บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือ
2. อุปกรณ์
3. สารเคมี

1. เครื่องมือ

1.1 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope, Wild® M3Z , Wild, Heerbrugg, Switzerland)

1.2 กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope, Ziess® Auxiovert 135, Carlziess company, Germany, 100 x and 320 x DIC)

1.3 กล้องจุลทรรศน์ทรานสมิตเต็ดไลท์(Transmitted light microscope, Nikon® Optiphot, Nikon Corporation, Japan)

1.4 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow, Gelaire® TC 48, Flow Laboratories,USA)

1.5 ตู้บ่มควบคุมคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 Incubator, Forma Scientific, USA)

1.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert® W270, Memmert GmbH Co., Schwabach, Germany)

1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Kubota®-5100, Kubota Corporation, Tokyo, Japan)

1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH metre, Orion®-720A, Orion Research Inc., Boston,MA, USA)

1.9 เครื่องวัดแรงดันออสโมลาร์ (Osmolarity metre, Osmomat®-030, Genotec GmbH, Berlin, Germany)

1.10 เครื่องชั่ง (Balance, Precisa®-300A, Oerliken AG, Zurich, Switzerland)

1.11 เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer, IKA Labortechnik MIDI MR1D, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Germany)

1.12 เครื่องกรองน้ำมิลลิคิว (Milli-Q® UF Plus, Millipore Corporation, MA, USA)

1.13 ไมโครปิเปต ขนาด 5-50, 50-200, และ 200-1000 µl (Micro-pipette, Biohit® Proline USA)

1.14 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air Oven, Memmert®-U40 Memmert GmbH Co., Schwabach, Germany)

1.15 ตู้อบความร้อนชื้น (Autoclave, Hirayama®-HA-3D, Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan)

2. อุปกรณ์

2.1 เข็มฉีดยา เบอร์ 20 ยาว 1 นิ้ว (Needle 20 guage 1 inch long, Nipro®, Nissho Nipro Corporation Ltd., Thailand)

2.2 กระบอกฉีดยา ขนาด 10 มล. (Dispossible syringe 10 ml, ERSTA® , Asik, Denmark)

2.3 กรรไกรผ่าตัดแสตนเลส

2.4 กระติกเทอร์โมส

2.5 บีคเกอร์ ขนาด 50, 100, 200,และ 400 มล. (Beaker, Pyrex® USA)

2.6 วอลลูเมติคฟลาส ขนาด 50 และ 100 มล. (Volumetric flask, 50 and 100 ml, Pyrex®, USA)

2.7 กระบอกตวง ขนาด 10 25 และ 50 มล. (Cylinder 10, 25, and 50 ml. Pyrex® , USA)

2.8 ถุงมือยาง (Latex gloves)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 กระดาษเช็ดมือ (Tissue towel, Kleenex®, คิมเบอร์ลีย์-คล๊าก ประเทศไทย จำกัด)

2.10 กระดาษกรอง (Filter paper, Whatman® , Whatman Laboratory Division, Kent, England. Cat. No. 1001 110)

2.11 แผ่นกรองต่อกับกระบอกฉีดยา ขนาด 0.22 ไมครอน (Filter syringe, Cameo® 25AS, Micron Separationns Inc., MA, USA)

2.12 หลอดพลาสติกปลอดเชื้อ ขนาด 15 มล. มีฝาปิด (Sterile centrifuge tube with cap, 15 ml, Corning®, Corning Incorporated, New York, USA)

2.13 จานเลี้ยงพลาสติก ขนาด 10x35 มม. (Culture dish 10x35 mm, Nunclon®, Nunc, Denmark)

2.14 จานพลาสติก ขนาด 15x65 มม. (Plastic dish 15x65 mm, Nunclon® , Nunc, Denmark)

2.15 ปลายปิเปต ขนาด 250 และ 1000 ไมโครลิตร (Pipette tip, 250 and 1000 µl, Treff®, Treff AG , Schweiz, Switzerland)

2.16 หลอดปั่นเหวี่ยงเล็ก ขนาด 500 และ 1500 ไมโครลิตร (Micro centrifuge tube 500 and 1500 µl Treff®, Treff AG , Schweiz, Switzerland)

2.17 กระจกสไลด์ (Microscope slide, Sail brand, Shanghai Machinery Import and Export Company, People's Republic of China)

2.18 กระจกปิดสไลด์ (Cover glass 22x22 mm., Menzel-Glaser®, Germany)

2.19 พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette 230 mm., John Polten Ltd., Essex, Englannd)

2.20 ดินสอปลายเพชร (Diamond tip pencil)

2.21 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)

2.22 หลอดฟาง ขนาด 0.25 มล. (Micro straw, 0.25 ml, IMV, France)

2.23 จุกอุดหลอดฟาง (Micro straw plug)

2.24 กระบอกฉีดอินซูลินต่อปลายพลาสติก (Insulin syringe with plastic tip)

2.25 ฮีโมไซโตเมเตอร์ (Haemo cytometer, Neubauer, boeco, Germany)

3 สารเคมี

3.1 มีเดียม 199 (medium 199 with Earle's salts, Gibco BRL, Life Technologies Inc., USA)

3.2 โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$, BDH Analar®, BDH Chemicals Ltd., Poole, England. Prod 10247)

3.3 กลูโคส (D-glucose, BDH Analar®, BDH Laboratory Supplies, Poole, England. Prod 10117)

3.4 โซเดียม ไพรูเวท (Pyruvic acid, Sodium salt, Sigma® , Sigma Chemical Company, USA. No. P-2256)

3.5 แคลเซียม แลคเตท (L(+) - Lactic acid, Hemicalcium salt hydrate $2H_2O$, Sigma ® , Sigma Chemical Company, USA. No. L-2000)

3.6 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl, Merck, Germany. 6404.1000)

3.7 โซเดียมแลคเตท (DL-Lactic acid 60% w/w syrup Sodium content, Sigma®, Sigma Chemical Company, USA. No. L-1375)

3.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, pellets, BDH Chemicals Ltd., Poole, England. Prod 10252)

3.9 ไฮโดรคลอริค แอซิด (HCl, 1 mol/l, Merck, Germany 2405346)

3.10 กานามัยซินซัลเฟต (Kanamycin Sulfate from *Streptomyces kanamycetious* anhydrous, Sigma®,Sigma Chemical Company, USA. No. K-4000)

3.11 เจนตามัยซิน ซัลเฟต (Gentamycin sulfate from *Micromonospora purpurea*, Fluka , Switzerland. 48760)

3.12 โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin,BSA, Fluka Biochemika, Switzerland. 05480)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.13 ฟีตอล โบวายน์ ซีรัม (Foetal bovine serum, FBS, Seromed®, Biochrom KG, Berlin, Germany. No.

