

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการวิจัย

การศึกษาการเสริมชนิด serum ต่อการแสดงออกของจिनอินเทอร์เฟียร์รอนทาว (IFN- τ) และ BCL-2 ในการผลิตเอ็มบริโอนอกร่างกายของโค ซึ่งได้ผ่านการพิจารณาและรับความเห็นชอบจากคณะกรรมการด้านจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ตามหนังสือลำดับที่: จส.มข.44/2552 เลขที่: ศธ 0514.1.12.2/48) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ใช้รังไข่โคเนื้อพันธุ์ลูกผสมพื้นเมืองเพศเมียจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดขอนแก่น ทั้งหมด 54 รังไข่ โดยเก็บโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี และปานกลางทั้งหมด 1,099 ใบ นำมาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย 4 กลุ่ม ๆ ละ 256 ใบ (แบ่งออกเป็นกลุ่มละ 32 ซ้ำ ๆ ละ 8 ใบ) เพื่อนำมาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ เมื่อได้การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิจึงทำการปฏิสนธิและเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย โดยแบ่งชนิดของ serum ออกเป็น 4 ทริทเมนต์ ดังนี้

ทริทเมนต์ที่ 1 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง synthetic oviductal fluid (SOF) ไม่มีการเสริม serum

ทริทเมนต์ที่ 2 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง synthetic oviductal fluid (SOF) เสริมด้วย bovine serum albumin 10 เปอร์เซ็นต์ (BSA, Sigma, St. Louise, MO)

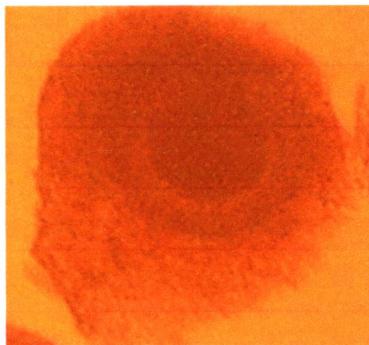
ทริทเมนต์ที่ 3 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง synthetic oviductal fluid (SOF) เสริมด้วย fetal calf serum 10 เปอร์เซ็นต์ (FCS, Gibco, N.Y., USA)

ทริทเมนต์ที่ 4 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง synthetic oviductal fluid (SOF) เสริมด้วย estrus cow serum 10 เปอร์เซ็นต์ (ECS, โดยเตรียมจากการเจาะเลือดโคตัวเมียที่เป็นสัดในช่วง standing heat นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกส่วนของ serum และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)

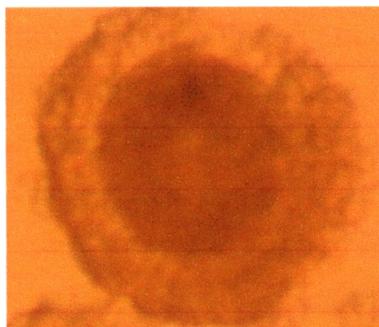


ภาพที่ 3-1 การเสริม serum ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนอกร่างกายของโค

ใช้ไอโอไซด์ที่ผ่านการประเมินคุณภาพด้วยวิธีการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาที่มีคุณภาพดี (ภาพที่ 3-2) และคุณภาพปานกลาง (ภาพที่ 3-3)



ภาพที่ 3-2 ไอโอไซด์ที่มีคุณภาพดี



ภาพที่ 3-3 ไอโอไซด์ที่มีคุณภาพปานกลาง

จากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจนถึงระยะบลาสโตซิสนำมาเก็บรักษาเอ็มบริโอด้วยการแช่แข็งในอุณหภูมิไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างเอ็มบริโอที่แช่แข็งจากทุกทรีทเมนต์เพื่อมาทำการสกัด RNA และนำตัวอย่าง RNA เพื่อทำการ reverse transcription จนกระทั่งได้ cDNA และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ศึกษาปริมาณของ mRNA ของโปรตีน IFN- τ และ BCL-2 ในตัวอย่างเอ็มบริโอด้วยวิธี quantitative real-time RT-PCR แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มที่เสริมด้วย serum กลุ่มละ 5 เอ็มบริโอ

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 สัตว์ทดลอง

แม่โคลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองไทย อายุ 3-6 ปี น้ำหนักประมาณ 200-400 กิโลกรัม ที่เข้าสู่โรงฆ่าสัตว์เทศบาลขอนแก่น

3.2.2 การเก็บรังไข่และโอโอไซต์ (Ovary and oocyte collection)

