บทที่ 3

ผลการทดลอง

จากการเลี้ยงไข่โคที่ได้จากรังไข่ของโคที่ส่งไปยังโรงฆ่าสัตว์ โดยนำมาเลี้ยงในน้ำยา TCM-199 ซึ่งมี 10% BCS เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้เพาะเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2 ที่ 39°C ไข่โคในระยะที่ยังเจริญไม่สมบูรณ์ (immature oocyte) จะเจริญเป็นไข่ที่มีความสมบูรณ์เต็มที่ (mature oocyte) สังเกตได้จาก cumulus cells ที่ล้อมรอบไข่จะเจริญขยายขนาดแผ่กระจายออกกว้างในจานทดลอง (รูปที่ 3.1)

นำไข่ที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่แล้วมาใส่ในน้ำยาปฏิสนธิซึ่งมีอสุจิโคจำนวนประมาณ 1.06-1.16 x 10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งของโคเพศผู้หมายเลข 9875 หลังจากการทำ swim up ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าอสุจิโคตัวนี้ในปริมาณที่กล่าวจะให้ผลปฏิสนธิสูง และ polyspermy ต่ำ นำมาเพาะเลี้ยงภายในตู้เพาะเลี้ยง ภายใต้ 5% CO_2 ที่ 39°C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง พบว่ามีเปอร์เซนต์การปฏิสนธิโดยเฉลี่ย 78.56% จากการย้อมด้วยสี 1% aceto orecein (น้ำหนัก/ปริมาตร) หลังจาก fix ในน้ำยา methanol : acetic (3:1 โดยปริมาตร) และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

เมื่อนำไข่โคที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา Hamster Embryo Culture Medium (HECM-3) หรือเรียกว่า Basic medium-3 (BM-3) ที่มี non-essential amino acid (NEA) อยู่ด้วย ซึ่งเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่สนับสนุนการเจริญในระยะแรกของเอ็มบริโอจนถึงอายุ 72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ (Pinyopummitr และ Bavister, 1991) เรียกระยะนี้ว่าระยะการเพาะเลี้ยงที่ 1 ผลการเจริญของเอ็มบริโอโคแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 พบว่าในจำนวนเอ็มบริโอ 938 ตัว ในการปฏิสนธิชุดแรก มีเอ็มบริโอในระยะ 1-เซลล์ 9.80% (92) เอ็มบริโอในระยะ 2-เซลล์ 6.08% (57) เอ็มบริโอระยะ 3- 6-เซลล์ 29.20% (274) และเอ็มบริโอระยะ ≥ 7-เซลล์ มีจำนวนถึง 54.90% (515) การแบ่งตัวของเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ แสดงในรูป 3.2

เพื่อให้ได้เอ็มบริโอที่มีจำนวนเซลล์มากพอ เหมาะแก่การตัดแบ่งไปตรวจสอบเพศด้วยเทคนิค PCR และนำส่วนที่เหลือไปเพาะเลี้ยงหรือเก็บไว้ในกรณีที่จะใช้ในการถ่ายฝากในโอกาสต่อไป จึงทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอตั้งแต่ระยะ 2-เซลล์ ถึง ≥ 7-เซลล์ ให้เจริญต่อไปจาก 72 ถึง 192 ชั่วโมง โดยสุ่มกระจายเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ รวมทั้งที่มีกลูโคสและฟอสเฟต เพื่อหาน้ำยาเพาะเลี้ยงที่จะสนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะนี้ที่ดีที่สุด

การทดลองที่ 1 ผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังได้รับการผสม (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)

จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่มีกรดอะมิโนจำพวก NEA (T_1) แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 ในจำนวน 168 เอ็มบริโอที่เจริญในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 พบว่ามีจำนวน เอ็มบริโอเจริญเป็น blastocyst, expanded blastocyst, hatched blastocyst และจำนวน blastocyst ทั้งหมดเป็น 10(5.8±7.0), 14(8.4±12.1), 0 และ 24(14.3±12.0) เอ็มบริโอ ตามลำดับ

ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่มีกรดอะมิโนจำพวก EA (T_2) ในจำนวน 178 เอ็มบริโอที่เจริญในระยะเพาะเลี้ยงที่ 2 พบว่ามีจำนวนเอ็มบริโอเจริญเป็น blastocyst, expandcd blastocyst, hatched blastocyst และจำนวน blastocyst ทั้งหมดเป็น 3(1.6±3.4), 10(6.3±10.9), 1 (0.5±1.9) และ 14(8.3±11.2) เอ็มบริโอ ตามลำดับ

ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่มีกรดอะมิโนจำพวก NEA + EA (T_3) ในจำนวน 166 เอ็มบริโอที่เจริญในระยะเพาะเลี้ยงที่ 2 พบว่ามีจำนวนเอ็มบริโอเจริญเป็น blastocyst, expanded blastocyst, hatched blastocyst และจำนวน blastocyst ทั้งหมดเป็น 6(3.4±5.5), 28 (17.2±10.2), 0 และ 34(20.6±11.2) เอ็มบริโอ ตามลำดับ

ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่ 10% BCS (T_4) ในจำนวน 165 เอ็มบริโอที่เจริญในระยะเพาะเลี้ยงที่ 2 พบว่ามีจำนวนเอ็มบริโอเจริญเป็น blastocyst, expanded blastocyst, hatched blastocyst และจำนวน blastocyst ทั้งหมดเป็น 2(1.3±3.4), 45(25.9±12.1), 18(11.0±9.7), และ 65(39.8±12.0) เอ็มบริโอ ตามลำดับ

ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199 ที่ 10% BCS (T_5) ในจำนวน 169 เอ็มบริโอที่เจริญในระยะเพาะเลี้ยงที่ 2 พบว่ามีจำนวนเอ็มบริโอเจริญเป็น blastocyst, expanded blastocyst, hatched blastocyst และจำนวน blastocyst ทั้งหมดเป็น 4(1.2±6.7), 41(23.5±11.1), 18(9.9±15.5), และ 63(36.4±18.4) เอ็มบริโอ ตามลำดับ

เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดลอง พบว่า ในกลุ่ม T_1 มีจำนวนเอ็มบริโอเจริญถึงระยะ blastocyst 10 เอ็มบริโอ (5.8±7.0) กลุ่มที่ T_2, T_3, T_4 และ T_5 มีจำนวนเอ็มบริโอเจริญถึงระยะเดียวกันเท่ากับ 3(1.6±3.4), 6(3.4±5.5), 2(1.3±3.4) และ 4(1.2±6.7) ตาม

ลำดับ ซึ่งจำนวนของเอ็มบริโอกลุ่ม T_2 - T_4 ที่พบมีจำนวนใกล้เคียงกันจึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างชัดเจน เมื่อทดสอบที่ $p > 0.005$ ($p = 0.131918$) และจำนวนเอ็มบริโอในกลุ่ม T_2, T_4 และ T_5 ที่เจริญถึงระยะ blastocyst ต่ำกว่าในกลุ่ม T_1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จำนวนเอ็มบริโอที่เจริญจนถึงระยะ expanded blastocyst เมื่อเปรียบเทียบในระหว่างกลุ่ม พบว่า เอ็มบริโอที่เจริญในระยะนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ($p = 0.000000271$) โดยที่ในกลุ่ม T_1 และ T_2 ซึ่งมีจำนวนเอ็มบริโอ 14(8.4±12.1) และ 10(6.3±10.9) ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม T_3, T_4 และ T_5 ที่มีจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญจนถึงระยะนี้เป็น 28(17.2±10.2), 45(25.9±12.1) และ 41(23.5±11.1) เอ็มบริโอ ตามลำดับ นอกจากนี้ในกลุ่ม T_3 ยังแตกต่างอย่างชัดเจนจากกลุ่ม T_4 แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม T_5 ส่วน T_4 และ T_5 เป็นกลุ่มควบคุมที่มีแต่ซีรัม พบว่าให้จำนวนของเอ็มบริโอที่เจริญในระยะนี้ใกล้เคียงกันจึงไม่เห็นผลความแตกต่าง

การทดลองที่ 2 ผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังได้รับการผสม (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)

ในการเตรียมเอ็มบริโอเพื่อทดสอบผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอในระยะเพาะเลี้ยงที่ 2 นำไข่ที่ปฏิสนธิแล้วด้วยวิธีการทดลองที่ 1 จำนวน 347 เซลล์ ไปเลี้ยงในน้ำยา mHECM-3 + NEA เป็นเวลา 54 ชั่วโมง พบว่าที่ 72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ มีเอ็มบริโอเจริญอยู่ในระยะต่าง ๆ คือ 1-เซลล์ 7.78% (27) ระยะ 2-เซลล์ 11.24% (39) ระยะ 3- 6-เซลล์ 34.01% (118) และระยะ ≥ 7-เซลล์ 46.97% (153) (ดูตารางที่ 3.3)

เมื่อนำเอ็มบริโออายุ 72 ชั่วโมงหลังปฏิสนธิ (ระยะ 2- เซลล์ ถึง ≥ 7-เซลล์) ไปสุ่มกระจายเลี้ยงต่ออีก 120 ชั่วโมงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนครบทั้ง 21 ชนิด และเติมกลูโคส ฟอสเฟต หรือกลูโคส + ฟอสเฟต อย่างใดอย่างหนึ่ง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.4 พบว่าเอ็มบริโอที่เจริญถึงระยะ < มอรูลาร์ในทั้ง 8 กลุ่มทดลอง (T_1 - T_8) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองที่ $p < 0.05$ ($p = 0.0015986$) ในกลุ่ม T_1 ซึ่งมีปริมาณของกลูโคสอยู่เพียง 0.2 mM มีจำนวนเอ็มบริโอเจริญถึงในระยะนี้ 5(12.5±9.57) เอ็มบริโอ เมื่อเปรียบเทียบกับ T_3 ซึ่งมีกลูโคสอยู่ 5.56 mM พบเอ็มบริโอเจริญถึงระยะนี้ 2(5±5.77) เอ็มบริโอ และใน T_4 มีปริมาณกลูโคสต่ำเท่ากับ T_1 (0.2 mM) และมี 0.35 mM ของฟอสเฟต พบเอ็มบริโอเจริญในระยะนี้ 3(7.5±5.0) เอ็มบริโอ ทั้ง 3 กลุ่มทดลองนี้มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มทดลองที่เหลือ คือ T_2 (มีกลูโคส 2.0 mM) T_5 (มีกลูโคส 2.0 mM และ 0.35 mM ฟอสเฟต) และ T_6 (มีกลูโคส 5.56 mM และ 0.35 mM ฟอสเฟต) ซึ่งไม่พบว่ามีเอ็มบริโอเจริญในระยะนี้ ส่วน T_7 และ T_8 ที่มีเพียง 10% BCS ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 และ TCM-199 ตามลำดับ จะไม่พบการเจริญของเอ็มบริโอในระยะนี้เช่นกัน