3.14 คาเฟอิน (Caffeine, anhydrous, Sigma® , Sigma Chemical Company, USA. No. C-0750)

3.15 ไฮยารูโลดิเนส (Hyarulodinase from bovine testes, Sigma®, Sigma Chemical Company, USA. No. H-3506)

3.16 เอสตราไดออล (Estradiol water soluble E_2, Sigma® , Sigma Chemical Company, USA. No. E-4389)

3.17 ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (Follicle Stimulating Hormone, FSH 100 unit/ampule, Product of People's Republic of China)

3.18 ลูทีไนซิง ฮอร์โมน (Luteinizing Hormone, LH 100 unit/ampule, Product of People's Republic of China)

3.19 กลีเซอโรล (Glycerol, Merck, E. Merck, Germany 4094. 1000)

3.20 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma®, Sigma Chemical Company, USA No. D-5879)

3.21 เอทิลีนไกลคอล (Ethylene glycol, Analyticals® Carloerba, Farmitalia Carloerba, S.p.A, Milano, Italy. Cat.No. 107-21-1)

3.22 โปรปิลีนไกลคอล (Propylene glycol, Sigma® ,Sigma Chemical Company, USA No. P-1009)

3.23 บิวเทนไดออล (2,3-butanediol , Sigma® , Sigma Chemical Company, USA No. B-6386)

3.24 มินเนอรอล ออย (Mineral oil, Sigma Cell Culture®, Sigma Chemical Company, USA No. M-8410)

3.25 ซูโครส (Sucrose, Merck, E. Merck, Germany Art. 7651)

3.26 กรดอเซติค (Acetic acid glacial 100%, Merck, E. Merck, Germany Art. 63. 2500)

3.27 เอทานอล (Ethanol absolute GR, Merck, E. Merck, Germany Art. 983. 1000)

3.28 ออซีน (Orcein, Merck, E. Merck Germany .Art. 7091)

3.29 ไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen, บริษัท ล.แจ้งตงออกซิเจน อ้อมน้อย สมุทรสงคราม)

3.30 น้ำกลั่น 2 ครั้ง (Double distilled water, องค์การเภสัชกรรม, กรุงเทพ)

3.31 น้ำยาทำความสะอาด (Cleaning Solution 7X® , ICN Biomedical, Inc. Ohio, USA ,(cat. No. 76-670-94)

3.32 น้ำยาฆ่าเชื้อ(Antiseptic solution, Hibicet® , Zeneca Limited, Cheshire, U.K.)

วิธีการทดลอง

1. มีเดียมที่ใช้เลี้ยงโอโอไซต์และปฏิสนธินอกร่างกาย

1.1 มีเดียมพื้นฐาน ใช้ชื่อย่อว่า M199B (ดัดแปลงจาก Yoshida et. al.,1990) ใช้สำหรับพักไข่และล้างไข่ก่อนจะนำเข้าจานเลี้ยงหรือจานปฏิสนธิ (pH 7.4) ใช้เป็นมีเดียมพื้นฐานสำหรับเตรียม IVM มีเดียม และ IVF มีเดียม และใช้คาพาซิเตทอสุจิ (pH 7.8) ด้วย มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียม ดังต่อไปนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ	
1) มีเดียม 199	990	มก.
2) โซเดียมไฮดรอกไซด์	220	มก.
3) กลูโคส	55	มก.
4) แคลเซียมแลคเตท	90	มก.
5) โซเดียมไพรูเวท	10	มก.

6). เจนตามัยซิน ซัลเฟต	10	มก.
7). ฟีตอลโบวายน์ซีรัม	10	มล.
8). น้ำมิลลิคิว	100	มล.

วิธีเตรียม

1. ละลายมีเดียม 199 และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำมิลลิคิวให้ได้ปริมาตร 100 มล.
2. ละลายสารเคมี ในข้อ 3) – 6) ด้วยสารละลายจากข้อ 1. ประมาณ 60 มล.
3. เติมฟีตอลโบวายน์ซีรัม 10 มล. ลงในข้อ 2. แล้วเติมสารละลายจากข้อ 1. ให้ได้ปริมาตร 100 มล.
4. วัดออสโมลาร์ลิตี (ควรได้ 290–310 มิลลิออสโมล)
5. บ่มในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 10 นาที
6. วัดความเป็นกรด ด่าง แล้วปรับให้ได้ pH 7.4 หรือ 7.8 โดยใช้ไฮโดรคลอริคแอซิด 1 N หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N
7. กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 ไมครอน
8. เก็บในตู้เย็น 4°ซ ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์

1.2 มีเดียมสำหรับเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก เรียกชื่อย่อว่า IVM มีเดียม เป็นมีเดียมที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ (Sophon and Kamonpatana, 1996) กล่าวคือ ประกอบด้วย มีเดียม M199B pH 7.4 ที่เติมด้วยฮอร์โมน และของเหลวจากฟอลลิเคิลสุกร (pFF) ดังนี้

ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (FSH)	1 หน่วย/มล.
ลูทไนซ์ซิงฮอร์โมน (LH)	1 หน่วย/มล.
เอสตราไดออล 17 β	1 มคก./มล.
pFF	10 % โดยปริมาตร

วิธีเตรียม

1. ใช้ไมโครปิเปต ดูด FSH จาก stock solution (1 หน่วย/10 มคล.) มา 100 มคล. ใส่ในหลอดทดลอง
2. ดูด LH จาก stock solution (1 หน่วย/10 มคล.) มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. ดูด เอสตราไดออล จาก stock solution(1 มก./10 มล.) มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
4. ดูด pFF มา 1 มล. ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม M199B ลงไปจนครบ 10 มล.
5. กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 มค. ใช้เตรียมหยด IVM

1.3 มีเดียมสำหรับการปฏิสนธินอกร่างกาย เรียกชื่อย่อว่า IVFมีเดียม คือ M199B pH 7.4 ที่เติมด้วยคาเฟอิน 2 มิลลิโมลาร์

วิธีเตรียม

1. ชั่ง คาเฟอิน 4 มก. แล้วละลายด้วย M199B 10 มล.
2. กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 ไมครอน นำไปใช้เตรียมจานปฏิสนธิเลย

1.4 มีเดียมสำหรับเลี้ยงไซโกต เรียกชื่อย่อว่า IVC มีเดียม ใช้สำหรับเลี้ยงไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิมาแล้ว เพื่อให้ไข่สุกที่ถูกอสุจิผสมเกิดการแบ่งตัวในระยะแรก จนถึง 4 เซลล์ IVC มีเดียม มีส่วนประกอบและวิธีเตรียม ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
1) มีเดียม 199	990 มก.
2) โซเดียมไบคาร์บอเนต	220 มก.
3) โซเดียมไพรูเวท	110 มก.
4) โซเดียมแลคเตท	370 มคล.
5) เจนตามัยซิน ซัลเฟต	10 มก.
6) ฟีตอล โบวายน์ ซีรัม	10% โดยปริมาตร
7) น้ำมิลลิคิว	100 มล.

