บทนำ

โคพื้นเมืองเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและสังคมในเกษตรกรระดับรากหญ้า โคพื้นเมืองสามารถปรับตัว และดำรงชีวิตในท้องถิ่น ตลอดจนอนุภูมิภาคอุษาคเนย์ได้เป็นอย่างดี พันธุกรรมที่มีในโคพื้นเมืองจึงมีคุณค่ายิ่งในทางชีววิทยาและเศรษฐกิจในอนาคต ภายใต้สภาวะคุกคามของสภาวะโลกร้อน อย่างไรก็ตามประชากรของโคพื้นเมืองสายพันธุ์แท้ได้ลดจำนวนลงอย่างน่าเป็นห่วง ดังนั้น การอนุรักษ์พันธุกรรม และการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์เพื่อประโยชน์ในอนาคตจึงเป็นยุทธศาสตร์ที่สำคัญยิ่ง เทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์นับเป็นเครื่องมือสำคัญในการบรรลุเป้าหมายดังกล่าว ที่ผ่านมาได้มีการเก็บรักษาตัวอ่อน และเชื้อพันธุ์สัตว์ในสภาพแช่แข็ง ซึ่งเป็นที่ประจักษ์ชัดว่าได้ก่อให้เกิดผลดีต่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์อย่างขนานใหญ่ ได้มีการศึกษาถึงการเก็บรักษาไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในสภาวะแช่แข็ง และมีรายงานถึงผลสำเร็จในการผลิตลูกโคจากการปฏิสนธิไข่แช่แข็งและอสุจิ (Dinnyes et al. 2000, Viera et al. 2002) อย่างไรก็ตามคุณภาพของไข่ที่ผ่านการแช่แข็งยังมีคุณภาพไม่ดีพอ การผลิตตัวอ่อนจากไข่ที่ผ่านการแช่แข็งยังต่ำกว่าไข่ที่ไม่ได้แช่แข็งอยู่มากในทุก specis (Diez et al. 2012) ทั้งนี้สาเหตุเนื่องมาจากไข่เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ จึงทำให้สัดส่วนพื้นผิวต่อปริมาตรมีน้อย จึงไวต่ออุณหภูมิเย็น การเกิดการก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์ไข่ระยะ M II มีความสามารถให้สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งได้นำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เชื่องช้า อีกทั้งเปลือก zona pellucid ของไข่ยังทำหน้าที่อุปสรรค์ในการเคลื่อนผ่านของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งและน้ำ กระบวนการแช่แข็งและทำละลายทำให้ zona pellucid ของไข่เกิดสภาวะแข็งอันเป็นอุปสรรคต่อการเข้าปฏิสนธิโดยอสุจิ ไข่มีองค์ประกอบของ lipid ใน cytoplasm ที่สูงซึ่งทำให้ไว้ต่อความเย็น การจัดเรียงตัวของ chromosome ของไข่ระยะ M II มีปัญหาต่อการแช่แข็ง ทำให้โครงสร้างต่างๆ ภายในเสียสภาพ เกิดความผิดปกติของ chromosome และ DNA และท้ายที่สุด ไข่มีความไวต่อความเสียหายที่เกิดจาก reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกิดขึ้นในปริมาณมากระหว่างแรแช่แข็งส่งผลต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการพัฒนา (Dinnyes et al. 2007; Saragusty and Arav, 2011)

การแช่แข็งไข่แบบ vitrification ให้อัตราการรอดของไข่สูงกว่าการแช่แข็งแบบ slow freezing (Kuwayama, 2007; Saragusty and Arav, 2011) แม้ว่าสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งจะเป็นพิษต่อเซลล์ แต่ในการแช่แข็งเซลล์ไข่แบบ vitrification นิยมใช้สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งชนิดที่ซึมผ่านเซลล์ ได้แก่ ethylene glycol (EG), dimethylsulfoxide (DMSO) และ propylene glycol (PrOH) (Ambrosini et al. 2006) มักพบการใช้ EG ร่วมกับ DMSO (Yamada et al. 2007) และ EG ร่วมกับ PROH (Chian et al, 2004) อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงความเป็นพิษของ DMSO ต่อไข่โค (Arav et al. 1993) สำหรับ EG Magnusson et al (2008) รายงานว่า ความเข้มข้นของ EG ที่ใช้ และระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่มีผลต่อความสามารถในการพัฒนาภายหลังการแช่แข็งแบบ vitrification อย่างไรก็ตาม EG ก็ถูกเลือกใช้มากที่สุดในการแช่แข็งตัวอ่อนและไข่แบบ vitrification ทั้งนี้เนื่องจากมีพิษน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่น (Fahy et al. 2004)

ความเสียหายที่เกิดกับเซลล์ไข่ระหว่างการแช่แข็งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความเสียหายจากความดันสารละลาย ความเป็นพิษของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง การก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์ และความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จากความเย็นขณะลดอุณหภูมิลง องค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ phospholipids, cholesterol, lipids อื่นๆ และ protein เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีความยืดหยุ่นสูง จะกิดความเสียหายต่ำกว่าเยื่อหุ้มเซลล์ที่ขาดความยืดหยุ่น การเสริม linoleic acid albumin (LAA) ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน มีผลดีต่อความทนต่อการแช่แข็งตัวอ่อนโค (Hochi et al, 1999) กระบือ (Laowtammthron et al. 2005) มีการเสริม trans-10-cis-12 conjugated linoleic acid (10 t, 12c CLA) ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคพบว่าทำให้ตัวอ่อนโคระยะ Hastocyst นต่อการแช่แข็ง (Pereira et al. 2007) มีรายงานการเสริม cholesterol แก่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในรูป cholesterol-loaded cyclodextrin และรายงานถึงผลดีต่ออัตรารอดชีวิตของอสุจิแพะ (Serin et al. 2010) และโค (Moraes et al. 2010)

ดังนั้น การศึกษาถึงวิธีการปรับปรุงคุณภาพเซลล์ไข่ภายหลังการแช่แข็งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวอ่อนจากเซลล์ไข่แช่แข็ง จึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษา

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของ ethylene glycol ในน้ำยาบ่มก่อนการ vitrification และศึกษาถึงผลของการเสริม LAA ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไข่ และการเสริม CLC ในน้ำยาก่อนการแช่แข็งและ vitrification ต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาของตัวอ่อนภายหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก: แสวงหาเทคนิคที่มีประสิทธิผลในการเก็บรักษาคุณภาพของไข่โคพื้นเมืองแบบแช่แข็ง

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับและระยะเวลาในการบ่มไข่กับ ethylene glycolในการแช่แข็งต่ออัตราการปฏิสนธิภายหลังการนำมาละลาย

2. เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของระดับ Cholesterols loaded cyclodextrin ต่ออัตราการพัฒนาของไข่ที่ผ่านการแช่แข็งภายหลังการปฏิสนธิ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายจากการเก็บเกี่ยวไข่อ่อนจากรังไข่ของแม่โคและนำไข่ที่ได้มาแช่แข็ง, เลี้ยงให้สมบูรณ์ ปฏิสนธิ และเลี้ยงตัวอ่อนให้เจริญภายนอกร่างกายถึงระยะ blastocyst และเก็บรักษาไว้ในสภาพแช่แข็ง

ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายโดยการเจาะดูดเก็บเกี่ยวไข่จากรังไข่ของโคที่มีชีวิต จากนั้นนำมาเลี้ยงให้พัฒนาจนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ (in vitro maturation) ปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (in vitro

fertilization) และเลี้ยงต่อจนได้ตัวอ่อนในระยะที่เหมาะสม (in vitro culture) วิธีการเก็บไข่ วิธีการนี้มีความยืดหยุ่นและประสิทธิผลสูง ทั้งนี้เนื่องจากสามารถดำเนินการเก็บไข่ได้ในลูกโค โคสาว โคนาง ตลอดจนโคตั้งท้องอ่อน โดยสามารถผลิตตัวอ่อนและย้ายฝากจนเกิดลูกโคได้ในระดับที่น่าพอใจ ในการเก็บเกี่ยวไข่ในสัตว์ที่โตเต็มวัย สามารถดำเนินการได้สัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดยไม่มีผลเสียต่อสุขภาพโคแต่ประการใด เทคนิคนี้จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญสนับสนุนการกระจายพันธุกรรมที่ดีเด่นของโค การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนน่าจะเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อน ดังนั้นการศึกษาถึงการเจาะดูดไข่โดยเทคนิค transvaginal – guide oocyte collection (Ovum Pick Up) และเทคนิคการผลิตตัวอ่อนจากไข่ที่ได้รับ จึงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ ช่วยสนับสนุนการเพาะขยายโคพันธุ์ดีให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามไข่ที่ได้มานั้นต้องดำเนินการเลี้ยงสู่ขบวนการ IVMFC โดยทันทีจึงยังขาดความยืดหยุ่น ดันนั้นการศึกษาถึงการแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาไข่ไว้สำหรับ ขบวนการ IVMFC จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของโคพื้นเมือง

ในการแช่แข็งไข่จะต้องเติม CPA ซึ่งมีพิษไม่มากก็น้อยในน้ำยา VS1 เพื่อเตรียมไข่และจากนั้นแช่ไข่ในน้ำยา VS2 ซึ่งมีความเข้มข้นของ CPA สูง ความสำเร็จของการแช่แข็งเพื่อให้ไข่มีสภาพสมบูรณ์และพัฒนาภายหลังการปฏิสนธิ จึงขึ้นกับปัจจัยด้านเวลาที่สัมผัสกับ CPA และความเข้มข้นของ CPA ที่ใช้ สมมติฐานของการศึกษานี้ คือ ใช้ EG ที่ความเข้มข้นระดับต่ำในการเสริมในน้ำยา VS1 ให้สัมผัสกับไข่อ่อนในระยะเวลาที่เหมาะสม

