) ให้ได้ขนาดบาง 60 ถึง 90 นาโนเมตร แล้ววางชิ้นตัวอย่างที่บางมากลงบนตะแกรงวางตัวอย่าง ขนาด 200 mesh

4.10 ย้อมชิ้นตัวอย่างด้วยยูรานิล อาซิเตท 2 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และเลดซิเตท 0.5 เปอร์เซ็นต์ให้ย้อมทำในที่มืดโดยตัดพาราฟิล์มวางในจานแก้วคกให้แน่น ใช้กระดาษกรองกรองสารยูรานิล อาซิเตท ให้เป็นหยดเล็กบนพาราฟิล์ม จำนวนหยดเท่ากับตะแกรงวางตัวอย่างที่ย้อม วางตะแกรงวางตัวอย่างด้านที่มีตัวอย่างบนหยดของยูรานิล อาซิเตทก่อน ทิ้งไว้ 10 ถึง 15 นาที หลังจากนั้นยกตะแกรงวางตัวอย่างซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง แล้วล้างด้วยเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ จุ่มขึ้นลง 20 ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรอง ล้างส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นต้มกรองโดยจุ่มขึ้นลง ประมาณ 20 ครั้งซับให้แห้ง จากนั้นจุ่มตัวอย่างลงในเลดซิเตท นาน 10 ถึง 15 นาที แล้วล้างส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นต้มกรอง 2 บิกเกอร์ๆ ละ 20 ครั้ง (จุ่มขึ้นลง) และซับให้แห้ง แล้วเก็บใน กล่องเก็บตะแกรงวางตัวอย่าง

4.13 ศึกษาชิ้นตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่ 60 กิโลโวลท์

5. การศึกษาปริมาณและรูปแบบสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงและเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง

5.1 นำเซลล์บู่ที่นำไปแช่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลิวบริเวณแอมพูล่าและอิสทมัส ที่เลี้ยงเป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง มาปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน

5.2 คุกเก็บ condition medium เฉพาะส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนไว้ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

6. ศึกษาลักษณะโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดหลังในอาหารเพาะเลี้ยง โดยทำการศึกษาดังนี้

6.1 นำ condition medium ที่เก็บแช่แข็งไว้มาวิเคราะห์หาสารหลังจากเซลล์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยเปรียบเทียบสารหลังใน ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลิว เปรียบเทียบเป็นช่วงเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง ซึ่งเทคนิคนี้มีหลักการแยกโปรตีนโดยอาศัยขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล

6.2 วัดปริมาณโปรตีนของสารหลังจากเซลล์ด้วยวิธีของ Lowry (1951) ใช้ spectrophotometer ช่วงค่าความยาวคลื่นแสง 650 นาโนเมตร คำนวณหาค่าโปรตีนเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน (standard protein of bovine serum albumin)

6.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธีของ Lowry (1951) แล้วเตรียมสารตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนคงที่เท่ากันคือ 15 ไมโครกรัมต่อหลอด

6.4 ผสมสารตัวอย่างให้เข้ากัน นำสารตัวอย่างไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปหยอด (load) ลงในแต่ละหลอด ทำเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bench Mark™ Protein Ladder ทำการแยกโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ นานประมาณ 50 นาที ใน MOPS buffer

6.5 นำเจลที่ได้ไปย้อมใน staining solution (COOMASSIE BRILLIANT BLUE R®-250) ทั้งไว้ข้ามคืนแล้วล้างสีส่วนเกินออก (destain) ด้วย destaining solution

7. การวิเคราะห์โปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Liquid chromatography/Mass spectrometer/Mass spectrometer (LC/MS/MS)

การวิเคราะห์จำแนกชนิดของโปรตีนอย่างละเอียดทำได้โดยการเปรียบเทียบลายพิมพ์การแตกตัวของเปปไทด์แต่ละชิ้นที่ได้จริงจากการวัดด้วยเครื่อง Mass Spectrometer กับรูปแบบการแตกตัวของเปปไทด์จากการคำนวณในฐานข้อมูลโปรตีนมาตรฐาน

7.1 นำโปรตีนที่สนใจมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งแต่ละสายอาจมีความสั้นยาวไม่เท่ากัน ทำให้มีน้ำหนักไม่เท่ากัน เนื่องจากการกระจายตัวของกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีนในโปรตีนแต่ละชนิดจะมีลักษณะเฉพาะ ดังนั้นน้ำหนักของสายเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีนและไลซีนจึงเป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีนนั้นๆ (ลายพิมพ์มวลเปปไทด์แต่ละสายที่ประกอบกันเป็น 1 โปรตีนจะพบเฉพาะในโปรตีนชนิดเดียวเท่านั้นตามทฤษฎี เหมือนกับลายพิมพ์นิ้วมือที่จะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะบุคคล ไม่พบซ้ำกับคนอื่น)

7.2 ละลายเปปไทด์ด้วยสารละลาย 0.1% formic acid แล้ววิเคราะห์ด้วย nano-LC/MS/MS เปปไทด์จะถูกแยกออกจากกันด้วย Reverse phase column chromatography ใช้ acetonitrile ต่อ water โดยใช้ acetonitrile จาก 2 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวชะเปปไทด์ที่ผ่านจากคอลัมน์จะถูกนำไปวิเคราะห์รูปแบบการแตกตัวของเปปไทด์ด้วย ESI-Mass spectrometer

7.3 นำรูปแบบการแตกตัวของเปปไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MASCOT เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI

บทที่ 5

ผลการทดลอง

1. ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์นุท่อนำไข่แม่สุกรในรอบการเป็นสัด บริเวณแอมพูล่าและอิสทมัส

1.1 ผลจากการเก็บตัวอย่างรังไข่และท่อนำไข่แม่สุกรในรอบการเป็นสัดจากโรงฆ่าสุกรในจังหวัดนครปฐม จำนวน 110 รังไข่ เจาะได้เซลล์ไข่ 880 เซลล์ คิดเป็น 8 เซลล์ไข่ต่อหนึ่งรังไข่ จำแนกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะฟอลลิคูลาร์จำนวน 73 รังไข่ เจาะได้เซลล์ไข่ 557 เซลล์ และระยะลูทีลจำนวน 37 รังไข่ เจาะได้เซลล์ไข่ 323 เซลล์ จากการวิจัยสามารถแบ่งชนิดของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบ (COCs) ได้ 5 ชนิด (ภาพที่ 17) โดยแบ่งตามการเรียงตัวของเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ คือ

- ก. ชนิดที่ 1 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Intact cumulus cells layer)
- ข. ชนิดที่ 2 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cells layer)
- ค. ชนิดที่ 3 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cells layer)
- ง. ชนิดที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completely denuded oocyte)
- จ. ชนิดที่ 5 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบแผ่ขยาย (Expanded cumulus cells layer)

จากการเจาะเซลล์ไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ต่อระยะลูทีลพบเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 จำนวน 347 ต่อ 127 เซลล์ไข่ชนิดที่ 2 จำนวน 68 ต่อ 58 เซลล์ไข่ชนิดที่ 3 จำนวน 13 ต่อ 25 เซลล์ไข่ชนิดที่ 4 จำนวน 96 ต่อ 73 และเซลล์ไข่ชนิดที่ 5 จำนวน 33 ต่อ 40 ตามลำดับ ดังแสดงตามตารางที่ 2 และ 3 ซึ่งทั้งระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีล พบเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบทั้ง 5 ชนิดเหมือนกัน ดังภาพที่ 13 (ก ถึง จ) และเมื่อนำ COCs ชนิดที่ 1 และ 2 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ M 199 ที่เสริมด้วย 10% heattreated fetal calf serum (HTFCS), NaHCO_3 2.2 mg/mL (Sigma Company, St Louis MO), 1 M Hepes (Sigma, St Louis MO), 0.25 mM pyruvate, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LH, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estradiol ซึ่งละลายใน ethanol และ gentamycin sulfate 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไข่ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเจริญพัฒนา (maturation) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้

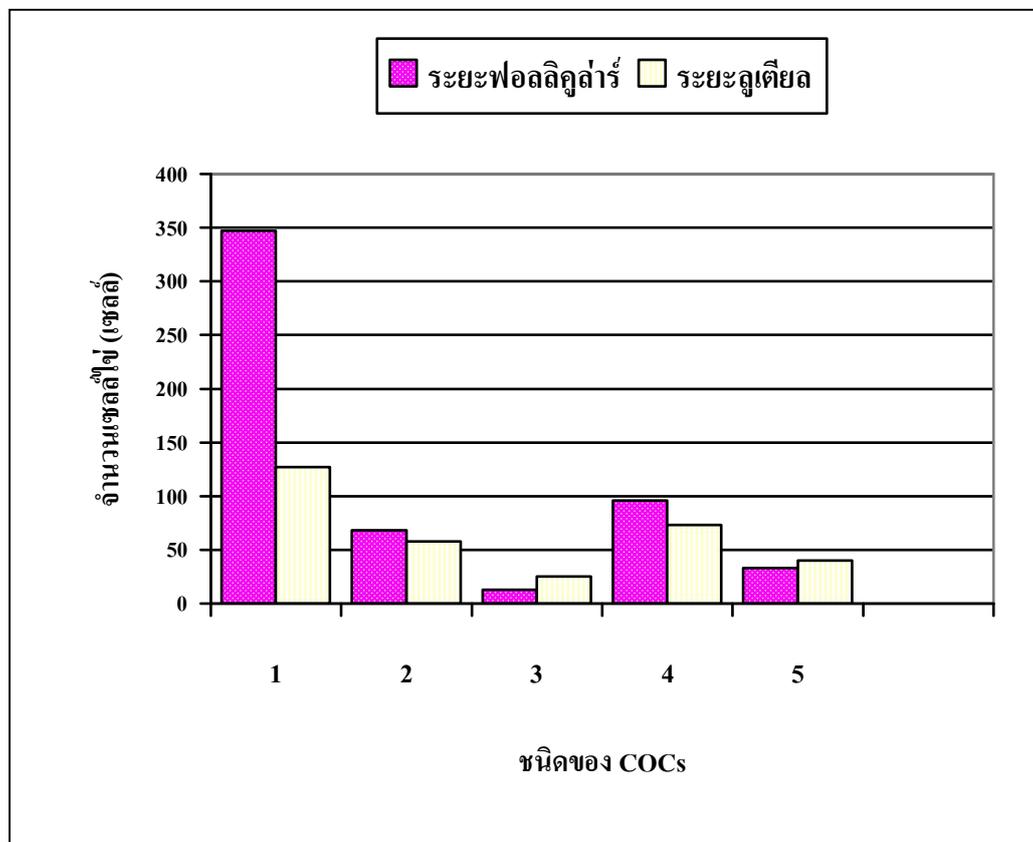
ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์ไข่ต่อรังไข่ในระยะฟอลลิคูลาร์จำนวน 73 รังไข่ แบ่งตามการเรียงตัวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่

ชนิดของ COCs	จำนวนเซลล์ไข่	เปอร์เซ็นต์
1. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Intact cumulus cells layer)	347	62.30
2. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cells layer)	68	12.21
3. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cells layer)	13	2.33
4. เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completely denuded oocyte)	96	17.24
5. เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบแผ่ขยาย (Expanded cumulus cells layer)	33	5.92
รวม	557	100

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์ไข่ต่อรังไข่ในระยะลูทีลจำนวน 37 รังไข่แบ่งตามการเรียงตัวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่

ชนิดของ COCs	จำนวนเซลล์ไข่	เปอร์เซ็นต์
1. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Intact cumulus cells layer)	127	39.32
2. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cells layer)	58	17.96
3. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cells layer)	25	7.74
4. เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completely denuded oocyte)	73	22.6
5. เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบแผ่ขยาย (Expanded cumulus cells layer)	40	12.38
รวม	323	100

ภาพที่ 16 กราฟจำนวนเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบ (COCs) ทั้ง 5 ชนิด ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลในแม่สุกร



จากกราฟแสดงจำนวนชนิดของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบทั้งหมด 880 เซลล์

ชนิดที่ 1 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น

ชนิดที่ 2 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น

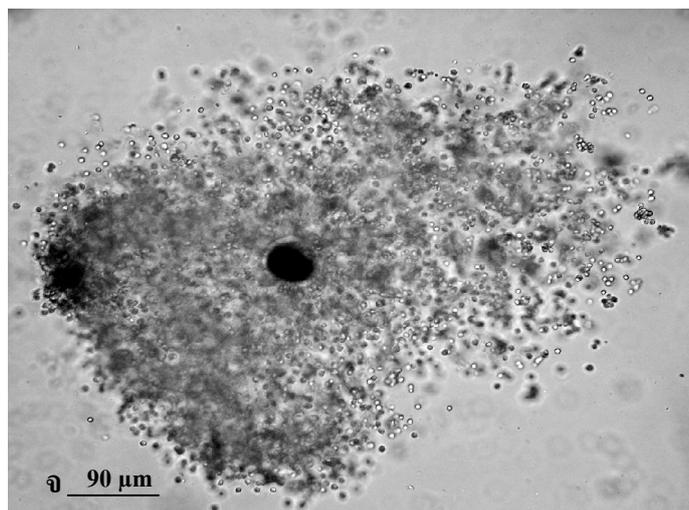
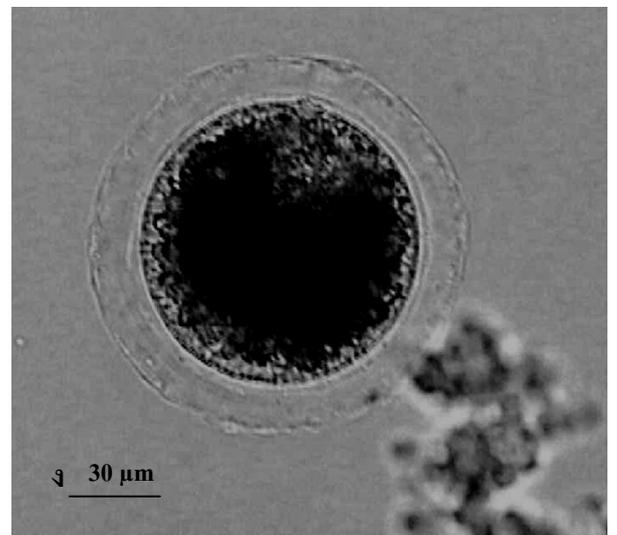
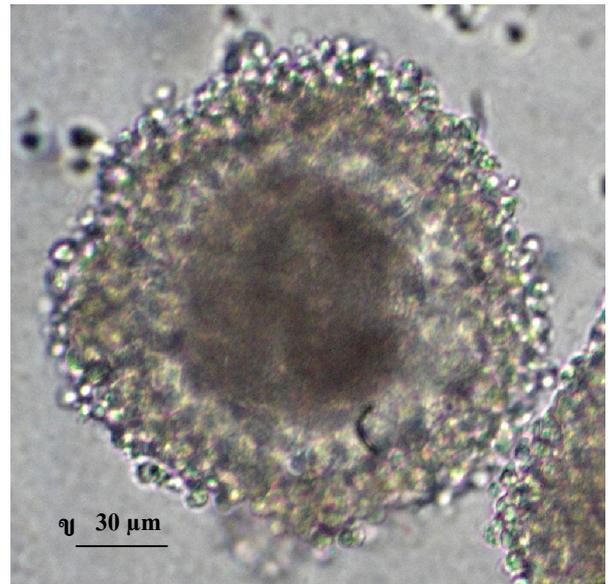
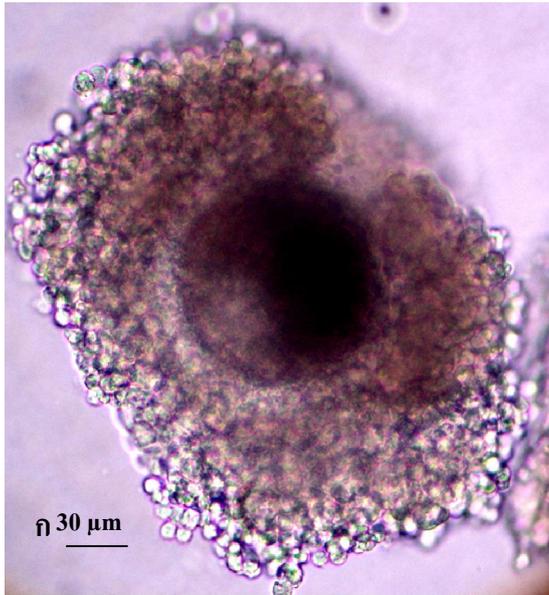
ชนิดที่ 3 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน

ชนิดที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ

ชนิดที่ 5 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบแผ่ขยาย

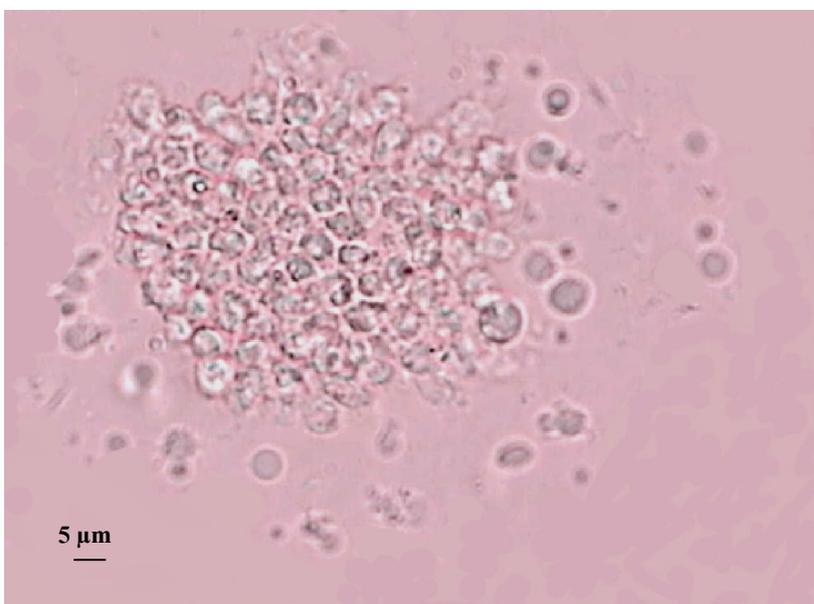
พบว่าเซลล์ไข่ชนิดที่หนึ่งและสอง ซึ่งเป็นเซลล์ไข่ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้สุกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการในระยะฟอลลิคูลาร์ต่อระยะลูทีล มีจำนวนเท่ากับ 415 ต่อ 185 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6 ต่อ 5 เซลล์ต่อรังไข่ จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ไข่ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้สุกได้ระยะฟอลลิคูลาร์มีค่าเฉลี่ยมากกว่าระยะลูทีล

ภาพที่ 17 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ แสดง (ก) เซลล์ไข่ชนิดมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (ข) เซลล์ไข่ชนิดมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (ค) เซลล์ไข่ชนิดมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (ง) เซลล์ไข่ชนิดที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบและ (จ) เซลล์ไข่ชนิดที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบแผ่ขยาย

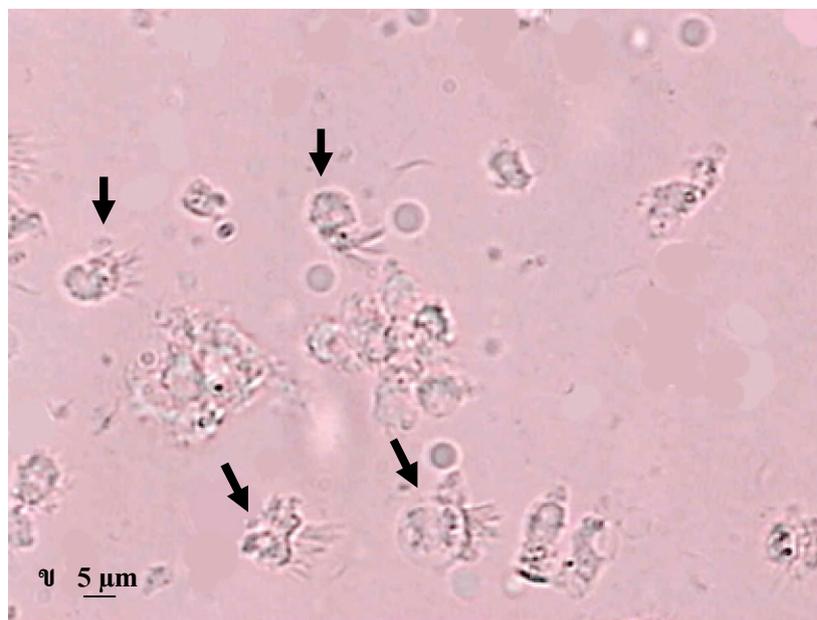
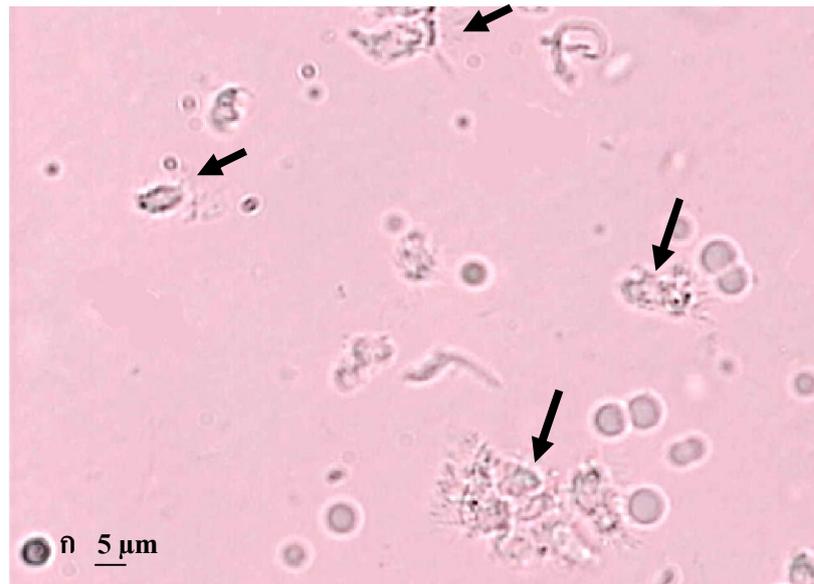