วิธีเตรียม

1. ละลายมีเดียม 199 และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำมิลลิคิวให้ได้ปริมาตร 100 มล.
2. ละลายสารเคมี ในข้อ 3).- 5) ด้วยสารละลายจากข้อ 1. ประมาณ 60 มล.
3. เติมฟีตอลโบวายน์ซีรัม 10 มล. ลงในข้อ 2. แล้วเติมสารละลายจากข้อ 1. ให้ได้ปริมาตร 100 มล.
4. วัดออสโมลาร์ลิตี (ควรได้ 290-310 มิลลิออสโมล)
5. บ่มในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 10 นาที
6. วัดความเป็นกรด ด่าง แล้วปรับให้ได้ pH 7.4 โดยใช้ ไฮโดรคลอริคแอซิด 1 N หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N
7. กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 มค.
8. เก็บในตู้เย็น 4^{o}ซ ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์

1.5 ของเหลวจากฟอลลิเคิล (Follicular Fluid, pFF) ใช้สำหรับเสริมใน IVM มีเดียม ในอัตราส่วน 10% โดยปริมาตร มีวิธีเตรียมโดยนำเอาของเหลวที่เจาะได้จากฟอลลิเคิล

ของสุกรที่ดูดออกมาหลังจากตกตะกอนโอโอไซต์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 รอบ/นาที นาน 1 ชม. ดูดเอาของเหลวส่วนบนออกมา กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 ไมครอน แล้วแบ่งย่อยใส่หลอดไมโครเซนตริฟิว เก็บไว้ใช้ที่ -20°ซ

1.6 น้ำเกลือ/BSA ใช้สำหรับล้างเอาเซมินอล ฟลูอิด ออกจากอสุจิ มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
1) โซเดียมคลอไรด์	9 กรัม
2) โบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน	100 มก.
3) กานามัยซิน ซัลเฟต	100 มก.
4) น้ำกลั่น 2 ครั้ง	1 ลิตร

วิธีเตรียม

1. ละลายโซเดียมคลอไรด์และกานามัยซิน ซัลเฟต ในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ให้ได้ 1 ลิตร
2. ละลายโบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน ในน้ำเกลือ ข้อ 1) โดยปล่อยให้ค่อย ๆ ละลายไปเอง ไม่ต้องเขย่า ไม่ต้องคน
3. วัดความเป็นกรด ด่าง ปรับให้ได้ pH 7.2 ด้วยไฮโดรคลอริค แอซิด 1 N หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N
4. กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 มค. เก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ ใช้ได้นาน 1 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. โอโอไซต์สุกร

โอโอไซต์ที่ใช้ในการทดลองทุกครั้ง ได้จากการเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่สุกรขุน อายุ 5-7 เดือน ที่ถูกส่งมา ณ. โรงฆ่าสัตว์บางแค เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร

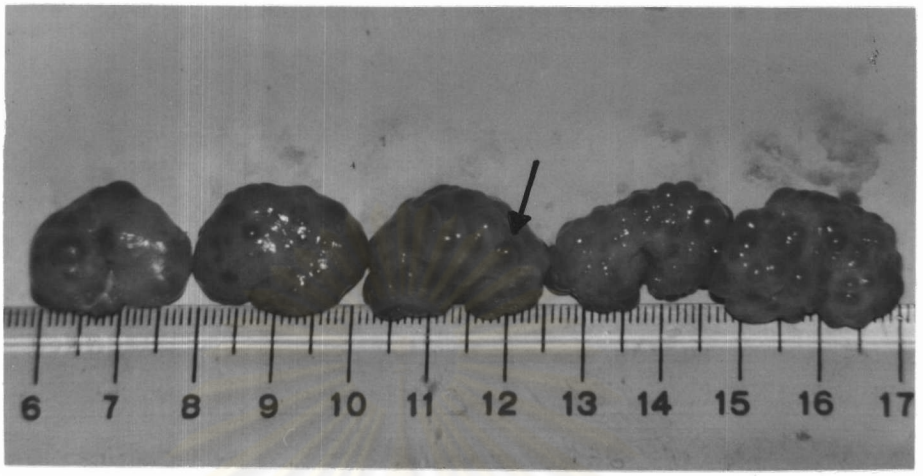
วิธีเก็บรังไข่

เก็บรังไข่ทันทีที่มดลูกถูกตัดออกจากตัวสัตว์ โดยใช้กรรไกรสแตนเลสตัดรังไข่ทั้งสองข้าง ออกจากขั้วยึดบริเวณปลายปีกมดลูก รวบรวมไว้ในกระติกเทอร์โมสที่มีน้ำเกลือผสมกานามัยซินซัลเฟต 100 มก./ลิตร อุณหภูมิ 27-29^{o}ซ (อุณหภูมิห้อง) นำรังไข่ที่รวบรวมได้ภายใน 1 ชม. กลับมายังห้องปฏิบัติการ โดยใช้เวลาเดินทางด้วยรถยนต์ประมาณ 1 ชม.

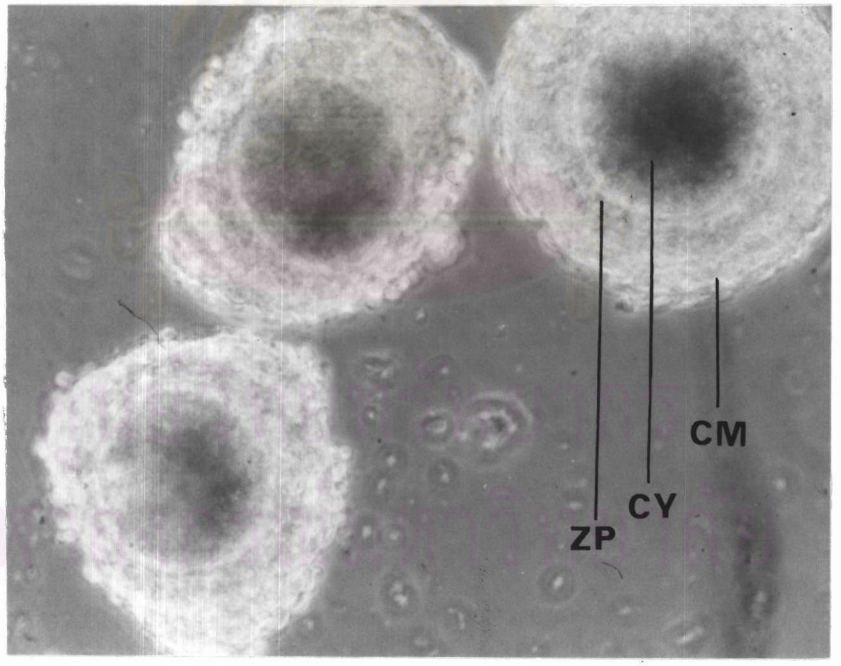
ทำความสะอาดรังไข่โดยการล้างด้วยน้ำเกลือผสมกานามัยซิน 4 ครั้ง แล้วจึงแช่เก็บในบีคเกอร์ รอการเจาะฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์มาศึกษา

ทำการเจาะฟอลลิเคิลด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 20 ยาว 1 นิ้ว ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 มล. โดยเลือกเจาะฟอลลิเคิลขนาด 2-6 มม. ดูดเอาของเหลวภายในฟอลลิเคิลออกมารวบรวมไว้ในหลอดแก้วทดลอง หลังจากตั้งหลอดแก้วทดลองทิ้งไว้นาน 15 นาที ดูดเอาของเหลวส่วนบนออกครึ่งหนึ่ง แล้วเทของเหลวและตะกอนในหลอดแก้วลงในจานพลาสติก ขนาด 15x65 มม. นำจานพลาสติกไปส่องหาโอโอไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่มีกำลังขยาย 10 เท่า รวบรวมโอโอไซต์ด้วยพาสเจอร์ปิเปตยืดปลาย ไว้ในมีเดียม M199B 3 มล. ในจานเลี้ยงขนาด 10x35 มม.