อีกด้านหนึ่งคือแนวทางการปรับปรุงความสามารถในการทนได้ต่อการแช่แข็ง โดยเน้นการปรับปรุงคุณภาพของเยื่อห่อหุ้มไข่

1. การเสริม LAA ในน้ำยา IVM โดยคาดว่า unsaturated fatty acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ phospholipids ของ cell membrane จะช่วยให้ไข่ทนต่อการแช่แข็ง เช่นเดียวกับที่ได้ผลมาแล้วในการแช่แข็งตัวอ่อน

2. การเสริม cholesterol – loaded methyl-β-cyclodextrin ในน้ำยาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนการแช่แข็งไข่ โดยคาดว่า cholesterol จะผ่าน cumalen cell และไข่ ซึ่งจะช่วยให้อัตรารอดชีวิตของไข่ภายหลังการแช่แข็งสูงขึ้น

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การแช่แข็งไข่ในโค

ความพยายามแช่แข็งไข่ในโคยังเป็นสิ่งที่ท้าทาย เนื่องจากไข่อ่อนมีความไวต่อความเสียหายจากอุณหภูมิต่ำ (Prentice and Anzer 2011; Diez et al., 2012) ไม่ว่าจะเป็นไข่ระยะ GV. หรือ MII มีการศึกษาการแช่แข็งไข่โคในทุกระยะ (Lim et al. 1999; Diez et al. 2012) การแช่แข็งไข่อ่อนโคยังเป็นสิ่งที่ท้าทายนักวิจัย แม้จะมีความสำเร็จในการผลิตลูกโคจากไข่ที่ผ่านการแช่แข็งแล้วก็ตาม

มีรายงานว่า Oocyte ที่ได้จากลูกโคเมื่อนำมาแช่แข็งจะมีความเสียหายสูงกว่า Oocyte จากแม่โค ที่สอดคล้องกับรายงานของ Diez et al. (2005) ซึ่งระบุว่าการแช่แข็งตัวอ่อนที่ระยะ mature เมื่อนำไป

ปฏิสนธิจะได้ตัวอ่อนระยะ blastocyst สูงกว่าไข่ที่แช่แข็งที่ยังไม่เป็นพวก immature และการใช้สาร cytochalacin D แก่ไข่ที่ยังไม่ immature ไม่ทำให้เกิดผลดีแต่ประการใด Vieira et al.(2002)

วิธีการแช่แข็ง

Ladda et al. (2001) รายงานว่า ไข่ของสุกรและโคจะมีความไวต่ออุณหภูมิที่เย็น ดังนั้น การแช่แข็งแบบ vitification จึงให้ผลดีกว่าการแช่แข็งแบบ slow freezingซึ่ง Mavrides and Morroll (2005), Prentice and Anzar (2011) และ Diez et al (2012) ได้รายงานสอดคล้องกันว่า ไข่ที่ผ่านการแช่แข็งแบบ vitification เมื่อนำไปปฏิสนธิจะมีอัตราพัฒนาดีกว่าไข่ที่ผ่านการแช่แข็งแบบslow freezing

ชนิดของcryoprotectant(CPA)

CPA ที่ใช้ในการแช่แข็งมีผลต่อคุณภาพไข่แตกต่างกัน CPA ที่ใช้เป็นพวกที่ซึมผ่านเซลล์ ได้แก่ EG, Gly, DMSO, PrOH และ acetamide มักมีการใช้ EG ควบคู่กับ DMSO (Diez et al, 2012) โดย Getin and Bastan (2006) รายงานว่า Ethylene glycol (EG)ให้ผลดีกว่าDimethyl sulfoxideหรือสารผสมของสารทั้ง 2 ชนิด ซึ่ง Papis et al. (2002) รายงานว่าในการใช้ EG เป็น CPA ระดับที่เหมาะสมคือ 3%และบ่มกับไข่ 30 นาทีจะให้ผลดีที่สุด

ขนาดของน้ำยาที่บรรจุตัวอ่อน,ความเข้มข้นของCPA, อุณหภูมิ และระยะเวลาที่สัมผัสกับ CPA มีผลต่อคุณภาพไข่ (Ladda et al, 2001) ดังนั้นการแช่แข็งจึงบรรจุไข่ในน้ำยาที่มีปริมาณน้อยที่สุด (Papis et al. 2000 ; Atabay et al 2004) หรือใช้ open pulled straw (Vieira et al,2002 ; Albarracin et al.,2005)

นอกจากนี้ยังมีความพยายามในการรักษาสภาพผนังเซลล์ไข่โดยการเติมสารบางชนิดในน้ำยา เพื่อรักษาระดับ Cholesterolsที่ผนังเซลล์ (Seidel Jr., 2006 ; Horrath and Seidel Jr., 2006)

มีรายงานการเสริม conjugated linoleic acid ในน้ำยา IVM ในช่วงการเลี้ยงไข่มีผลดีต่อคุณภาพตัวอ่อน (Lapa et al. 2011)

การเลี้ยงไข่ให้พัฒนาจนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ

ไข่ที่ได้ส่วนใหญ่จะนำมาเลี้ยงในน้ำยา TCM199 เสริม FCS ฮอร์โมน FSH, LH, Estradiol และ EGF (Majerus et al., 1999; Mermillod et al., 1993) การเลี้ยงร่วมกับ granulose cell ตลอดจนการเสริมด้วย growth factor หรือ heparin มีผลดีต่อการพัฒนาของไข่ (Galli et al., 2001)

การปฏิสนธิ

ส่วนใหญ่มักทำการปฏิสนธิใน Tyrode's medium (Machado et al., 2006) ในตู้บ่มอุณหภูมิ 38.5 °ซ CO_2 ระดับ 5% ในอากาศ Galli et al. (2001) รายงานว่า การลดระดับ O_2 ลง และการเสริม amino acid ในน้ำยา SOF มีผลดีต่ออัตราการปฏิสนธิ

การเลี้ยงตัวอ่อน

การเลี้ยงตัวอ่อนมักเลี้ยงในน้ำยา SOF เสริม FCS ระดับ 5 – 10% เลี้ยงร่วมกับเซลล์พื้นผิวท่อนำไข่ของโค ในตู้อุณหภูมิ 38.5 °ซ CO_2 ระดับ 5% ของอากาศ (Manik et al., 2003; De Roover et al., 2005) หรือ SOF เสริมด้วย amino acid และเลี้ยงในตู้ที่มี CO_2 ระดับ 5% และ O_2 ระดับ 5% (Galli et al., 2001; Machado

et al., 2006) Block (2007) รายงานว่า การเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ในน้ำยาที่มี Insulin-like growth factor-I มีผลดีต่ออัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนภายหลังการย้ายฝาก

การเก็บรักษาไข่และตัวอ่อนแบบแช่แข็ง

การแช่แข็งตัวอ่อนมีวิธีการลดอุณหภูมิหลายแบบ แต่การแช่แข็งในโคปัจจุบันมี 2 รูปแบบหลัก คือ

1. การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้า (slow rate cooling) ภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเป็นวิธีปฏิบัติทั่วไปในการค้าตัวอ่อนแช่แข็ง น้ำยาที่ใช้แช่แข็งตัวอ่อนมีความเข้มข้นของ cryoprotectant ประมาณ 1-2 M จุดอ่อนของการแช่แข็งแบบนี้ คือ ต้องใช้เครื่องมือที่ราคาแพง
2. การแช่แข็งแบบ vitrification ซึ่งจุดเด่น คือ ดำเนินการง่าย ต้นทุนต่ำ สามารถดำเนินการโดยบรรจุตัวอ่อนที่เตรียมไว้ในหลอดบรรจุขนาด 0.25 มิลลิลิตร และจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง ซึ่งอุณหภูมิลดลงด้วยอัตรา 2,500 °ซ/นาที โดยน้ำยาที่ใช้แช่แข็งตัวอ่อนมี cryoprotectant ความเข้มข้นสูงประมาณ 5-7 M ดังนั้นจึงต้องลดอุณหภูมิในการแช่แข็งอย่างรวดเร็ว และเมื่อนำมาใช้ต้องละลายอย่างรวดเร็ว (Mahmoudzadeh et al., 1993)

การแช่แข็งตัวอ่อนแบบ slow rate cooling เป็นการแช่แข็งโดยรักษาสภาวะสมดุลของสิ่งต่างๆ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายแก่ตัวอ่อน จากปรากฏการณ์ต่างๆ คือ การก่อตัวของผลึกน้ำแข็ง ความเสียหายจากความดันสารละลายที่สูง ความเป็นพิษของ cryoprotectant ความเข้มข้นสูงของ electrolytes ภายในเซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อทั้ง zonapellucida และเซลล์ของตัวอ่อน (Palasz and Mapletoft, 1996) ในการแช่แข็งแบบ vitrification จะตัดปัญหาเรื่องการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์

มีความพยายามลดความเป็นพิษของ cryoprotectant ที่ใช้ลง โดยเลือกใช้ชนิดที่เป็นพิษต่ำ และการใช้ cryoprotectant มีหลายชนิดร่วมกัน การเติม cryoprotectant แบบเพิ่มความเข้มข้นเป็นขั้นตอน (stepwise) การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้ความเสียหายจาก chilling injury ลดลง ความเสียหายดังกล่าวได้แก่ ความเสียหายของ lipid ภายในเซลล์ ความเสียหายที่เกิดกับองค์ประกอบที่เป็น lipid ของเซลล์ และโครงสร้างอื่นๆ (Palasz and Mapletoft, 2006)