จำนวนเอ็มบริโอในระยะมอรูลา (รูปที่ 3.3) จากตารางพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระยะกลุ่มทดลองที่ $p > 0.05$ ($p = 0.7691147$) จำนวนเอ็มบริโอที่เจริญในระยะนี้ของ T_1 มี 6(15.0±23.8) เอ็มบริโอ ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ T_3, T_4 และ T_6 ส่วน T_2 จำนวนเอ็มบริโอเจริญในระยะนี้มี 2(5.0±1.0) เอ็มบริโอ และ T_5 มีจำนวน 4(10.0±8.16) เอ็มบริโอ เมื่อเปรียบเทียบกับ T_7 และ T_8 ซึ่งมีการเจริญของเอ็มบริโอในแต่ละกลุ่มทดลองเพียง 2(5.0±10.0) และ 2(5.0±5.77) เอ็มบริโอ ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าที่ใกล้เคียงและไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอ็มบริโอในระยะ Early blastocyst และ Blastocyst (รูปที่ 3.4) จากตารางพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างกลุ่มทดลองที่ $p > 0.05$ ($p = 0.9829353$ และ $p = 0.5529915$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญถึงระยะนี้ในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า เอ็มบริโอใน T_1 และ T_2 จะเท่ากับจำนวนเอ็มบริโอใน T_7 และ T_8 มีจำนวน 1 (2.5±5.0) เอ็มบริโอในแต่ละกลุ่มทดลอง ในกลุ่มทดลองที่เหลือคือ 3, 4, 5 และ 6 มีจำนวนเอ็มบริโอเจริญได้จำนวนเท่ากัน คือ 2(5.0±5.8) เอ็มบริโอ ซึ่งจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญได้มีค่าใกล้เคียงกัน ไม่สามารถพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเอ็มบริโอในระยะ Expanded blastocyst (รูปที่ 3.3) ในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างกลุ่มทดลองที่ $p > 0.05$ ($p = 0.3352476$) จำนวนเอ็มบริโอที่เจริญในระยะนี้ของ T_1 มี 12(30±11.6) เอ็มบริโอ ใน T_2 และ T_5 พบเอ็มบริโอในระยะนี้ จำนวน 4(10.0±8.2) เอ็มบริโอในแต่ละกลุ่มการทดลอง และมีเอ็มบริโอในระยะนี้จำนวน 5(12.5±15.0) เอ็มบริโอใน T_3 ส่วนใน T_4 และ T_6 มีจำนวนเอ็มบริโอในระยะนี้เป็น 8(5.0±5.8) และ 8(20.0±14.1) เอ็มบริโอ ตามลำดับ T_7 และ T_8 มีจำนวนเอ็มบริโอในระยะนี้เป็น 9(22.5±12.5) และ 10(25.0±10.0) เอ็มบริโอ ตามลำดับ เมื่อนำจำนวนเอ็มบริโอในทุกกลุ่มทดลองมาทดสอบหาค่าทางสถิติไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จำนวนเอ็มบริโอในระยะ Hatched blastocyst (รูปที่ 3.3) ที่พบในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างกลุ่มทดลองที่ $p < 0.05$ ($p =$

0.0410481) จำนวนเอ็มบริโอที่เจริญในระยะนี้ของกลุ่มทดลองที่ T_1, T_3, T_4, T_5, T_6 และ T_7 มีค่าใกล้เคียงกันคือ 2(5.0±5.8), 1(2.5±5.0), 0(0), 0(0), 1(2.5±5.0), และ 3(7.5±5.0) ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ T_2 และ T_8 ที่มีจำนวนเอ็มบริโอเป็น 5(12.5±15) และ 7(17.5 ±12.6) เอ็มบริโอ ตามลำดับ พบว่าใน T_2 และ T_8 นี้มีผลให้เอ็มบริโอเจริญได้ดีกว่าใน T_1, T_3, T_4, T_5, T_6 และ T_7 เป็นผลให้เห็นว่า T_2 และ T_8 มีความแตกต่างจากกลุ่มทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เป็นเอ็มบริโอระยะต่างๆ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรด อะมิโนชนิดไม่จำเป็นเวลา 54 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ

Treatments	n	No. of 1 cell (%)	No. of 2 cells (%)	No. of 3-6 cells (%)	No. of ≥ 7cells (%)
mHECM-3+NEA	938	92 (9.80)	57 (6.08)	274 (29.20)	515 (54.90)

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากอายุ 72 ชั่วโมง (2-เซลล์ - ≥ 7-เซลล์) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระยะที่ 1 เป็นเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสอายุ 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ

Treatments (T)	n	No. of Blastocysts ($\bar{x}$ ± SD)	No. of Expanded Blastocysts ($\bar{x}$ ± SD)	No. of Hatched Blastocysts ($\bar{x}$ ± SD)	No. of Total Blastocysts ($\bar{x}$ ± SD)
T_1	168	10* b** (5.8±7.0)	14 a (8.4±12.1)	0 a (0)	24 ab (14.3±12.0)
T_2	178	3 a (1.6±3.4)	10 a (6.3±10.9)	1 a (0.5±1.9)	14 a (8.3±11.2)
T_3	166	6 ab (3.4±5.5)	28 b (17.2±10.2)	0 a (0)	34 b (20.6±11.2)
T_4	165	2 a (1.3±3.4)	45 c (25.9±12.1)	18 b (11.0±9.7)	65 c (39.8±12.0)
T_5	169	4 a (1.2±6.7)	41 bc (23.5±11.1)	18 b (9.9±15.5)	63 c (36.4±18.4)

เมื่อ T_1 = mHECM-3 + NEA T_4 = mHECM-3 + 10% BCS

T_2 = mHECM-3 + EAT$_5$ = TCM-199 + 10% BCS

T_3 = mHECM-3 + NEA + EA

หมายเหตุ * จำนวนเอ็มบริโอที่เจริญในระยะต่าง ๆ

** อักษรเดียวกันใน column เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ $p > 0.05$

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เป็นเอ็มบริโอระยะต่างๆ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรด อะมิโนชนิดไม่จำเป็นเวลา 54 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ

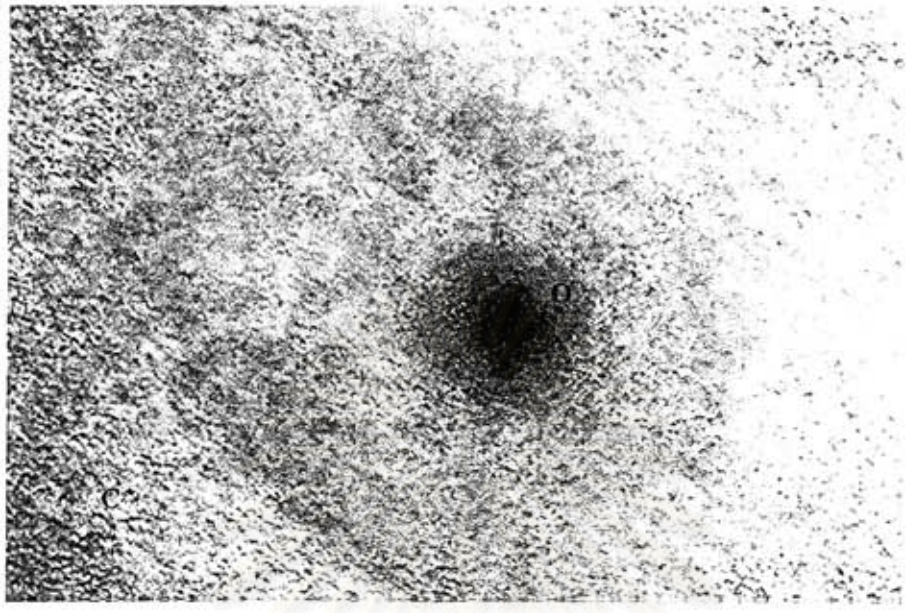
Treatments	n	No. of 1 cell (%)	No. of 2 cells (%)	No. of 3-6 cells (%)	No. of ≥ 7cells (%)
mHECM-3 +NEA	347	27 (7.78)	39 (11.24)	118 (34.01)	163 (46.97)

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากอายุ 72 ชั่วโมง (2-เซลล์ - ≥ 7-เซลล์) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระยะที่ 1 เป็นเอ็มบริโอระยะมอรูลาและบลาสโตซีส อายุ 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรดอะมิโน 21 ชนิด และกลูโคส ฟอตเฟส หรือ กลูโคส+ฟอสเฟตอย่างใดอย่างหนึ่ง

Treatments (T)	n	No. of < Morula ($\bar{x}$ ±SD)	No.of Morula ($\bar{x}$ ±SD)	No. of Early Blastocysts & Blastocysts ($\bar{x}$ ±SD)	No. of Expanded Blastocysts ($\bar{x}$ ±SD)	No. of Hatched Blastocysts ($\bar{x}$ ±SD)	No. of Total Blastocysts ($\bar{x}$ ±SD)
T_1	40	5 a (12.5±9.57)	6 (15.0±23.8)	1 (2.5±5.0)	12 (30.0±11.6)	2 a (5.0±5.8)	15 (37.5±20.6)
T_2	40	0 b (0)	2 (5.0±1.0)	1 (2.5±5.0)	4 (10.0±8.2)	5 b (12.5±15.0)	10 (25.0±19.2)
T_3	40	2 c (5.0±5.77)	6 (15.0±12.9)	2 (5.0±5.8)	5 (12.5±15)	1 a (2.5±5.0)	8 (20.0±24.5)
T_4	40	3 d (7.5±5.0)	6 (15.0±12.9)	2 (5.0±5.8)	8 (5.0±5.8)	0 a (0)	10 (25.0±19.2)
T_5	40	0 b (0)	4 (10.0±8.16)	2 (5.0±5.8)	4 (10.0±8.2)	0 a (0)	6 (15.0±5.8)
T_6	40	0 b (0)	6 (15.0±12.9)	2 (5.0±5.8)	8 (20.0±14.1)	1 a (2.5±5.0)	10 (27.5±12.6)
T_7	40	0 b (0)	2 (5.0±10.0)	1 (2.5±5.0)	9 (22.5±12.5)	3 a (7.5±5.0)	13 (32.5±22.5)
T_8	40	0 b (0)	2 (5.0±5.77)	1 (2.5±5.0)	10 (25.0±10)	7 b (17.5±12.6)	18 (45.0±17.3)