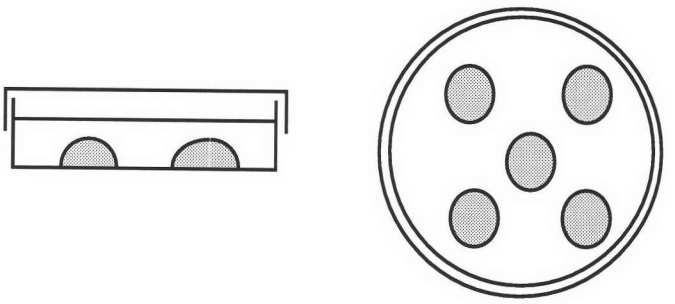
คัดเลือกโอโอไซต์ที่มีลักษณะกลม มีส่วนของไซโตพลาสซึมแน่นเต็มไม่เว้าแหว่ง มีสีไม่คล้ำดำ และมีคูมูลัสเซลล์หุ้มล้อมรอบมากกว่า 4 ชั้น ไว้ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 2 รังไข่สุกร ที่เก็บมาจากโรงฆ่าสัตว์ เจาะเอาโอโอไซต์จากฟอลลิเคิล(ศรชี้) ขนาด 2-6 มม. (ขนาดรังไข่เป็น ซม.)



รูปที่ 3 โอโอไซต์ที่คัดเลือกไว้ใช้ในการทดลองมีคูมูลัสเซลล์หุ้มล้อมรอบมากกว่า 4 ชั้น CM = คูมูลัสเซลล์ ZP = โซนาเพลลูซิดา และ CY = ไซโตพลาสซึม (กำลังขยาย 200 เท่า)



รูปที่ 4 การเตรียมหยด IVM มีเดียม เมื่อมองจากด้านบน (ขวา) และ ด้านข้าง (ซ้าย)

3. วิธีเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก

1. เตรียมจานเลี้ยงโอโอไซต์ในตู้ปลอดเชื้อ โดยหยด IVM มีเดียม ด้วยไมโครปิเปตหยดละ 40 มคล. จำนวน 5 หยด ลงบนจานเลี้ยงพลาสติก ขนาด 10x35 มม. แล้วคลุมด้วยมินเนอรอลออย 4 มล. เติมหยด IVM มีเดียมอีกหยดละ 60 มคล. รวมเป็น 100 ไมโครลิตร ต่อหยด นำจานเลี้ยงไปบ่มไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 39^{o}ซ ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในอากาศ อย่างน้อย 6 ชม. ก่อนเลี้ยงไข่

2. นำโอโอไซต์ที่คัดเลือกไว้ มาล้างด้วย IVM มีเดียม ด้วยการดูด เป่า ผ่านหยด IVM มีเดียมที่เตรียมไว้ 4 หยด ก่อนที่จะย้ายเข้าจานเลี้ยงจริง โดยจะเลี้ยงโอโอไซต์ 10 ใบต่อหยด

3. นำจานเลี้ยงกลับเข้าตู้อบ เลี้ยงโอโอไซต์ไว้นานตามที่กำหนดในการทดลองนั้นๆ

4. วิธีการเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการปฏิสนธิ

น้ำเชื้อสุกรที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดได้มาจากพ่อสุกรพันธุ์ดูรอคเจอร์ซี ไม่เจาะจงตัวที่ใช้ในฟาร์มที่ผลิตลูกสุกรเพื่อเลี้ยงขุนแห่งหนึ่งใน จ.นครปฐม โดยใช้น้ำเชื้อส่วนที่มีตัวอสุจิ ที่ได้จากการรีดด้วยมือ ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิหลังจากรีด เกิน 85% เจือจาง 1:1 ด้วยน้ำเกลือที่มี กานามัยซินซัลเฟต 100 มก./ลิตร นำมาเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการ ณ. อุณหภูมิ 24^{o}ซ นาน 8-19 ชม. ก่อนเริ่มใช้

นำน้ำเชื้อมาล้างด้วย น้ำเกลือ/BSA 3 ครั้ง ดังนี้

1. ดูดน้ำเชื้อ 5 มล. รวมกับน้ำเกลือ/BSA 5 มล. ในหลอดพลาสติกมีฝาปิด พลิกกลับไป-มา ให้น้ำเชื้อกับน้ำเกลือผสมกัน
2. นำหลอดน้ำเชื้อไปปั่นเหวี่ยง ที่ 1000 รอบ/นาที (190 x g) นาน 3 นาที
3. ดูดเอาส่วนบน 5 มล. ใส่ในหลอดใหม่ เติมน้ำเกลือ/BSA ลงไปอีก 5 มล. ดูดให้ผสมกันเบาๆ
4. ปั่นเหวี่ยง ที่ 2400 รอบ/นาที (1095 x g) นาน 3 นาที
5. เทน้ำเกลือทิ้งให้หมด
6. เติมน้ำเกลือ/BSA ลงไป 10 มล. ดูดอสุจิที่ก้นหลอดให้กระจายตัวในน้ำเกลือให้ทั่ว
7. ทำซ้ำ เหมือนข้อ 4) และ ข้อ 5)
8. กระจายตัวอสุจิที่ก้นหลอดด้วย M199B (pH 7.8) 2 มล.
9. ตรวจดูอัตราการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของอสุจิโดยการนับโดยประมาณด้วยฮีโมไซโตเมเตอร์
10. ปรับความเข้มข้นของตัวอสุจิให้ได้ $2x10^8$ ตัว/มล. ด้วย M199B (pH 7.8) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4-6 ชม.

5. วิธีปฏิสนธินอกร่างกาย

1. เตรียมจานปฏิสนธิในตู้ปลอดเชื้อ โดยหยด IVF มีเดียม ด้วยไมโครปิเปต หยดละ 50 มคล. จำนวน 10 หยด ลงบนจานพลาสติก ขนาด 10x35 มม. แล้วคลุมด้วยมินเนอรอล ออย 4 มล. นำไปบ่มในตู้บ่มที่ 39^{o}ซ ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในอากาศ อย่างน้อย 6 ชม. ก่อนใช้ทำปฏิสนธิ
2. นำไข่ที่เลี้ยงสุกแล้วมาดูด เป่าเบา ๆ ด้วยพาสเจอร์ปิเปตยืดปลายแคบๆ เพื่อเอาคูมูลัสเซลล์ออกบ้างบางส่วน ล้างไข่โดยการผ่านไข่ในหยด IVF มีเดียม 4 หยด แล้วย้ายเข้าจานปฏิสนธิ หยดละ 10 ใบ
3. เจือจางน้ำเชื้อที่บ่มไว้ด้วย IVF มีเดียม ให้เหลือความเข้มข้น $1x10^7$ ตัว/มล. แล้วดูดน้ำเชื้อ 5 มคล. ใส่ลงไปในหยดปฏิสนธิที่มีไข่สุกรออยู่แล้ว ความเข้มข้น

ของตัวอสุจิในหยด ปฏิสนธิประมาณ $5x10^4$ ตัว/หยด หรือ ประมาณ 1×10^6 ตัว/มล.

4. นำจานปฏิสนธิเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ $39^oซ$ ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในอากาศ นาน 6 ชม.
5. ย้ายไข่จากจาน IVF ไปยังจาน IVC ซึ่งเตรียมไว้ล่วงหน้าเหมือนกับจาน IVM แต่ใช้ IVC มีเดียม บ่มในตู้บ่มต่ออีก 42 ชม.

6. วิธีการแช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน

6.1 การเตรียมมีเดียม

มีเดียมที่ใช้ในการทำไวตริฟิเคชันทุกชนิด จะใช้มีเดียม 199 เป็นตัวทำละลาย มีเดียม 199 คือ มีเดียม 199 990 มก. และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 220 มก. ละลายในน้ำมิลลิคิว 100 มล.