รูปแบบในการบรรจุตัวอ่อนเพื่อแช่แข็งแบบ vitrification

มีการแช่แข็งตัวอ่อนแบบ vitrification ในหลอดบรรจุขนาด 0.25 มิลลิลิตร ซึ่งลดอุณหภูมิได้ 2,500 °ซ/นาที ต่อมามีการพัฒนารูปแบบภาชนะในการบรรจุตัวอ่อนเพื่อแช่แข็งแบบ vitrification ตัวอย่างเช่น open pulled straw ซึ่งเป็นการยืดหลอดให้เรียวเล็กและบางกว่า straw ปกติ ทำให้ตัวอ่อนอยู่ในสารละลายปริมาตรน้อยลง จึงได้รับพิษจาก cryoprotectant น้อยลง และเมื่อแช่แข็งจะมีอุณหภูมิ ลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 20,000 °ซ/นาที (Pereira and Marques, 2008) พบว่าอัตรารอดชีวิตของการแช่แข็งแบบ vitrification โดยบรรจุ open pulled straw กับการแช่แข็งโดยบรรจุหลอด straw ธรรมดาภายใต้การควบคุมอุณหภูมิโดยเครื่องควบคุมให้ผลไม่ต่างกัน (Lopatarova et al., 2006) ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบหลอดบรรจุตัวอ่อนเพื่อแช่แข็งแบบ vitrification ระหว่าง open pulled straw (OPS) และการยืดหลอดแก้วขนาดเล็ก (glass micropipette, GMP) ซึ่งเรียวเล็กและยาวกว่า OPS พบว่า GMP ให้ตัวอ่อนรอดชีวิตสูงกว่า (90.4 กับ 79.6%)

ได้มีการปรับปรุงการแช่แข็งแบบ vitrification โดยหยดตัวอ่อนลงบน electron microscope grids ซึ่งวางบนไนโตรเจนเหลว พบว่าทำให้สามารถลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมากขึ้นอีก (Vaita, 2000)

Cryoprotectant ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบ vitrification

จากการค้นคว้ารายงานการวิจัยบางส่วนซึ่งตีพิมพ์งานวิจัยระหว่างปี ค.ศ. 1998 ถึง 2008 พบว่านักวิจัยส่วนใหญ่แช่แข็งตัวอ่อนด้วยน้ำยาที่มีองค์ประกอบที่หลากหลาย โดยส่วนใหญ่ใช้ ethylene glycol กับ dimethyl sulfaxide โดยมีการใช้ในระดับ 16.5% EG + 16.5% DMSO (Cho et al., 2002; Moore et al., 2007) ระดับ 20% EG + 20% DMSO (Rizos et al., 2001; Tominaga and Hamada, 2004; Vieira et al., 2007; Gomez et al., 2008) ระดับ 25% EG + 25% DMSO (Kaidi et al., 1998) โดยน้ำยาที่ใช้คือ TCM 199 + serum 5-20% และมักเสริม sucrose ประมาณ 0.5 M ด้วย

อัตรารอดชีวิตของไข่และตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็งแบบ vitrification

มีการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็งแบบ vitrification โดยนำตัวอ่อนภายหลังการละลายไปเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 38.5 °ซ 5% CO_2 ภายใต้น้ำยาแบบต่างๆ เช่น TCM 199 + 10% FCS (Cho et al., 2002) TCM 199 + 20% FCS และ 10 mM ß-merceptoethanol (Tominaga and Hamada, 2004) เลี้ยงในน้ำยา KSOM + BSA 2 mg/ml + simple medium ในตู้ 5% CO_2, 5% O_2 และ 95% N_2 50 nM non – essential amino acids และ 2 mM L – glutamine (Moore et al., 2007) Nedamble et al. (2006) ได้ศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็งแบบ vitrification และรายงานว่าการใช้น้ำยา KSOM – SOF ให้ผลดีกว่าการใช้ CR_1, KSOM และ SOF อย่างเดียว และการเสริม ß-ME ในน้ำยามีผลดีต่อการรอดชีวิตของตัวอ่อน สอดคล้องกับรายงานของ Rizos et al. (2001) ซึ่งได้ศึกษาระบบการเลี้ยงตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็งและละลายพบว่าระบบการเลี้ยงต่างๆ มีผลต่ออัตรารอดชีวิตของตัวอ่อน ในการเลี้ยงตัว

อ่อนแบบ co-culture พบว่า buffalo rat liver cells ให้ผลดีกว่า granulose cell (Kaidi et al., 1996) อ้างโดย (Kaidi et al., 1998)

ตัวอ่อนที่ได้จากแม่โคจะทนต่อการแช่แข็งสูงกว่าตัวอ่อนที่ผลิตนอกร่างกาย (Rizos et al., 2001) การผลิตนอกร่างกายแล้วนำไปเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะก็ให้ผลในเรื่องการทนต่อขบวนการแช่แข็งไม่ต่างจากผลิตจากแม่โค (Enright et al., 2000) โดยทั่วไปแล้วคุณภาพตัวอ่อนมีผลมากต่ออัตรารอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งแบบ vitrification (Contreras et al., 2008; Gomez et al., 2008)

Assumpeao et al. (2003) รายงานว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ตัวอ่อนมีอัตรารอดชีวิตสูงกว่าแบบ vitrification (43.3 กับ 9.8%) แต่ Lane et al. (1998) รายงานว่าการแช่แข็งตัวอ่อนทั้ง 2 แบบ ให้ผลไม่แตกต่างกัน (77 และ 71%)

วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยประกอบด้วย 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ Ethylene glycol และระยะเวลาการบ่มในน้ำยา vitrification medium VS1 ต่อคุณภาพของไข่โคพื้นเมืองแบบแช่แข็ง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 3×2 factorial in CRD ร่วมกับกลุ่มควบคุม โดยใช้โอโอไซต์จากรังไข่โคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์เข้าทดลองจำนวน 200 โอโอไซต์ต่อทรีทเม้นท์

ทรีทเม้นท์

แบ่งการทดลองออกเป็น 7 ทรีทเม้นท์โดยใช้โอโอไซต์โคเข้าทดลองจำนวน 200โอโอไซต์ต่อทรีทเม้นท์ดังนี้

ทรีทเม้นท์ที่ 1 กลุ่มควบคุม (fresh control)

ทรีทเม้นท์ที่ 2 บ่มโอโอไซต์ในสารละลายป้องกันการแช่แข็งในน้ำยา SV1 ที่ประกอบด้วย 2% EG, 20% fetal cafe serum (FCS) ใน TCM-199 (vitrification solution 1; VS1) นาน 10 นาที ก่อนบ่มในน้ำยาสุดท้ายของการแช่แข็ง (vitrification solution 2; SV2: 35%EG, 20%FCS, 1M Sucrose in TCM-199)

ทรีทเม้นท์ที่ 3 บ่มโอโอไซต์ในสารละลายป้องกันการแช่แข็งในน้ำยา SV1 ที่ประกอบด้วย 2% EG, 20% FCS ใน TCM-199 (VS1) นาน 20 นาที ก่อนบ่มในน้ำยาสุดท้ายของการแช่แข็ง (VS2)

ทรีทเม้นท์ที่ 4 บ่มโอโอไซต์ในสารละลายป้องกันการแช่แข็งในน้ำยา SV1 ที่ประกอบด้วย 4% EG, 20% FCS ใน TCM-199 (VS1) นาน 10 นาที ก่อนบ่มในน้ำยาสุดท้ายของการแช่แข็ง (VS2)

ทรีทเม้นท์ที่ 5 บ่มโอโอไซต์ในสารละลายป้องกันการแช่แข็งในน้ำยา SV1 ที่ประกอบด้วย 4% EG, 20% FCS ใน TCM-199 (VS1) นาน 20 นาที ก่อนบ่มในน้ำยาสุดท้ายของการแช่แข็ง (VS2)

ทรีทเม้นท์ที่ 6 บ่มโอโอไซต์ในสารละลายป้องกันการแช่แข็งในน้ำยา SV1 ที่ประกอบด้วย 6% EG, 20% FCS ใน TCM-199 (VS1) นาน 10 นาที ก่อนบ่มในน้ำยาสุดท้ายของการแช่แข็ง (VS2)

ทรีทเม้นท์ที่ 7 บ่มโอโอไซต์ในสารละลายป้องกันการแช่แข็งในน้ำยา SV1 ที่ประกอบด้วย 6% EG, 20% FCS ใน TCM-199 (VS1) นาน 20 นาที ก่อนบ่มในน้ำยาสุดท้ายของการแช่แข็ง (VS2)

2. วิธีการดำเนินการทดลอง

2.1 โอโอไซต์

โอโอไซต์จากรังไข่โคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น ทำการเก็บเซลล์โอโอไซต์โคตามวิธีของ Wang et al. (2007)โดยการกรีดเซลล์ฟอลลิเคิลบนรังไข่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 มิลลิเมตรด้วยใบมีดผ่าตัดในสารละลาย modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS)+1mg/ml Polyvinylpyrrolidone (PVP) ทำการคัดเลือกและประเมินคุณภาพของโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และจัดแบ่งเกรดตามจำนวนชั้นของ cumulus cells โดยโอโอไซต์เกรด A มีชั้นของ cumulus cells >4 ชั้น เกรด B มีชั้นของ cumulus cells 3 หรือ 4 ชั้น เกรด C มีชั้นของ cumulus cell 1 หรือ 2 ชั้น เกรด D ไม่มี cumulus cell และเกรด E มี cumulus cell กระจายรอบโอโอไซต์ (Merton et al., 2003)

2.2 กลุ่มตัวอย่าง

โอโอไซต์โคเกรด A, B จากรังไข่ที่ได้จากจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น จำนวน 1400 โอโอไซต์ ถูกนำมาใช้ในการทดลอง