1.2 สันฐานวิทยาของเซลล์บุท่อหน้าไข่สุกร (Porcine oviductal epithelial cells : POEC) บริเวณแอมพูล่าและอิสทมัสในรอบการเป็นสัด

จากการเก็บตัวอย่างท่อหน้าไข่แม่สุกรในรอบการเป็นสัด โดยเก็บในระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีล ได้ชุดเซลล์บุท่อหน้าไข่แม่สุกรบริเวณแอมพูล่าและอิสทมัส ศึกษาลักษณะสันฐานวิทยาในรอบการเป็นสัดในสภาพธรรมชาติโดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่าเซลล์บุท่อหน้าไข่แม่สุกรบริเวณแอมพูล่าและอิสทมัสทั้งระยะฟอลลิคูลาร์และลูทีล ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด คือเซลล์บุท่อหน้าไข่รูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบนซึ่งพบเซลล์ชนิดนี้ในระยะฟอลลิคูลาร์มากกว่าระยะลูทีลและเซลล์บุท่อหน้าไข่รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย ดังภาพที่ 18, 19 (ก และ ข) และภาพที่ 20 (ก ถึง ค)

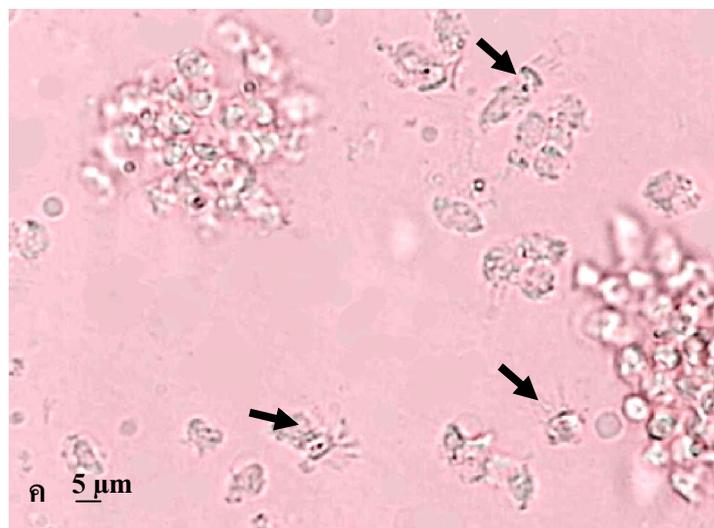
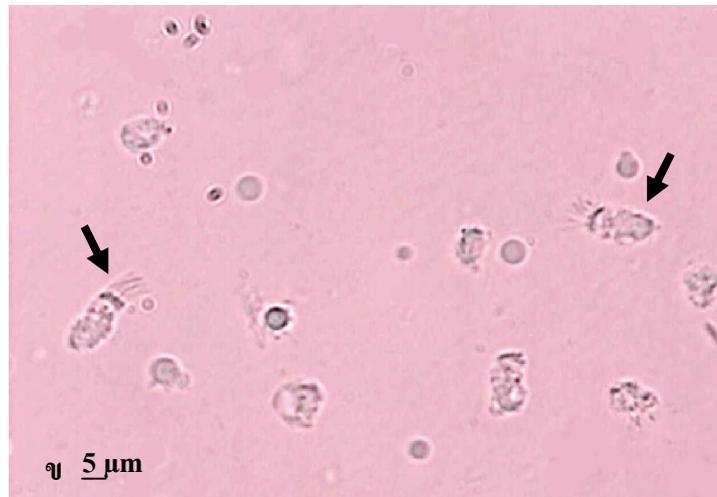
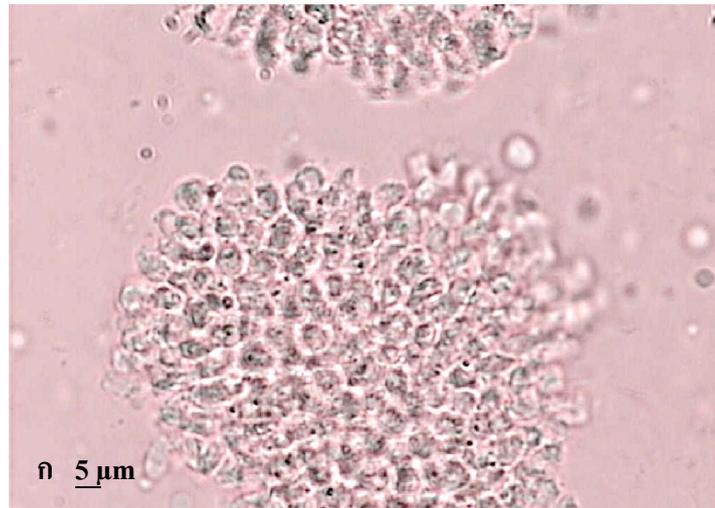


ภาพที่ 18 สันฐานวิทยาของเซลล์บุท่อหน้าไข่บริเวณแอมพูล่าและอิสทมัสในระยะฟอลลิคูลาร์ในสภาพธรรมชาติ แสดงเซลล์มีรูปร่างกลมไม่มีซีเลียอยู่เป็นกลุ่มๆ



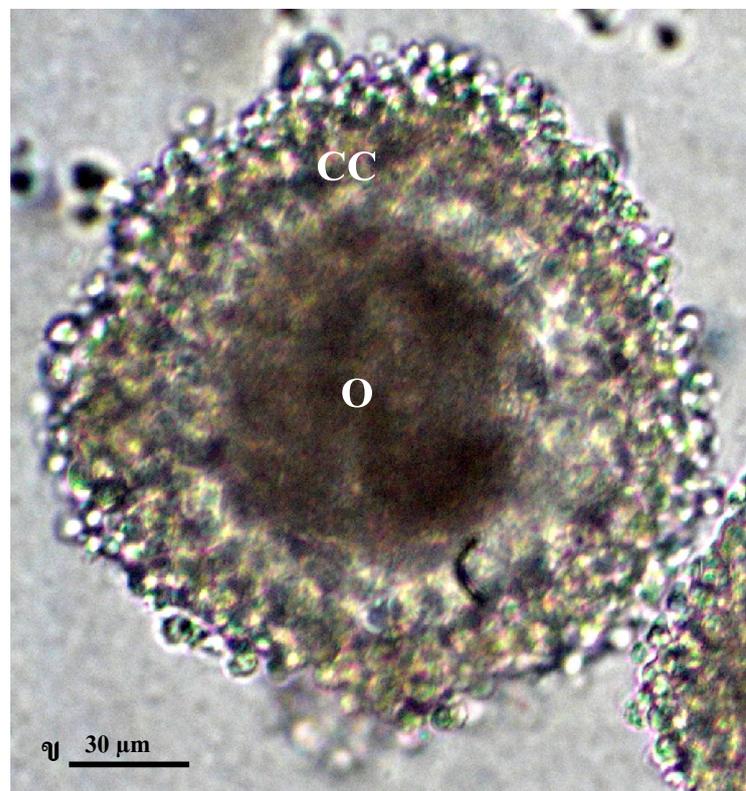
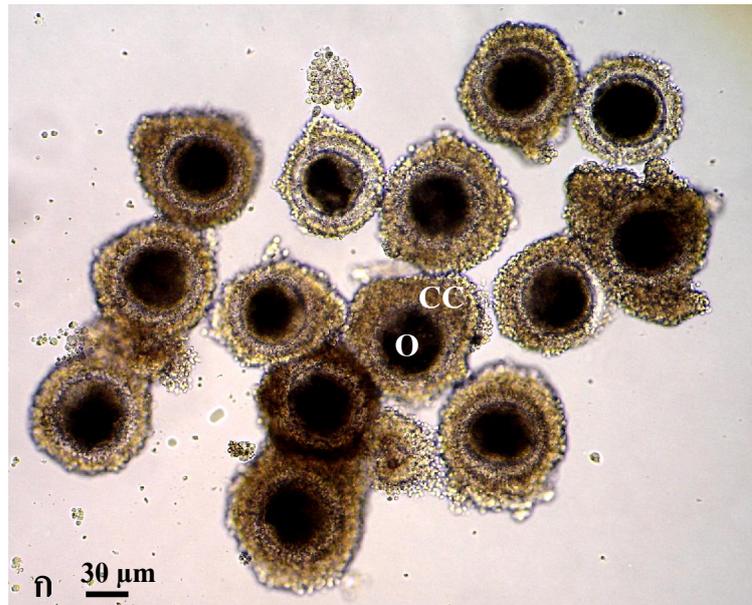
ภาพที่ 19 (ก และ ข) ตัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าและอิสหมัตใน
ระยะฟอลลิคูลาร์ในสภาพธรรมชาติ ในภาพแสดงเซลล์รูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบน (ลูกศร)

ภาพที่ 20 (ก ถึง ค) สัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อ นำไข่บริเวณแอมพูล่าและอัสทรมัธยมระยะลูติเซลล์
ในสภาพธรรมชาติ พบเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลียอยู่เป็นกลุ่มๆ และเซลล์รูปร่างยาวมีซีเลียอยู่
ด้านบน (ลูกศร)

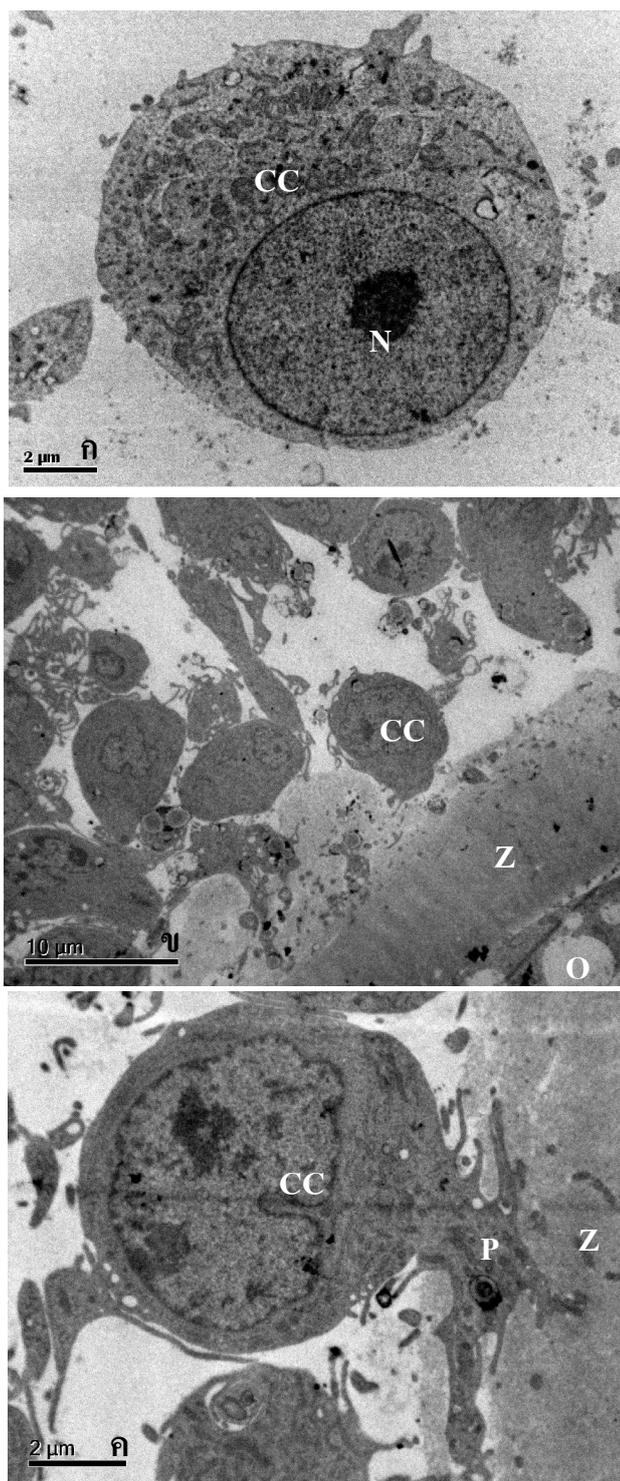


2. ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา ความสัมพันธ์ของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์ไข่ (complexes oocyte cumulus : COCs) ในรอบการเป็นสัด

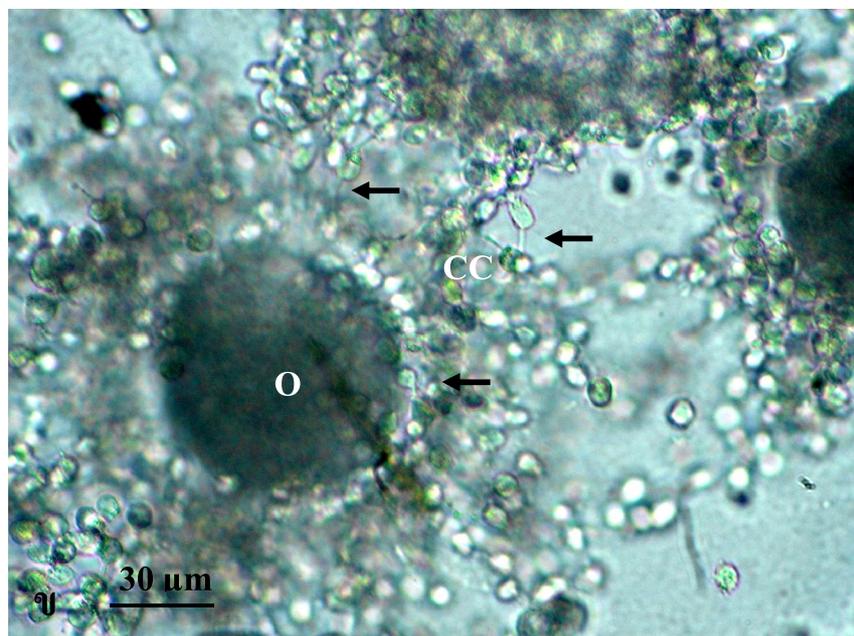
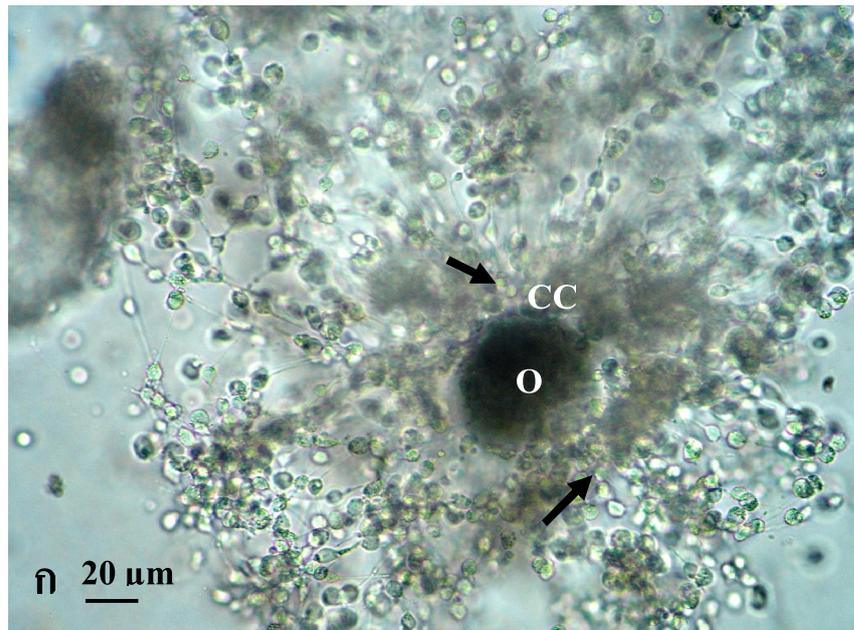
ผลการเพาะเลี้ยงพบว่า เมื่อนำเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 (เซลล์ไข่แบบมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น) และเซลล์ไข่ชนิดที่ 2 (เซลล์ไข่แบบมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร M 199 ที่เสริมด้วย 10% heattreated fetal calf serum (HTFCS), NaHCO_3 2.2 mg/mL (Sigma Company, St Louis MO), 1 M Hepes (Sigma, St Louis MO), 0.25 mM pyruvate, 15 $\mu\text{g/mL}$ FSH, 1 $\mu\text{g/mL}$ LH, 1 $\mu\text{g/mL}$ estradiol ซึ่งละลายใน ethanol และ gentamycin sulfate 50 $\mu\text{g/mL}$ บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่และ COCs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่าเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (cumulus: CC) มีลักษณะรูปร่างกลมเรียงตัวหลายชั้น ดังแสดงในภาพที่ 21 (ก และ ข) เช่นเดียวกับภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภาพที่ 22 (ก และ ข) และพบเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ลักษณะกลมมีส่วนที่ยื่นยาว (process) ฝังตัวเข้าสู่โซนินา เพลลูซิดา (zona pellucida: Z) ของเซลล์ไข่ (ภาพที่ 22 ค) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ไข่หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอย่างเห็นได้ชัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบ CC แผ่กระจายออกจากเซลล์ไข่และมีลักษณะเป็นรูปกรวยยื่นยาว ดังแสดงในภาพที่ 23 (ก และ ข) เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยาภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไซโทพลาซึมของ CC เคลื่อนตัวออก เซลล์ CC เปลี่ยนจากทรงกลมเป็นเซลล์ยื่นยาวออก ซึ่งสัณฐานวิทยาเหมือนกันทั้งระยะฟอลลิคูลาร์ (ภาพที่ 24) และระยะลูทีอัล (ภาพที่ 25) และจากเคมีทิน เซกชัน (semi-thin section) ผลการทดลองพบว่า เซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ก่อนเพาะเลี้ยงทั้งระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีอัล สัณฐานวิทยาของ CC มีลักษณะเรียงตัวกันหลายชั้น หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง พบ CC มีลักษณะยื่นยาวแผ่กระจายตัวออกจากเซลล์ไข่และหลังเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง CC แผ่กระจายตัวมากขึ้นและเซลล์ลักษณะยื่นยาว แสดงในภาพที่ 26 (ก ถึง ค) และภาพที่ 27 (ก ถึง ค)



ภาพที่ 21 (ก และ ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของ COCs ในรอบการเป็นสัคของเซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ก่อนเพาะเลี้ยงพบเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (CC) เรียงตัวอยู่หลายชั้นรอบเซลล์ไข่ (O)