เก็บรังไข่จากแม่โคลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองภายหลังการฆ่าโดยการตัดเส้นเลือด หลอดลม และหลอดอาหารที่บริเวณลำคอ หลังจากฆ่าและซากหลังฆ่าภายในเวลา 30 นาที ทำการเก็บรังไข่จากปีกมดลูกทั้งสองข้างแช่ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการภายในเวลา 1 ชั่วโมง ระหว่างการขนส่งรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร และขนาด 3 ถึง 8 มิลลิเมตร โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรพร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 18 จากนั้นนำของเหลวจากฟอลลิเคิลเทใส่จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90x15 มิลลิลิตร เติมสารละลาย dPBS 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาส่องหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องสเตอริโอ ล้างโอโอไซต์ 3 ครั้งในสารละลาย dPBS ทำการประเมินคุณภาพของโอโอไซต์ตามวิธีการของ Gordon (1994)

3.3 การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

3.3.1 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (In vitro maturation, IVM)

นำโอโอไซต์ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร และขนาด 3 ถึง 8 มิลลิเมตร โดยทำการสุ่มโอโอไซต์เพื่อนำมาล้างด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยง (Tissue Culture Media, TCM-199 เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ และยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์) 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำโอโอไซต์ที่ได้จากการสุ่มมาเพาะเลี้ยงด้วย TCM-199 เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ และยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ ภายในจานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35x10 มิลลิลิตร แล้วปิดทับด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Hochi et al. (1998)

3.3.2 วิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย (In vitro fertilization, IVF)

นำโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ จากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิมาล้างด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง หลังจากนั้นก่อนที่จะทำการปฏิสนธิต้องนำโอโอไซต์ไปใส่ในจานที่มี fertilization medium 250 μ l (Tyrode medium กับ 25 μ l, Na-lactate 22 nM, Na-Py 1 nM, และ heparin-sodium salt (184 units/mg heparin ; Calbiochem, San Diego, CA) เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ จากนั้นเตรียมอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ที่ดีมาปั่นเหวี่ยงด้วยสาร Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) ให้มีความหนาแน่น (Percoll 90% มากกว่า 2.5 มิลลิลิตร) เมื่อนำมาทำการปั่นเหวี่ยง 700 รอบ เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะมีอสุจิที่รอดชีวิตและมีส่วนที่เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ นำไปทำความสะอาดด้วย Hepe-buffered Tyrode แล้วย้ายเข้าไปใส่ใน microdrops เพื่อทำการปฏิสนธิ

หลังจากปฏิสนธินำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Rizos et al. (2003)

3.3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (In vitro culture, IVC)

ทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ปฏิสนธิแบบนอกร่างกายโดยทำการแยกส่วนของน้ำยาเพาะเลี้ยง synthetic oviductal fluid (SOF) เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ โดยแยก microdrops และเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5-7 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงทุกๆ 24 ชั่วโมง บันทึกการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอโดยการประเมินทางทางสัณฐานวิทยา ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Gandhi et al. (2000)

3.3.4 วิธีการแช่แข็งและทำละลายเอ็มบริโอ

1) การแช่แข็งเอ็มบริโอ

โดยนำเอ็มบริโอระยะมอรูลา และระยะบลาสโตซิส มาแช่ในสารละลายแช่แข็งซึ่งประกอบไปด้วย TCM-199 เสริมด้วยกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วบรรจุลงในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตรยาว 2 เซนติเมตร ประกอบด้วย TCM-199 ยาว 2 เซนติเมตร กั้นด้วยฟองอากาศ 0.5 เซนติเมตร นำหลอดบรรจุเอ็มบริโอมาทำให้สัมผัสกับไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -170 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นจึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาเพื่อรอการวิเคราะห์ ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีการของ Yang et al. (1992)

2) วิธีการทำละลายเอ็มบริโอ

โดยการนำหลอดบรรจุเอ็มบริโอสัมผัสอากาศ 10 วินาที นำมาจุ่มในน้ำอุ่น 36 องศาเซลเซียส 3 นาที ในระหว่างนี้ให้ตั้งหลอดขึ้นแล้วเขย่าให้สารละลายทั้ง 2 เข้ากัน จากนั้นจึงนำเอ็มบริโอออกจากหลอด และล้างในสารละลาย TCM-199 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ดัดแปลงตามวิธีการของ Van et al. (1995)