2.3 In vitro maturation

ทำการบ่มโอโอไซต์เพื่อให้พร้อมต่อการปฏิสนธิตามวิธีของ Ward et al. (2002) โดยโอโอไซต์โคเกรด A, B ที่ได้จากการคัดเลือกจะถูกนำมาล้างในสารละลาย mDPBS+1mg/ml PVP (100 µl/drop) จำนวน 4 รอบ ตามด้วยการล้างใน TCM-199 (100 µl/drop) อีก 4 รอบ แล้วทำการประเมินคุณภาพของโอโอไซท์และนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยา IVM ที่ประกอบด้วย FSH 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, LH 100ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ,estradiol-17-β 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 1% Antibiotic ใน TCM-199 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โอโอไซต์ในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl ภายในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO2 in air เป็นระยะเวลา 22 ชั่วโมง ยกเว้นกลุ่ม ควบคุมที่ทำการบ่ม 24 ชั่วโมงก่อนการปฏิสนธิ

2.4 การแช่แข็งโอโอไซต์แบบ vitrification

ทำการแช่แข็งเซลล์โอโอไซต์โคด้วยวิธี vitrification ตามวิธีของ Prentice et al. (2011) โดยหลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์โอโอไซต์ในน้ำยา IVM ครบ 22 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (มี first polar body) มาล้างด้วยในน้ำยา 25 mM Hepes buffered TCM 199+20% FCS (v/v)+50µg gentamycin/mL (Basic Medium; BM) 1 รอบ หลังจากนั้นทำการการย่อยเซลล์ cumulus cell ออกจากเซลล์โอโอไซต์ ด้วยการแช่ในน้ำยา 0.1 % hyaluronidase (100 ul/drop) จำนวน 3 รอบ รอบละ 1 นาที แล้วใช้พลาสเจอร์ปิเปตที่ยืดให้ปลายมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 130- 140 ไมครอน ดูดโอโอไซต์ขึ้นลงหลายๆ ครั้ง เพื่อให้ cumulus cell ออกจากเซลล์โอโอไซต์ให้มากที่สุดก่อนการแช่แข็ง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์โอโอซต์อีกครั้งในน้ำยา BM (100µl/drop) จำนวน 3 รอบก่อนการแช่แข็ง การแช่แข็งเซลล์โอโอไซต์เริ่มต้น

โดยการบ่มเซลล์โอโอไซต์ในน้ำยา SV1 (200µl/drop) ตามระยะเวลาและความเข้มข้นของ EG แต่ละทรีทเม้นท์กำหนด (ข้อ 4. ทรีทเม้นท์) ที่อุณหภูมิ 38.5 °C จากนั้นทำการย้ายโอโอไซต์มาบ่มต่อในในน้ำยา vitrification (SV2) (20µl/drop) พร้อมทำบรรจุเซลล์โอโอไซต์จากน้ำยา VS2 ปริมาตร 5µl ใส่ใน 0.25ml cryo-plastic straws แล้วจุ่มลงไนโตรเจนเหลวทันทีภายในระยะเวลาไม่เกิน 30 วินาที หลังจากการบ่มในน้ำยา VS2 ทั้งนี้การแช่แข็งโอโอไซต์จะทำครั้งละ 5 ใบ โดยโอโอไซต์จะถูกแช่แข็งในชั่วโมงที่ 22 หลังจากเลี้ยงในน้ำยา IVM

2.5 การทำละลายโอโอไซต์แช่แข็ง

ทำการละลายโอโอไซต์แช่แข็งการตามวิธีของ Prentice et al. (2011) โดยนำโอโอไซต์แช่แข็งมาทำการละลายในสารทำละลาย (Warming Solution (WS) ที่ประกอบด้วย 20%FCS, 1M Sucrose in TCM-199 ปริมาตร 15 ml ในหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 30 วินาที จากนั้นทำการตัด cryo-plastic straw ให้เซลล์โอโอไซต์ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 30 mm ที่มีน้ำยา WS อุณหภูมิ 38.5 °C ทำการคัดเลือกเซลล์โอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์โอโอไซต์ที่คัดเลือกได้มาล้างด้วย mDPBS+1mg/ml PVP จำนวน 3 รอบ และล้างในน้ำยา BM อีก 2 รอบ หลังจากนั้นโอโอไซต์จะถูกนำมาบ่มต่อในน้ำยา IVM ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO2 in air นาน 2 ชั่วโมงก่อนนำไปประเมินการรอดชีวิตของโอโอไซต์หลังการละลาย

2.6 การประเมินการหลอดชีวิตของโอโอไซต์หลังการละลาย

ทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของโอโอไซต์โดยใช้ fluorescein diacetate staining (FAD) ตามวิธีของ Dinnye´s et al. (2000) โดยนำโอโอไซต์ที่ได้จากการทำละลายมาบ่มในน้ำยา 2.5 µg/ml FAD ใน PBS(-) +5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) ที่อุณหภูมิ 38.5°C, นาน 2 นาทีในห้องมืด หลังจากนั้นทำการล้างโอโอไซต์ด้วย PBS(-) +5 mg/ml BSA 3 รอบ และทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence

2.7 การปฏิสนธินอกร่างกาย (IVF)

หลังจากการประเมินการรอดของเซลล์โอโอไซต์แล้วเซลล์โอโอไซต์ที่รอดชีวิตจะถูกนำมาทำการปฏิสนธิปฏิสนธิเซลล์โอโอไซต์ ทำการเตรียม Sperm เพื่อปฏิสนธิด้วยวิธี swim up method ตามวิธีของ Samardzija et al. (2006) โดยทำการอุ่นน้ำเชื้อโคพื้นเมืองไทย จำนวน 2 หลอดในน้ำอุ่น 37.5 °C นาน 30 วินาที จากนั้นเช็ดทำความสะดาดน้ำเชื้อให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูชุบ 70% Ethanol แล้วทำการตัดหลอดน้ำเชื้อและเก็บน้ำเชื้อใน 1.5 ml eppendorf tube หลังจากนั้นทำการดูดน้ำเชื้อจาก eppendorf tube ปริมาตร 200µl และเติมลงไปในหลอดทดลองที่มีน้ำยา Tyrode's albumin lactate pyruvate-HEPES (TALP-HEPES) ที่ประกอบด้วย 0.3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 2cc/หลอด จำนวน 3 หลอด จากนั้นทำการเอียงหลอด 45 องศาในตู้อบ CO_2 5 %, 38.5 °C in air นาน 1 ชั่วโมง

หลังจากบ่มครบ 1 ชั่วโมง ทำการดูดส่วนใส่ของน้ำยา TALP-HEPES ปริมาตร 1.8 ml ในแต่ละหลอด รวมกันในหลอดปั่นแยกขนาด 15 ml ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วนำไปปั่นเหยี่วงด้วยความเร็ว 2100 rpm นาน 7 นาที เมื่อทำการปันเหวี่ยงครบ 7 นาที ทำการดูดส่วนใสทิ้งไปให้เหลือแต่ตะกอน sperm ที่ก้นหลอด

แล้วทำการเติม TALP-HEPES ปริมาตร 6 ml แล้วนำไปปั่นเหยี่วงอีกหนึ่งรอบด้วยความเร็วและระยะเวลาเท่าเดิม จากนั้นทำการดูดส่วนใสทิ้งไปให้เหลือแต่ตะกอน sperm ที่ก้นหลอด แล้วทำการเจือจางตะกอน sperm ด้วย1 ml ของน้ำยา in vitro fertilization-TALP (TALP-IVF) ที่ประกอบด้วย 6 mg/ml fatty acid-free BSA (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), 10 μg/ml heparin, 20 μM penicillamine/ml, 10 μM hypotaurine/ml และ 2μM epinephrine/ml ทำการปฏิสนธิโดยการบ่มโอโอไซท์และอสุจิร่วมกัน (Ward et al., 2002) ในสารละลาย TALP-IVF ที่ระดับความเข้มข้นของตัวอสุจิ $1x10^6$ ตัว/ml ในตู้อบ CO_2 5 %, 38.5 °C in air นาน 18 ชั่วโมง โดยในการทดลองนี้จะใช้น้ำเชื้อแช่แข็งโคพื้นเมืองไทยจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกันตลอดการทดลอง

2.8 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนแบบนอกร่างกาย

คัดเลือกโอโอไซต์ที่มีการปฏิสนธิอย่างสมบรูณ์ (Zygotes) มาเลี้ยงรวมกับเยื่อบุท่อนำไข่ (BOEC) ในสูตรน้ำยา Modified Synthetic Oviductal Fluid (mSOF) (Park et al. 2005) เลี้ยงจนถึงระยะ blastocyst โดยเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมง

2.9 การเก็บข้อมูล

2.9.1 การประเมินการอัตราการรอดชีวิตของโอโอไซต์หลังการละลาย

บันทึกการพัฒนาของโอโอไซต์หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกาย 22 ชั่วโมงและจำนวนโอโอไซต์ที่มีชีวิตรอดและไม่มีชีวิตรอด

2.9.2 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคนอกร่างกายจากโอโอไซต์แช่แข็ง

บันทึกอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะ Zygotes, cleaved, 8-cell และ day 8 blastocysts

2.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตาม Augmented Factorial Experiments Design (Stell and Torries., 1980) ด้วยวิธี PROC GLM ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย orthogonal contrast โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS. (1996)

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริม linoleic acid albumin (LAA) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงไข่และผลของการบ่ม cholesterol loaded methyl β cyclodextrin (CLC) ต่อคุณภาพไข่แบบแช่แข็ง

1. แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 ทรีทเมนท์ คือ

ทรีทเมนท์ที่ 1 ไข่เลี้ยงในน้ำยาปกติ และดำเนินการแช่แข็งแบบ vitrification (fresh control)

