การศึกษาเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะ หนูขาวในห้องทดลอง

สมพร ดวนใหญ่ จำเนียร สัตยาพันธุ์ อุไรวรรณ ชีวเจริญ

ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

การทดลองครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการในการเพาะเลี้ยงคัพภะหนูขาวในห้องทดลอง ใช้หนูขาวเพศเมีย อายุประมาณ 8 สัปดาห์ จำนวน 100 ตัว ทำการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟอง ด้วยการฉีด– *PMSG 10 iu.* เข้าช่องท้อง หลังจากนั้นอีก 48 ช.ม. ฉีด *HCG 10 iu.* เข้าช่องท้อง แล้วนำไปผสมกับพ่อพันธุ์ ตรวจ *Vaginal plug* เช้าวันรุ่งขึ้นนำหนูที่ได้รับการผสมไปฆ่าโดยการดึงคอ ตัดเก็บท่อนำไข่ ใช้เข็มเบอร์ 30 *G* ต่อเข้ากับไซริงค์ขนาด 1 มล. สอดเข้าท่อนำไข่ และฉีดน้ำยาเพาะเลี้ยงคัพภะ ล้างคัพภะออกจากท่อนำไข่เก็บคัพภะจากท่อนำไข่ ในระยะ 2 *cells*, 4 *cells* และ 8 *cells* หลังจากฉีด *HCG* แล้ว 48, 60 และ 72 ชม. ตามลำดับนำคัพภะที่เก็บได้ไปทำการเพาะเลี้ยงโดยวิธี *micro-droplet* ภายในตู้อบ 37 *C* และปรับสภาพอากาศในตู้อบเป็น 5% ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผสมในอากาศ ตรวจการเจริญของคัพภะทุก ๆ 24 ชม. หลังจากการเพาะเลี้ยงคัพภะสิ้นสุดลง ปรากฏว่า จากการเพาะเลี้ยงคัพภะ ระยะ 2 *cells* จำนวน 418 ฟอง ระยะ 4 *cells* จำนวน 154 ฟอง และระยะ 8 *cells* จำนวน 63 ฟอง คัพภะสามารถเจริญไปเป็นระยะ *blastocyst* ได้เพียง 10 ฟอง, 4 ฟอง และ 33 ฟองตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงคัพภะในห้องทดลองเป็นวิธีการที่ช่วยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการเจริญหรือแบ่งตัวของคัพภะ ว่ามีปัจจัยอะไรมาเกี่ยวข้องบ้าง ซึ่งก็มีการนำเอาวิธีการนี้มาช่วย ทำให้การถ่ายฝากคัพภะ *(embryo transfer)* ประสบผลสำเร็จดียิ่งขึ้น อาทิเช่น การนำเอาวิธีการเพาะเลี้ยงคัพภะในห้องทดลอง ทดสอบความอยู่รอดของคัพภะที่ผ่านการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 5 *C* หรือเก็บในสภาพแช่แข็ง *(-196 C)* ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากให้แก่ตัวรับในสภาพจริง ๆ ทำให้การทดสอบทำได้สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย แต่การเพาะเลี้ยงคัพภะในห้องทดลองเป็นวิธีการที่มีเทคนิคและวิธีการที่เกี่ยวข้องด้วยหลายประการ การที่จะนำเอามาใช้ก็จึงจำเป็นต้องศึกษาเทคนิคและวิธีการที่เกี่ยวข้องให้มากพอ เพื่อที่เมื่อนำมาใช้จะทำให้มีข้อผิดพลาดน้อยที่สุดและได้รับประโยชน์มากที่สุด การศึกษาครั้งนี้ มุ่งศึกษาเทคนิคและวิธีการต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงคัพภะในห้องทดลอง โดยใช้หนูขาวเป็นสัตว์ทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลองใช้หนูขาวพันธุ์ *Swiss mice* เพศเมีย อายุประมาณ 8 สัปดาห์จำนวน 100 ตัว และเพศผู้ อายุประมาณ 8 - 10 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว เลี้ยงในกล่องพลาสติก และเก็บไว้ในโรงเรือนหลังคามุงกระเบื้อง