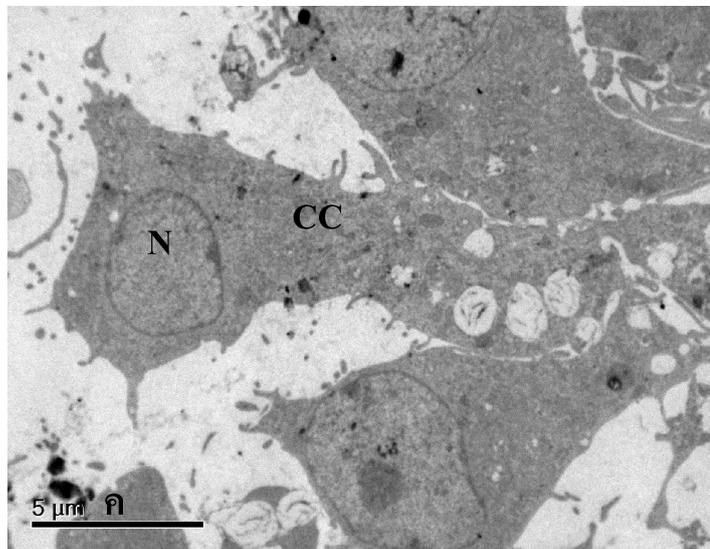
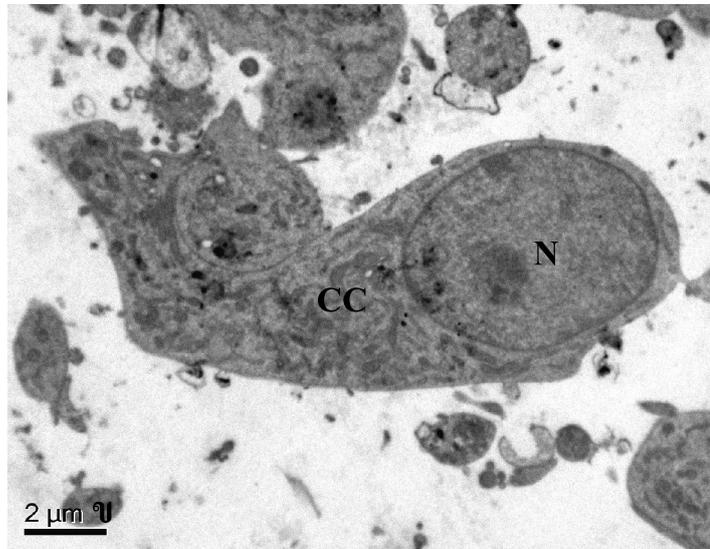


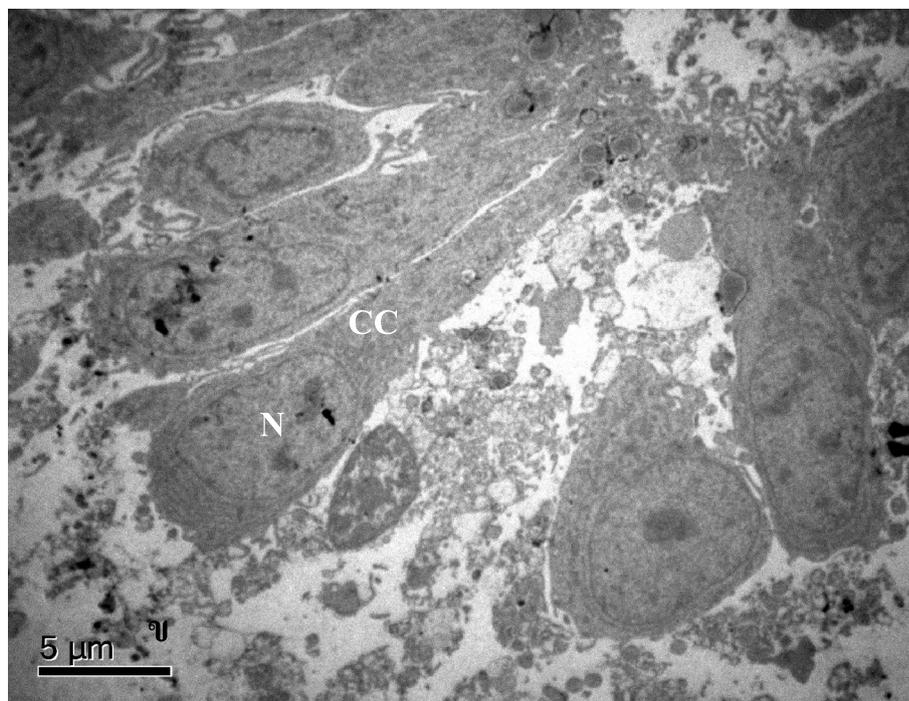
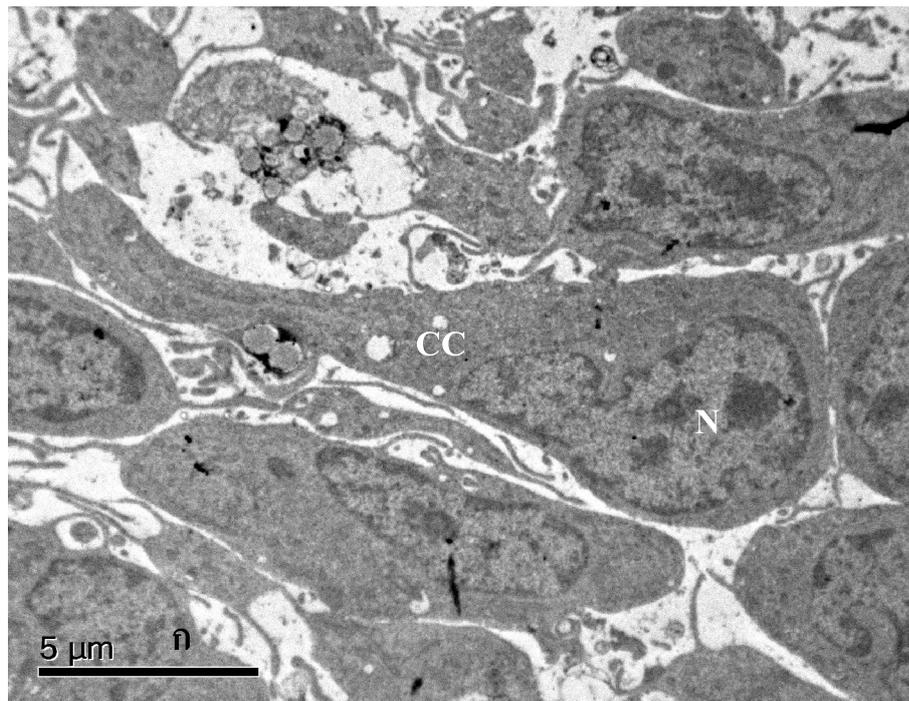
ภาพที่ 22 (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (CC) ซึ่งมีลักษณะกลมมีนิวเคลียส (N) ตรงกลาง (ข) ระยะฟอลลิคูลาร์ก่อนเพาะเลี้ยง CC เรียงตัวหลายชั้นรอบโซนาเพลลูซิदा (Z) ซึ่งอยู่ติดกับเซลล์ไข่ (O) (ค) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (CC) มีส่วนที่ยื่นยาว (process: P) ฝังตัวเข้าโซนาเพลลูซิदा (Z)



ภาพที่ 23 (ก และ ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงสัณฐานวิทยาเซลล์ล้อมรอบ-เซลล์ไซ (CC) ของเซลล์ไซชนิดที่ 1 และ 2 ระยะฟอลติคูลาร์หลังเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไซมีลักษณะยื่นยาวแผ่กระจายตัวออกจากเซลล์ไซ (O) สัมผัสเข้าสู่ผิวเซลล์ไซ (ลูกศร)

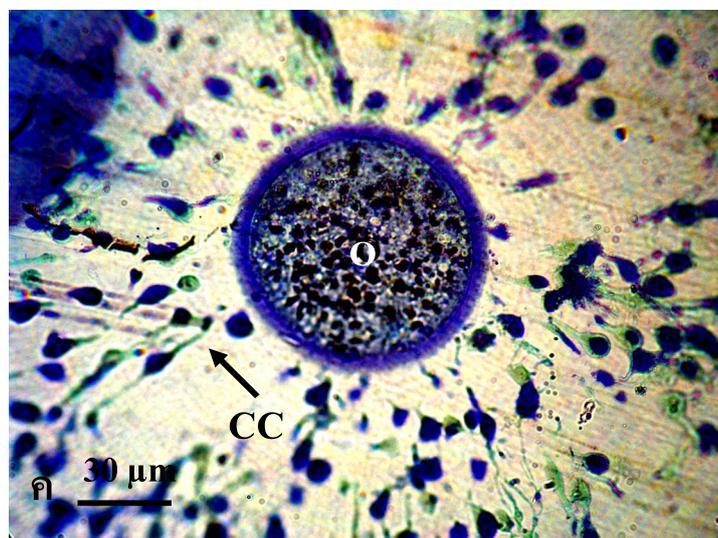
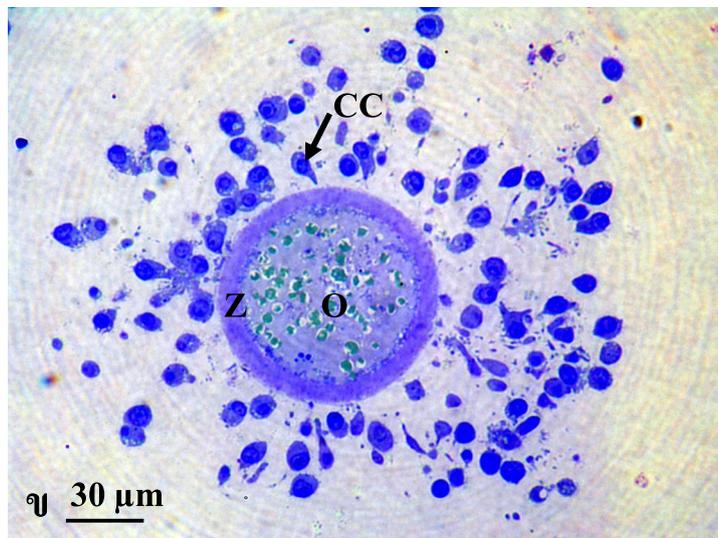
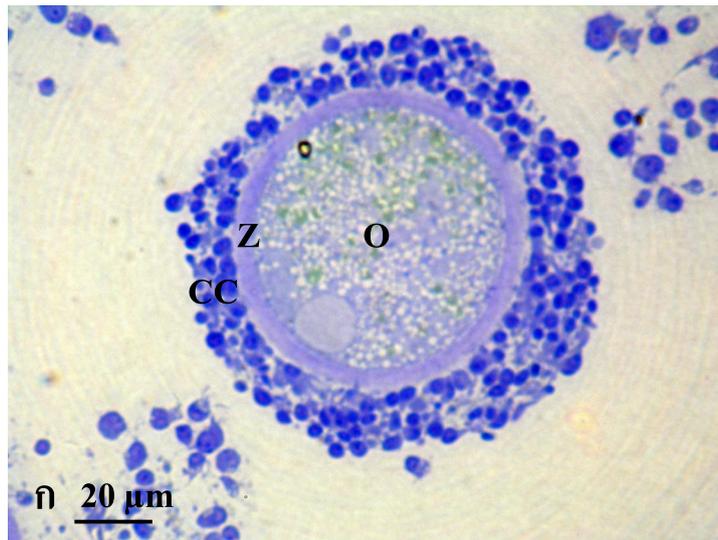
ภาพที่ 24 (ก ถึง ค) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงสัณฐานวิทยาของ COCs ชนิดที่ 1 และ 2 ระยะฟอลลิคูลาร์หลังเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (CC) เปลี่ยนแปลงรูปร่างยื่นยาว



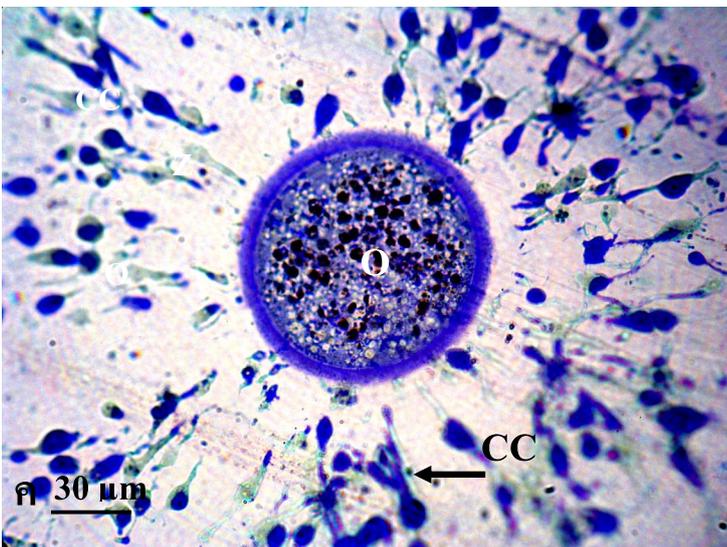
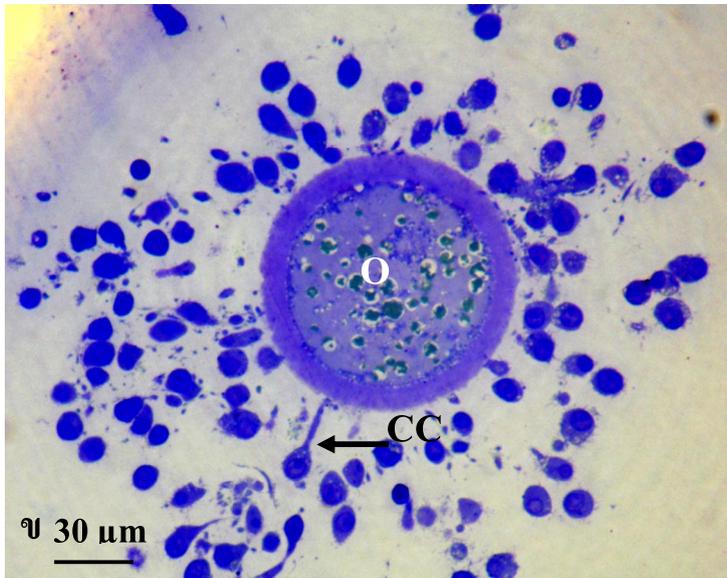
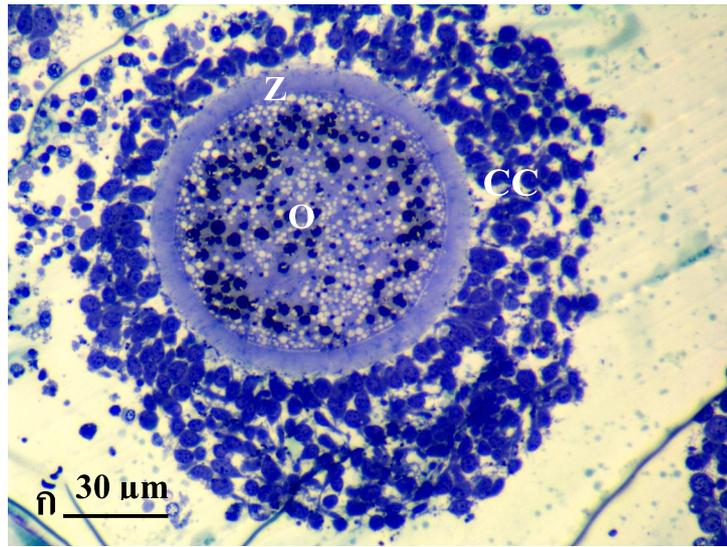


ภาพที่ 25 (ก และ ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงสัณฐานวิทยาของ COCs เซลล์ไข่ชนิดที่ 1 และ 2 ระยะตุติยลหลังเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง แสดงเซลล์ล้อมรอบ-เซลล์ไข่ (CC) เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์ยื่นยาว

ภาพที่ 26 (ก ถึง ค) ภาพจาก Semi -Thin section ย้อมสี 1% Toluidine blue แสดงสัณฐานวิทยา ของ COCs ในรอบการเป็นสัครยะฟอลลิคูลาร์ ของเซลล์ไข่ชนิดที่ 2 ก่อนเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ (ก) พบ CC เรียงตัวกันหลายชั้น (ข) หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมงภายในตู้บ่ม พบ CC มีลักษณะยื่นยาวและกระจายตัวตามลูกศร (ค) หลังเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง พบ CC แผ่กระจายตัวมากขึ้นตามลูกศร

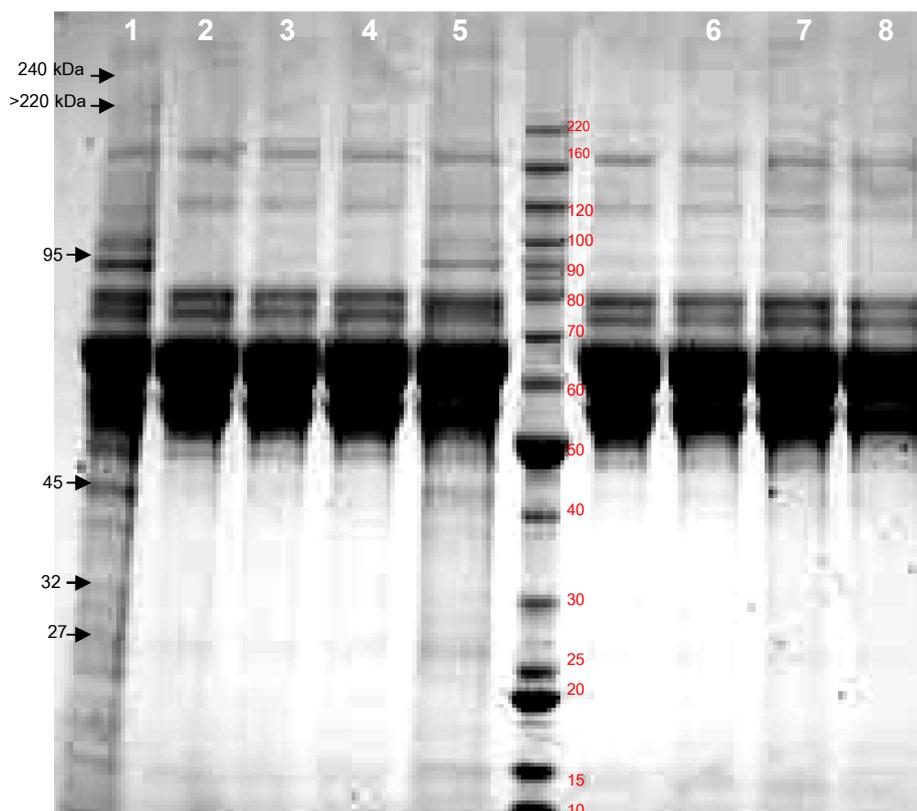


ภาพที่ 27 (ก ถึง ค) ภาพจาก Semi-thin section ย้อมสี 1% Toluidine blue โดยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงสัณฐานวิทยา COCs ในรอบการเป็นสักระยะเดียวของเซลล์ไข่ (O) ชนิดที่ 2 ก่อนเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ (ก) พบ CC มีการเรียงตัวของเซลล์หลายชั้น (ข) หลังเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง 95 เปอร์เซ็นต์ พบ CC แผ่กระจายตัวออกจาก O และยื่นยาวดังลูกศร (ค) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบ CC ยื่นยาวมากขึ้นตามลูกศร



3. เปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนที่หลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (condition medium) ของเซลล์เพาะเลี้ยง POEC และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์แกรนูโลซา (CC+GC) ในรอบการเป็นสัตรยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูเตียล หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

3.1 ผลจากการเก็บสารหลังจากเซลล์บู่ที่นำไปสู่ระยะฟอลลิคูลาร์บริเวณแอมพูล่าเปรียบเทียบกับบริเวณอิสทมัสพบรูปแบบโปรตีนจากสารหลั่งในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสองบริเวณมีความคล้ายกันดังภาพที่ 28 ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันมีหลายขนาด ตัวอย่างเช่นขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 27, 32, 45, 95 kDa และ 240 kDa ในแถบโปรตีน F10 (ช่อง 5) และพบว่าแถบโปรตีนนี้ชัดเจนในตัวอย่างของ FA0 (ช่อง 1) ซึ่งพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa ในช่อง 1 ด้วย ซึ่งขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันนั้นได้เลือกรูปแบบโปรตีนที่น่าสนใจมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 220 kDa และ 240 kDa ในช่อง 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากสารหลั่งในเซลล์บู่ที่นำไปสู่ระยะฟอลลิคูลาร์บริเวณแอมพูล่าเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Standard protein marker) ที่กำหนดไว้แล้ว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10 ถึง 220 kDa



FA0	FA2	FA4	FA6	FI0	STD	Control	FI2	FI4	FI6
ช่อง 1	ช่อง 2	ช่อง 3	ช่อง 4	ช่อง 5	ช่อง 6	ช่อง 7	ช่อง 8	ช่อง 9	ช่อง 10

ภาพที่ 28 แถบ โปรตีนของสารหลังจาก POEC ระยะฟอลลิคูลาร์ที่หลังในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อ เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

หมายเหตุ ช่องที่ 1: FA0 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง

ช่องที่ 2: FA2 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)

ช่องที่ 3: FA4 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)

ช่องที่ 4: FA6 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

ช่องที่ 5: FI0 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิทมัสที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง

ช่องที่ 6: STD = Standard protein marker

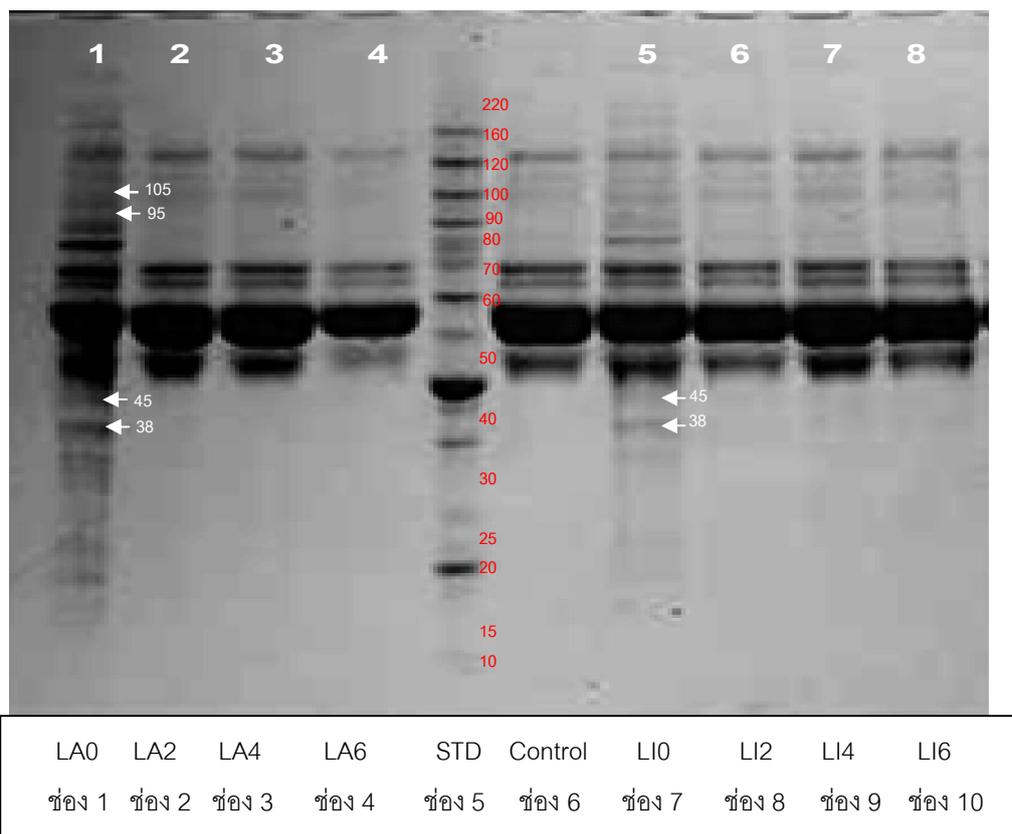
ช่องที่ 7: Control = M 199 + 10 % fetal calf serum

ช่องที่ 8: FI2 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิทมัสที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)

ช่องที่ 9: FI4 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิทมัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)

ช่องที่ 10: FI6 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิทมัสที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

3.2 ผลการเก็บสารหลังจากเซลล์บู่ที่นำไปสู่ระยะยูติลบริเวณแอมพูล่าเปรียบเทียบกับบริเวณอิสทมัส พบว่ารูปแบบโปรตีนจากสารหลังในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสองส่วนมีลักษณะคล้ายกัน ดังภาพที่ 29 พบโปรตีนขนาดประมาณ 38 และ 45 kDa (ช่อง 1 และช่อง 7) ซึ่งเป็นสารหลังจากเซลล์บู่ที่นำไปสู่ระยะยูติลบริเวณแอมพูล่าและอิสทมัสที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง ซึ่งโปรตีนจาก LA0 (ช่อง 1) จะเห็นชัดกว่าโปรตีนจาก LI0 (ช่อง 7) ในส่วนเหนือชั้นตอนบนของเจล พบโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 70-220 kDa พบได้เกือบทุกแถบโปรตีนแต่ที่เห็นได้ชัด (ช่อง 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 และ 10) และได้เลือกรูปแบบโปรตีนที่น่าสนใจขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 95 kDa และ 105 kDa จากช่อง 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากสารหลังในเซลล์บู่ที่นำไปสู่ระยะยูติลบริเวณแอมพูล่าที่เจาะออกจากถุงไข่ที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่กำหนดไว้แล้ว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10 ถึง 220 kDa

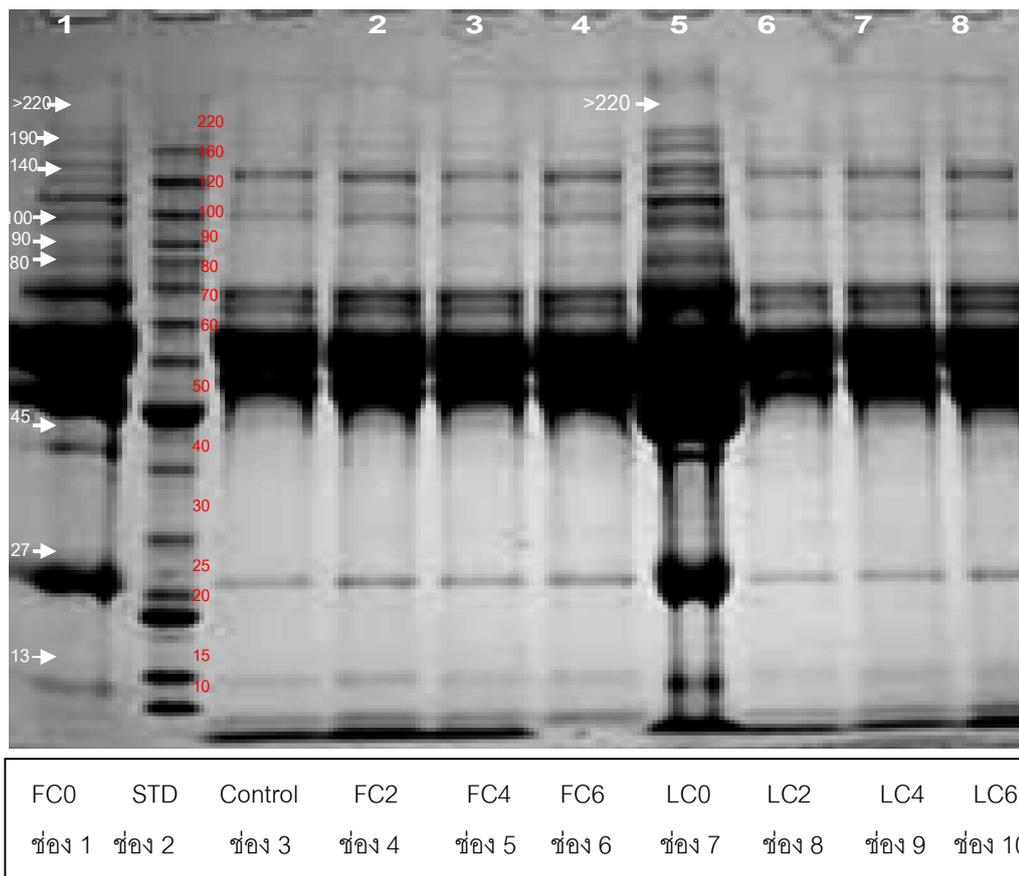


ภาพที่ 29 แถบโปรตีนสารหลังจาก POEC ระยะลูติเซลล์ที่หลังในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

หมายเหตุ

- ช่องที่ 1: LA0 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง
- ช่องที่ 2: LA2 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)
- ช่องที่ 3: LA4 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)
- ช่องที่ 4: LA6 = สารหลังจาก POEC บริเวณแอมพูล่าที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)
- ช่องที่ 5: STD = Standard protein marker
- ช่องที่ 6: Control = M 199 + 10 % fetal calf serum
- ช่องที่ 7: LI0 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิซทมัสที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง
- ช่องที่ 8: LI2 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิซทมัสที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)
- ช่องที่ 9: LI4 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิซทมัสที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)
- ช่องที่ 10: LI6 = สารหลังจาก POEC บริเวณอิซทมัสที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

3.3. ผลการเก็บสารหลังจากเซลล์ CC + GC ของรังไข่แม่สุกรที่เพาะเลี้ยงระยะฟอลลิคูลาร์ และระยะลูเตียล พบว่ารูปแบบโปรตีนจากสารหลั่งในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองระยะมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่คล้ายกัน โดยเฉพาะโปรตีนจากสารหลั่งจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ และระยะลูเตียลที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง FC0 และ LC0 (ช่อง 1 และช่อง 7) พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 13, 27, 45 kDa ในส่วนเหนือชั้นตอนบนของเจล พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 80, 90, 100, 140, 190, 220 และมากกว่า 220 kDa เห็นได้ในทุกแถบโปรตีนลักษณะที่พบคล้ายกันกับแถบโปรตีนควบคุมในช่อง 3 แต่เห็นได้ชัดเจนในช่อง 1 และช่อง 7 ซึ่งได้เลือกโปรตีนที่สนใจในระยะฟอลลิคูลาร์ช่อง 1 ขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 27, 45, 140 และมากกว่า 220 kDa ส่วนระยะลูเตียลที่ช่อง 7 เลือกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 แถบ โปรตีนของสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีลที่หลังในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

หมายเหตุ

ช่องที่ 1: FC0 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง

ช่องที่ 2: STD = Standard protein marker

ช่องที่ 3: Control = M 199 + 10 % fetal calf serum

ช่องที่ 4: FC2 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)

ช่องที่ 5: FC4 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)

ช่องที่ 6: FC6 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

ช่องที่ 7: LC0 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะลูทีลที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง

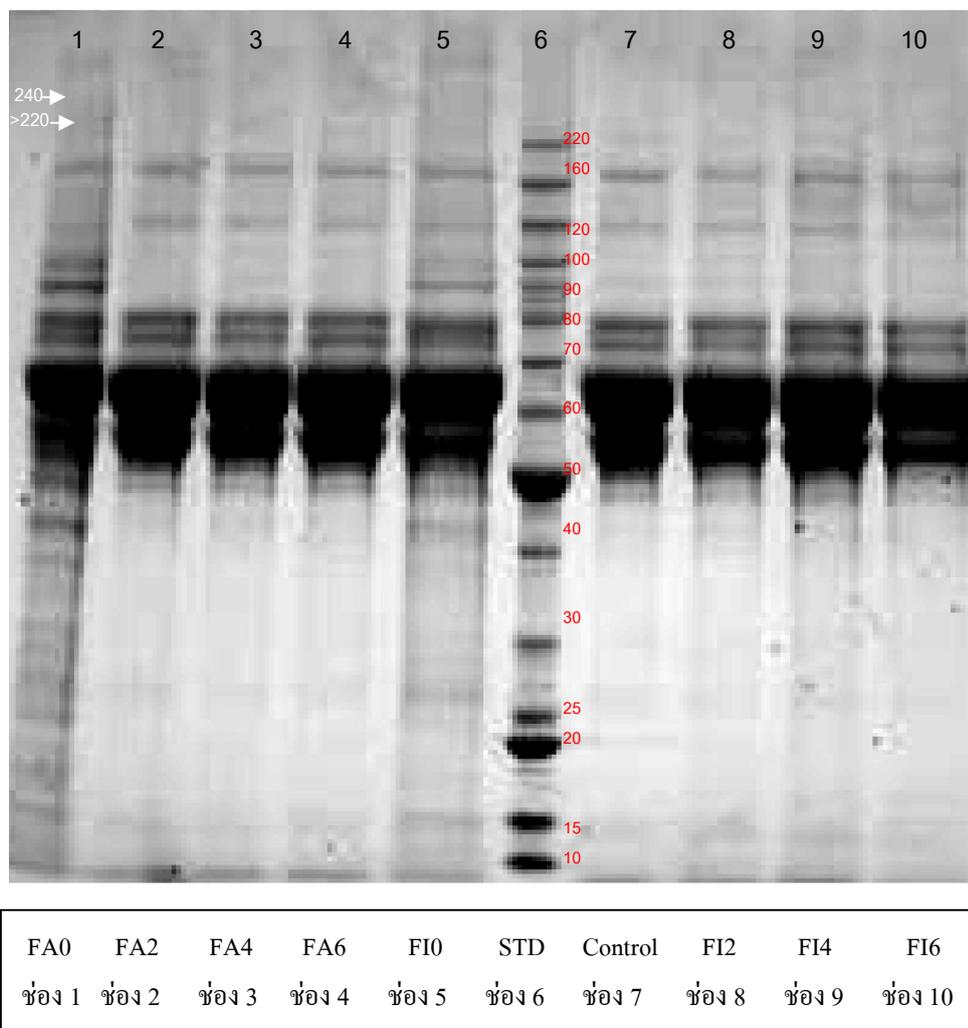
ช่องที่ 8: LC2 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะลูทีล ที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)

ช่องที่ 9: LC4 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะลูทีลที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)

ช่องที่ 10: LC6 = สารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะลูทีลที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

4. วิเคราะห์โปรตีนที่สนใจด้วยวิธี LC/MS/MS เพื่อศึกษาชนิดของโปรตีนที่หลงในอาหารเพาะเลี้ยงจากเซลล์เพาะเลี้ยงของ POEC และ CC + GC

4.1 ผลการนำโปรตีนที่ได้จากสารหลังจากเซลล์บ่มก่อนนำไปบริเวณแอมพูล่าและอิมมัทสระยะฟอลลิคูลาร์ โดยวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วตัดโปรตีนที่สนใจจากเจลในช่อง 1 ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa และ 240 kDa ซึ่งเทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS ประเมินผลโดยใช้โปรแกรม Mascot เกณฑ์การวิเคราะห์ที่ใช้ $p < 0.05$ ได้ผลดังตารางที่ 4 และ 5



ภาพที่ 31 ตำแหน่งของโปรตีนที่ตัดขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa และ 240 kDa จากเจลโปรตีนช่อง 1

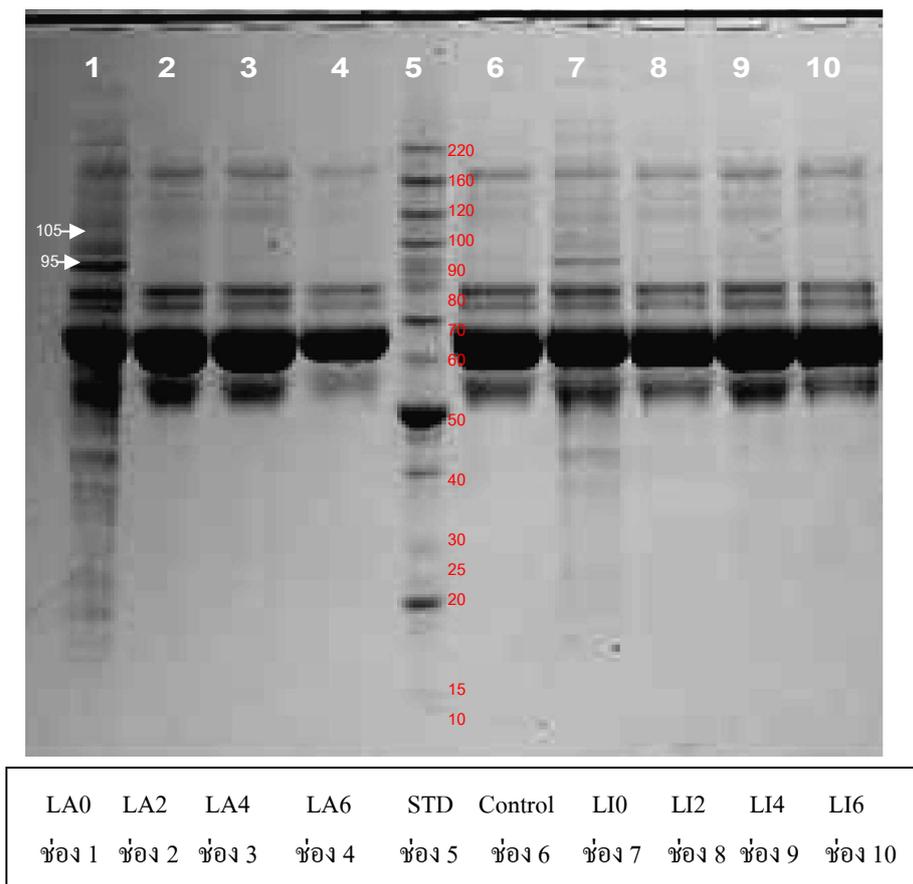
ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi/136429	Trypsin precursor
gi/6981420	Protease, serine, 1 (Trypsin 1) (Rattus norvegicus)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน 240 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi/136429	Trypsin precursor
gi/6981420	Protease, serine, 1 (Trypsin 1) (Rattus norvegicus)
gi/28317	Unnamed protein product (Homo sapiens)

4.2 ผลการนำโปรตีนจากเซลล์ที่ทนน้ำไขระยเหตุเดียวบริเวณแอมพูล่าที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง (LA0) โดยวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วตัดโปรตีนที่สนใจขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 95 kDa และ 105 kDa เมื่อเทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS โดยใช้โปรแกรม Mascot เกณฑ์การวิเคราะห์ที่ใช้ $p < 0.05$ ได้ผลดังตารางที่ 6 และ 7



ภาพที่ 32 ตำแหน่งของโปรตีนที่ตัดจากเจลช่อง 1 ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 95 kDa และ 105 kDa

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์ที่นำไปบริเวณแอมพูล่าระยะดูเตียล ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ 95 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 47522774	90-kDa heat shock protein [Sus scrofa]
gi 1170383	Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)
gi 149636948	PREDICTED: hypothetical protein [Ornithorhynchus anatinus]
gi 306891	90kDa heat shock protein
gi 149525990	PREDICTED: similar to heat shock protein 84b, partial [Ornithorhynchus anatinus]
gi 123681	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (Tumor-specific transplantation 84 kDa antigen) (TSTA)
gi 309317	84 kD heat shock protein
gi 73989602	PREDICTED: similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86) isoform 3 [Canis familiaris]
gi 73989600	PREDICTED: similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86) isoform 2 [Canis familiaris]
gi 73989598	PREDICTED: similar to heat shock protein 1, alpha isoform 1 [Canis familiaris]
gi 194033	heat-shock protein hsp86
gi 1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor
gi 61104911	heat shock protein 90Bb [Homo sapiens]
gi 11935049	keratin 1 [Homo sapiens]
gi 73696357	heat shock 90kDa protein 1, beta [Macaca mulatta]
gi 30962111	albumin [Felis catus]
gi 136429	Trypsin precursor
gi 73974509	PREDICTED: similar to heat shock protein 1, beta [Canis familiaris]
gi 126335261	PREDICTED: similar to angiotensin receptor [Monodelphis domestica]
gi 4159806	type II keratin subunit protein [Mus musculus]
gi 306891	90kDa heat shock protein

gi 149525990	PREDICTED: similar to heat shock protein 84b, partial [Ornithorhynchus anatinus]
gi 123681	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (Tumor-specific transplantation 84 kDa antigen) (TSTA)
gi 309317	84 kD heat shock protein
gi 73989602	PREDICTED: similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)
	isoform 3 [Canis familiaris]
gi 73989600	PREDICTED: similar to Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86) isoform 2 [Canis familiaris]
gi 73989598	PREDICTED: similar to heat shock protein 1, alpha isoform 1 [Canis familiaris]
gi 194033	heat-shock protein hsp86
gi 1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor
gi 61104911	heat shock protein 90Bb [Homo sapiens]
gi 11935049	keratin 1 [Homo sapiens]
gi 73696357	heat shock 90kDa protein 1, beta [Macaca mulatta]
gi 30962111	albumin [Felis catus]
gi 136429	Trypsin precursor
gi 73974509	PREDICTED: similar to heat shock protein 1, beta [Canis familiaris]
gi 126335261	PREDICTED: similar to angiotensin receptor [Monodelphis domestica]
gi 4159806	type II keratin subunit protein [Mus musculus]
gi 12859782	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 194037336	PREDICTED: similar to Keratin 77 [Sus scrofa]
gi 119892108	PREDICTED: similar to keratin 2 (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens) [Bos taurus]
gi 6981420	protease, serine, 2 [Rattus norvegicus]
gi 28590	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 55956899	keratin 9 [Homo sapiens]
gi 148747492	keratin 2 [Sus scrofa]
gi 191765	alpha-fetoprotein

gi 17028367	Similar to gelsolin (amyloidosis, Finnish type) [Homo sapiens]
gi 2865466	heat shock protein 75 [Homo sapiens]
gi 14198259	Unknown (protein for IMAGE:3584589) [Mus musculus]
gi 52789	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 28317	unnamed protein product [Homo sapiens]