ทรีทเมนท์ที่ 2 ไข่เลี้ยงในน้ำยาปกติ และดำเนินการแช่แข็งแบบ vitrification

ทรีทเมนท์ที่ 3 ไข่เลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA 1 มก/มล และดำเนินการแช่แข็งแบบ vitrification

ทรีทเมนท์ที่ 4 ไข่เลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA 2 มก/มล และดำเนินการแช่แข็งแบบ vitrification

ทรีทเมนท์ที่ 5 ไข่เลี้ยงในน้ำยาปกติ 22 ชม. จากนั้นบ่มในน้ำยาที่มี CLC 1 มก/มล นาน 1 ชม. และดำเนินการแช่แข็งแบบ vitrification

ทรีทเมนท์ที่ 6 ไข่เลี้ยงในน้ำยาปกติ 22 ชม. จากนั้นบ่มในน้ำยาที่มี CLC 2 มก/มล นาน 1 ชม. และดำเนินการแช่แข็งแบบ vitrification

2. แผนดำเนินการทดลอง

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

สำหรับการเตรียม cholesterol-loaded methyl-β-cyclodextrin ดำเนินการตามวิธีการที่อ้างโดย Horvath and Seidel (2006)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า น้ำยาบ่ม VS1 ที่มีระดับ EG 6% ระยะเวลาบ่มน้ำยา 10 นาที ให้ผลต่อการรอดชีวิตของไข่ภายหลังการแช่แข็งแบบวิทริพิเคชั่น การแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst สูงสุดกว่าทุก treatment ($P<0.05$) (12.09%) ยกเว้นที่มีระดับ EG 4% และบ่ม 20 นาที ซึ่งการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst ต่ำกว่า แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ไข่ที่ผ่านการแช่แข็งทุกทรีทเมนท์ มีการพัฒนาของตัวอ่อน ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทำการแช่แข็ง (38.83%) (ดังแสดงใน Table 1) แสดงถึงความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการแช่แข็งไข่เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมฝ่ายตัวเมีย

จาก Table 1 จะพบว่า น้ำยาที่มีระดับ EG ความเข้มข้นต่ำ ต้องการระยะเวลาบ่มที่ยาวนาน ส่วนน้ำยาที่มีระดับ EG ความเข้มข้นสูง ต้องการระยะเวลาบ่มที่สั้น และหากบ่มยาวนานระดับความเป็นพิษต่อไข่จะสูง ส่งผลต่อการรอดชีวิตและอัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst ของไข่ ระยะที่เหมาะสมของไข่โคต่อการแช่แข็งยังมีข้อมูลที่ขัดแย้งกัน (Magnusson et al. 2002) ในการแช่แข็งไข่แบบ vitrification นั้น วิธีลดความเสียหายจากพิษของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (CPA) คือการให้ไข่สัมผัสกับ CPA ความเข้มข้นต่ำในระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะสัมผัสกับ CPA ความเข้มข้นสูง (Vajta et al 1998) ในบรรดา CPA ชนิดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ glycerol ไม่เหมาะสมกับ mature oocyte การใช้ CPA 2 ชนิดรวมกัน คือ EG และ DMSO ดูจะเป็นที่นิยม (Diez et al. 2012) อย่างไรก็ตาม Papis et al (2000) รายงานว่า การสัมผัสน้ำยา vitgrification medium VS, ที่มีระดับ EG 3% ให้ผลดีที่สุด ส่วนในงานทดลองของ Magnusson et al. (2008) ใช้น้ำยาที่มี EG ระดับ 30% (VS1) และ 40% ของ VS2 ในไข่ระยะต่างๆ และสรุปว่าความเข้มข้นของ CPA และระยะพัฒนาของไข่มีผลต่อการพัฒนาภายหลังการแช่แข็งแบบ vitrification ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไข่โคพื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมืองเป็นตัวอย่างการทดลอง และพบว่า EG (VS1) ระดับที่เหมาะสม 6% โดยบ่มนาน 10 นาที และไปสัมผัสกับน้ำยา VS2 ซึ่งมี EG ระดับ 35% นาน 30 วินาที ก่อนการ vitrification

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริม linoleic acid albumin (LAA) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงไข่ (IVM medium) และผลของการบ่มไข่กับ cholesterol loaded methyl-β-cyclodextrin (CLC) ต่อคุณภาพไข่โคแบบแช่แข็ง พบว่า น้ำยา IVM ที่มี linoleic acid (LAA) มีผลดีต่อการรอดชีวิตของไข่ภายหลังการแช่แข็ง โดย LAA ระดับ 2 มก/มล ให้อัตราการพัฒนาของ zygote สู่ระยะ blastocyst สูงกว่ากลุ่มควบคุม vitrification (Table 2) Lapa et al (2011) รายงานว่า การเสริม t10, c12 CLA ในน้ำยา IVM มีผลดีต่อการพัฒนาของ zygote สู่ระยะ blastocyst โดยคาดว่าอาจมีผลดีต่อการเพิ่มระดับ IGF-I สำหรับ LAA นั้น มีรายงานว่าทำให้ตัวอ่อนทนต่อการแช่แข็งได้ดีขึ้น (Laowtammathron et al. 2005) และเป็นผลดีต่อการทนได้ในการแช่แข็งของไข่ที่นำ nucleus ออก (Hochi et al., 2000)

การบ่ม mature oocyte ในน้ำยาที่เสริม cholesterol-loaded methyl-β-cyclodextrin ระดับ 2 มก/มล เป็นเวลา 1 ชม. มีผลดีต่อการพัฒนาของตัวอ่อนสู่ระยะ blastocyst สอดคล้องกับรายงานของ Horvath and Scidel (2006) ที่รายงานว่ามีผลดีต่อการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ+เซลล์ ในน้ำยาที่ไม่มี serum โดยคาดว่า cholesterol สามารถซึมผ่าน cumulus และ zona pellucida โดยการศึกษาดังกล่าวผลต่อการพัฒนาถึงระยะ blastocyst ไม่แตกต่างกัน ส่วนในการศึกษานี้ซึ่งใช้น้ำยาที่มี serum 10% พบว่าการเสริมสารดังกล่าวก่อนการแช่แข็งมีผลดีต่อการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะ blastocyst

การศึกษาครั้งนี้เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้พบว่า การแช่แข็งไข่โครระยะสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิโดยใช้น้ำยาที่มี ethylene glycol ระดับ 6% ระยะเวลาบ่มใน VS1 10 นาที ให้ผลดีที่สุด

การเสริม linoleic acid albumin ระดับ 1 มก ในน้ำยา IVM 1 มล เพื่อเลี้ยงเซลล์ไข่จนสมบูรณ์ มีผลดีต่อความทนได้ต่อการแช่แข็งและสามารถพัฒนาสู่ระยะ blastocyst

การเสริม cholesterol-loaded methyl-β-cyclodextrin (CLC) ระดับ 2 มก/มล ในน้ำยา IVM เป็นเวลา 1 ชม. มีผลดีต่อการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst

ข้อเสนอแนะในการศึกษาต่อไป

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริม LAA และ CLC มีผลดีต่ออัตราการรอดชีวิตของไข่โครระยะพร้อมปฏิสนธิที่ทำการแช่แข็งแบบ vitrification และมีผลดีต่อการพัฒนาภายหลังการปฏิสนธิของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst ควรมีการดำเนินการศึกษาต่อไปถึงการเสริม LAA ในไข่ทั้งระยะ immature และระยะ mature และการเสริม CLC แต่ไข่ระยะ mature ก่อนการแช่แข็งแบบ vitrification ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

Table 1 Effect of ethylene glycol concentrations in VS1 and equilibration time on viability, cleavageand developmental rates of native cattle oocytes.

Treatment	IVM	Vitri	FDA	Servival (n)	Servival rate (%)	IVF	Crevage Zygote (n)		Clevage (n)	Clevage rate (%)	Day 8 blasto. (n)	Day 8 blastocyst rate	
							2-cell	≥4 cell				/Oocyte (%)	/Zygote (%)
Fresh control	207	-	-	-	-	207	56	132	188	91.24±1.13[a]	80.0	38.83±0.85[a]	42.83±1.33[a]
2% EG for 10 min	207	207	207	130	62.77±0.64[d]	126	36	14	50	39.32±1.14[e]	1.0	0.36±0.36[e]	1.43±1.43[e]
2% EG for 20 min	207	207	207	123	59.46±1.51[e]	119	37	15	52	42.35±2.07[e]	2.0	0.87±0.59[e]	3.57±2.43[e]
4% EG for 10 min	207	207	207	145	70.26±0.26[c]	145	45	28	73	50.39±2.12[d]	12.0	5.47±0.85[d]	16.14±2.12[c]
4% EG for 20 min	207	207	207	158	76.29±0.90[b]	158	45	45	90	57.06±1.93[c]	16.0	7.73±0.44[c]	18.09±1.20[bc]
6% EG for 10 min	207	207	207	181	87.61±0.95[a]	181	44	73	117	64.74±1.41[b]	25.0	12.09±0.67[b]	21.45±1.23[b]
6% EG for 20 min	207	207	207	105	50.66±1.02[f]	105	29	3	32	31.14±2.08[f]	0.0	0.00[e]	0.00[e]

[a,b,c,d,e,f] Values followed by different superscripts within rows differ ($P<0.05$).

Table 2 Effect of linoleic acid albumin supplementation in IVM medium and cholesterol loaded methyl-β-cyclodextrin incubation on embryo development of vitrified native cattle oocytes.