เมื่อ T_1 = mHECM-3 + (NEA+EA) + 0.2 mM Glucose
T_2 = mHECM-3 + (NEA+EA) + 2.0 mM Glucose
T_3 = mHECM-3 + (NEA+EA) + 5.56 mM Glucose
T_4 = mHECM-3 + (NEA+EA) + 0.2 mM Glucose + 0.35 mM NaH_2PO_4
T_5 = mHECM-3 + (NEA+EA) + 2.0 mM Glucose + 0.35 mM NaH_2PO_4
T_6 = mHECM-3 + (NEA+EA) + 5.56 mM Glucose + 0.35 mM NaH_2PO_4
T_7 = mHECM-3 + 10%BCS
T_8 = TCM-199 + 10%BCS

หมายเหตุ * จำนวนเอ็มบริโอที่เจริญในระยะต่าง ๆ
** อักษรเดียวกันใน column เดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ $p > 0.05$

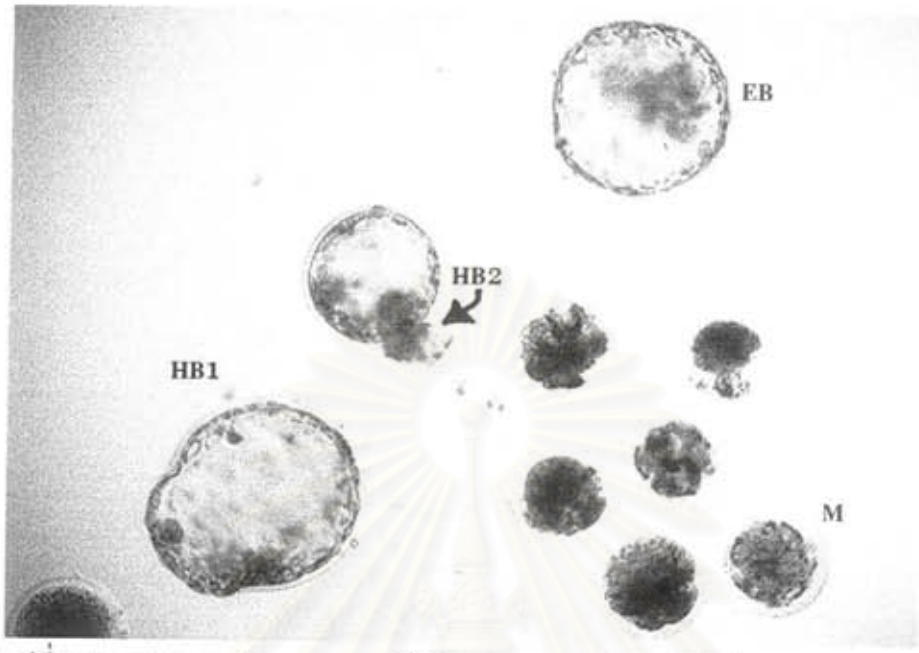


รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของไข่ที่เจริญอย่างสมบูรณ์ในจานทดลอง ในการทำ *In vitro* maturation: O = Oocyte, C = Cumulus cells (200X)

รูปที่ 3.2 แสดงเอมบริโอโคที่ระยะ 8-เซลล์ จากการเพาะเลี้ยงระยะที่ 1

z = Zona pellucida : b = blastomere (100X)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 แสดงการเจริญของเอมบริโอโคสู่ระยะการต่าง ๆ ได้แก่ Morula (M), Expanded blastocyst (EB), Hatching blastocyst (HB1) และ Hatched blastocyst (HB2) (100X)

รูปที่ 3.4 แสดงเอมบริโอในระยะบลาสโตซีสที่มีช่องว่าง Blastocoel (B) (200X)

การทดลองที่ 8 การกำหนดเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันเทคนิค

ในการวิเคราะห์ผลทาง PCR ต้องทำการทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ในครั้งนี้ โดยนำเลือดโคที่ทราบเพศแน่นอนแล้วมาสกัด DNA ตามวิธีดำเนินการทดลองในข้อ 6.2 (บทที่ 2) จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์เพศโดยใช้ PCR ในที่ที่มี specific primer 1 คู่ และ allele-specific primers 2 คู่ ตามการทดลองในข้อ 7.4 (บทที่ 2) ผลการวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ทาง PCR โดยใช้ agarose gel electrophoresis (ข้อ 7.5) แสดงไว้ในรูปที่ 3.5 (ก) และ (ข) จากรูปเมื่อใช้ DNA ที่สกัดจากเลือดโคเพศเมีย 12 ตัว ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีขนาดเป็น 246 bp ทั้งหมด (รูปที่ 3.5 (ก) Lane 1-12) แต่เมื่อใช้ DNA ที่สกัดจากเลือดโคเพศผู้ 12 ตัว (รูปที่ 3.5 (ข)) ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีขนาดเป็น 246 bp และ 179 bp ทั้งหมด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการ วิเคราะห์เพศโดยใช้การเพิ่มปริมาณ DNA ที่ zfx และ zfy ด้วย nested primers 2 คู่ โดยกระบวนการ PCR ให้ผลถูกต้อง 100% ดังนั้นจึงจะใช้วิธีการนี้วิเคราะห์เพศของเอ็มบริโอที่ต้องการศึกษาต่อไป