2. ฮอร์โมนที่ใช้ในการ *superovulation* ใช้ *PMSG* และ *HCG*

3. อุปกรณ์ในการเก็บคัพภะ ได้แก่ เข็มเบอร์ 30, *petri dish, forceps,* กรรไกร, น้ำยาล้างเก็บคัพภะจากท่อนำไข่ ใช้ *culture media*[8] *pipette* ดูดเก็บคัพภะ, *stereoscope, slide* หลุม

4. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงคัพภะ

4.1 CO_2 *incubator* ที่ปรับอุณหภูมิและ CO_2 ได้เองโดยอัตโนมัติ

4.2 culture medium

4.3 paraffin (Lab grade) weight/ml = 0.83-0.89 Gm ที่ 20 *C*

4.4 Plastic petri dish สำหรับ *culture* ใช้ขนาด 50 *X 12 mm*

5. กล้องสำหรับตรวจคัพภะ ใช้กล้อง *Inverted microscope*

วิธีการ

1. การเลี้ยงดูหนูทดลองเลี้ยงในโรงเรือนที่มีอุณหภูมิไม่แน่นอนให้น้ำตลอดเวลา ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง และเปลี่ยนวัสดุรองพื้น สัปดาห์ละ 3 - 4 ครั้ง

2. การเตรียมฮอร์โมนในการทำ *superovulation* เจือจาง *PMSG* และ *HCG* ด้วยน้ำเกลือให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ และเก็บฮอร์โมนที่เจือจางแล้วไว้ในตู้เย็น *-20 C* การนำมาใช้แต่ละครั้งจะนำขวดเก็บฮอร์โมนมาละลาย แล้วใช้ *syringe* ขนาด 1 *ml* ดูดฮอร์โมนมาตามต้องการและเก็บขวดฮอร์โมนที่เหลือแช่ตู้เย็น -20 *C* ต่อไป

3. การทำ *superovulation* และเก็บคัพภะ ฉีด *PMSG 10 iu* เข้าช่องท้องหนูตัวเมียที่จะใช้หลังจากนั้นอีก 48 ชม.ฉีด *HCG 10 iu* เข้าช่องท้อง แล้วนำไปผสมกับพ่อพันธุ์ในอัตราส่วน 1:2 ถึง 1:3 ตรวจ *Vaginal plug* วันรุ่งขึ้น เก็บคัพภะระยะ 2 *cells* หลังจากฉีด *HCG* แล้ว 48 ชม. 4 *cells* และ 8 *cells* หลังจากฉีด *HCG* แล้ว 60 ชม. และ 72 ชม. ตามลำดับ การเก็บคัพภะจะทำการฆ่าหนูด้วยวิธีการดึงคอ ตัดเอา *oviduct* ทั้ง 2 ข้างใส่ใน *petri dish* หยด *culture media* ลงไปด้วย 1 หยด ใช้เข็มเบอร์ 30 *G* ที่ต่อเข้ากับ *Tuberculin syringe* ซึ่งดูดน้ำยาล้างเก็บคัพภะไว้แล้ว สอดปลายเข็มเข้า *oviduct* ด้านที่ต่อกับปีกมดลูก โดยใช้กล้อง *stereoscope* และ *forceps* ช่วย จากนั้นฉีด *culture media* เข้าไปในท่อนำไข่ จะทำให้คัพภะภายในท่อนำไข่ถูกล้างออกมา คัพภะที่เก็บได้จะดูดมารวมกันไว้ใน *slide* หลุมที่มี *culture media* อยู่

4. การเตรียม *media* ตามวิธีของ *Whittingham (1971)*

5. การเพาะเลี้ยงคัพภะใช้วิธี *micro droplet* โดยดัดแปลงวิธีการของ *Brinster (1963)* ซึ่งมีขั้นตอนพอสรุปได้คือ ก่อนการเพาะเลี้ยงคัพภะจะเตรียม *petri dish* ที่จะเพาะเลี้ยงคัพภะไว้ โดยหยด *culture media* หยดละประมาณ 0.2-0.4 *ml* ลงบน *plastic petri dish 4* หยด แล้วดูด *paraffin* เติมลงไปใน *petri dish* ประมาณ 8 *ml* จากนั้นนำ *petri dish* เข้าตู้ CO_2 *incubator* ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 37 *C* และปรับอากาศภายในไว้ 5% Co_2 *in Air* เมื่อล้างเก็บคัพภะจากหนูได้แล้ว ใช้ *fine pasteur pipette* ดูดคัพภะมาใส่ใน *microdrop* ของ *media* ที่เตรียมไว้ใน *petri dish* หยดละ 5-10 ใบ นำ *petri dish* เข้าตู้ CO_2 *incubator* ตรวจการเจริญของคัพภะทุก ๆ 24 ชม. ด้วยกล้อง *inverted microscope* แล้วนำไปใส่ *petri dish* ที่ตรวจแล้วเข้าตู้ CO_2 *incubator* ต่อไปจนครบ 72 ชม.