*Treatment Group	IVM	Vitri	FDA	Servival (n)	Servival rate (%)	IVF	Crevage Zygote (n)		Clevage (n)	Clevage rate (%)	Day 8 blasto. (n)	Day 8 blastocyst rate	
							2-cell	≥4 cell				/Oocyte (%)	/Zygote (%)
Fresh Control	232	0	0	0	0.00	232	86	121	207	89.56±2.53^{a}	93	40.18±1.55^{a}	45.24±2.22^{a}
Vitrification control	232	232	232	197	85.07±2.10^{c}	197	73	51	124	62.97±2.06^{d}	29	12.58±1.05^{d}	23.16±1.05^{c}
1 mg/ml CLC	232	232	232	203	87.58±1.43^{abc}	203	59	67	126	62.46±1.68^{d}	31	13.33±0.88^{d}	24.62±1.80^{c}
2 mg/ml CLC	232	232	232	210	90.64±0.71^{a}	210	76	73	149	71.02±1.75^{c}	45	19.25±1.05^{c}	30.05±1.70^{b}
1% LA A	232	232	232	199	85.93±1.99^{bc}	197	68	76	144	73.47±2.09^{c}	42	18.07±0.87^{c}	29.10±1.29^{b}
2% LA A	232	232	232	208	89.60±0.69^{ab}	208	75	85	160	77.13±2.94^{b}	52	22.31±1.41^{b}	32.28±1.60^{b}

^{a,b,c,d,e} Values followed by different superscripts within rows differ ($P<0.05$).

*Treatment Group; Group 1: Fresh control , Group 2: Vitrification control, Group 3: COCs were pre-incubation in TCM-199 containing with 1 mg/ml CLC for 1 h before Vitrification, Group 4: COCs were pre-incubation in TCM-199 containing with 1 mg/ml CLC for 1 h before Vitrification, Group 5: COCs were maturation in TCM-199 containing with 1% (v/v) LAA before Vitrification, Group 6:COCs were maturation in TCM-199 containing with 2 % (v/v) LAA in before Vitrification. COCs were vitrification at 22 h after maturation. For Vitrification ; COCs were incubation in vitrifacation solution 1 for 10 min, (VS1: 6% EG, 20% FCS, 1% antibiotic in TCM-199 for 10 min) after that the COCs were move to incubation in vitrifacation solution 2 <30 Sec and immediately plunge in LN2 .

References

ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. 2550. จำนวนสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย ปี 2549. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Albarracin, J. L. , R. morato, C. Rojas and T. Mogas. 2005. Effect of vitrification in open pulled straws on the cytoloogy of in vitro maturation prepubertal and adult bovine oocytes. Theriogenology 63: 890 – 901

Atabay, EC. Y. Takahashi, S. Tatagiri, M. Nagano, Akoya and Y. Kanai. 2004. Vitrification of bovine oocyte and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. Theriogenology 61; 15 – 23

Block, J. 2007. Use of insulin-like growth factor-I to improve post transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*. Theriogenology 68S: S49 - S55.

Cho, S.K., S.G. Cho, I.H. Bae, C.S. Park and I.K. Kong. 2002. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). Anim. Reprod. Sci. 73:151-158.

Contreras, D. A., C. S. Galina, J. G. Avila, M. P. Aspron, N. Moreno – Mendoza. 2008. A system to evaliate the quality of frozen embryos through short – term culture. Anim. Reprod. Sci. 106: 369 – 379.

Diez, C., M. Munoz, J.N. Caamano and E. Gomez. 2012. Cryopreservation of the bovine oocyte : Current status and perspectives. Reprod. Dom. Anim. 47 (suppl.3) 76-83.

Enright, B.P., P. Lonergan, A. Dinnyes, T. Fair, F.A. Ward, X. Yang and M.P. Boland. 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. Theriogenology. 54: 659-673.

Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi and G. Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. Theriogenology 55: 1341 – 1357.

Gomez, E., A. Rodriguez, M. Munoz, J.N. Caamano, C.O. Hidalgo, E. Moran, N. Facal and C. Diez. 2008. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. Theriogenology. 69:1013-1021.

Harvath, G. and G.E. Seidle Jr. 2006. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesteralloaded methyl - β – cyelodextrin. Theriogenology (inpress).

Hochi, S., M. Kato, K. Ito, M. Hirabayashi, M. Ueda, A Sekimoto et. al. 2000. Nuclear transfer in cattle : effect of in vitro-produced bovine molurae. Therio genology 1999; 52:497-504.

Kaidi, S., I. Donnay, A. Van Langendonckt, F. Dessy and A. Massip. 1998. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. Anim. Reprod. Sci. 52: 39-50.

Lapa, M., C.C. Marques, S.P. Aleves, M.I. Vasques, M.C. Baptista, I. Carvalhais, M. Silva Pereira, A.E.M. Horta, R.J.B. Bessa and R.M. Pereira. 2011. Effect of trans-10 cis-12 conjugated dinoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. Reprod. Dom. Anim. 46:904-910.

Laowtammathron, C., C. Lorthongpanich, M. Ketudat-Cairns S. Hochi, R. Parnpai. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear transferred bovine and swamp buffalo blastocysts : effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology 64:1189-1196.

Lane, M. W., T. J. Ahern, I. M. Lewis, D. K. Gardner and T. T. Peura. 1998. Cryopreservation and direct transfer of in vitro produce bovine embryo: a comparison between vitrification and slow – freezing. Theriogenology 49: 170 (Abstr.)

Ledda, S. , G. Leoni, L. Boliolo and S. Naitana. 2001.Oocyte coyopressvation and ovarian tissue banking. Theriogenology 55 : 1359-1371.

Lim, J.M. , J.J. Ko, W.S. Hwang, H.M. Chang and K. Niwa. 1999. Development of in vitro matures bovine oocytes after cryopressvation with different cryprotectants. Theriogenology 51 : 1303-1310.

Lopatarova, M., S. Ceeh, L. Holy and R. Dolezel. 2006. The effect of vitrification I open pulled straws or pregnancy rates after transfer of in vivo produced bovine embryos. Vet. Medicina. 51:454-460.

Machado, S. A., H. D. Reichenbach, M. Weppert, E. Wolf, P. B. D. Goncalves. 2006. The variability of ovum pick – up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cowa. Theriogenology 65: 573 – 583.

Machado, R., M.A.C.M. Bergamaschi, R.T. Barbosa, C.A. de Oliveira and M. Binelli. 2008. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovalution hormonal treatment. Theriogenology 69: 798-804.

Magnusson, V., W.B. Feitosa, M.D. Goissis, C. Yamada, L.M.T.T. Tavares, M.E. Ortiz, D'Avila Assumpcao, J.A. Visintin. 2008. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. Anim. Reprod. Sci. 106:265-273.

Mahmoudzadeh, A. R., A. Van Soom, I. Van Vlaendren, and A. De Kruif . 1993. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. Thriogenology 39:1291-1302.

Majerus, V., R. De Roover, D. Etienne, S. Kaidi, A. Massip, F. Dessy and I. Donnay. 1999. Embryo production by ovum pick up in unsimulated calves before and after puberty. Theriogenology 52: 1169 – 1179.

Manik, R. S., S. K. Singla and P. Palta. 2003. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound – guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. Anim. Reprod. Sci. 76: 155 – 161.

Mavrides, A. and D. Morroll. 2005. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. Eu. J. Obst. Gynee. Reprod. Biol. 118 : 66-70.

Mermillod, P., A. Vasteenbrugge, C. Wils, J. L. Mourmeaux, A. Massip and F. Dessy. 1993. Characterization of embryotropic activity of exogenous protein – free – oviduct – conditioned – medium used in culture of cattle embryos. Biol. Reprod. 582 – 587.

Moore, K., C. J. Rodriquez – Sallaberry, J. M. Kramer, S. Johnson, E. Wroclaska, S. Goicoa, and A. Niasari – Naslaji. 2007. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. Theriogenology 68: 1316 – 1325.

Nedambale, T.L., F. Du, X. Yang and X.C. Tian. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β-mercaptoethanol. Anim. Reprod. Sci. 93: 61-75.

Palasz, A.T. and R.J. Mapletoft. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes : recent advances. Biotech. Advances. 14:127-149.

Papis, K. , M. Shimizu and Y. Izaike. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology 54 : 651-658.

Pereira, R.M. and C.C. Marques. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell and Tissue Banking 9:267-277.

Prentice, J.R. and M. Anzar. 2011. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. Vet. Med. Int. Vol. 2011:1-11.

Rizos D., F. Ward, M. P. Boland and P. Lonergan. 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology. 56:1-16.

Seidel. J.r. , G.E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology 65 : 228-235.

Tominaga, K. and Y. Hamada. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. Theriogenology. 61:1181-1191.

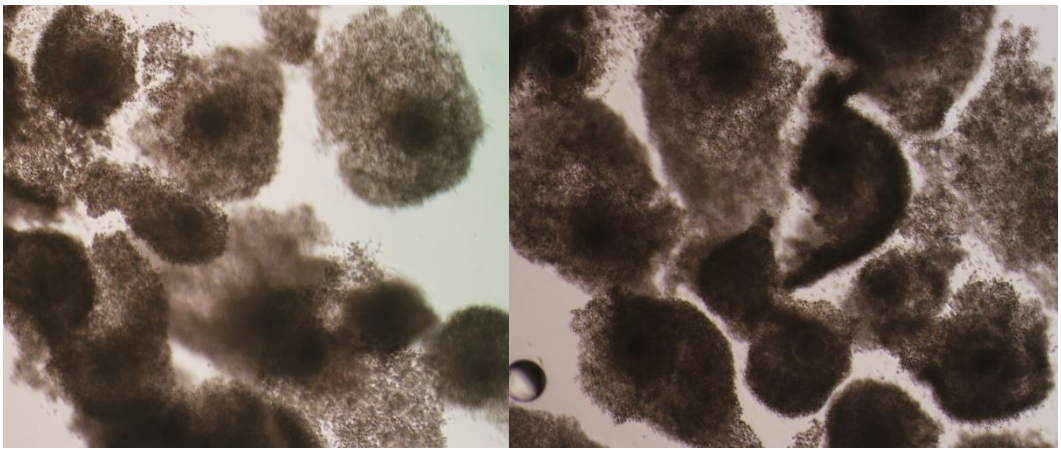
Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals.. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 357-364.