ในการวิเคราะห์ผลทาง PCR ต้องทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่างชนิดของสัตว์ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ทางเพศในครั้งนี้ เมื่อนำเลือดคนที่ทราบเพศแน่นอนแล้ว และเลือดโคที่ทราบเพศแน่นอนแล้วมาสกัด DNA ตามวิธีในข้อ 6.2 (บทที่ 2) จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาวิเคราะห์เพศ โดยใช้ PCR ซึ่งใช้ allele-specific primers 2 คู่ (หรือ nested primers) (ตารางที่ 2.6) ทำตามการทดลองในข้อ 7.4 ผลการวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์ทาง PCR โดยใช้ agarose gel electrophoresis (ข้อ 7.5) แสดงไว้ในรูปที่ 3.6 (ก) และ (ข)

จากรูปเมื่อใช้ DNA ที่สกัดจากเลือดคนเพศเมียจำนวน 10 คน และจากเลือดโคเพศเมีย 2 ตัว ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีขนาดเป็น 246 bp ทั้งหมด (รูปที่ 3.6 (ก) Lane 1-10 และ Lane 11(B) และ 12(B)) เมื่อใช้ DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ 10 คน ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีขนาดเป็น 246 bp ทั้งหมด ยกเว้น Lane 4 และ 7 ไม่มีผลิตภัณฑ์ทาง PCR (รูปที่ 3.6 (ข) Lane 1-10) ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ DNA ที่สกัดจากเลือดโค 2 ตัวเพศผู้ จะมีขนาดเป็น 246 bp และ 176 bp (รูปที่ 3.6 (ข) Lane 11(B) และ 12(B)) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์เพศโดยใช้การเพิ่มปริมาณ DNA ที่ zfx และ zfy ด้วย allele-specific primer หรือ nested primer โดยกระบวนการ PCR ให้ผลความจำเพาะต่อโคและมีความไวสูงในการวิเคราะห์ด้วย nested primers โดยมีความถูกต้องถึง 100% และผลการตรวจ OSA (Ovine serum albumin) ซึ่งมีอยู่ในน้ำยาของเซลล์บลาสโต

เมียร์ ต่อการปนเปื้อนในการวิเคราะห์เพศทาง PCR พบว่าไม่มีผลต่อการวิเคราะห์การเพิ่ม DNA ของ zfx และ zfy ที่มีความเข้มข้นของ OSA 0.1 - 0.6% ในน้ำยา ดังนั้นจึงจะใช้วิธีการนี้วิเคราะห์เพศของเอ็มบริโอที่ต้องการศึกษาต่อไป

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อนำเอ็มบริโอจำนวน 50 ตัว ในระยะ compact morula ทำ biopsies แล้ว ได้เซลล์บลาสโตเมียร์จำนวน 3-4 เซลล์ ในแต่ละเอ็มบริโอ นำมา วิเคราะห์หาเพศทาง PCR แสดงไว้ในรูปที่ 3.7, 3.8 และ 3.9 จากภาพตัวอย่างที่ได้ แถบ DNA มีขนาด 246 bp จะเป็นตัวอย่างที่แสดงเพศเมีย ส่วนที่แสดงเป็นเพศผู้จะมีแถบ DNA ขนาด 246 bp และ 179 bp ซึ่งสรุปผลการวิเคราะห์ทางเพศของตัวอย่างเอ็มบริโอทั้ง 50 ตัว แสดงไว้ในตารางที่ 3.5 พบว่ามีเอ็มบริโอจำนวน 49 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์เพศได้ (98% ของเอ็มบริโอทั้งหมด) มีเพศเมีย 28 ตัวอย่าง (56%) และเพศผู้ 21 ตัวอย่าง (42%) มีเอ็มบริโอ 1 ตัวอย่างที่ไม่พบแถบ DNA (2%) เพราะตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR โดยไม่เห็นแถบ DNA ดังรูปที่ 3.8 Lane 38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)

Lane M	DNA marker		
Lane 1	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 1	Lane 7	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 7
Lane 2	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 2	Lane 8	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 8
Lane 3	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 3	Lane 9	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 9
Lane 4	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 4	Lane 10	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 10
Lane 5	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 5	Lane 11	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 11
Lane 6	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 6	Lane 12	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 12

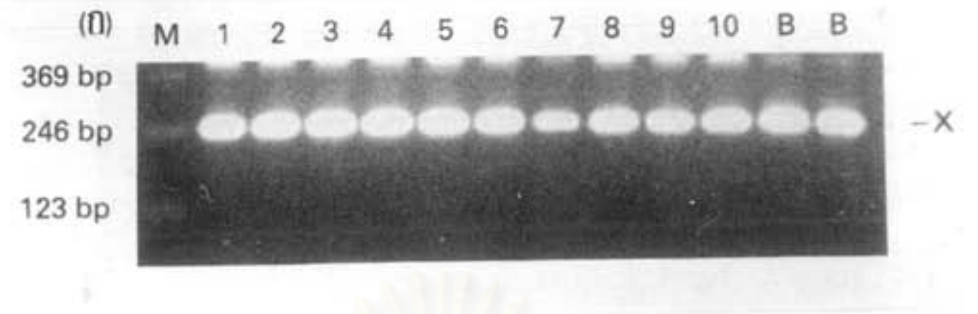
รูปที่ 3.5(ก) ผลการทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ทาง PCR โดยโคเพศเมีย 12 ตัว