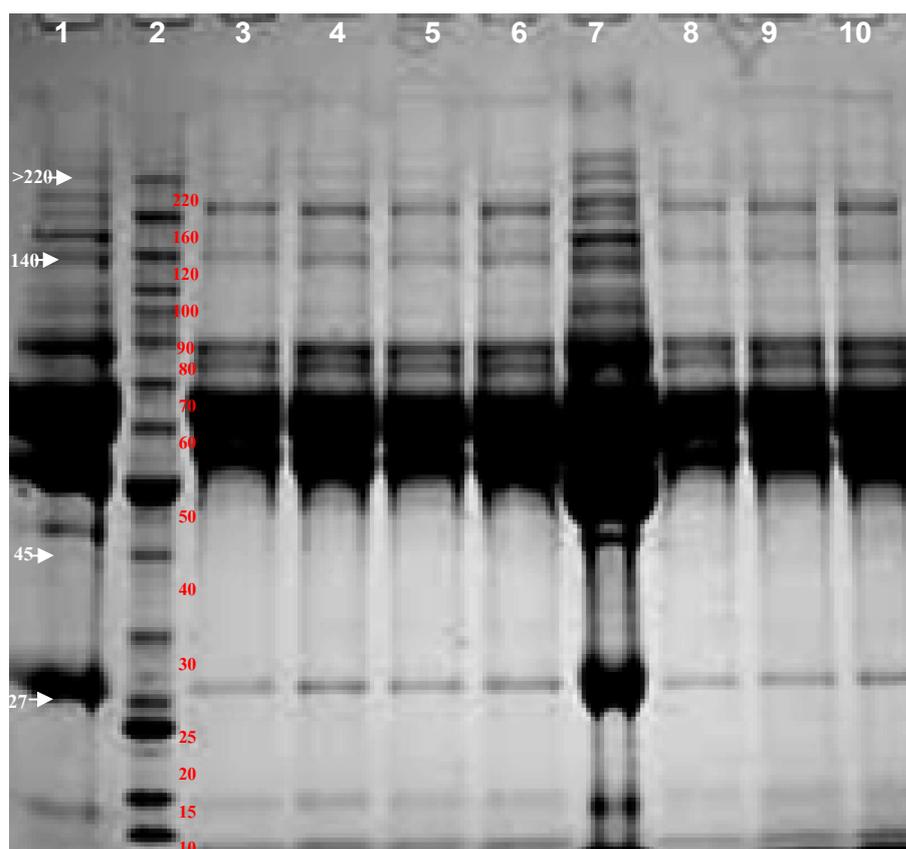
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากเซลล์ที่นำไปใช้บริเวณแอมพูล่าระยะลูติลขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ 105 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 6005942	valosin-containing protein [Homo sapiens]
gi 984249	protein kinase [Sus scrofa]
gi 74178174	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 4503483	eukaryotic translation elongation factor 2 [Homo sapiens]
gi 11935049	keratin 1 [Homo sapiens]
gi 73972966	PREDICTED: similar to heat shock protein 1, beta isoform 1 [Canis familiaris]
gi 149525990	PREDICTED: similar to heat shock protein 84b, partial [Ornithorhynchus anatinus]
gi 178056753	glycogen phosphorylase, liver [Sus scrofa]
gi 73971731	PREDICTED: similar to Iron-responsive element binding protein 1 (IRE-BP 1) (Iron regulatory protein 1) (IRP1) (Ferritin repressor protein) (Aconitate hydratase) (Citrate hydro-lyase) (Aconitase) [Canis familiaris]
gi 126334046	PREDICTED: similar to iron regulatory factor [Monodelphis domestica]
gi 194224903	PREDICTED: similar to aconitase 1, soluble [Equus caballus]
gi 197101163	aconitase 1, soluble [Pongo abelii]
gi 115498012	glycogen phosphorylase, liver [Bos taurus]
gi 32488	unnamed protein product [Homo sapiens]

gi 229552	albumin
gi 126283523	PREDICTED: similar to Liver glycogen phosphorylase [Monodelphis domestica]
gi 73989579	PREDICTED: similar to brain glycogen phosphorylase isoform 1 [Canis familiaris]
gi 183353	glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1)
gi 55741435	oviductal glycoprotein 1 [Sus scrofa]
gi 136429	Trypsin precursor
gi 194207375	PREDICTED: similar to Phosphorylase, glycogen; liver [Equus caballus]
gi 4159806	type II keratin subunit protein [Mus musculus]
gi 12859782	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 28317	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 114667176	PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) [Pan troglodytes]
gi 687239	tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein
gi 194037336	PREDICTED: similar to Keratin 77 [Sus scrofa]
gi 119892108	PREDICTED: similar to keratin 2 (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens) [Bos taurus]
gi 46485130	TPA: TPA_exp: keratin Kb40 [Mus musculus]
gi 74219975	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 109096781	PREDICTED: keratin 6A isoform 18 [Macaca mulatta]
gi 85701680	keratin 76 [Mus musculus]
gi 51092293	keratin 77 [Mus musculus]
gi 148747492	keratin 2 [Sus scrofa]
gi 1082886	tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein TRAP-1 - human
gi 21313044	katanin p60 subunit A-like 2 [Mus musculus]
gi 6981420	protease, serine, 2 [Rattus norvegicus]
gi 19343783	2610301G19Rik protein [Mus musculus]
gi 293686	epidermal keratin subunit II
gi 1098541	osmotic stress protein 94

<u>gi 74001348</u>	PREDICTED: similar to mitochondrial ribosomal protein L39 isoform a [Canis familiaris]
<u>gi 62122767</u>	keratin 9 [Canis lupus familiaris]

4.3 ผลการนำโปรตีนที่ได้จากสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ที่ยังไม่ได้ เพาะเลี้ยง (FC0) โดยวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วตัดโปรตีนที่สนใจขนาด น้ำหนักโมเลกุลที่ 27, 45, 140 และมากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS โดยใช้ โปรแกรม Mascot เกณฑ์การวิเคราะห์ที่ใช้ $p < 0.05$ ได้ผลดังตารางที่ 8 ถึง 11 ตามลำดับ



FC0	STD	Control	FC2	FC4	FC6	LC0	LC2	LC4	LC6
ช่อง 1	ช่อง 2	ช่อง 3	ช่อง 4	ช่อง 5	ช่อง 6	ช่อง 7	ช่อง 8	ช่อง 9	ช่อง 10

ภาพที่ 33 ตำแหน่งของโปรตีนที่ตัดขนาดน้ำหนักโมเลกุล 27, 45, 140 และมากกว่า 220 kDa จาก เจลโปรตีนช่อง 1

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลติคูลาร์ขนาด
น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ 27 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 89216	Ig lambda chain V-C region PLC3 - pig (fragment)
gi 227747	Ig VL
gi 21703157	immunoglobulin kappa light chain VJ region [Sus scrofa]
gi 89215	Ig kappa chain V-C region (PLC18) - pig (fragment)
gi 48374067	inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein [Sus scrofa]
gi 473213	IgM [Mus musculus]
gi 55369	immunoglobulin light chain [Mus musculus]
gi 297642	immunoglobulin variable region [Mus musculus domesticus]
gi 999962	Chain A, The Structure Of A Bivalent Diabody
gi 1002414	immunoglobulin light chain
gi 3328091	monoclonal anti-DNA IgM kappa-chain variable region [Mus musculus]
gi 194043301	PREDICTED: similar to hCG2010519 [Sus scrofa]
gi 90935	Ig kappa chain V region (SM1.5) - mouse (fragment)
gi 197102	(V-J). Ig heavy chain V-region. [Mus musculus]
gi 197096	(V-J). Ig heavy chain V-region. [Mus musculus]
gi 197098	(V-J). Ig heavy chain V-region. [Mus musculus]
gi 2385463	anti-pseudouridine monoclonal antibody light chain variable region [Mus sp.]
gi 111185614	IgI-V1 protein [Mus musculus]
gi 90911	Ig kappa chain V region (H37-60) - mouse
gi 1870366	anti-DNA immunoglobulin light chain IgG [Mus musculus]

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ขนาดน้ำหนักรหัสของโปรตีนที่ 45 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 47522826	haptoglobin [Sus scrofa]
gi 47522844	complement component 3 [Sus scrofa]
gi 47523830	apolipoprotein A-IV [Sus scrofa]
gi 136429	Trypsin precursor
gi 164302	alpha-1 acid glycoprotein
gi 179665	complement component C3
gi 149636227	PREDICTED: similar to chromosome 1 open reading frame 114 [Ornithorhynchus anatinus]
gi 6981420	protease, serine, 2 [Rattus norvegicus]
gi 6978487	aldolase A, fructose-bisphosphate [Rattus norvegicus]
gi 194665589	PREDICTED: hypothetical protein [Bos taurus]
gi 86695	Ig gamma chain C region - chimpanzee
gi 121111	Glia-derived nexin precursor (GDN) (Protease nexin I) (PN-1)
gi 149587632	PREDICTED: similar to alpha 2 type VI collagen, partial [Ornithorhynchus anatinus]
gi 154818367	beta-actin [Neovison vison]

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลติคลูล่าร์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ 140 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

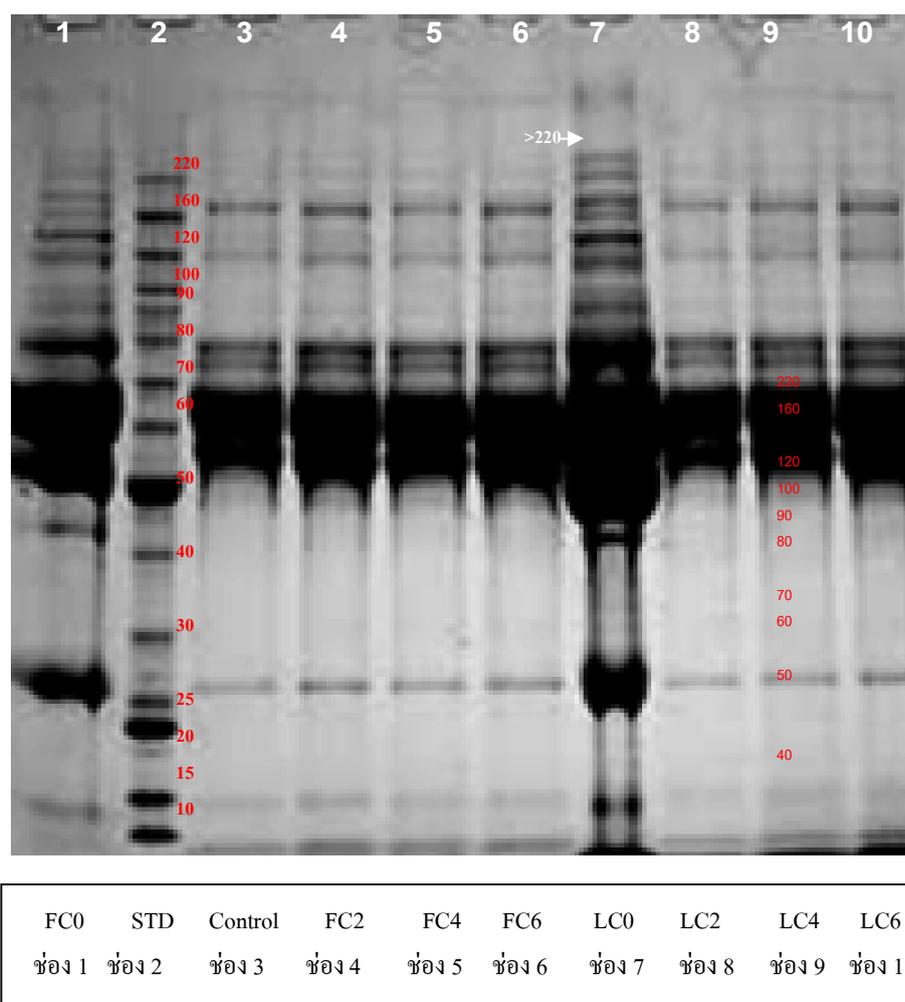
รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 194041147	PREDICTED: similar to Ceruloplasmin precursor (Ferroxidase) [Sus scrofa]
gi 47522844	complement component 3 [Sus scrofa]
gi 164318	albumin
gi 99028969	complement component 3 [Bos taurus]
gi 78101268	Chain B, Human Complement Component C3
gi 1620909	ceruloplasmin [Homo sapiens]
gi 1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor
gi 3319897	albumin [Canis familiaris]
gi 544053	Complement C3 precursor [Contains: Complement C3 beta chain; Complement C3 alpha chain; C3a anaphylatoxin; Complement C3b alpha' chain; Complement C3c alpha' chain fragment 1; Complement C3dg fragment; Complement C3g fragment; Complement C3d fragmen
gi 158138568	albumin [Rattus norvegicus]
gi 26340966	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 164503	immunoglobulin gamma-chain
gi 57164373	pre-pro serum albumin [Ovis aries]
gi 164507	immunoglobulin gamma-chain
gi 136429	Trypsin precursor
gi 126723309	complement component 3 [Oryctolagus cuniculus]
gi 57619174	ceruloplasmin [Ovis aries]
gi 76363596	Serum albumin precursor
gi 2136516	Ig gamma 4 chain constant region - pig (fragment)
gi 58585560	albumin [Microtus fortis fortis]
gi 166236027	immunoglobulin gamma chain 6b [Sus scrofa]

<u>gi 15808978</u>	albumin precursor [Schistosoma mansoni]
<u>gi 2492797</u>	Serum albumin precursor
<u>gi 149642125</u>	PREDICTED: similar to complement component C3 [Ornithorhynchus anatinus]
<u>gi 90824</u>	Ig heavy chain V-D-J region (RP93) - mouse (fragment)
<u>gi 112696672</u>	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
<u>gi 194037849</u>	PREDICTED: alpha-2-macroglobulin [Sus scrofa]
<u>gi 112699006</u>	immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]
<u>gi 194376358</u>	unnamed protein product [Homo sapiens]
<u>gi 85787215</u>	complement component C3 [Isoodon macrourus]
<u>gi 2136551</u>	Ig alpha chain C region - pig (fragment)
<u>gi 6649884</u>	Ig heavy chain [Homo sapiens]
<u>gi 47522736</u>	hemopexin [Sus scrofa]
<u>gi 149587632</u>	PREDICTED: similar to alpha 2 type VI collagen, partial [Ornithorhynchus anatinus]

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลั่งจากเซลล์ CC + GC ระยะฟอลลิคูลาร์ขนาด
น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 160961491	keratin 1 [Pan troglodytes]
gi 56407693	fibronectin [Sus scrofa]
gi 28317	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 61740600	keratin 10 [Canis lupus familiaris]
gi 4159806	type II keratin subunit protein [Mus musculus]
gi 12859782	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 57012358	keratin 73 [Rattus norvegicus]
gi 136429	Trypsin precursor
gi 194212015	PREDICTED: similar to type II keratin Kb15 [Equus caballus]
gi 194037336	PREDICTED: similar to Keratin 77 [Sus scrofa]
gi 119892108	PREDICTED: similar to keratin 2 (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens) [Bos taurus]
gi 149417895	PREDICTED: similar to keratin 6 irs3 [Ornithorhynchus anatinus]
gi 109096781	PREDICTED: keratin 6A isoform 18 [Macaca mulatta]
gi 46485130	TPA: TPA_exp: keratin Kb40 [Mus musculus]
gi 148747492	keratin 2 [Sus scrofa]
gi 52789	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 293686	epidermal keratin subunit II
gi 6981420	protease, serine, 2 [Rattus norvegicus]

4.4 ผลการนำโปรตีนที่ได้จากสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะลุติยลที่ยังไม่ได้เพาะเลี้ยง (LC0) โดยวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วตัดโปรตีนที่สนใจขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS โดยใช้โปรแกรม Mascot เกณฑ์การวิเคราะห์ที่ใช้ $p < 0.05$ ได้ผลดังตารางที่ 12



ภาพที่ 34 ตำแหน่งของโปรตีนที่ตัดขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 220 kDa จากเจลโปรตีนช่อง 1

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากสารหลังจากเซลล์ CC + GC ระยะลุติยขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมากกว่า 220 kDa เมื่อเทียบกับ database ของสิ่งมีชีวิตอื่น

รหัสโปรตีน	ชนิดของโปรตีน
gi 119888979	PREDICTED: heparan sulfate proteoglycan 2 [Bos taurus]
gi 194207923	PREDICTED: heparan sulfate proteoglycan 2 [Equus caballus]
gi 28317	unnamed protein product [Homo sapiens]
gi 11935049	keratin 1 [Homo sapiens]
gi 108998883	PREDICTED: heparan sulfate proteoglycan 2 [Macaca mulatta]
gi 73950644	PREDICTED: similar to Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor (HSPG) (Perlecan) (PLC) [Canis familiaris]
gi 194037847	PREDICTED: similar to Alpha-2-macroglobulin precursor (Pregnancy zone protein) (Alpha-2-M) [Sus scrofa]
gi 61740600	keratin 10 [Canis lupus familiaris]
gi 73950646	PREDICTED: similar to Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor (HSPG) (Perlecan) (PLC) [Canis familiaris]
gi 1172451	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor (HSPG) (Perlecan) (PLC)
gi 122891114	perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2) [Mus musculus]
gi 27805977	keratin 10 [Bos taurus]
gi 164318	albumin
gi 146741296	keratin 1 [Sus scrofa]
gi 547754	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (CK 2e) (K2e) (keratin-2)
gi 148697968	mCG120448, isoform CRA_a [Mus musculus]
gi 1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precursor
gi 4159806	type II keratin subunit protein [Mus musculus]

gi 12859782	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 148747492	keratin 2 [Sus scrofa]
gi 136429	Trypsin precursor
gi 119892108	PREDICTED: similar to keratin 2 (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens) [Bos taurus]
gi 3319897	albumin [Canis familiaris]
gi 109096781	PREDICTED: keratin 6A isoform 18 [Macaca mulatta]
gi 148356276	keratin 4 [Bos taurus]
gi 149714794	PREDICTED: keratin 4 [Equus caballus]
gi 149031970	rCG50690 [Rattus norvegicus]
gi 30962111	albumin [Felis catus]
gi 398168	keratin 2 epidermis [Mus musculus]
gi 194037336	PREDICTED: similar to Keratin 77 [Sus scrofa]
gi 47059013	keratin 73 [Mus musculus]
gi 80475848	KRT73 protein [Homo sapiens]
gi 57012360	keratin 4 [Rattus norvegicus]
gi 149449400	PREDICTED: similar to heparan sulfate proteoglycan perlecan, partial [Ornithorhynchus anatinus]
gi 46485130	TPA: TPA_exp: keratin Kb40 [Mus musculus]
gi 74219975	unnamed protein product [Mus musculus]
gi 114667176	PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) [Pan troglodytes]
gi 85701680	keratin 76 [Mus musculus]
gi 149417893	PREDICTED: similar to epidermal cytokeratin 2 [Ornithorhynchus anatinus]
gi 76617986	PREDICTED: keratin 18 [Bos taurus]
gi 149714860	PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin-18) (CK-18) (Keratin-18) (K18) (Cell proliferation-inducing gene 46 protein) [Equus caballus]
gi 191765	alpha-fetoprotein
gi 194212015	PREDICTED: similar to type II keratin Kb15 [Equus caballus]

gi 149417897	PREDICTED: similar to keratin 6 irs4 [Ornithorhynchus anatinus]
gi 57012352	keratin 75 [Rattus norvegicus]
gi 149422950	PREDICTED: similar to keratin 13 [Ornithorhynchus anatinus]
gi 293686	epidermal keratin subunit II
gi 6981420	protease, serine, 2 [Rattus norvegicus]
gi 18031720	keratin protein K6irs [Homo sapiens]
gi 126308030	PREDICTED: similar to Krt35 protein [Monodelphis domestica]
gi 126308114	PREDICTED: similar to K12 keratin [Monodelphis domestica]

จากผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS โดยใช้โปรแกรม Mascot พบโปรตีนที่น่าสนใจที่มีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าและอีสทรม์ระยะฟอลลิคูลาร์เลือกโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa และ 240 kDa เซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าและอีสทรม์ระยะลูทีลเลือกโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 95 kDa และ 105 kDa โปรตีนที่ได้จาก CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์เลือกโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 27, 45, 140 และมากกว่า 220 kDa ส่วนโปรตีนที่ได้จาก CC+GC ระยะลูทีลเลือกโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa ผลที่ได้พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากันมีโปรตีนที่ตรวจพบหลายชนิด