3.3.5 วิธีการสกัด RNA จากเอ็มบริโอ

1. การเตรียมตัวอย่างเอ็มบริโอเพื่อทำการสกัด

1) ทำละลายเอ็มบริโอที่แช่แข็งภายในหลอดแช่แข็ง

- 2) ทำการวิเคราะห์คุณภาพของเอ็มบริโอ โดยใช้จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อ ขนาด 35x10 มิลลิเมตร (Nunc Delta, Nalge Nunc International, Denmark) จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope, Olympus SZ-ST, Japan)
- 3) ใช้ไมโครไปเปตปลอดเชื้อในการคัดเลือกเอ็มบริโอ โดยดูจากจานพลาสติก นำมาใส่ไว้ใน micro tube ขนาด 1.5 มิลลิเมตร โดยอยู่ภายในอุณหภูมิความเย็นของน้ำแข็ง (4-6 องศาเซลเซียส)
- 4) เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

2. การสกัด RNA จากเอ็มบริโอ ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ บริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

ก่อนทำการสกัด RNA จากตัวอย่างควรทำความสะอาดพื้นที่โดยใช้ แอลกอฮอล์ ฉีดพ่นและใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้สะอาด ควรจำกัดพื้นที่ใช้ทำการสกัด RNA

- 1) นำตัวอย่างที่อยู่ในอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทำละลายด้วยอุณหภูมิ ความเย็นของน้ำแข็ง (4-6 องศาเซลเซียส) เป็นการป้องกันการสลายตัวของ RNA
- 2) ใช้ไมโครไปเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่างลงใน micro tube ขนาด 1.5 มิลลิเมตร จากนั้นทำการเติม lysis/binding buffer 400 μ l. ผสมตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง homogenizer ประมาณ 15 วินาที และนำมาทำการ centrifuge 15,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที
- 3) เมื่อการ centrifuge สมบูรณ์ ควรประกอบ filter tube และ collection tube ที่ประกอบเข้ากันให้เรียบร้อยทำการดูดตัวอย่าง จากนั้นใช้ไมโครไปเปตดูดเอาส่วนบนของหลอด โดยประมาณสูงสุดไม่เกิน 700 μ l และ absolute ethanol 200 μ l. ลงในหลอดที่เตรียมไว้ และนำมาทำการ centrifuge 13,000 รอบ เป็นเวลา 30 วินาที
- 4) จากนั้นเทส่วนของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทิ้งไป แล้วทำการไปเปต DNase incubation buffer 90 μ l. และ DNase I ที่เตรียมไว้ 10 μ l. ใช้ไมโครไปเปตดูดสารขึ้นลงเพื่อเป็นการผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 5) จากนั้นจึงเติม wash buffer I 500 μ l. ลงไปในส่วนบนของ filter tube และนำมาทำการ centrifuge 8,000 รอบ เป็นเวลา 15 วินาที เทส่วนของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทิ้งไป

- 6) เติม wash buffer II 500 μ l. ลงไปในส่วนบนของ filter tube และนำมาทำการ centrifuge 8,000 รอบ เป็นเวลา 15 วินาที เทส่วนของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทิ้งไป
- 7) เติม wash buffer II 300 μ l. ลงไปในส่วนบนของ filter tube และนำมาทำการ centrifuge 13,000 รอบ เป็นเวลา 15 วินาที เทส่วนของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทิ้งไป
- 8) นำ filter tube ที่ได้มาประกอบเข้ากับ micro tube ปลอดเชื้อ โดยนำ collection tube ทิ้งไป
- 9) สูดท้ายเติม elution buffer 100 μ l. ลงไปในส่วนบนของ filter tube และนำมาทำการ centrifuge 8,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนที่ตกลงมายัง micro tube ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
- 10) การวัดความเข้มข้นของ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนของช่วงแสง A_{260}
 - 10.1) ความเข้มข้นของ ssRNA 1 หน่วยของ $A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$
 H_2O
 - 10.2) ค่า OD ที่เหมาะสมควรมีค่า เท่ากับ 0.1 ถึง 1.0
 - 10.3) ทำการตรวจทำความสะอาด Cuvettes โดยน้ำกลั่นปราศจาก RNase
 - 10.4) การคำนวณความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง
 จาก ตัวอย่างปริมาณ ssRNA ที่สกัดได้ ปริมาตร เท่ากับ 100 μ l.
 ทำการเจือจางโดยการไปเปิด ssRNA 25 μ l.
 เติมน้ำที่ปราศจาก RNase 475 μ l.
 ดังนั้น อัตราส่วนในการเจือจาง เท่ากับ 1:20
 จากนั้น อ่านค่าการดูดกลืนของช่วงแสง A_{260} ยกตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.56
 - 10.5) สูตรการคำนวณความเข้มข้นของ ssRNA (Lab FAQs – Find a Quick Solution (3rd Edition), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) In: WWW.roche-applied-science.com

$$\text{ความเข้มข้นของ ssRNA } 44.8 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 0.56 \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{dilution factor}$$