6.1.1 ไวตริฟิเคชัน มีเดียม เรียกชื่อย่อว่า VTM ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิด คือ VTM 1, VTM 2 และ VTM3

6.1.1.1 VTM 1 EG 7.5 โมลาร์ และ โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน 6 %

1) ชั่งโบวายน์ซีรัมอัลบูมิน มา 600 มก. แล้วเทลงในบีคเกอร์ที่มี มีเดียม 199 อยู่ 5,768 มคล. ปล่อยให้โบวายน์ซีรัมอัลบูมินละลายเองโดยไม่ต้องเขย่าบีคเกอร์
2) เติม EG ลงไปในบีคเกอร์ 4,232 มคล. ผสมให้เข้ากัน
3) กรองด้วย แผ่นกรอง ขนาดรู 0.22 มคล. เก็บในตู้เย็น $4^oซ$ (ใช้ได้นาน 2 เดือน)

6.1.1.2 VTM 2 EG 6.25 โมลาร์ และ GLY 0.7 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ ฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20% โดยปริมาตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1) ชั่งซูโครสมา 342 มก. เทลงในบีคเกอร์ที่มีมีเดียม 199 อยู่ 4 มล. เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย แล้วเติมฟีตอลโบวายน์ซีรัมลงไปอีก 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน
2) เติม EG ลงในบีคเกอร์ 3.5 มล. ผสมให้เข้ากัน
3) เติม GLY ลงไปในบีคเกอร์ 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วย แผ่นกรองขนาดรู 0.22 มค. เก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ (ใช้ได้นาน 1 เดือน)

6.1.1.3 VTM 3 EG 7.15 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ ฟีตอลโบ-วายน์ซีรัม 20% และ CB 7.5 มคก./มล.

1) ชั่งซูโครสมา 342 มก. เทลงในบีคเกอร์ที่มีมีเดียม 199 อยู่ 5,970 มล. เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย แล้วเติมฟีตอลโบวายน์ซีรัมลงไปอีก 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน
2) เติม EG ลงไปในบีคเกอร์ 4 มล.
3) เติม CB ลงไป 30 มคล. (stock solution 2.5 มก./มล.) เขย่าให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรู 0.22 มค. เก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ (ใช้ได้นาน 1 เดือน)

6.1.2 6% โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน ในมีเดียม 199

1) ชั่ง โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน มา 600 มก. เทลงในบีคเกอร์ที่มีมีเดียม 199 10 มล.ปล่อยให้ละลายช้า ๆ ไม่ต้องเขย่าบีคเกอร์
2) กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 มค. และเก็บไว้ที่ 4°ซ (ใช้ได้นาน 1 สัปดาห์)

6.1.3 มีเดียม 199 20% ฟีตอลโบวายน์ซีรัม

1) เติมฟีตอลโบวายน์ซีรัม 2 มล. ลงในบีคเกอร์ที่มีมีเดียม 199 อยู่ 8 มล. เขย่าให้เข้ากัน
2) กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 มค. เก็บไว้ที่ 4°ซ (สามารถใช้ได้นาน 1 สัปดาห์)

6.1.4 ซูโครส 1 โมลาร์

1) ชั่งซูโครสมา 3.42 กรัม เทลงในบีคเกอร์ที่มีมีเดียม 199 อยู่ 10 มล. ซึ่งมีโบวายน์ซีรัมอยู่ 0.4% ผสมจนกระทั่งซูโครสละลายหมด

2) กรองด้วยแผ่นกรอง 0.22 มค. เก็บไว้ที่ 4°ซ (สามารถใช้ได้นาน 1 สัปดาห์)

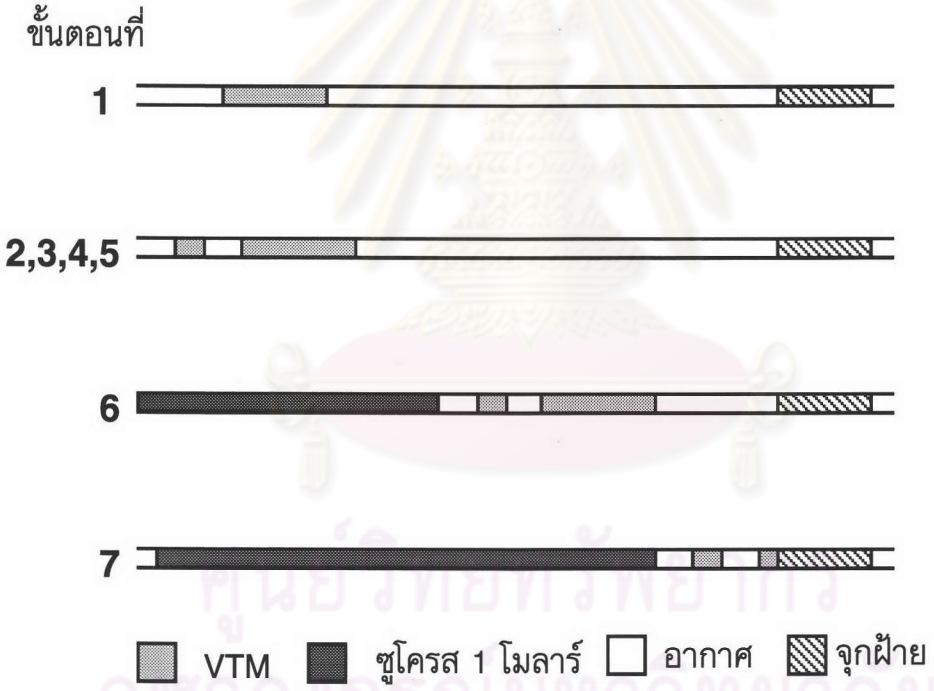
6.2 ขั้นตอนการแช่แข็ง

1. ปรับสมดุลแรงดันออสโมติคของไข่ใน 25% VTM (VTM 1, VTM 2 หรือ VTM 3 : 6 % โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน ในมีเดียม 199 หรือ มีเดียม 199 20% ฟีตอลโบวายน์ซีรัม = 1 : 3) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ)
2. ปรับสมดุลแรงดันออสโมติคของไข่ใน 66% VTM (VTM 1, VTM 2 หรือ VTM 3 : 6 % โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน ในมีเดียม 199 หรือ มีเดียม 199 20% ฟีตอลโบวายน์ซีรัม = 2:1 นาน 1.5 นาที
3. ดูดเอาไข่มาไว้ใน VTM และบรรจุไข่เข้าในหลอดฟางที่เตรียมไว้ ภายในเวลา 1.5 นาที
4. วางหลอดฟางไว้เหนือผิวไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 3 นาที
5. จุ่มหลอดฟางลงในไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจน

6.3 ลำดับการบรรจุมีเดียมและไข่เข้าหลอดฟาง (VTM หมายถึง VTM 1 หรือ VTM 2 หรือ VTM3) ตามวิธีการที่ใช้ในการบรรจุตัวอ่อนโคและกระบือสำหรับทำไวตริฟิเคชัน (Sophon, 1994)

1. ดูด VTM เข้าหลอดฟาง ยาว 1.5 ซม.
2. ดูด อากาศ เข้าไป ยาว 0.5 ซม.