บทที่ 6

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์บุท่อนำไข่แม่สุกรบริเวณแอมพูล่าและอิสทมัสในรอบการเป็นสัดทั้ง 2 ระยะ คือระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูทีล พบเซลล์บุท่อนำไข่รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย (ciliated columnar epithelial cells) และเซลล์บุท่อนำไข่รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (non-ciliated round shape epithelial cells) แต่ไม่มีไมโครวิลไล (microvilli) สันๆ อยู่ที่ผิว (Dekel และ Phillips, 1979; Kamici และคณะ, 1999; Steffl และคณะ, 2004; Kress และ Morson, 2007; Codon และ Casanave, 2009) และจากการศึกษาของ Areekijseeree และคณะ (2005) (2006) ที่ศึกษาความแตกต่างของสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของเซลล์บุท่อนำไข่สุกรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าในระยะฟอลลิคูลาร์มีเซลล์บุท่อนำไข่รูปทรงกระบอกที่มีซีเลียจำนวนมากกว่าในระยะลูทีล โครงสร้างของเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าและอิสทมัสเป็นส่วนที่สำคัญในกระบวนการสืบพันธุ์ ซึ่งเซลล์ไขเคลื่อนเข้าสู่ท่อนำไข่เพื่อรอการปฏิสนธิกับเซลล์สุจิหลังเซลล์ไขสุกและตกจากรังไข่ บริเวณแอมพูล่าเป็นที่เกิดการปฏิสนธิและมีการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะเริ่มแรก (Leese, 1988; Desantis และคณะ, 2004) ลักษณะของเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่าในระยะฟอลลิคูลาร์ พบเซลล์ที่มีซีเลียเป็นจำนวนมากกว่าระยะลูทีล (Yanis และคณะ, 2009) เซลล์ที่มีซีเลียนี้ช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ไขที่สุก ส่วนในระยะลูทีลจะพบเซลล์บุท่อนำไข่ที่ไม่มีซีเลียเป็นจำนวนมากขึ้น (Abe และ Oikawa, 1991 Areekijseeree และคณะ, 2006) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สร้างและหลั่งสารไกลโคโปรตีน (glycoprotein) พบที่ต่อมหลั่งสาร (secretory granule) (Murray, 1992; Desouza และ Murry, 1995) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Verhage และคณะ ในปี ค.ศ.1997 พบว่าเซลล์บุท่อนำไข่ที่ไม่มีซีเลียของลิงบาบูนจะหลั่งสารไกลโคโปรตีนเมื่อระดับเอสโตรเจนสูงขึ้น สำหรับลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อนำไข่บริเวณอิสทมัสในรอบการเป็นสัด พบเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์ที่ไม่มีซีเลียแต่ไม่มีไมโครวิลไล สันๆ หรือเซลล์หลั่งสาร (secretory cells) จำนวนมาก ซึ่งงานวิจัยของ Arthur และคณะ (1976) พบว่าเซลล์หลั่งสารมีขนาดเล็กกว่าที่พบในมดลูกและปากมดลูกซึ่งเหมือนกับในบริเวณแอมพูล่า

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ COCs ในรอบการเป็นสัดได้คัดเลือกรังไข่ที่อยู่ในระยะฟอลลิคูลาร์และลูทีลมาทำการศึกษา โดยได้เจาะเซลล์ไขบริเวณแอนทรัลฟอลลิเคิล

(antral follicle) จำนวนทั้งหมด 110 รังไข่ ระยะฟอลลิคูลาร์จำนวน 73 รังไข่ และระยะลูทีอัลจำนวน 37 รังไข่ เจาะได้เซลล์ไข่ทั้งหมด 880 เซลล์ เฉลี่ยได้ 8 เซลล์ไข่ต่อรังไข่ เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ไข่ของสุกรสาวพบว่าในสุกรสาวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46 เซลล์ไข่ต่อรังไข่ (Areekijsee และ Vejaratpimol, 2006) ซึ่งมากกว่าในแม่สุกร และพบว่าเป็นระยะฟอลลิคูลาร์ต่อระยะลูทีอัลเท่ากับ 557 ต่อ 323 ซึ่งพบเซลล์ไข่ที่มีลักษณะแตกต่างกัน 5 ชนิด โดยแบ่งตามลักษณะของเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ คือเซลล์ไข่ชนิดที่หนึ่ง (เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น) เซลล์ไข่ชนิดที่สอง (เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น) เซลล์ไข่ชนิดที่สาม (เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน) เซลล์ไข่ชนิดที่สี่ (เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ) และเซลล์ไข่ชนิดที่ห้า (เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบแผ่ขยาย) (มงคล เตชะกำพูน และคณะ, 2536; Tomer และคณะ, 1997) ซึ่งจากการเจาะได้เซลล์ไข่ชนิดต่างๆ พบว่าเซลล์ไข่ชนิดที่หนึ่งและสองที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และทำให้เซลล์ไข่สุกได้ในระยะฟอลลิคูลาร์ต่อระยะลูทีอัลเท่ากับ 415 ต่อ 185 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในระยะฟอลลิคูลาร์มีจำนวนเซลล์ไข่ชนิดที่หนึ่งและชนิดที่สองมากกว่าระยะลูทีอัล ในงานวิจัยของมงคล เตชะกำพูน และคณะ (2536) พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไข่ระหว่างรังไข่จากแม่สุกรที่ผ่านรอบการเป็นสัดมาแล้วกับสุกรสาวที่ยังไม่มีรอบของการเป็นสัดจำนวนของเซลล์ไข่ที่ได้จากรังไข่ของแม่สุกรมีค่าน้อยกว่าของสุกรสาว เนื่องจากหลังวัยเจริญพันธุ์จะมีการเจริญของฟอลลิเคิลและเซลล์ไข่มากกว่าก่อนวัยเจริญพันธุ์ฟอลลิเคิลและเซลล์ไข่จะเจริญจนถึงช่วงตกไข่ในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัด โดยบางส่วนจะสูญเสียก่อนตกไข่และอีกส่วนหนึ่งจะเจริญจนถึงช่วงตกไข่

นอกจากนี้พบว่าเซลล์ไข่ชนิดที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นและแบบหลายชั้นเป็นเซลล์ไข่ที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อการปฏิสนธิในอกร่างกาย เพราะอัตราการปฏิสนธิและการเจาะของตัวอสุจิสูงเมื่อเทียบกับเซลล์ไข่ชนิดอื่นๆ (Kikuchi และคณะ, 1993) งานวิจัยนี้ได้เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ชนิดที่หนึ่งและชนิดที่สองในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M 199 ที่เสริมด้วย 10% heattreated fetal calf serum (HTFCS), NaHCO_3 2.2 mg/mL (Sigma Company, St Louis MO), 1 M Hepes (Sigma, St Louis MO), 0.25 mM pyruvate, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FSH, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LH, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estradiol ซึ่งละลายใน ethanol และ gentamycin sulfate 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าเซลล์ไข่ทั้งสองชนิดสามารถพัฒนาให้ไข่สุกได้สูง (Areekijsee และคณะ, 2006; Mahmodi และคณะ, 2009) นอกจากนี้ Areekijsee และคณะ (2006) ได้ศึกษาเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่า COCs ของสุกรสาวชนิดที่หนึ่งและชนิดที่สองเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วยฮอร์โมนสามารถพัฒนาให้ไข่สุกได้สูงขึ้น ซึ่งพบในการศึกษาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เช่น ในโคได้มีการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่โคในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

M 199 และเสริมด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนและแอลเอส ซึ่งสามารถทำให้เซลล์ไข่ของโคสุกได้ (ณรงค์ เลียงเจริญ และคณะ, 2549; Kitiyanant และคณะ, 1995; Choi และคณะ, 2000; Geshi และคณะ, 2000) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mossa และคณะ (2007) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฟอลลิเคิลในรังไข่กับคุณภาพของการพัฒนาตัวอ่อนของแกะในการเพาะเลี้ยงโดยเพิ่มฮอร์โมนเอสโตรเจนและแอลเอสในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

ตามธรรมชาติลักษณะถุงไข่ที่เป็นแอนทรัลฟอลลิเคิล ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด เซลล์ที่อยู่ติดกับเซลล์ไข่เรียกว่าคมูลัสเซลล์ (cumulus cell: CC) ส่วนเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบในถุงไข่ เรียกว่าแกรนูโลซ่าเซลล์ (granulosa cell: GC) เซลล์ CC และ GC มีหน้าที่สร้างสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ เช่น ion nucleotides และกรดอะมิโน ปล่อยเข้าสู่ไข่ในถุงไข่ (Tsafiriri และคณะ, 1976; Stone และคณะ, 1978) สารนี้คือ oocyte maturation inhibitor (OMI) หรือเรียกว่า meiosis arresting factor ทำหน้าที่หยุดการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ในขณะที่เซลล์ไข่ซึ่งมี CC หนาแน่นถูก OMI ยับยั้งให้อยู่ในระยะ diplotene stage of prophase I และยังทำให้ primary oocyte ไม่พัฒนาไปสู่ secondary oocyte (Centola และคณะ, 1981; Whitaker, 1996; Li และคณะ, 2000) ซึ่งขนาดของฟอลลิเคิลที่ใหญ่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาร OMI ที่หลั่งออกมาน้อย แต่ไม่ขึ้นกับรอบการเป็นสัด (Wiel และคณะ, 1983) ในงานวิจัยครั้งนี้เมื่อเจาะ COCs ออกจากแอนทรัลฟอลลิเคิล มีผลให้ CC แยกตัวออกจาก GC เซลล์ไข่ที่ถูกแยกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะเกิดการแบ่งตัวแบบไมโอซิสต่อได้เอง โดยผนังของนิวเคลียของเซลล์ไข่จะหายไป เรียกการหายไปนี้ว่าเจมินัล เวสิเคิล เบรกดาวน์ (Germinal vesicle breakdown: GVBD) ซึ่งเป็นลักษณะอย่างหนึ่งที่บ่งชี้ถึงสภาพของการเจริญพร้อมปฏิสนธิ (มงคล เตชะกำฟู, 2543) ดังนั้นการทำให้ CC ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่กระจายตัวออก ทำให้ไม่สามารถส่งสาร OMI มายับยั้งการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไข่ได้ และเมื่อเสริมฮอร์โมนจึงทำให้เซลล์ไข่สามารถพัฒนาจนสุกได้เซลล์ไข่มีการเจริญและพัฒนาจากระยะ primary oocyte เข้าสู่ระยะ secondary oocyte โดยการเพิ่มฮอร์โมนหรือได้รับอิทธิพลของฮอร์โมนโกนาโดโทรฟิน (gonadotropins: GnRH) ซึ่งมีผลไปกระตุ้นฮอร์โมนเอสโตรเจนและแอลเอส จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่งฮอร์โมนเอสโตรเจน แอลเอส และสเตียรอยด์ฮอร์โมน เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจนมากระตุ้นเซลล์ไข่จึงเจริญต่อไปได้ (Schwartz และ Channing, 1977) ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Stone และคณะ ในปี ค.ศ. 1978 ที่เสริมฮอร์โมนแอลเอสในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์และสามารถทำให้เซลล์ไข่สุกได้เช่นเดียวกับ Wetscher และคณะ (2004) ได้ศึกษาการฝากถ่ายตัวอ่อนในโคเพื่อศึกษาการเจริญของตัวอ่อนในระยะแรกด้วยการเพิ่มฮอร์โมนโกนาโดโทรฟินทำให้โคเกิดการตกไข่ได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า OMI ถูกยับยั้งโดยเอนไซม์ทริปซิน แต่สามารถทำงานได้ดีหลังจากละลายเมื่อถูกแช่แข็งหรือขณะมีอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส (Tsafiriri และคณะ, 1976)

ผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรนาน 48 ชั่วโมงศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบการเปลี่ยนแปลงไซโทพลาซึมของ CC เคลื่อนตัวและยื่นยาวออกจากผิวเซลล์ไข่ (Dietl และ Czuppon, 1984; Martinova และคณะ, 2007) ยืนยันผลได้จากการทำ Semi-thin section ที่ได้แสดงให้เห็นการแยกตัวของ CC ออกจากเซลล์ไข่ โดย CC มีลักษณะกระจายออกเซลล์ที่มีรูปร่างกลมเปลี่ยนเป็นรูปกรวยยื่นยาวออก (Areekijseeree และ Vejaratpimol, 2006) งานวิจัยนี้สามารถทำให้เซลล์ไข่แม่สุกรสุกได้ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ด้วยวิธีนี้ทำให้ประหยัดเวลาและสารเคมีรวมทั้งอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้นเองและใช้ฮอร์โมนเท่าที่จำเป็น แต่สามารถเตรียมเซลล์ไข่ให้สุกได้เพื่อประโยชน์ที่จะนำไปใช้ในอนาคต หากต้องการที่จะขยายพันธุ์เป็นจำนวนมาก ซึ่งพบว่าสุกรที่ถูกคัดทิ้งเป็นสุกรที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ ซึ่งจากงานวิจัยของ Tienthai และคณะ (2005) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของท่อนำไข่สุกรสาวทดแทนที่ถูกคัดทิ้งโดยเจาะเลือดและเก็บอวัยวะสืบพันธุ์หลังจากสุกรถูกส่งไปยังโรงฆ่าสัตว์ พบว่าสุกรมีปัญหาไม่เป็นที่คัดร้อยละ 68 ผสมไม่ติดร้อยละ 32 ซึ่งในแม่สุกรที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์จะต้องถูกคัดทิ้งเช่นเดียวกัน

จากงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาสารหลังจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยง (condition medium) ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อในเรื่องสารหลังจากเซลล์ของท่อนำไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง โดยการแยกแถบโปรตีนด้วยการทำ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเลือกโปรตีนที่สนใจแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Liquid chromatography/Mass spectrometer/Mass spectrometer (LC/MS/MS) โดยใช้โปรแกรม Mascot เกณฑ์การวิเคราะห์มีค่าความน่าเชื่อถือร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ซึ่งสารหลังจากเซลล์ที่นำมาศึกษาตามขั้นตอนดังกล่าวเลือกระยะของการเป็นสัดและบริเวณที่แตกต่างกัน 4 แบบ คือสารหลังจากเซลล์ของท่อนำไข่ระยะฟอลลิคูลาร์บริเวณแอมพูล่า สารหลังจากเซลล์ของท่อนำไข่ระยะลูติลลารีแอมพูล่าและสารหลังจากเซลล์ CC+GC ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลารี ซึ่งงานวิจัยของ Richard และ Sirard (1996) พบว่า GC ที่อยู่ในของเหลวในฟอลลิเคิลมีสัณฐานกลมและอยู่เป็นกลุ่มเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เซลล์จะแยกออกเป็นกลุ่มเล็กๆ หรือเป็นเซลล์เดี่ยวแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา ซึ่งเซลล์เหล่านี้หลังสารอาหารเพาะเลี้ยง แต่จากงานวิจัยหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมงในทุกการทดลองไม่พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จึงได้เลือกแถบโปรตีนที่สนใจจากถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลารี และสารหลังจากเซลล์ของท่อนำไข่ระยะฟอลลิคูลาร์และระยะลูติลลารี โดยเลือกโปรตีนจากสารหลังของเซลล์ของท่อนำไข่ระยะฟอลลิคูลาร์บริเวณแอมพูล่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa และ 240 kDa ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Areekijseeree และ Veerapraditsin (2008) ได้ทำการทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์ที่นำไข่ในสุกรสาว และนำสารหลังจากเซลล์ที่นำไข่สุกร (POEC) และสารหลังจากเซลล์ CC+GC ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในช่วงเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง โดยวิธี SDS-PAGE และพบแถบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa ในทุกแถบโปรตีน ซึ่งจากงานวิจัยพบว่าชนิดของโปรตีนที่ตรวจพบได้ในแถบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa และ 240 kDa ทั้งสองแถบจากงานวิจัยนี้ที่นำมาวิเคราะห์ได้ผลเหมือนกัน คือ trypsin precursor และ protease

สำหรับสารหลังจากเซลล์ที่นำไข่ระยะลูติลบริเวณแอมพูล่า ได้เลือกแถบโปรตีนที่สนใจขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 95 และ 105 kDa ซึ่งขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 95 kDa พบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากันหลายชนิด ได้เลือก 90 kDa heat shock protein ซึ่งพบว่าเป็นโปรตีนที่มีอยู่ภายในเซลล์ทำหน้าที่หลักเป็นตัวกระตุ้นโปรตีนอื่นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น (Zhao และคณะ, 2002) จากงานวิจัยของ King และคณะ (1994) ศึกษาเกี่ยวกับการนำเซลล์ที่นำไข่ของโคในรอบการเป็นสัดหาโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 85 ถึง 95 kDa ที่ชักนำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์สุจิเพื่อการปฏิสนธิในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับโปรตีนที่นำมาจากของเหลวในท่อไข่ Staros และ Killian (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 6 แบบกับโซนา เพลลูซิตาของโคในรอบการเป็นสัด และงานวิจัยของ Gerena และ Killian (1995) ศึกษาของเหลวในท่อไข่ของโคในรอบการเป็นสัด พบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 47 kDa ตลอดรอบการเป็นสัด และพบโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 80 ถึง 95 kDa ช่วงก่อนตกไข่ 3 ถึง 4 วัน ส่วนขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ 105 kDa พบโปรตีน glycogen phosphorylase protein kinase และ oviductal glycoprotein ซึ่งงานวิจัยของ Verhage และคณะ (1997) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ที่นำไข่ของลิงบาบูนพบโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 110 ถึง 130 kDa ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่ช่วยให้อสุจิมี่ความพร้อมในการปฏิสนธิได้ดีขึ้น สำหรับ glycogen phosphorylase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการแตกตัวของไกลโคเจนให้เป็นกลูโคส ส่วน protein kinase ทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการสลายไกลโคเจนโดยทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+})

ส่วนโปรตีนที่ได้จากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ในรอบการเป็นสัดระยะฟอลลิคูล่าพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27, 45, 140 และมากกว่า 220 kDa ซึ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27 kDa ที่พบจากการทำวิจัย คืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin: Ig) เป็น globulin ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกายมี 5 ชนิด คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE แต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกันโดยทั่วไป Ig ถูกทำลายใน granulocytes และ reticuloendothelial cells ของตับและระบบทางเดินอาหาร บางส่วนถูกขับออกทางลำไส้และไต ซึ่งในงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006)

ที่ศึกษาเกี่ยวกับรูปแบบเฉพาะของโปรตีนจากน้ำในรังไข่ของมนุษย์ในระยะต่างๆ ที่วิเคราะห์โดย MALDI-TOF MS พบ immunoglobulin เช่นกัน

โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45 kDa พบโปรตีนหลายชนิด คือ haptoglobin, complement component 3 และ apolipoprotein A-IV สำหรับ haptoglobin เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในพลาสมาซึ่งในภาวะปกติ haptoglobin จะจับกับฮีโมโกลบินอิสระ (free hemoglobin) โดยค่า haptoglobin จะมีค่าลดลงในคนที่มีภาวะเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) สามารถผ่านเข้าสู่ฟอลลิเคิลและมีผลต่อคุณภาพเซลล์ไข่ซึ่งขัดขวางการแลกเปลี่ยนของ apolipoprotein A-I (Porta และคณะ, 1998) ส่วน apolipoprotein A-IV เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน HDL-c (High-density lipoproteins cholesterol) มีหน้าที่กระตุ้นการไหลของคอเลสเตอรอลถูกสร้างขึ้นในตับและลำไส้เล็ก (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537) ซึ่งทำหน้าที่เหมือน apolipoprotein A-I สำหรับ complement component 3 เป็นโปรตีนในพลาสมา ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งในภาวะปกติไม่ทำงานจะทำงานต่อเมื่อถูกกระตุ้น โดยงานวิจัยของ Gordon และคณะ (1986) ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับยับยั้งกับเอนไซม์โปรติเอสในของเหลวในรังไข่ของมนุษย์กับสุกร พบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 45 kDa

โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 140 kDa พบ ceruloplasmin และ hemopexin ซึ่ง ceruloplasmin เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ที่ตับ มีโครงสร้างเป็นทองแดง 90 เปอร์เซ็นต์ และอีก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนมีหน้าที่ลำเลียงธาตุเหล็กในเลือด โดยเปลี่ยนเหล็กเฟอร์รัสไปเป็นเหล็กเฟอร์ริก ส่วน hemopexin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เก็บรักษาธาตุเหล็ก (Smith และคณะ, 1983)

โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa พบ fibronectin (FN) ซึ่งเป็นไกลโค-โปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตรวมอยู่ด้วย ที่เกี่ยวข้องไปถึงเมมเบรน และ extracellular matrix ด้วย เช่น collagen, fibrin และ heparane sulfate พบมากในเลือด จึงเป็นตัวการสำคัญในกระบวนการหายของแผลและยังพบมากในน้ำลาย ดังนั้นการเลียแผลจะเป็นการสมานแผลอย่างหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีส่วนสำคัญในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Williams และคณะ, 2008)