(ข)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Lane M	DNA marker		
Lane 1	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 1	Lane 7	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 7
Lane 2	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 2	Lane 8	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 8
Lane 3	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 3	Lane 9	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 9
Lane 4	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 4	Lane 10	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 10
Lane 5	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 5	Lane 11	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 11
Lane 6	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 6	Lane 12	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 12

รูปที่ 3.5 (ข) ผลการทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ทาง PCR โดยโคเพศผู้ 12 ตัว



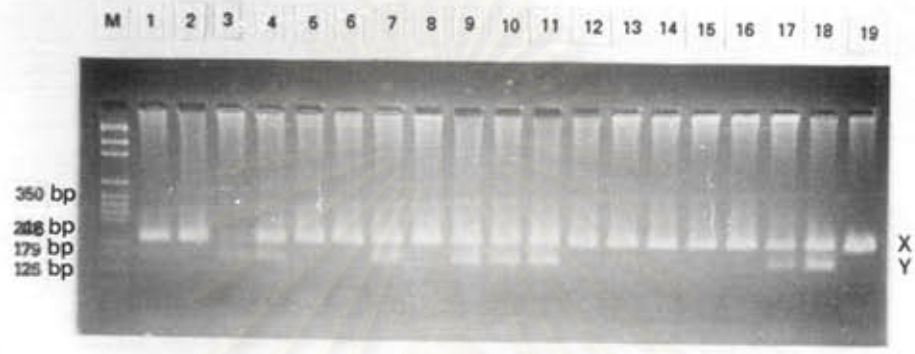
Lane M	DNA marker		
Lane 1	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 1	Lane 7	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 7
Lane 2	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 2	Lane 8	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 8
Lane 3	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 3	Lane 9	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 9
Lane 4	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 4	Lane 10	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 10
Lane 5	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 5	Lane B	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 1
Lane 6	DNA สกัดจากเลือดคนเพศเมีย คนที่ 6	Lane B	DNA สกัดจากเลือดโคเพศเมีย ตัวที่ 2

รูปที่ 3.6 (ก) ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเอมบริโอโค ใช้ DNA คนเพศเมีย และ DNA ของโคเพศเมียที่ทราบเพศแน่นอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

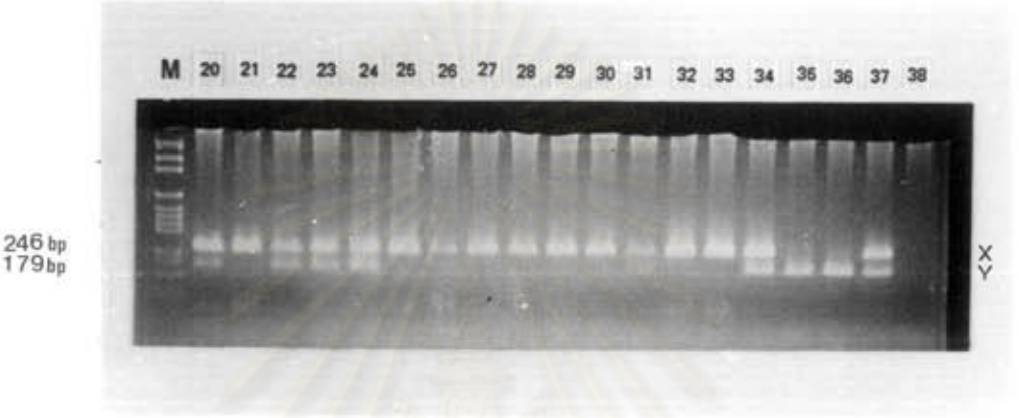
Lane M	DNA marker		
Lane 1	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 1	Lane 7	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 7
Lane 2	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 2	Lane 8	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 8
Lane 3	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 3	Lane 9	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 9
Lane 4	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 4	Lane 10	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 10
Lane 5	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 5	Lane B	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 1
Lane 6	DNA สกัดจากเลือดคนเพศผู้ คนที่ 6	Lane B	DNA สกัดจากเลือดโคเพศผู้ ตัวที่ 2

รูปที่ 3.6 (ข) ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเอมบริโอโค ใช้ DNA คนเพศผู้ และ DNA ของโคเพศผู้ที่ทราบเพศแน่นอน