3. ดูด VTM เข้าหลอดฟาง 0.3 ซม.
4. ดูดอากาศ เข้าไป ยาว 0.5 ซม.
5. บรรจุไข่เข้าไปประมาณ 10-20 ใบ ในส่วนของ VTM 0.3 ซม. โดยใช้ปิเปตยืดปลาย
6. ดูดซูโครส 1 โมลาร์ เข้าไป ยาว 7 ซม.
7. ดูดอากาศเข้าไป จนกระทั่ง VTM ส่วนแรกสัมผัสกับจุกฝ้ายของหลอดฟาง
8. ตัดด้านปลายเปิดหลอดฟาง ห่างจากส่วนที่เป็นซูโครส 0.5 ซม. แล้วอุดด้วยจุกอุดหลอดฟาง



รูปที่ 5 การบรรจุไข่เข้าหลอดฟาง เพื่อแช่แข็งแบบไวตริฟิเคชันตามลำดับขั้นตอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17082717

6.4 ขั้นตอนการละลาย

1. หยิบหลอดฟางที่ต้องการด้วยปากคีบขึ้นมาจากถังไนโตรเจนเหลว ยกไว้ในอากาศ 10 วินาที
2. จุ่มหลอดฟางลงในอ่างน้ำ อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 10 วินาที
3. เช็ดหลอดฟางให้แห้งด้วย ผ้าหรือกระดาษสะอาด
4. สะบัดหลอดฟางให้ส่วน VTM รวมกับส่วนซูโครส
5. จุ่มทางจุกอุดหลอดฟางลงไปในอ่างน้ำ อุณหภูมิ 37°ซ นาน 3 นาที
6. สลับเอาปลายด้านจุกฝ้ายลงในอ่างน้ำ อุณหภูมิ 25°ซ นาน 3 นาที
7. เช็ดหลอดฟางให้แห้ง ตัดปลายหลอดฟางทางด้านจุกอุดหลอดฟาง ใช้แท่งโลหะเล็ก ๆ ดันจุกฝ้ายให้ของเหลวในหลอดฟางไหลออกมายังจานพลาสติก
8. หาไข่จากจานพลาสติกโดยเร็ว แล้วย้ายเข้าไปใน มีเดียม M199B 2 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

7. วิธีการวัดผลการสุกของไข่และอัตราการปฏิสนธิ

7.1 การวัดผลการเจริญและการปฏิสนธิของไข่

เมื่อเลี้ยงไข่หรือปฏิสนธิ นานตามเวลาที่ต้องการ แล้วทำการย่อยเอาคูมูลัสเซลล์ออกโดยเติมไฮยารูโลดิเนส 30 ไอ.ยู./หยด ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วใช้พลาสเจอร์ปิเปตปลายแคบ ดูด เป่า ให้คูมูลัสเซลล์หลุดออกจนหมด ล้างไข่ให้สะอาดด้วยน้ำเกลือแล้วนำไปวางบนกระจกสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปทำให้คงสภาพด้วยการแช่ในอเซติคแอลกอฮอล์นานกว่า 48 ชม. แล้วย้อมสีด้วย 1% อซีโตออซีน นำไข่ที่ย้อมสีแล้วไปตรวจระยะการเจริญของนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทรรศน์ทรานสมิตเต็ดไลท์ กำลังขยาย 200 เท่า โดยแบ่งระยะการเจริญของนิวเคลียสตามแบบของ Hunter และ Polge (1966) ดังนี้คือ

เจอมินอลเวสิเคิล (GV)

ระยะนี้เป็นระยะพักตัวที่นิวเคลียสยังคงรูปแบบไม่เปลี่ยนแปลงจากไข่ที่พบในระยะต้นของการเป็นสัด จะพบนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางหรือตรงขอบ ยังคงมีเมมเบรนของนิวเคลียสอยู่และมีพื้นที่โดยรอบค่อนข้างมาก ลักษณะเส้นโครโมโซมจะเรียงตัวอยู่เป็นรูปวงแหวนหรือเกือกม้าล้อมรอบจุดนิวเคลียสเดี่ยว

โปรเมตาเฟส (PM)

ระยะนี้จะใช้ครอบคลุมระหว่างช่วงท้ายของระยะโปรเฟส ต่อกับช่วงต้นของระยะเมตาเฟส I ลักษณะของนิวเคลียสที่ปรากฏเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างเห็นได้ชัด นิวเคลียร์เมมเบรนจะเห็นได้เพียงเส้นบางๆ หรือมองไม่เห็นเลย พื้นที่ของนิวเคลียสน้อยลงเพราะส่วนแกรนูลหายไป เส้นโครโมโซมก็จะหดตัวเป็นก้อนเดี่ยวหรือจุดเล็กๆ กระจาย และส่วนนิวเคลียสตรงกลางจะไม่ปรากฏ

เมตาเฟส I (M I)

ระยะนี้จะไม่มีนิวเคลียร์เมมเบรน โครโมโซมจะก่อตัวและเรียงตัวเป็นลำดับอยู่แนวกึ่งกลางของขั้วสปินเดิล แนวตามยาวของเส้นสปินเดิล จัดเรียงตัวแผ่เป็นรัศมีไปยังผิวของไข่

อนาเฟส I (ANA I)

จะพบโครโมโซมเคลื่อนเข้าใกล้ขั้วแต่ละด้านที่สปินเดิลดึงเข้ามา

ทีโลเฟส (TEL I)

โครโมโซมที่ไปถึงส่วนบริเวณขั้วของสปินเดิล และส่วนกลางของสปินเดิลแยกออก โพลาร์บอดีอันแรกกำลังก่อตัว แต่ยังคงเห็นชัดเจนว่ายังต่อกับสปินเดิล

เมตาเฟส II (M II)

โพลาร์บอดีอันแรกแยกตัวออกจากไข่ (เซคันดรี โอโอไซต์) และโครโมโซมส่วนที่เหลือในไซโตพลาสซึมก็จะมาเรียงตัวที่ศูนย์กลางของสปินเดิล

ไข่ที่มีโพลาร์บอดี ถือว่าเป็นไข่ที่สุกแล้วและไข่ที่มีหัวอสุจิขยายใหญ่ขึ้นหรือพบโปรนิวคลีไอของอสุจิกับหางอสุจิ ถือว่าไข่ใบนั้นได้รับการปฏิสนธิ

7.1.1 การทำให้เซลล์ไข่คงสภาพและการย้อมสี ส่วนของนิวเคลียส

1. น้ำยาคงสภาพ (Fixative) 100 มล. ประกอบด้วย

กรดอซีติค	25 มล.
เอทานอล	75 มล.

2. สีย้อม อซีโตออซีน (Aceto orcein)

อุ่นกรดอซีติค 45 มล. ให้ร้อน แล้วเติมออซีนลงไป 1 กรัม ทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมน้ำกลั่นลงไป 55 มล. ต้องกรองก่อนใช้

3. น้ำยาล้างสี อซีโตกลีเซอโรล (Aceto glycerol) ประกอบด้วย

กรดอซีติค	20 มล.
กลีเซอโรล	20 มล.
น้ำกลั่น	60 มล.