จากสมการ ค่า 0.56 หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรในตัวอย่าง
 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ หมายถึง ความเข้มข้นของ RNA 1 หน่วยของ A_{260} ssRNA
 dilution factor หมายถึง อัตราการเจือจางสารละลาย เท่ากับ 1:20
 44.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ หมายถึง ความเข้มข้นของ ssRNA จากตัวอย่าง

3.3.6 วิธีการสังเคราะห์ cDNA ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของบริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

- 1) ทำละลาย RNA ที่ได้สกัดเก็บไว้จากที่ อุณหภูมิห้อง โดยทำการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ โดย ปล่อยให้ทำละลายในอุณหภูมิความเย็นของน้ำแข็ง (4-6 องศาเซลเซียส) ไม่ควรให้ทำละลายด้วยความเร็ว หรือใช้อุณหภูมิที่สูง เนื่องจากการสลายตัวของ RNA เกิดขึ้นได้ง่าย
- 2) ใช้น้ำกลั่นปลอดประจุ และอุปกรณ์ทุกอย่างที่ทำการอบด้วยอุณหภูมิร้อน และความดันในการฆ่าเชื้อ
- 3) จากนั้นเตรียมหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร นำมาทำการเติมสาร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร	ความเข้มข้น
สารสกัด total RNA	2 μ l	4 ng
Anchoredoligo (dT) 18 Primer	1 μ l	2.5 μ M
Random Hexamer Primer	2 μ l	60 μ M
Water, PCR grade	6.4 μ l	ปรับปริมาตรรวม 11.4 μ l

- 4) จากนั้นนำหลอด PCR ที่เตรียมสารไว้ดังตารางนำมาเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการทำลายโครงสร้างของ RNA ที่เป็น secondary structures และทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการนำหลอดมาไว้ในอุณหภูมิความเย็นของน้ำแข็ง (4-6 องศาเซลเซียส)
- 5) นำสารที่ได้มาทำการเติมส่วนประกอบของ RT mix โดยเติมสาร ดังตารางต่อไปนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร	ความเข้มข้น
Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer	4 μ l	1 x 8 mM MgCl ₂
Protector RNase Inhibitor	0.5 μ l	20 U
Deoxynucleotide Mix	2 μ l	1 mM
DTT	1 μ l	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1 μ l	10 U
	ปริมาตรรวม ทั้งหมด	20 μ l

6) หลังจากนำยาครบทุกตัวทำการผสมสารให้กันอย่างดี vortex อย่างเบาๆ เสร็จแล้วทำการปั่นตก โดยเครื่อง spin down 15 วินาที หรือ ปั่น 2000 rpm เวลา 30 วินาที

7) นำเอา RT- reaction tube เข้าไปในเครื่อง PCR แล้วโปรแกรมดังนี้

Program Name	Temp.	Time	Cyclers
Reverse Transcription	50 °C	30 นาที	1
Stop reaction	85°C	10 นาที	1

8) หลังจากทำการสังเคราะห์ cDNA เรียบร้อยแล้ว สามารถนำเอา cDNA ดังกล่าวไปทำ real time PCR หรือสามารถเก็บไว้ใช้ที่อุณหภูมิ -20°C ถึง -25°C

9) การวัดความเข้มข้นของ cDNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนของช่วงแสง A_{260}

9.1) ความเข้มข้นของ cDNA 1 หน่วยของ $A_{260} = 33 \mu\text{g}/\text{ml H}_2\text{O}$

9.2) ค่า OD ที่เหมาะสมควรมีค่า เท่ากับ 0.1 ถึง 1.0

9.3) ทำการตรวจทำความสะอาด Cuvettes โดยน้ำกลั่น

9.4) การคำนวณความเข้มข้นของ cDNA ตัวอย่าง

จาก ตัวอย่างปริมาณ cDNA ที่สกัดได้ ปริมาตร เท่ากับ 20 μl .

ทำการเจือจางโดยการไปเปิด cDNA 5 μl .

เติมน้ำกลั่น 495 μl .