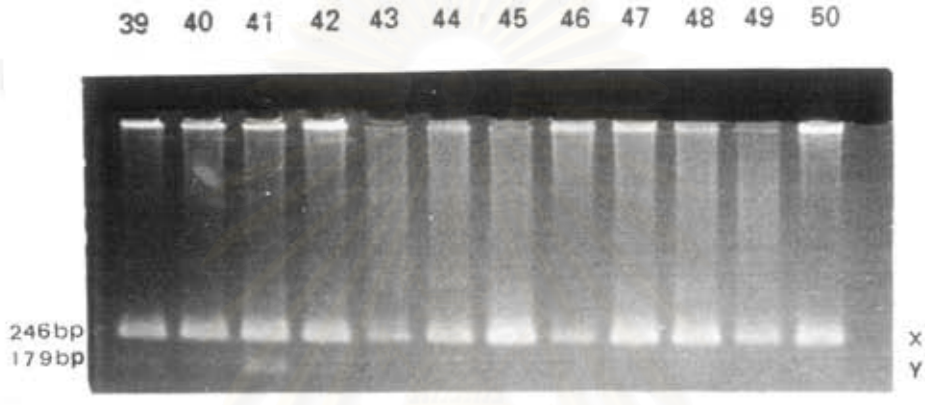
Lane M	DNA marker	Lane 10	embryo no. 10
Lane 1	embryo no. 1	Lane 11	embryo no. 11
Lane 2	embryo no. 2	Lane 12	embryo no. 12
Lane 3	embryo no. 3	Lane 13	embryo no. 13
Lane 4	embryo no. 4	Lane 14	embryo no. 14
Lane 5	embryo no. 5	Lane 15	embryo no. 15
Lane 6	embryo no. 6	Lane 16	embryo no. 16
Lane 7	embryo no. 7	Lane 17	embryo no. 17
Lane 8	embryo no. 8	Lane 18	embryo no. 18
Lane 9	embryo no. 9	Lane 19	embryo no. 19

รูปที่ 3.7 แสดงผลการวิเคราะห์เพศโคจากบลาสโตเมียร์ ของ embryo biopsies โดยวิธีการ PCR และตรวจผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis



Lane M	DNA marker	Lane 29	embryo no. 29
Lane 20	embryo no. 20	Lane 30	embryo no. 30
Lane 21	embryo no. 21	Lane 31	embryo no. 31
Lane 22	embryo no. 22	Lane 32	embryo no. 32
Lane 23	embryo no. 23	Lane 33	embryo no. 33
Lane 24	embryo no. 24	Lane 34	embryo no. 34
Lane 25	embryo no. 25	Lane 35	embryo no. 35
Lane 26	embryo no. 26	Lane 36	embryo no. 36
Lane 27	embryo no. 27	Lane 37	embryo no. 37
Lane 28	embryo no. 28	Lane 38	embryo no. 38

รูปที่ 3.8 แสดงผลการวิเคราะห์เพศโคจากบลาสโตเมียร์ของ embryo biopsies โดยวิธีทาง PCR และตรวจผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis



Lane 39	embryo no. 39	Lane 45	embryo no. 45
Lane 40	embryo no. 40	Lane 46	embryo no. 46
Lane 41	embryo no. 41	Lane 47	embryo no. 47
Lane 42	embryo no. 42	Lane 48	embryo no. 48
Lane 43	embryo no. 43	Lane 49	embryo no. 49
Lane 44	embryo no. 44	Lane 50	embryo no. 50

รูปที่ 3.9 แสดงผลการวิเคราะห์เพศโดจากบลาสโตเมียร์ของ embryo biopsies โดยวิธีทาง PCR และตรวจผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.5 สรุปผลการวิเคราะห์เพศด้วยผลิตภัณฑ์ PCR จากรูปที่ 3.7, 3.8 และ 3.9

เลขที่ของเอ็มบริโอ	ขนาดแถบ DNA ของผลิตภัณฑ์ (bp)	เพศที่วิเคราะห์ได้
เลขที่ 1 (Lane 1 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 2 (Lane 2 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 3 (Lane 3 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 4 (Lane 4 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 5 (Lane 5 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 6 (Lane 6 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 7 (Lane 7 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 8 (Lane 8 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 9 (Lane 9 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 10 (Lane 10 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 11 (Lane 11 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 12 (Lane 12 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 13 (Lane 13 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 14 (Lane 14 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 15 (Lane 15 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 16 (Lane 16 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 17 (Lane 17 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 18 (Lane 18 รูปที่ 3.7)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 19 (Lane 19 รูปที่ 3.7)	246	เพศเมีย
เลขที่ 20 (Lane 20 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 21 (Lane 21 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 22 (Lane 22 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 23 (Lane 23 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 24 (Lane 24 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 25 (Lane 25 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 26 (Lane 26 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 27 (Lane 27 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 28 (Lane 28 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 29 (Lane 29 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 30 (Lane 30 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 31 (Lane 31 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 32 (Lane 32 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 33 (Lane 33 รูปที่ 3.8)	246	เพศเมีย
เลขที่ 34 (Lane 34 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 35 (Lane 35 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 36 (Lane 36 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 37 (Lane 37 รูปที่ 3.8)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 38 (Lane 38 รูปที่ 3.8)	ไม่มีผล	-
เลขที่ 39 (Lane 39 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 40 (Lane 40 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 41 (Lane 41 รูปที่ 3.9)	246 และ 179	เพศผู้
เลขที่ 42 (Lane 42 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 43 (Lane 43 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 44 (Lane 44 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 45 (Lane 45 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 46 (Lane 46 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 47 (Lane 47 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 48 (Lane 48 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 49 (Lane 49 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย
เลขที่ 50 (Lane 50 รูปที่ 3.9)	246	เพศเมีย