4. ขี้ผึ้ง สำหรับติดกระจกปิดสไลด์ (Slide wax)

ประกอบด้วย พาราฟิน 9 ส่วน กับ พาราพลาส 1 ส่วน รวมกัน โดยทำให้ละลายที่ 60^{o}ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

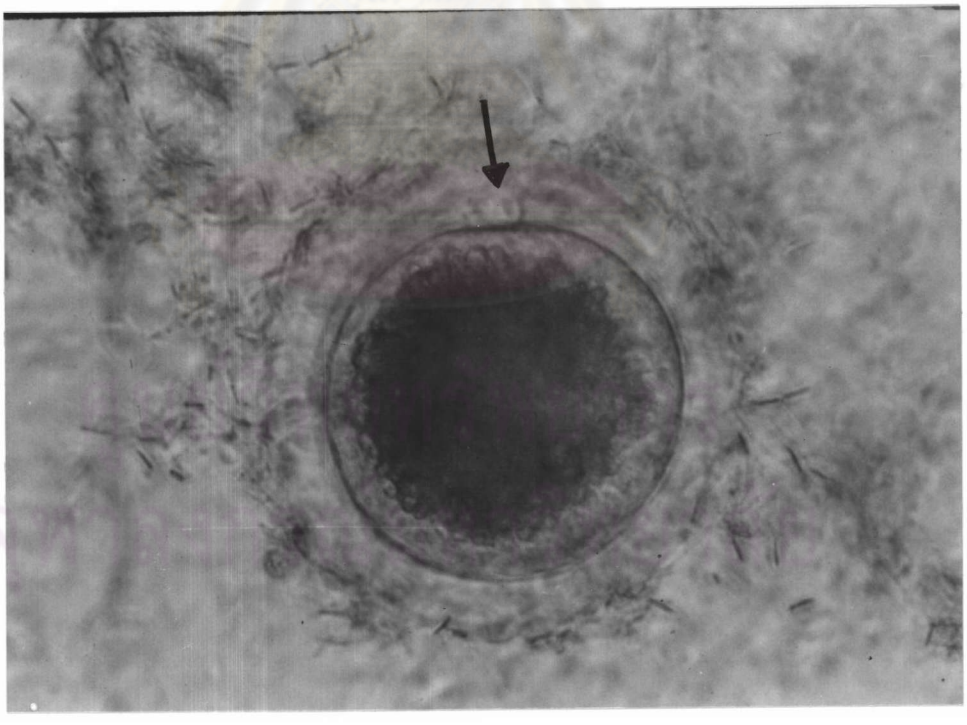
วิธีการทำให้คงสภาพและย้อมสี

1. ย่อยเอาคูมูลัสเซลล์ที่ติดอยู่รอบ ๆ โอโอไซต์ออกก่อน โดยใช้ไฮยาลูโรนิเดส (เข้มข้น 3000 ไอ.ยู/มล.) ลงในหยดเลี้ยงโอโอไซต์ ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตยืดปลายให้เล็ก ดูด เป่าเบา ๆ หลาย ๆ ครั้ง จนคูมูลัสเซลล์หลุดออกจนเกลี้ยง ล้างไข่ให้สะอาดด้วยน้ำเกลือ โดยการย้ายผ่านหยดน้ำเกลือ 4-5 ครั้ง
2. นำกระจกสไลด์ชนิดมีฝ้าที่แช่ไว้ในแอลกอฮอล์ 95% มาเช็ดให้แห้ง แล้วใช้ดินสอปลายเพชร ขีดเป็นมุมของสี่เหลี่ยมขนาดเท่ากระจกปิดสไลด์
3. ใช้พาสเจอร์ปิเปตยืดปลาย ดูดเอาโอโอไซต์ที่จะย้อมสีประมาณ 10-20 ใบ มาวางบนสไลด์ เป็นกลุ่ม ๆ ละ 10 ใบ กระจายไข่ให้แยกจากกัน แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ กดกระจกปิดสไลด์เบา ๆ ช้า ๆ สังเกตดูว่า กระจกปิดสไลด์ทับไข่ลงไปพอประมาณและชะด้วยน้ำเกลือเข้าไปใต้กระจกปิดสไลด์
4. นำแผ่นสไลด์ที่มีโอโอไซต์ ไปแช่ในโถแช่สไลด์ที่มีน้ำยาคงสภาพอยู่แช่ทิ้งไว้นานกว่า 48 ชม. จึงนำไปย้อมสีได้ หรือหากต้องการเร็วขึ้นย้ายโถแช่สไลด์ลงไปในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิที่ 39°ซ ทิ้งไว้นาน 3 ชม. ก็จะนำไปย้อมสีได้เช่นกัน
5. เอาแผ่นสไลด์ออกจากโถแช่น้ำยาคงสภาพ มาไว้ในโถเอทานอลแช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วจึงนำไปย้อมสี
6. ทำการย้อมสี โดยชะสีย้อม อซีโตออซีน เข้าไปที่ข้างหนึ่งของกระจกปิดสไลด์ ส่วนอีกด้านหนึ่ง ใช้กระดาษซับหรือกระดาษทิชชู ซับของเหลวดึงให้สีย้อมไหลผ่าน มาอีกด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์
7. ทิ้งแผ่นสไลด์ที่ย้อมสีไว้นาน 1-3 นาที แล้วล้างเอาสีย้อมออกโดยใช้น้ำยาล้างสีอซีโตกลีเซอโรลชะสีออกให้หมดโดยทำเช่นเดียวกับการย้อม

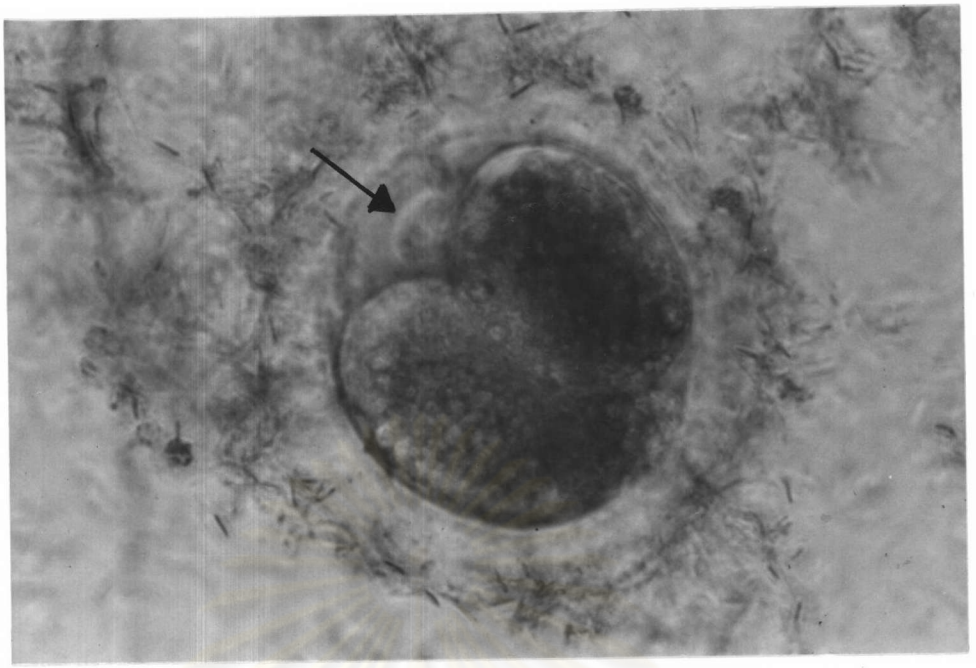
8. ซับขอบกระจกปิดสไลด์ให้แห้ง แล้วใช้ยาเคลือบเล็บป้ายรอบ ๆ กระจกปิดสไลด์ ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 และ 200 เท่า