ดังนั้น อัตราส่วนในการเจือจาง เท่ากับ 1:100

จากนั้น อ่านค่าการดูดกลืนของช่วงแสง A_{260} ยกตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.44

9.5) สูตรการคำนวณความเข้มข้นของ cDNA (Lab FAQs – Find a Quick Solution (3rd Edition), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) In: WWW.roche-applied-science.com

$\text{ความเข้มข้นของ cDNA } 1452 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 0.44 \times 33 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 100$
--

จากสมการ

ค่า A_{260} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 260 นาโนเมตร

33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ หมายถึง ความเข้มข้นของ cDNA 1 หน่วยของ A_{260}

100 หมายถึง อัตราการเจือจางสารละลาย เท่ากับ 1:100

1452 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ หมายถึง ความเข้มข้นของ cDNA จากตัวอย่าง

3.3.7 วิธีการวิเคราะห์การการแสดงออกของจีนโดย Quantitative real-time RT-PCR ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของบริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany โดยใช้ cDNA สกัดจากเอ็มบริโอ จำนวน 30 เอ็มบริโอ (แบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลองที่เสริมชนิดของ serum กลุ่ม ๆ ละ 10 เอ็มบริโอ) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ Chromo4™ Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad, Laboratories Inc. USA) ประกอบด้วย 96-well reaction โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1) วิธีการเตรียม working solution

- การเตรียม 10 μ M primer Forward (อัตราส่วน 1: 10)

เตรียมโดย stock primers (100 μ M) 1 μ l : PCR water grade 9 μ l

- การเตรียม 10 μ M primer reverse (อัตราส่วน 1: 10)

เตรียมโดย stock primers (100 μ M) 1 μ l : PCR water grade 9 μ l

ตารางที่ 3-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน IFN- τ และ BCL-2 ในโค

จีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Accession number	Sources
IFN-τ			
Forward primer	5' - GCCCTGGTGCTGGTCAGTA - 3'	XM_593584	
Reverse primer	5' - CATCTTAGTAGCGAGGAGTC - 3'	XM_593584	Rizos et al. (2003)
BCL-2			
Forward primer	5' - CTGCACCTGACGCCCTTCAC - 3'	XM_586976	
Reverse primer	5' - GCGTCCCAGCCTCCGTTGT - 3'	XM_586976	Li et al. (2009)

2) วิธีการ Quantitative real-time RT-PCR ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของบริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany

2.1 นำเอาน้ำยาที่ใช้การเตรียม master mix มาทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเอาน้ำยาแต่ละตัวมาทำการ vortex อย่างเบาๆ เสร็จแล้วทำการปั่นตกด้วยเครื่องตกตะกอนสาร (Spin down Centrifuge, TOMOS MiniStar[®], Spin Down Centrifuge, USA) ประมาณ 15 วินาที หรือใช้เครื่อง microcentrifuge โดยตั้งความเร็วประมาณ 2,000 rpm ประมาณ 30 วินาที

2.2 นำเอาน้ำยามาทำการเตรียม master mix ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังนี้

Reagents	Final conc.	1:10	1 reaction (μ l)
Faststart SYBR Green Master	1x		25
Primer forward	0.33 μ M	3:27	1
Primer forward	0.33 μ M	3:27	1
Water, PCR grade	-		18
Total			45

2.3 หลังจากการเตรียม master mix เสร็จแล้วผสมให้เข้ากันอย่างดี โดยการใช้ไมโครไปเปิดดูดขึ้นลงประมาณ 20 ครั้ง จากนั้นทำการปั่นตกด้วยเครื่อง spin down ประมาณ 15 วินาที

2.4 ทำการแบ่ง master mix ใส่ PCR tube จำนวน 45 μ l.

2.5 เติม cDNA template (อัตราการเจือจาง 50 เท่า) จำนวน 5 μ l. และน้ำ (PCR grade water) สำหรับ negative control จำนวน 5 μ l.

2.6 เสร็จแล้วทำการปั่นเหวี่ยง และนำไปเข้าเครื่อง real time PCR และตั้งโปรแกรมเครื่องดังต่อไปนี้

Program Name	Cycles	Target ($^{\circ}$ C)	Hold (hh:mm:ss)
Pre-Incubation	1	95 $^{\circ}$ C	00:10:00
Amplification	50		
Segment 1		95 $^{\circ}$ C	00:00:30
Segment 2		50 $^{\circ}$ C	00:00:20
Segment 3		72 $^{\circ}$ C	00:00:45
Melting curve	1	65-95 $^{\circ}$ C	00:00:10

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำมาทดสอบความแตกต่างโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้ PROC ANOVA (SAS, 2001) เปรียบเทียบขนาดของฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซด์ การพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซด์ การปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย โดยวิธี Chi-square analysis หรือ chi-square analysis with Yates' correction และวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของโปรตีน IFN- τ และ BCL-2 ของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel et al., 1997)

3.5 สถานที่ทำการวิจัย/ เก็บข้อมูล

- 3.6.1 โรงฆ่าสัตว์เทศบาลขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น
- 3.6.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- 3.6.3 ห้องปฏิบัติการกลางศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.6 ระยะเวลาทำการวิจัย

ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2553