Vajta, G., P. Holm, M. Kuwayama, P.J. Booth, H. Jacobsen T. Greve, H. Callesen. 1998: Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryo. Mol. Reprod. Dev 51:53-58.

Vieira, A.D., F. Forell, C. Feltrin and J.L. Rodrigues. 2007. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. Anim. Reprod. Sci. 99: 377-383.

Vieira, A.D. , A. Mezzalira, D.P. Barbieri, R.C. Lehmkuhl, M.I.B. Rubin and G. Vajta.2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. Cryobiology 45 ; 91-94.

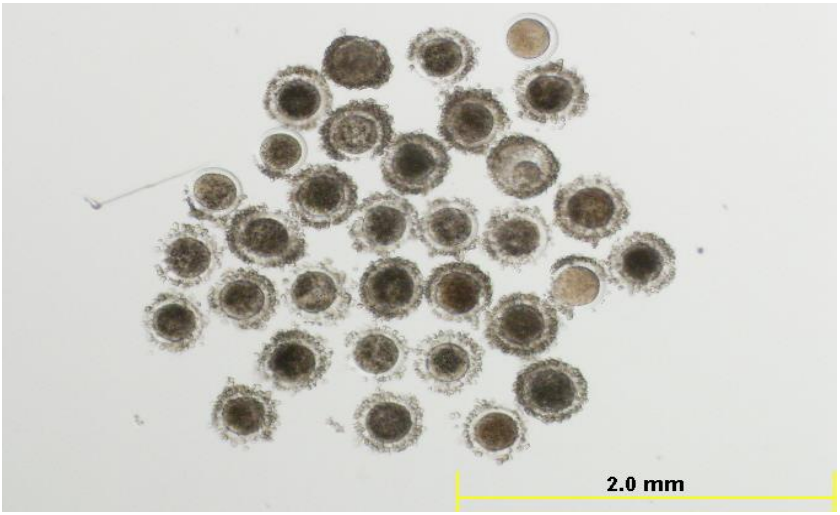
ภาคผนวก



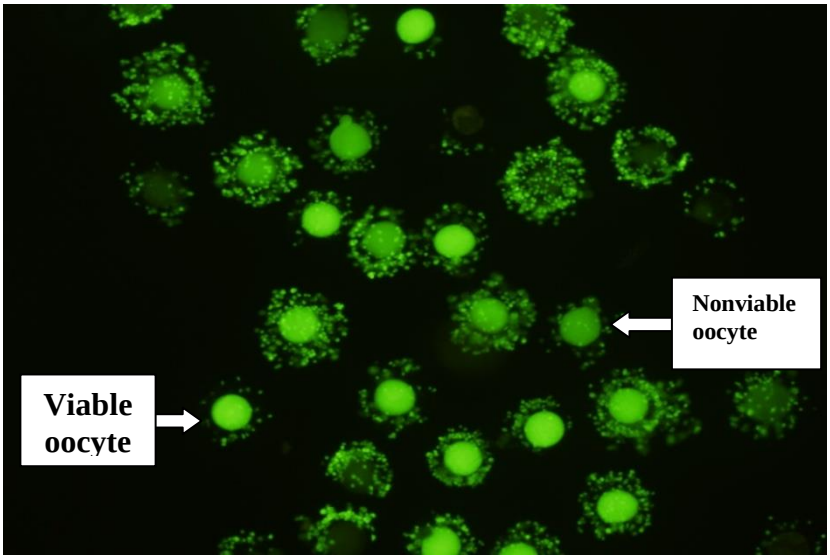
รูปที่ 1: In vitro Maturation of bovine oocytes.

รูปที่ 2: Bovine oocytes loading in to cryo-plastic straw.

รูปที่ 3: Vitrification of bovine oocyte.



รูปที่ 4: Vitrified-thawed bovine oocytes.



รูปที่ 5: FDA straining post-thawed vitrified bovine oocytes.

รูปที่ 6: Blastocyst from vitrified-thawed bovine oocytes.

น้ำยาสำหรับการทดลอง

Modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS) (stock)

1) NaCl (Sigma S-5886)	4 กรัม
2) KCL (Sigma P5405)	0.1000 กรัม
3) KH_2PO_4 (Sigma P-5655)	0.1000 กรัม
4) Na_2HPO_4 (Sigma 5136)	0.5750 กรัม
5) Glucose (Sigma G-7021)	0.5000 กรัม
6) Pyruvic acid (Sigma P-5280)	0.0180 กรัม
7) $CaCl_2.2H_2O$ (Sigma C-2393)	0.0687 กรัม
8) $MgCl_2.6H_2O$ (Sigma M-2393)	0.0500 กรัม
9) Penicillin-Streptomycin; P-S stock (50x Sigma P0906)	500 ไมโครลิตร
10) Ultra pure Water	500 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-6 เทใส่ขวด volumetric flask แล้วเติม Ultra pure Water 200 มิลลิลิตร แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
2. ชั่งสารในข้อ 7-8 เทใส่บีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร แล้วเติม Ultra pure Water 50 มิลลิลิตร แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
3. เทสารในข้อ 2 ใส่ลงใน volumetric flask ในข้อ 1 อย่างช้าๆ ผ่านแท่งแก้วใส่ ป้องกันการตกตะกอน จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ด้วย Ultra pure Water
4. กวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer ด้วยความเร็วปานกลาง ให้น้ำยาใสเป็นเนื้อเดียวกัน
5. เติม P-S stock ลงในสารในข้อ 4 แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
6. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ในขวด 500 มิลลิลิตร
7. เก็บที่ 4 °C ได้นาน 3 เดือน

mDPBS+1 mg/ml Polyvinylpyrrolidone (PVP)

1) mDPBS stock	500 มิลลิลิตร
2) PVP (Sigma P-5405)	0.5 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด ใส่ขวด volumetric flask แล้วกวนให้เข้ากันด้วย stirrer
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ในขวด 500 มิลลิลิตร
3. แบ่งใส่ขวด 50 มิลลิลิตร

4. เก็บที่ 4 °C ได้นาน 3 เดือน

Phosphate buffer saline (-) (PBS (-) stock)

1) NaCl (Sigma S-5886)	10 กรัม
2) KCL (Sigma P5405)	0.2500 กรัม
3) KH_2PO_4 (Sigma P-5655)	1.4400 กรัม
4) Na_2HPO_4 (Sigma 5136)	0.20 กรัม
5) Ultra pure Water	1 ลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนด ใส่ขวด volumetric flask
2. เติม Ultra pure Water ให้เครบตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
3. แบ่งใส่ขวด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหมอนึ่งความดันไอ (autoclave)
4. เก็บที่อุณหภูมิห้อง ใช้ได้นาน 6 เดือน

In vitro maturation medium (IVM Medium)

1) Medium199 (Sigma M-7528)	8.8400 มิลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	1 มิลิลิตร
3) FSH (stock)	5 ไมโครกรัม
4) LH	100ไมโครกรัม
5) Estradiol-17-β	10 ไมโครกรัม
6) P-S stock	100 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-6 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอด 10 มิลลิลิตร
3. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นาน 1 สัปดาห์

0.1 % hyaluronidase

1.) Hyaluronidase (Sigma H-3506)	0.05 กรัม
2.) PVP (sigma P-0930)	0.05 กรัม
3.) mDPBS (Stock)	50 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Hyaluronidase และ PVP ตามปริมาตรที่กำหนด

2. เทสารทั้งหมดลงในกระบอกตวงที่มี mDPBS อยู่ 50 มิลลิลิตรแล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer

3. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm

4. แบ่งใส่หลอด eppendorpf 1มิลลิลิตร/หลอด

5. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C ใช้ได้นาน 6 เดือน

น้ำยาสำหรับการแช่แข็งเซลล์โอโอไซต์โค

Basic Medium (BM) (20 ml)

1) Medium199 (Sigma M-7528)	15.800 มิลลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	4.000 มิลลิลิตร
3) P-S stock	200 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-3 ให้เข้ากัน

2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร

3. เก็บที่อุณหภูมิ 4˚C ได้นาน 1 สัปดาห์

Vitrification solution 1 (VS1)

2%EG, 20%FCS, 1% Antibiotic in TCM 199 ……VS1 (20 ml)

1) TCM199 (Sigma M-7528)	17.680 มิลลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	4 มิลลิลิตร
3) Ethylene glycol (Sigma E-9129)	400 ไมโครลิตร
4) P-S stock	200 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-4 ให้เข้ากัน

2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอด 50 ml

3. เก็บที่อุณหภูมิ 4˚C ได้นาน 1 สัปดาห์

4%EG, 20%FCS, 1% Antibiotic in TCM 199 ……VS1 (20 ml)

1) TCM199 (Sigma M-7528)	15.00 มิลลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	4 มิลลิลิตร
3) Ethylene glycol (Sigma E-9129)	800 ไมโครลิตร
4) P-S stock	200 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-4 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร
3. เก็บที่อุณหภูมิ 4˚C ได้นาน 1 สัปดาห์

6%EG, 20%FCS, 1% Antibiotic in TCM 199 ……..VS1 (20 ml)

1) TCM199 (Sigma M-7528)	14.600 มิลลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	4 มิลลิลิตร
3) Ethylene glycol (Sigma E-9129)	1.2 มิลลิลิตร
4) P-S stock	200 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-4 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร
3. เก็บที่อุณหภูมิ 4˚C ได้นาน 1 สัปดาห์

Vitrification solution 2 (VS2)