ในการทดลองครั้งนี้จะทำการเพาะเลี้ยงคัพภะจากการเตรียม *media 3* ครั้ง คือ

ครั้งที่ 1 เตรียม *media* แบบ *bulk* ปรับ *pH* ด้วย 100% CO_2 และ 1*N NaOH* ให้ได้ *pH* 7.4 การเพาะเลี้ยงใช้ *paraffin* ที่ไม่ได้ทำการ *equilibrate* กับ *media*

ครั้งที่2เตรียม*media*แบบ *bulk*ปรับ *pH* ด้วย *NaOH* และ *HCl* ให้ได้ *pH 7.3* การเพาะเลี้ยงใช้ *paraffin* ที่ *equilibrate* และไม่ได้ *equilibrate* กับ *media*

ครั้งที่ 3 เตรียม *media* จาก *stock sol* ปรับ *pH* ด้วย 1*N NaOH* ให้ได้ *pH 7.3* การเพาะเลี้ยงใช้ *paraffin* ที่ *equilibrate* และไม่ได้ *equilibrate* กับ *media*

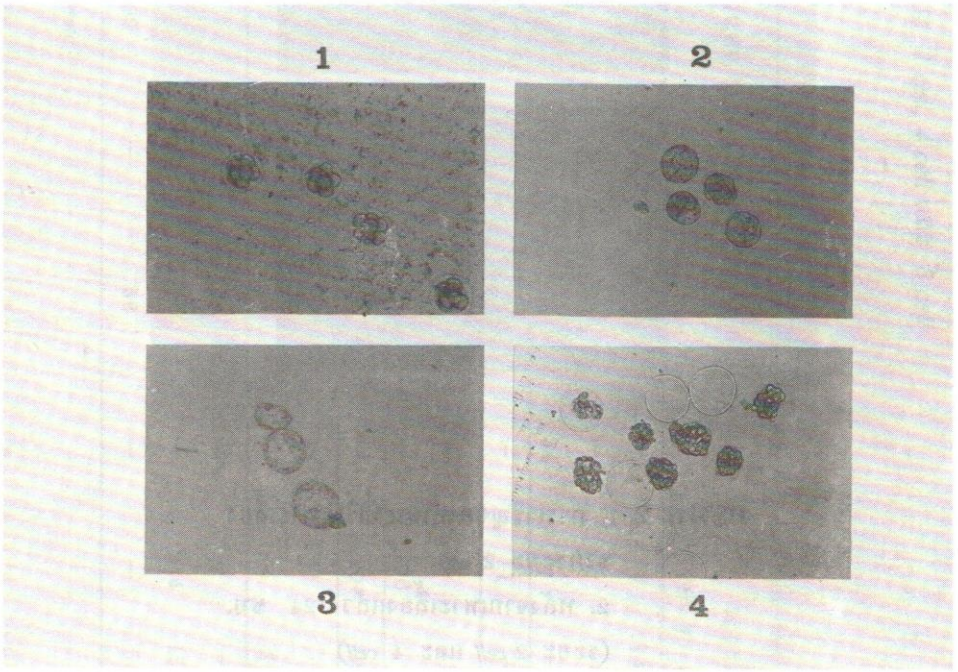
ผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงคัพภะระยะ 2 *cells* จำนวนทั้งสิ้น 418 ฟอง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 72 ชม. มีคัพภะที่อยู่ในระยะ 2 *cells = 244* ฟอง, 4 *cells = 154* ฟอง *morula = 10* ฟอง, และ *blastocyst = 10* ฟอง คัพภะระยะ 4 *cells* จำนวน 56 ฟอง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 60 ชม. จะมีคัพภะอยู่ในระยะ 8 *cells = 50* ฟอง, *morula = 1* ฟอง, *blastocyst = 4* ฟองและ *degenerate = 1* ฟอง สำหรับคัพภะระยะ 8 *cells*