7.2. การตรวจนับการแบ่งเซลล์

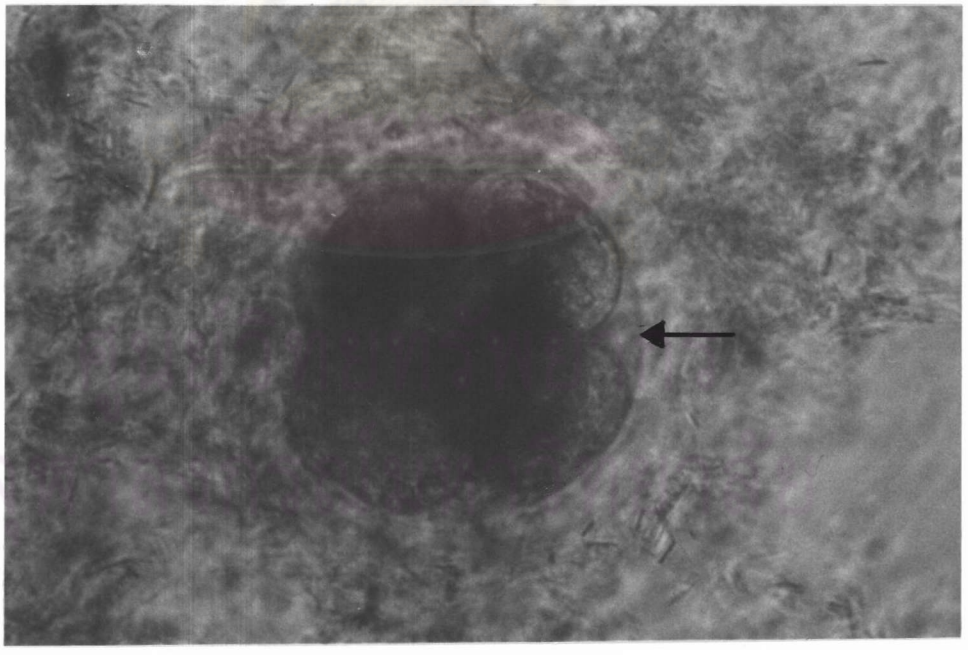
หลังจากผสมอสุจิลงไปในหยดปฏิสนธิ 48 ชม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มี ไซโตพลาสซึมแยกเป็น 2-4 ส่วน ออกมาดูด เป่าด้วยพาสเจอร์ปิเปตปลายแคบเอาคูมูลัสเซลล์และตัวอสุจิที่ติดอยู่รอบๆ ออก นำไปตรวจนับการแบ่งเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 100 และ 320 เท่า ไข่ที่สุกได้รับการผสมและมีการแบ่งตัวเป็นปกติ จะพบโพลาร์บอดีและบลาสโตเมียจะมีขนาดสม่ำเสมอ



รูปที่ 6 โอโอไซต์สุกรเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. ผสมรวมกับอสุจิใน IVF มีเดียมนาน 6 ชม. แล้วย้ายมาเลี้ยงใน IVC มีเดียมอีก 42 ชม. เป็นไข่สุก สังเกตจาก โพลาร์บอดี (ศรชี้) แต่ไม่มีการแบ่งตัว (กำลังขยาย 320 เท่า)



รูปที่ 7 โอโอไซต์สุกรเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. ผสมรวมกับอสุจิใน IVF มีเดียมนาน 6 ชม. แล้วย้ายมาเลี้ยงใน IVC มีเดียมอีก 42 ชม. เป็นไข่สุก (สังเกตจากโพลาร์บอดีที่ลูกศรชี้) ที่ได้รับการผสมและมีการแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ (กำลังขยาย 320 เท่า)



รูปที่ 8 โอโอไซต์สุกรเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. ผสมรวมกับอสุจิใน IVF มีเดียมนาน 6 ชม. แล้วย้ายมาเลี้ยงใน IVC มีเดียมอีก 42 ชม. เป็นไข่สุก (สังเกตจากโพลาร์บอดีที่ลูกศรชี้) ที่ได้รับการผสมและมีการแบ่งตัวเป็น 4 เซลล์ (กำลังขยาย 320 เท่า)

8. การล้างและทำความสะอาดอุปกรณ์ และการทำปลอดเชื้อ

การล้างและทำความสะอาดอุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เมื่อใช้เสร็จแล้ว จะล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง เพื่อไม่ให้มีคราบสิ่งสกปรกและสารเคมีแห้งติดอุปกรณ์ แล้วนำมาล้างด้วยน้ำยา 7x® 5% ก่อนล้างควรแช่อุปกรณ์เหล่านี้ไว้ก่อน 5-6 ชม. สำหรับอุปกรณ์ที่เป็นยางหรือพลาสติก หรือ 1-2 วัน สำหรับอุปกรณ์ที่เป็นเครื่องแก้วหรือสแตนเลส เมื่อล้างในน้ำยา 7x® เสร็จแล้ว ล้างน้ำยา 7x ® ออก ด้วยน้ำขจัดอิออน อีก 6 ครั้ง และล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปคว่ำผึ่งให้แห้งในบริเวณที่ไม่มีฝุ่นละออง แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อต่อไป

การทำปลอดเชื้อ

ก่อนทำปลอดเชื้อ จะทำการห่อหรือบรรจุด้วยวิธีการที่เหมาะสมสำหรับอุปกรณ์และวิธีทำให้ปลอดเชื้อ

1. การอบด้วยความร้อนแห้ง ในตู้อบอุณหภูมิ 160^{o}ซ นาน 1 ชม. หรือ 180^{o}ซ นาน 30 นาที เหมาะสำหรับเครื่องแก้วทุกชนิดและสแตนเลส ก่อนอบต้องหุ้มหรือปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยล์
2. การอบด้วยความร้อนชื้น ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121^{o}ซ นาน 40 นาที เหมาะสำหรับอุปกรณ์ที่เป็นสแตนเลสหรือพลาสติกทนความร้อน ก่อนอบต้องบรรจุในซองกระดาษหรือหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ให้เรียบร้อย

9. การดูแลห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการ เป็นห้องปิดที่ได้รับการทำความสะอาดทั้งห้องอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง โดยทำการดูดฝุ่นและเช็ดบริเวณทำงานและพื้นห้องด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ และทำความสะอาดบริเวณที่ทำงานด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทุกครั้ง ก่อนและหลังปฏิบัติการ มีรองเท้าแตะและเสื้อกาวน์ให้เปลี่ยนสำหรับสวมเฉพาะในห้องปฏิบัติการ

10. วิธีการทดลอง

วิธีปฏิบัติการในการเตรียมมีเดียม เตรียมโอโอไซต์ เตรียมอสุจิ การเลี้ยงไข่ให้สุก การปฏิสนธิและการแช่แข็ง ได้ระบุไว้ดังกล่าวข้างต้น เพื่อใช้เป็นบรรทัดฐานในการค้นคว้าในหัวข้อใหญ่ 3 หัวข้อ โดยจะแบ่งกล่าวเป็น 3 บท ซึ่งจะได้กล่าวถึงรายละเอียดถึงเรื่องของ วัตถุประสงค์ แผนการทดลองและผลการทดลอง พร้อมทั้งสรุปผล วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ เป็นบทๆ ไป โดยมีหัวข้อดังนี้

บทที่ 4 ระบบการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุกและการปฏิสนธินอกร่างกาย

บทที่ 5 การเก็บรักษารังไข่และโอโอไซต์ที่อุณหภูมิเหนือจุดเยือกแข็ง

บทที่ 6 การเก็บรักษาโอโอไซต์และไข่สุกใต้จุดเยือกแข็ง

11. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ใช้ Chi-square test เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ผลที่ได้ระหว่างกลุ่มทดลองและกับกลุ่มควบคุม