โปรตีนที่ได้จากสารหลังจากเซลล์ CC+GC ในรอบการเป็นสักระยะลูติเคิลเลือกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 kDa คือ alpha-2-macroglobulin เป็นพลาสมาโปรตีนถูกสร้างในตับ ทำหน้าที่ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (De Boer และคณะ, 1993)

จากการศึกษาโปรตีนที่หลังจากเซลล์ CC+GC ในรอบการเป็นสักระยะฟอลลิคูล่าและระยะลูติเคิลเป็นโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากเซลล์ของฟอลลิเคิล มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของฟอลลิเคิลและการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของฟอลลิเคิล ซึ่งสารควบคุมภายในรังไข่แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 อินฮิบิน (inhibin) แอคติวีน (activin) และฟอลลิสเต-

ติน (follistatin) กลุ่มที่ 2 โกรทแฟกเตอร์ต่างๆ (growth factors) พบว่าโปรตีนหลายชนิดที่พบในสารหลังจากเซลล์ CC+GC เป็นโกรทแฟกเตอร์ที่เป็น binding compounds เช่น fibronectin alpha-2-macroglobulin ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการเจริญของฟอลลิเคิลในเรื่องการปรับเปลี่ยน (modulation) การเพิ่มจำนวน (proliferation) และการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของเซลล์ แกรนูโลซ่าและทีก้าในฟอลลิเคิล (มงคล เตชะกำพุ, 2543) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Angelucci และคณะ, (2006) ได้วิเคราะห์โปรตีนจากของเหลวภายในฟอลลิเคิลของผู้หญิงจำนวน 25 คนพบโปรตีนจำนวน 695 ตำแหน่ง ซึ่งมีโปรตีนหลายชนิดที่พบในการทดลองครั้งนี้เช่นเดียวกัน ได้แก่ alpha-2-macroglobulin, ceruloplasmin, complement component 3, immunoglobulin, haptoglobin, apolipoprotein A-IV, hemopexin และ albumin

จากผลการศึกษาพบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ซึ่งพบในท่อนำไข่และถุงไข่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการศึกษาถึงประโยชน์ที่ได้จากโปรตีนที่พบเพื่อที่จะได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต จะเห็นได้ว่าการนำรังไข่และท่อนำไข่ของสัตว์ที่ไม่ได้นำไปบริโภคมาใช้ศึกษาทดลองอาจเป็นประโยชน์ในระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ เช่น การเตรียมความพร้อมของอสุจิเพื่อการปฏิสนธิ ช่วยให้อสุจิเคลื่อนที่ได้ดีมีชีวิตรอยู่ได้นาน ช่วยในการปฏิสนธิ และช่วยพัฒนาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในระยะแรก (Brackett และ Mastroianni, 1974; Buih และคณะ, 1993; King และคณะ, 1994; Woldesenbet และ Newton, 2003; Areekijserree และ Veerapraditsin, 2007; Lloyd และคณะ, 2008; Imam และคณะ, 2009)

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

- กัมพล แก้วเกษ. การจัดการฟาร์มสุกรพันธุ์ (ความรู้พื้นฐาน). นครปฐม. ร้านพัชรารักษ์. 2548.
- กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย. 2549.
- ไชยา อึ้งสูงเนิน. คู่มือสุกร. ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท. 2532.
- ชวนพิศ ดีเอโกนามกุล. “วิธีวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพโปรตีน.” อนุพันธุศาสตร์และพันธุ-
วิศวกรรม. นครปฐม. โรงพิมพ์สาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา. 2536.
- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ, อนนท์ เทืองสันเทียะ, วิบูลย์ เข้มวิศวกูร และ มาลี อภิเมธีธำรง. “ผลของขนาด
ฮอร์โมนเอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคขาวลำพูน.”
ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน ปากช่อง นครราชสีมา กรมปศุสัตว์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2550.
- พิณทิพ รื่นวงษา. “การแยกโปรตีนโดยวิธีทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.” อนุพันธุศาสตร์และพันธุ-
วิศวกรรม. นครปฐม. โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.
2536.
- พรทิพย์ ชัยมณี, ธนิต ผิวนี้่ม และ อรนาถ สุนทรวัฒน์. “เจลฟิลเตรชันและสมบัติบางประการของ
โปรตีน.” ปฏิบัติการชีวเคมี 1. นครปฐม. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศิลปากร. 2530.
- ไพศาล เทียนไทย. “บทบาทของท่อหน้าไข่กับการขนส่งและการคาปาซิเตชันของตัวอสุจิในสุกร.”
เวชสารสัตวแพทย์ ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 (30 มิถุนายน 2547). 31-40.
- มงคล เตชะกำฟู. เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์. กรุงเทพฯ. บริษัท
दानสุทธาการพิมพ์ จำกัด. 2543.
- มงคล เตชะกำฟู, วันเพ็ญ ศรีอนันต์, จินดา สิงห์ล่อ และ วิชัย ทันตศุภารักษ์. “การผลิตตัวอ่อนสุกร
ด้วยวิธีการปฏิสนธิในอกร่างกาย.” เวชสารสัตวแพทย์ 23, 3 (กันยายน 2536) :
189-198.
- มยุรา อารีกิจเสรี. “การเตรียมตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.”
วารสารศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 12, 1 (มิถุนายน 2547) : 9 -12.
- มยุรา อารีกิจเสรี. เทคนิคการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาเพื่อการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. นครปฐม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศิลปากร. 2548.

- มยุว อารีกิจเสรี. “เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์นุ่ท่อนำไข่ และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกรเพื่อการศึกษาทางชีววิทยาการสืบพันธุ์และการทดสอบทางพิษวิทยา.” วารสารวิทยาศาสตร์ศึกษา 1, 2 (พฤษภาคม – สิงหาคม 2547) : 33 -36.
- เรณู เวชรัชต์พิมล. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. นครปฐม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2540.
- วิไลรัตน์ นุชประมุข. อิเล็กทรอนิกส์ทางการแพทย์. กรุงเทพฯ. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2528.
- อภัสสร ฆมิคท์. ชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต. 2537.
- อรรณพ คุณาวงกต. วิทยาการสืบพันธุ์สุกร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2545.

ภาษาต่างประเทศ

- Abe H and Oikawa T. Examination by scanning electron microscopy of oviductal epithelium Of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phases. *The Anatomical Record*. 2004. 233 : 399-408.
- Alavi-Shoushtari SM, Asri-Rezai S and Abshenas J. A study of the uterine protein variations during the estrous cycle in the cow: Molecular weights determination. *Anim. Reprod. Sci*. 2008. 105 : 302-310.
- Anderson A-M, Einarsson S and Edqvist LE. Prepubertal LH, oestradiol-17 β and progesterone pattern in gilts. *Zbl. Vet. Med. A*. 1983. 30 : 438-446.
- Angelucci S, Ciavardelli D, Giuseppe FD, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P and Llio CD. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. 1764 : 1775-1785.
- Areekijsee M. Scanning electron microscopy observations of porcine ampullary oviductal epithelial cells. *Silpakorn University International Journal*. 2003. 3 (1-2) : 266-272.
- Areekijsee M, Vejaratpimol R and Gumlungpat N. Microstructure investigations of porcine ampullary oviductal epithelial cells by scanning electron microscope. *Abstract of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand 19-21 October 2004 Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani*. 43.

- Areekijserree M, Thongpan A and Vejaratpimol R. Morphological study of porcine oviductal epithelial cells and cumulus-oocyte complex. *Kasetsart Journal. (Nat. Sci.)* 2005. 39 (1) : 136-144.
- Areekijserree M, Thongpan A and Vejaratpimol R. Porcine oviductal epithelial cells and cumulus-oocyte complex observance. *Abstract of the 22th EMST Annual Conference Microscopy Society of Thailand 2-4 February 2005 at Chonburi, Thailand.*
- Areekijserree M and Vejaratpimol R. In vivo and in vitro study of porcine oviductal epithelial cells cumulus oocyte complexes and granulosa cells: A scanning electron microscopy and inverted microscopy study. *Micron.* 2006. 37 : 707-716.
- Areekijserree M and Veerapraditsin T. Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. *Micron.* 2008. 39 :160-167.
- Arthur G H. *Veterinary Reproduction and Obstetrics.* London : Beccles and Colchester. 1977.
- Brackett BG and Mastroianni L. Composition of oviductal fluids. In Johnson A, Foley C(eds). *The oviduct and its Functions.* New York: Academic press. 1974 : 134-159.
- Brussow K P, Torner H, Kanitz W and Ratky J. In vitro technologies related to pig embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 2000. 40(5) : 469-480.
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S and Ledda S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified without cumulus cells. *Theriogenology.* 2007. 68 : 1138-1149.
- Buccione R, Vanderhyden, Caron P and Eppig J. FSH- induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev. Biol.* 1990. 138 : 16-25.
- Buhi WC, O'Brien B, Alvarez IM, Erdos G and Dubois D. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucid, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol. of Reprod.* 1993. 48 : 1274–1283.
- Campbell NA and Reece J B. *Biology.* 6th. USA. ed. Addison-Wesley. 2002.
- Centola GM, Anderson LD and Channing CP. Oocyte maturation inhibitor (OMI) activity in protein granulosa cells. *Gamete Research.* 1989. 4 : 451–461.

- Chen L, Russell P and Larsen W. Sequential effects of follicle- stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol. Reprod.* 1994. 51 : 290–295.
- Chen XY, Li QW, Zhang SS, Han ZS, Zhao R, Wu SY and Huang J. Effects of ovarian cortex cell co-culture during in vitro maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 2007. 99 : 306-316.
- Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE, Jr and Squires. Effect of gonadotropins on bovine oocytes matured in TEM-199. *Theriogenology.* 2001. 56 : 661-670.
- Codon SM and Casanave EB. Morphology and histological annual changes of the oviduct of *Chaetophractus villosus* (mammalian, xenarthra, dasypodidae). *Int. J. Morphol.* 2009. 27 (2) : 355-360.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matas C and Garcia E. Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucid hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction.* 2002. 124 : 279-288.
- De Boer JP, Creasey AA, Chang A, Abbink JJ, Roem D, Eerenberg AJ, Hack CE and Taylor FB. Alpha-2- macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis : studies using a baboon model. *Infect Immun.* 1993. 61 (12) : 5035-5043.
- Dekel N and Phillips DM. Maturation of the rat cumulus oophorus: A scanning electron microscopic study. *Biol. of Reprod.* 1979. 21 : 9-18.
- De Loos F, Kastrop P, Maurik PV, Beneden HV and Kruip AM. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol. Reprod. Dev.* 1991. 28 : 255-259.
- Desantis S, Ventriglia G, Zubani D, Corriero A, Deflorio M, Acone F, Palmieri G and De Metrio G. Differential lectin binding patterns in the oviductal ampulla of the horse during oestrus. *European Journal of Histochemistry.* 2005. 49 : 33-44.
- DeSouza M and Murray MK. An Estrogen–Dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology.* 1995. 136 : 2485-2496.

- Dietl J and Czuppon AB. Ultrastructural studies of the porcine zona pellucida during the solubilization process by Li-3,5-diiodosalicylate. *Gamete Research*. 1984. 9 : 45-54.
- Einarsson S and Gustafsson B. Development abnormalities of female sexual organs in genital tract in 1,000 gilts. *Acta vet. scand.* 1970. 11 : 427-442.
- Finley J, Briske-Anderson M, Reeves P and Johnson L. Zinc uptake and transcellular movement by CACO-2 cells: Studies with media containing fetal bovine serum. *J. Nutr. Biochem.* 1995. 6 : 137-144.
- Flechon JE, Degrouard J, Kopečný V, Pivko J, Pavlok A and Motlik J. The extracellular matrix of porcine mature oocytes : Origin, composition and presumptive roles. *Reprod. Biol. and Endocrin.* 2003. 1 : 1-13.
- Funahashi H, Ekwall H, Kikuchi K and Rodriguez-Martinez H. Transmission electron microscopy studies of the zona reaction in pig oocytes fertilized in vivo and in vitro. *Reproduction*. 2001. 122 : 443-452.
- Funahashi H, Ekwall H and Rodriguez-Martinez H. Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* 2000. 63 : 1437-1442.
- Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N and Nagai T. Effect of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or cumulus cells. *Biol. Reprod.* 2000. 63 : 1730-1734.
- Gerena RL and Killian GJ. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *Journal of Experimental Zoology*. 1995. 256 : 113-120
- Gomez E, Rodriguez A, Munoz M, Caamano JN, Hidalgo CO, Moran E, Facal N and Diez C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*. 2008. 69 : 1013-1021.
- Gordon WL, Wan-Kyng L and Darrell NW. Inhibin fractionation : A comparison of human and porcine follicular fluid, with particular reference to protease activation. *Biol. of Reprod.* 1986. 35 : 209-218.
- Kamaci M, Suludere Z, Irmak K, Can C and Bayhan H. Observation of isthmatic epithelial cells from fallopian tubes at follicular phase by light and scanning electron microscope. *Eastern Journal of Medicine*. 1999. 4(2) : 51-53.

- Kidson A, Schoevers E, Langendijk P, Verheijden J, Colenbrander B and Bevers M. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. *Theriogenology*. 2003. 59 : 1889-1903.
- Kikuchi K, Nagai T, Motilk J, Shioya Y and Izaike Y. Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*. 1993. 39 : 593-599.
- King RS, Anderson SH and Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *Journal of Andrology*. 1994. 15 : 468-478.
- Kittiyant Y, Lhungmahamonkol S, Areekijseree M, Tocharus C, Thonabulsombat C and Pavasuthipaisit K. Porcine oviduct support in vitro bovine embryo development. *Theriogenology*. 1993. 39 (1) : 246.
- Kittiyant Y, Thonabulsombat C, Tocharus C, Sanitwongse B and Pavasuthipaisit K. Co-culture of bovine embryos from oocytes matured and fertilized in vitro to the blastocyst stage with oviductal tissues. *J. Sci. Soc. Thailand*. 1989. 15 : 251-260.
- Kittiyant Y, Tocharus C, Areekijseree M and Pavasuthipaisit K. Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound-guided aspiration fertilized and co-cultured in vitro with bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology*. 1995. 43 : 250-250 (1).
- Kress A and Morson G. Changes in the oviductal epithelium during the estrous cycle in the Marsupial *Monodelphis domestica*. *J. Anat.* 2007. 211 : 503-517.
- Kunavongkrit A and Larsson K. Ovulation rate and embryonic migration in cross-bred gilts. *Nord. Vet-Med.* 1982. 34 : 20-24.
- Kunavongkrit A, Karlberg K and Einarsson S. The relationship between plasma levels estradiol-17 β , progesterone and the consistency of the cervix in the sow. *Theriogenology*. 1983. 20 : 61-66.
- Kunavongkrit A, Kindahl H, Einarsson S. and Edquist L-E. Clinical and endocrinological studies in primiparous zero-weaned sows 1. clinical and morphological findings with special reference to the effects of PGF 2 alpha treatment. *Zbl.Vet. Med.* 1983a. 30 : 607-615.
- Kunavongkrit A, Chantaraprateep P, Prateep P and Poomsuwan P. Ovarian activities and abnormalities in slaughtered gilts. *Thai. J. Hlth. Resch.* 1987. 1 : 9-14.

- Imam S, Ansari M, Ahmed N and Kumaresan A. Effect of oviductal fluid proteins on buffalo sperm characteristics during cryopreservation. *Theriogenology*. 2006. 69 : 925-931.
- Lloyd RE, Elliott RMA, Fazeli A, Watson PF and Holt WV. Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro *Reproduction, Fertility and Development*. 2008. 21 (3) : 408–418.
- Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil*. 1988. 82 : 843-856.
- Li RJ, Norman RJ, Armstrong DT and Gilchrist RB, Oocyte secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol. Report*. 2000. 63 : 839-845.
- Liu AX, Zhu YM, Luo Q, Wu YT, Gao HJ, Zhu XM, Xu CM and Huang HF. Specific peptide patterns of follicular fluids at different growth stages analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007. 1770 : 29–38.
- Lucidi P, Bernabo N, Turriani M, Barboni B and Mattioli M. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod. Biol. and Endocrin*. 2003. 1 : 45.
- Mahmodi R, Abbasi M, Amiri I, Kashani IR, Pasbakhsh P, Saadipour K, Amidi F, Abolhasani F and Sobhani A. Cumulus cell role on mouse germinal vesicle oocyte maturation, fertilization, and subsequent embryo development to blastocyst stage in vitro. *Yakhteh Medical Journal*. 2009. 11 : 299-302.
- Martinova Y, Petrov M, Mollova M, Rashev P and Ivanova M. Ultrastructural study of cat zona pellucida during oocyte maturation and fertilization . *Anim. Reprod. Sci*. 2008. 108 : 425-434.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G and Seren E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilizes in vitro. *Theriogenology*. 1989.31 : 1201-1207.
- McElroy SL, Kim JH, Kim S, Jeong YW, Lee EG, Park SM, Hossein MS, Koo OJ, Abul Hashem MD, Jang G, Kang SK, Lee BC and Hwang WS. Effects of culture conditions and nuclear transfer protocols on blastocyst formation and mRNA expression in pre-implantation porcine embryos. *Theriogenology*_2008. 69 : 416-425.

- Mori T, Amano T and Shimizu H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Biol. Reprod.* 2000. 62 : 913-919.
- Mossa F, Leoni GG, Berlinguer F, Succu S, Madeddu M, Bebbere D and Naitana S. Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances in vitro embryo yield in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 2007. 109 : 134-145.
- Murray MK. Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. *Biol. Reprod.* 1992. 47 : 889-902.
- Murray MK. An estrogen-dependent glycoprotein is synthesized and released from the oviduct in a temporal and region-specific manner during early pregnancy in the ewe. *Biol. of Reprod.* 1993. 48 : 446-453.
- Nagai T. In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 1996. 42 : 153-163.
- Niemann H and Rath D. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology*. 2001. 56 : 1291-1304.
- Park CK and Sirard MA. The effect of pre-incubation of frozen-thawed spermatozoa with oviductal cells on the in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*. 1996. 46 : 1181-1189.
- Pereira RM, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI and Horta AEM. Embryos and culture cells: A model for studying the effect of progesterone. *Anim. Reprod. Sci.* 2008. 111 : 31-40.
- Porta A, Cassano E, Balestrieri M, Bianco M, Picone R, De Stefano C and Abrescia P. Haptoglobin transport into human ovarian follicles and its binding to apolipoprotein A-1. *Zygote.* 1999. 7 : 67-77.
- Reeves PG, Briske-Anderson MJ and Newman SM. High zinc concentrations in culture media affect copper uptake and transport in differentiated human colon adenocarcinoma cells. *Am. Inst. Nutr.* 1996 : 1701-1711.
- Rigby J. The cervix of the sow during estrus, *Vet. Rec.* 1967. 80 : 672-675.

- Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J, Matás C and Ruiz S. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 2001. 68 : 85-98.
- Romar R, Coy P, Gadea J and Rath D. Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2005. 85 : 287-300.
- Saeki K, Hoshi M, Leibfried- Rutledge ML and First NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 1991. 44 : 256-260.
- Sanmanee N and Areekijserree M. In vitro toxicology assessment of cadmium bioavailability on primary oviductal epithelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2009. 27 : 84-89.
- Schwartz NB and Channing CP. Evidence for ovarian “inhibin”: Suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by injection of porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. 74 ; 5721-5724.
- Smith EL, Hill RL, Lehman IR, Lefkowitz RJ, Handler P and White A. *Principles of biochemistry : mammalian biochemistry.* 7th New York. ed. McGraw-Hill. 1983.
- Sirard MA, Desrosier S and Assidi M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology.* 2007. 68s : s71-s76.
- Sisson S and Grossman J. *The anatomy of the domestic animals.* W.B. Saunders Co. U.S.A. 1970.
- Somfai T, Kikuchi K, Medvedev S, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto DI, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Sato E and Nagai T. Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 2005. 90 : 307-328.
- Speicher DW. “ Electrophoresis.” *In Short Protocols in Protein Science, 10-1 to 10-47.* Edited by Coligan, J. E. et al. New York : John Wiley & Sons. 2003.
- Staros AL and Killian GJ. In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *Journal of Reproduction and fertility.* 1998. 112 : 131-137.
- Steffl M, Schweiger M and Amselgruber WM. Immunophenotype of porcine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle: a double-labelling immunohistochemical study *Histochemistry and Cell Biology.* 2004. 121 : 239-244.