35%EG, 20%FCS, 1% Antibiotic, 1 M Sucrose in TCM199…… (VS2) (20ml)

1) TCM199 (Sigma M-7528)	8.800 มิลลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	4 มิลลิลิตร
3) Ethylene glycol (Sigma E-9129)	7 มิลลิลิตร
4) Sucrose (Sigma S-0389)	6.846 กรัม
5) P-S stock	200 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-5 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร
3. เก็บที่อุณหภูมิ 4˚C ได้นาน 1 สัปดาห์

Warming Solution (WS)

20%FCS, 1% Antibiotic, 1 M Sucrose in TCM199…… (WS) (20ml)

1) TCM199 (Sigma M-7528)	15.800 มิลลิลิตร
2) FCS (Gibco 10270-098)	4 มิลลิลิตร
3) Sucrose (Sigma S-0389)	6.846 กรัม

4) P-S stock 200 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-4 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm ใส่หลอด 15 ml
4. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ˚C ได้นาน 1 สัปดาห์

น้ำยาสำหรับตรวจวัดอัตราการรอดชีวิตหลังทำละลาย

2.5 µg/ml Fluorescein diacetate staining (FAD) (Stock)

1) FDA (Sigma F-7378) 0.0025 กรัม

2) Acetone 0.5 มิลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-2 ให้เข้ากัน
2. แบ่งใส่หลอด eppendorpf 4 µl /หลอด
3. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C ใช้ได้นาน 6 เดือน

PBS (-) + 5mg/ml BSA

1) PBS (-) stock 50 มิลิลิตร

2) BSA (Sigma. A-7638) 0.25 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-2 ให้เข้ากัน
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm ในขวด 50 มิลลิลิตร
3. เก็บที่ 4 ˚C ได้นาน 3 เดือน

2.5 µg/ml (FAD) (working)

1) 2.5 µg/ml FAD (Stock) 4 ไมโครลิตร

2) PBS (-) + 5 mg/ml BSA 800 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ผสมสาร 1-2 ให้เข้ากัน
2. แบ่งใส่หลอด eppendorpf 4 µl /หลอด
3. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C ใช้ได้นาน 6 เดือน

สูตรน้ำยาสำหรับการปฏิสนธินอกร่างกาย (IVF)

TALP Stock (100 ml)

1) PVA (Sigma P-8136)	0.100 กรัม
2) NaCI (Sigma S-5886)	0.643 กรัม
3) KCl (Sigma P5405)	0.024 กรัม
4) NaH_2PO_4 (Sigma S-5011)	0.0048 กรัม
5) Glucose (Sigma G-7021)	0.090 กรัม
6) Penicillamine (Sigma P-4875)	0.050 กรัม
7) CaCl2.2H2O (Sigma C-7902)	0.029 กรัม
8) MgCl2.6H2O (Sigma M-2393)	0.010 กรัม
9) Gentamicin (Sigma G-1397)	50.00 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-6 เทใส่ขวด volumetric flask แล้วเติม Ultra pure Water 50 มิลลิลิตร แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
2. ชั่งสารในข้อ 7-8 เทใส่บีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร แล้วเติม Ultra pure Water 10 มิลลิลิตร แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
3. เทสารในข้อ 2 ใส่ลงใน volumetric flask ในข้อ 1 อย่างช้าๆ ผ่านแท่งแก้วใส่ ป้องกันการตกตะกอน จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Ultra pure Water
4. กวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer ด้วยความเร็วปานกลาง ให้น้ำยาใสเป็นเนื้อเดียวกัน
5. เติม Gentamicin (ข้อ 9) ลงในสารในข้อ 4 แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
6.ปรับ pH 7.4
7. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ในขวด 100 ml
8. เก็บที่ 4 °C ได้นาน 2 สัปดาห์

TALP-HEPES (50 ml)

1) TALP Stock	50 มิลลิลิตร
2) Caffeine-Sodium Benzoate (Sigma C-4144)	0.05 กรัม
3) Lactates (Sodium salt 60% solution) (Sigma L-7900)	202.5 ไมโครลิตร
4) HEPES (free acid) (Sigma S-4034)	0.119 กรัม
5) NaHCO3 (Sigma S-5761)	0.020 กรัม
6) BSA (Sigma A-6003)	0.15 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารตามปริมาตรที่กำหนด
2. เทสารทั้งหมดลง beaker ที่มี TALP Stock อยู่ 50 มิลลิลิตรแล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
3. ปรับ pH 7.4-7.8
4. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm. ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร
5. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

TALP-IVF (50 ml)

1) TALP Stock	50 มิลลิลิตร
2) Heparin (Na salt) (Sigma H-3393)	0.50 มิลิกรัม (10 µg/ml)
3) Hypotaurine **(**Sigma H-1384**)**	0.055 มิลลิกรัม (10µM/ml)
4) Epinephrine (Sigma E-1635)	0.018 มิลลิกรัม (2µM/ml)
5) Lactates (Sodium salt 60% solution) (Sigma L-7900)	202.5 ไมโครลิตร
6) HEPES (free acid) (Sigma S-4034)	0.119 กรัม
7) NaHCO3 (Sigma S-5761)	0.020 กรัม
8) BSA (fatty acid-free) (Sigma 85041C)	0.3 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารตามปริมาตรที่กำหนด
2. เทสารทั้งหมดลง beaker ที่มี TALP Stock อยู่ 50 มิลลิลิตรแล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
3. ปรับ pH 7.4-7.8
4. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 µm. ใส่หลอด 50 มิลลิลิตร
5. เก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

น้ำยาสำหรับการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโค

Modified Synthetic Oviductal Fluid (mSOF 10x Stock)…… (100 มิลลิลิตร)

1) NaCl (Sigma S-5886)	6.2940 กรัม
2) KCl (Sigma P-5405)	0.5340 กรัม
3) KH_2PO_4 (Sigma P-5655)	0.1620 กรัม
4) Phenol red (Sigma P-0290)	500 ไมโครลิตร
5) CaCl2.2H2O (Sigma C-7902)	0.029 กรัม
6) MgCl2.6H2O (Sigma M-2393)	0.010 กรัม

7) Ultra pure Water	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-3 ตามปริมาตรที่กำหนด แล้วเทใส่กระบอกตวงขนาด 100 ML
2. เติม Ultra pure Water 50 มิลลิลิตร
3. เติม Phenol red แล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
4. ชั่งสารในข้อ 5-6 เทใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตรต่างหาก แล้วเติม Ultra pure Water 20 มิลลิลิตร แล้วแกว่งบีกเกอร์ให้สารเข้ากัน
5. นำสารที่ได้จากข้อ 4 ใส่ลงในกระบอกตวงในข้อ 1 อย่างช้าๆ ผ่านแท่งแก้วใส่ ป้องกันการตกตะกอน จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Ultra pure Water
6. ปรับ pH 7.4
7. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่ขวด 100 มิลลิลิตร
8. เก็บที่ 4 ˚C ได้นาน 1 เดือน

SOF Working (SOF wk)…….…… (50 มิลลิลิตร)

1) SOF 10x Stock	5.0 มิลลิลิตร
2) NaHCO3 (Sigma S-5761)	0.1053 กรัม
3) Na-Lactates (Sodium salt 60% solution) (Sigma L-7900)	23.5 ไมโครลิตร
4) Essential amino acid (EAA; 50x Solution) (Sigma M-5550)	1 มิลิลิตร
5) Non-essential Amino Acid Solution (NEAA; 100× Solution) (Sigma M-7145)	0.5 มิลิลิตร
6) Adjust volume by Ultra pure Water to	50 มิลิลิตร
7) Sodium pyruvate (Sigma P-5280)	0.0018 กรัม
8) L-gutamine (Sigma 90114C)	0.0073 กรัม
9) P-S stock **(**50x Sigma P0906)	50 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารตามปริมาตรที่กำหนด
2. เทสารทั้งหมดลง beaker ที่มี SOF 10x Stock อยู่ 5 มิลลิลิตรแล้วกวนสารละลายให้เข้ากันด้วย stirrer
3. ปรับ pH 7.4
4. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm. ใส่ขวด 50 มิลลิลิตร
5. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ˚C ใช้ได้นาน 1 เดือน

mSOF1 for day 0-2 embryo culture…… (10 มิลิลิตร)

1) SOF wk	10 มิลิลิตร
2) BSA (Sigma A-6003)	0.03 กรัม (3mg/ml)
3) P-S stock **(**50x Sigma P-0906)	100 ไมโครลิตร

** (Day fertilization = Day0) - Day2 (Cleavage)

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-3 ตามปริมาตรที่กำหนด แล้วเทใส่กระบอกตวงขนาด 10 ML
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอดขนาด 15 มิลิลิตร
7. เก็บที่ 4 ˚C

mSOF2 for day 3-4 embryo culture…… (10 มิลิลิตร)

1) SOF wk	10 มิลิลิตร
2) BSA (Sigma A-6003)	0.03 กรัม (3mg/ml)
3) D-Glucose (Sigma G-7021)	0.0025 กรัม
4) P-S stock **(**50x Sigma P0906)	100 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-4 ตามปริมาตรที่กำหนด แล้วเทใส่กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอดขนาด 15 มิลิลิตร
3. เก็บที่ 4 ˚C

mSOF3 for day 6-8 embryo culture……... (10 มิลิลิตร)

1) SOF wk	10 มิลิลิตร
2) BSA (Sigma A6003)	0.0306 กรัม (3mg/ml)
3) D-Glucose (Sigma G-7021)	0.0050 กรัม
4) P-S stock **(**50x Sigma P0906)	100 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารในข้อ 1-4 ตามปริมาตรที่กำหนด แล้วเทใส่กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
2. กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm ใส่หลอดขนาด 15 มิลิลิตร
3. เก็บที่ 4 ˚C