- Stone SL, Pomernatz SH, Schwartz-Kripner A and Channing CP. Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action, *Biol Reprod.* 1978. 19 : 585-92.
- Suzuki H, Jeong BS and Yang X. Dynamic changes of cumulus-oocyte cell communication during in vitro maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 2000. 63(3) : 723-9.
- Takano Y, Taguchi T, Suzuki I, Balis JU and Yuri K. Cytotoxicity of heavy metals on primary cultured alveolar type II cells. *Environ. Res.* 2002. 89 : 138-145.
- Tienthai P, Sajjarengpong K and Tummaruk P. Morphological changes in the oviduct of culling replacement gilts. *TJVM.* 2005. 36(4) : 41-53.
- Tomer H, Brussow K, Alm H, Ratky J and Kanitz W. Morphology of porcine cumulus-oocyte-complexes depends on the stage of preovulatory maturation. *Theriogenology.* 1998. 50 : 39-48.
- Tsafiriri A, Pomerantz SH and Channing CP. Inhibition of oocyte maturation by follicular fluid: Partial characterization of the inhibitor. *Biol. of Reprod.* 1976. 14 : 511-516.
- Van de Wiel DFM, Bar -Amit S, Tsafiriri A and de Jong FH. Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 1983. 68 : 247-252.
- Vannucchi CI, de Oliveira CM, Marques MG, Assumpcao MEOA and Visintin JA. In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co- culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology.* 2006. 66 : 1677-1681.
- Verhage HG, Fazleabas A T, Mavrogianis PA, Day -Bowman, MBO, Donnelly K M, Arias EB and Jaffe R C. The baboon oviduct : characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Human Reproduction and Embryology.* 1997. 3 : 541-552.
- Wetscher F, Havlicek V, Huber T, Gilles M, Tesfaye D, Griese J, Wimmers K, Schellander K, Muller M, Brem G and Besenfelder U. Intrafallopian transfer of gametes and early stage embryos for in vivo culture in cattle. *Theriogenology.* 2005. 64 : 30-40.
- White KL, Hehnke LF and Richards LL. Early embryonic development in vitro by co-culture with oviductal cells in pigs. *Biol. Report.* 1989. 41 : 425-430.
- Whitaker M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod.* 1996. 1 : 127-135.

- Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL and Schwarzbauer JE. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer research*. 2008. 68(9) : 3185-92.
- Woldesenbet S and Newton GR. Comparison of proteins synthesized by polarized caprine oviductal epithelial cells and oviductal explants in vitro. *Theriogenology*. 2003. 60 : 533-543.
- Wrathall AE. Ovarian disorders in the sow. *Vet. Bull*.1980. 50 : 253-272.
- Wu ASH, Carlson SD and First NL. Scanning electron microscopic study of the porcine oviduct and uterus. *J Anim Sci*. 1976. 42 : 804-809.
- Yaniz JL, Lopez-Gatius F and Hunter RHF. Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2009. 35 : 28-34.
- Yoshimura Y, Hosoi Y, Iritani A, Nakamura Y, Atlas SJ and Wallach EE. Developmental potential of rabbit oocytes matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biol. of Reprod*.1989. 40 : 26-33.
- Xia P, Rutledge J, Watson A J and Armstrong DT. Effect of estrogen-treated porcine ampulla oviductal epithelial cells on early embryonic development in vitro and characterization of their protein synthetic activity. *Anim. Reprod. Sci*. 1996. 45 : 217-229.
- Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh KDW, Hata J-i and Yamada T. Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. *Experimental Cell Research*. 2002. 275 : 200-214(15).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

องค์ประกอบของอาหารสูตร M 199 (Freshney, R. I.; 1987)

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199 (mg/l)
Amino acid	
L-alanine	25.0
L-arginine (freebase)	-
L-arginine.HCl	70.0
L-asparagine	-
L-asparagine.H ₂ O	-
L-aspartic acid	30.0
L-cysteine (freebase)	-
L-cystine	-
L-cystine.2Na	23.7
L-cysteine HCl.H ₂ O	0.0987
L-glutamic acid	66.8
L-glutamine	100
Glycine	50.0
L-histidine (freebase)	-
L-histidine HCl.H ₂ O	21.9
L-hydroxy-proline	10.0
L-isoleucine	20.0
L-leucine	60.0
L-lysine HCl	70.0
L-methionine	15.0
L-phenylalanine	25.0
L-proline	40.0
L-serine	25.0
L-threonine	30.0
L-tryptophan	10.0

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199 (mg/l)
L-tyrosine	-
L-tyrosine 2Na	49.7
L-Valine	25.0
Vitamins	
L-ascorbic acid	0.050
Biotin	0.010
D-Ca pantothenate	0.010
Calciferol	0.100
Choline chloride	0.500
Folic acid	0.010
i-inositol	0.050
Nicotinamide	0.025
Pyridoxal HCl	0.025
Riboflavin	0.010
Thiamine HCl	0.010
Vitamin B ₁₂	-
Pyridoxine HCl	0.025
Cholesterol	-
Para-aminobenzoic acid	0.050
Nicotinic acid	0.025
Menaphthone sodium bisulphate 3H ₂ O	0.019
DI- α tocopherol PO ₄ .2Na	0.01
Vitamin A acetate	0.115
Riboflavin PO ₄ .2Na	-
Thiamin mono PO ₄ .2Na	-
Inorganic salts	-
CaCl ₂ (anhyd.)	-

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199 (mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	186.0
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.70
KCl	400
KH ₂ PO ₄	60.0
MgCl ₂ .6H ₂ O	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	200
NaCl	8,000
NaHCO ₃	350
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	47.5
Na ₂ H ₂ PO ₄ .7H ₂ O	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-
CaNO ₃ .4H ₂ O	-
Other components	
D-glucose	1,000
D-galactose	-
Lipoic acid	-
Phenol red	17.0
Sodium pyruvate	-
Hypoxanthine	0.30
Linoleic acid	-
Putrescine 2HCl	-
Thymidine	-
Coccarboxylase	-
Coenzyme A	-
Deoxyadenosine	-

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199 (mg/l)
Deoxycytidine HCl	-
Deoxyguanosine	-
Diphosphopyridine nucleotide.4H ₂ O	-
Ethanol for solubilizing lipid component	-
Dinucleotide	
Glutathione(reduced)	0.05
5-methy-deoxycytidine	-
Sodium acetate.3H ₂ O	-
Sodium glucuronate.H ₂ O	
Sodium glucuronate.H ₂ O	-
Triphosphopyridine nucleotide	
Tween 80	5.00
Uridine triphosphate.4H ₂ O	-
Adenine SO ₄	10.0
5.'AMP	0.02
ATP-2Na	10.0
Cholesterol	0.02
2-Deoxyribose	0.50
Guanine HCl	0.30
D-ribose	0.50
Na acetate	36.7
Thymine	0.30
Uracil	0.30
Xanthine	0.30
CO ₂ (gas phase)	Ambient

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ชั่วคราว HEPES BUFFERED TYRODES MEDIUM

(TALP-HEPES) (Ping Xia, 1966)

1. NaCl	0.7422 g
2. KCl	0.0236 g
3. GLUCROSE	0.0901 g
4. NaH ₂ PO ₄ (anhydrous)	0.0048 g
5. NaHCO ₃	0.0168 g
6. HEPES (Na SALT:MW 260.30)	0.1302 g
7. HEPES (ACID FORM:MW 238.30)	0.1192 g
8. PENICILLIN –G	0.0065 g
9. PHENAL RED	0.001 g
10. BSA(BOVINE SERUM ALBUMIN)	0.3002 g
11. CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0294 g
12. MgCl ₂ .6H ₂ O	0.0102 g
13. PYRUVATE(SODIUM PYRUVATE)	1 ml
14. DL LACTIC ACID	186 µl
15. GENTAMYCIN	100 µl
Dulbecco phosphate buffered saline (PBS)	3% BSA

วิธีเตรียม

- นำสารที่ชั่งได้ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 9 ผสมลงในบีกเกอร์ขนาด 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำมีลลิควจำนวน 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- นำ CaCl₂.2H₂O เติมด้วยน้ำมีลลิคว จำนวน 10 มิลลิลิตร
- นำ MgCl₂.6H₂O เติมด้วยน้ำมีลลิคว จำนวน 10 มิลลิลิตร
- จากนั้นนำส่วนผสมในข้อ 1 ถึง 3 มาผสมกันคนเบาๆ ให้เนื้อสารผสมเข้าด้วยกัน
- เติม pyruvate 1 ml เติม dl lactic acid 186 µl และเติม gentamycin 100 µl
- ผสม BSA จำนวน 0.3002 กรัม รอจนผง BSA ละลายแล้วกรองน้ำยาผ่านฟیلเตอร์เมมเบรนที่มีขนาดรู 0.22 ไมครอน ใส่น้ำยาในขวดปลอดเชื้อ สามารถเก็บน้ำยา TALP-HEPES ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เมื่อจะนำมาใช้ในปฏิบัติการให้นำมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม Fetal calf Serum 500

Fetal Bovine Serum 100 ml (Tested for Mycoplasma)

การเตรียมซีรัมก่อนนำไปใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้เตรียม ดังนี้

1. เมื่อซื้อซีรัมมาให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
2. นำซีรัมออกมาละลายโดยวางไว้ในน้ำอุ่นควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส
3. นำไป heat inactivate สารประกอบบางชนิดและเอนไซม์ในอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แบ่งใส่ขวดที่ทำไว้เชื้อ (ฆ่าเชื้อ) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ขวดละ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

การเตรียมน้ำยาล้างรังไข่และท่อนำไข่นอกสถานที่

0.9% NSS	1000	ml
Penicillin G sodium	1000	μ l (100 \bar{U} /ml)

การเตรียมน้ำยาล้างรังไข่และท่อนำไข่ในห้องปฏิบัติการ

0.9% NSS	1000	ml
Penicillin G sodium	1000	μ l (100 \bar{U} /ml)
Streptomycin	0.1	g
Amphotericin B	0.25	μ g/ μ l

การเตรียม staining solution (COOMASSIE BRILLIANT BLUE R[®]-250) 100 ml

COOMASSIE BRILLIANT BLUE R [®] -250	0.214	g
Methly alcohol	50	ml
น้ำ DI	50	ml
Acetic acid	7	ml

ผสมแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

การเตรียม destaining solution 200 ml

Methly alcohol	14	ml
Acetic acid	10	ml
น้ำ DI	176	ml

การเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ Toluidine blue ใน 1 เปอร์เซ็นต์ Borax tetra, sodium borate

Toluidine blue	1	g
Borax	1	g

โดยละลาย Borax ด้วยน้ำก่อน 50 มิลลิลิตร จากนั้นละลาย Toluidine blue ในน้ำ 50 มิลลิลิตร แล้วเท Borax ผสมลงไป

การเตรียมสารเคมีเพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การเตรียม phosphate buffers solution (Sorenson's buffer) (เวคิน นพนิตย์, 2524)

เตรียม stock solutions :

1. Solution A: 0.2M sodium phosphate monobasic

ชั่ง NaH_2PO_4 27.80 g

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.60 g

ละลายในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

2. Solution B: 0.2M sodium phosphate dibasic

ชั่ง Na_2HPO_4 28.40 g

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 g

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.70 g

ละลายในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

3. เตรียม Working 0.2 M buffer solution :

Working solution ทำโดยการผสม stock solution ทั้ง A และ B ตามสัดส่วนในตารางเพื่อให้ได้ pH ตามต้องการ (pH 7.2-7.4)

Solution A (ml)	Solution B(ml)	pH
28	72	7.2
23	77	7.3
19	81	7.4

4. เตรียม 0.1 M phosphate buffer (Washing buffer) :

ผสม 0.2M buffer solution จาก (3) 1 ส่วน

น้ำกลั่น 1 ส่วน

5. การเตรียม Glutaraldehyde solution

Stock solution : 5% glutaraldehyde

Glutaraldehyde 50 %	10 ml
น้ำกลั่น	90 มิลลิลิตร

วิธีการ ถ้างวด Glutaraldehyde ให้สะอาดเช็ดให้แห้ง ตัดกอลวดแล้วใช้ ปิเปต คูดลงในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน ปิดฝาให้สนิท เก็บในช่องแช่แข็งของผู้เย็น

6. การเตรียม Working solution 2.5 % glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer

วิธีการ ละลาย stock solution แล้วผสมกับ 0.2 M phosphate buffer ปริมาณเท่ากัน (1:1) ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ไม่หมดต้องเก็บในช่องแช่แข็ง

7. การเตรียม 1% Osmium tetroxide

ผลึก Osmium tetroxide (O_2SO_4)	1 กรัม
น้ำกลั่น	99 มิลลิลิตร

วิธีการ เเท่น้ำกลั่นที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในขวดสีชา จากนั้นนำขวด Osmium tetroxide ตัดกอลวดแล้วทิ้งลงไปในขวดที่เตรียมน้ำกลั่นไว้ ให้น้ำกลั่นไหลเข้าไปในขวด Osmium tetroxide เพื่อให้ละลายทิ้งไว้ 1 คืนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การเตรียมพลาสติกสูตร Spurr's resin

โดยมีส่วนประกอบดังนี้

เรซิน	VCD (vinyl cyclohexene dioxide)	10 กรัม
ฟลักซีบิไลเซอร์	DER 736 (diglycidyl ether polypropylene glycol)	6 กรัม
สารที่ช่วยให้พลาสติกแข็ง	NSA (nonenyl succinic anhydride)	26 กรัม
ตัวเร่งการแข็งตัวของพลาสติก	DMAE (dimethylamino ethanol)	0.4 กรัม

วิธีการ ในการเตรียมสารเคมีจะทำการชั่งน้ำหนัก โดยเอาบีกเกอร์แบบแก้วหรือพลาสติกวางบนแท่งของเครื่องชั่งน้ำหนัก แล้วชั่งส่วนผสมชนิดต่างๆ ใส่ลงในบีกเกอร์ตามลำดับผสมให้เข้ากันด้วย magnetic bar ทำให้แข็งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 70 °C นาน 8 ชั่วโมง หรือ 80 °C นาน 7 ชั่วโมง ผสมก่อนใช้อย่างน้อย 1 คืน เก็บในช่องแช่แข็งเมื่อใช้ต้องนำออกจากตู้เย็นแล้วรอให้ถึงอุณหภูมิห้องก่อน

9. การเตรียม 0.5 % Lead citrate (Reynold's)

โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

เลดไนเตรต [Pb(NO ₃) ₂]	1.33 กรัม
โซเดียมซิเตรต [Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) .2H ₂ O]	1.76 กรัม
น้ำกลั่นต้มกรอง (stain-water)	30 มิลลิลิตร
เทส่วนผสมตามลำดับเขย่าแรงๆ 1 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว	
เติม 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 N NaOH)	8 มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	50 มิลลิลิตร
เลิกใช้ทันทีเมื่อมีตะกอนสีขาวเกาะที่ขวด	

10. การเตรียม 2 % Uranyl acetate

Uranyl acetate	2 g
50% methanol	98 ml

วิธีการ ชั่ง Uranyl acetate เติลงในสารละลายเมธานอล คนให้ละลายในที่มืดประมาณ 30 นาที เก็บในขวดสีชาหรือพลาสติกที่ห่อหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอย ผสมก่อนให้อย่างน้อย 1 วัน เก็บในตู้เย็นและใช้ที่อุณหภูมิห้อง อายุใช้งาน 6 เดือน

วิธีการหาปริมาณโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธีของ Lowry

1. นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมหลอดที่เป็น blank ด้วย มี 9 หลอด ทำตัวอย่างละ 2 หลอด รวมทั้งหมด 18 หลอด ใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 20 และ 1 ต่อ 40 โดยมีวิธีการเตรียมสาร ดังนี้

หลอดที่	ปริมาณ BSA(1mg/ml) (μ l)	น้ำกลั่น (μ l)	ความเข้มข้น โปรตีน (μ g)
blank	-	100	-
1	10	90	10
2	20	80	20
3	30	70	30
4	40	60	40
5	50	50	50
6	60	40	60
7	80	20	80
8	100	-	100

2. สารละลายฟีนอล (Folin phenol reagent) เจือจางเท่าตัวก่อนใช้

3. สารละลาย alkaline copper เตรียมจากสารละลาย 3 ชนิด สารละลาย A, B และ C

3.1 สารละลาย A ชั่ง sodium carbonate 20 g ในสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้น 0.1 M/ (10 มิลลิลิตร) จนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลาย B 1% w/v CuSO_4

3.3 สารละลาย C 1% w/v potassium หรือ sodium ttrate

สารละลาย alkaline copper เตรียมโดยใช้อัตราส่วนของ B:C:A เป็น 1:1:100 โดยปริมาตร การเตรียมต้องผสม สารละลาย B และ C ก่อน แล้วจึงเติมสารละลาย A ผสมให้เข้ากัน สารนี้เตรียมทันทีก่อนทำการทดลอง

วิธีการ นำสารละลายในข้อ 1. ทั้งหมด 18 หลอดมาหาปริมาณโปรตีน โดยเติมสารละลาย alkaline copper 3 มิลลิลิตรต่อหลอด เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

เติมสารละลายฟีนอล หลอดละ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เทียบกับหลอดที่เป็น blank

นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{650} และความเข้มข้นของโปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธีของ Lowry (1951)

เตรียมสารตัวอย่างให้มีปริมาณคงที่เท่ากัน คือ 15 ไมโครกรัมต่อ well โดยผสมสารตัวอย่าง ดังนี้

สารตัวอย่าง	X	ไมโครลิตร
NuPAGE [®] LSD Sample buffer (4X)	3.75	ไมโครลิตร
NuPAGE [®] Reducing Agent (10X)	1.5	ไมโครลิตร
น้ำ deionized	X	ไมโครลิตร
รวม	15	ไมโครลิตร

ตารางแสดงปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทดลองในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (μl)	ปริมาณสารตัวอย่าง ($\mu\text{l}/\text{well}$)	น้ำ deionized ($\mu\text{l}/\text{well}$)
FA0	25	2.08	7.67
FA2	25	4.17	5.58
FA4	25	4.31	5.44
FA6	25	4.81	5.57
FI0	25	4.03	5.72
STD	25	15	-
control	25	3.68	6.07
FI2	25	4.63	5.12
FI4	25	5	4.75
FI6	25	3.57	6.18

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (μ l)	ปริมาณสารตัวอย่าง (μ l/well)	น้ำ deionized (μ l/well)
LA0	25	1.47	8.28
LA2	25	4.17	5.58
LA4	25	3.68	6.07
LA6	25	2.36	7.39
STD	25	15	-
Control	25	3.68	6.07
LI0	25	3.21	6.54
LI2	25	4.46	5.29
LI4	25	4.81	4.94
LI6	25	4.31	5.44

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (μ l)	ปริมาณสารตัวอย่าง (μ l/well)	น้ำ deionized (μ l/well)
FC0	25	2.12	7.63
STD	25	15	-
control	25	3.68	6.07
FC2	25	5.68	4.07
FC4	25	5.68	4.07
FC6	25	6.94	2.81
LC0	25	6.25	3.5
LC2	25	5.95	3.8
LC4	25	5.68	4.07
LC6	25	5	4.75

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางวรรณมา เมธศาสตร์
 ที่อยู่ 30 ซอยกุ่มกิล 3 ถนนกุ่มกิล ตำบลห้วยจรเข้ม อำเภอมืองนครปฐม
 จังหวัดนครปฐม 73000
 ที่ทำงาน โรงเรียนพระปฐมวิทยาลัย อำเภอมือง จังหวัดนครปฐม
 โทรศัพท์ (034) 241657

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2523 สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยศิลปากร
 พ.ศ.2527 สำเร็จการศึกษาประกาศนียบัตรพยาบาลศาสตร์และผดุงครรภ์ชั้นสูง
 เทียบเท่าปริญญาตรี วิทยาลัยพยาบาลกรุงเทพ (ปัจจุบันเป็นวิทยาลัยพยาบาล
 บรมราชชนนี)
 พ.ศ.2547 สำเร็จการศึกษาปริญญาศึกษาศาสตรบัณฑิต (เอกวิทยาศาสตร์- มัธยมศึกษา)
 มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
 พ.ศ.2548 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย
 มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติการทำงาน

พ.ศ.2527-2533 พยาบาลวิชาชีพ 3-6 ตึกศัลยกรรมชาย โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม
 พ.ศ.2533-2548 พยาบาลประจำโรงเรียนพระปฐมวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม
 พ.ศ.2548-ปัจจุบัน ครูกลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์ โรงเรียนพระปฐมวิทยาลัย
 จังหวัดนครปฐม

ผลงาน

Mettasart W, Cheunim T and Areekijsee M. Oocyte collection and in vitro oocyte culture
 supplemented with hormones in sow. 1st Silpakorn University Research Fair November
 22, 2007 Nakhonprathom. Thailand.

Areekijsee M, Cheun-Im T, Mettasart W and Narkkong N. Porcine cumulus-oocyte complexes and
 their interaction in in vitro condition. 25th Annual Conference Microscope society of
 Thailand January 9-11, 2008 Phitsanulok, Thailand.