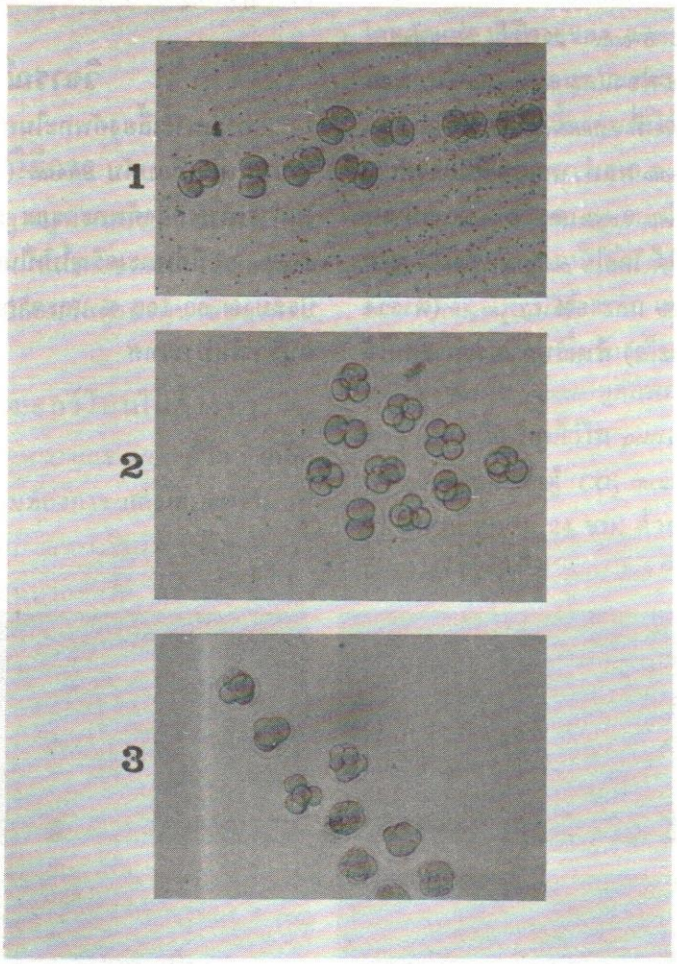
จำนวน 63 ฟอง หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48 ชม. จะมีคัพภะอยู่ในระยะ 8 *cells* = 29 ฟอง, *blastocyst* = 15 ฟอง, *hatched* = 18 ฟองและ *degenerate* = 1 ฟอง เมื่อดูถึงการใช้ *paraffin* ที่ *equilibrate* และไม่ได้ *equilibrate* กับ *culture media* ผลปรากฏว่า ในการเพาะเลี้ยงคัพภะระยะ 2 *cells*, 4 *cells* และ 8 *cells* สามารถเจริญเป็นระยะต่อไปได้ โดยใช้ *paraffin* ที่ไม่ได้ *equilibrate* กับ *culture media* และ 5% CO_2 *in Air* (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1 และ 2) สำหรับการเร่งการตกไข่ปรากฏว่าหนูมีการตกไข่ โดยเฉลี่ย 8 ฟอง

วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงคัพภะในครั้งนี้ ได้ผลค่อนข้างต่ำมาก เมื่อเทียบกับ *Brinster* (1963) ซึ่งรายงานว่าในการเพาะเลี้ยงคัพภะระยะ 2 *cells* โดยวิธี *micro droplet* จะมีคัพภะเจริญไปเป็นระยะ *blastocyst* ได้ประมาณ 60-100 % และจากการเพาะเลี้ยงคัพภะหนูขาวในประเทศ



ภาพที่ 1 1. การเจริญของคัพภะที่เริ่มเพาะเลี้ยงจากระยะ 8 *cell*
2. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. (ระยะ *blastocyst*)
3. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48 ชม. (ระยะ *hatched blastocyst*)
4. หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 60 ชม. (ระยะ *hatched blastocyst*)



ภาพที่ 2 1. การเจริญของคัพภะที่เริ่มเพาะเลี้ยงจากระยะ 2 *cell*
2. หลังจากเพาะเลี้ยงแล้ว 24 ชม. (ระยะ 2 *cell* และ 4 *cell*)
3. หลังจากเพาะเลี้ยงแล้ว 72 ชม. (ระยะ 4 *cell* ฟอง, 8 *cell* 1 ฟอง และ *morula* 4 ฟอง

ตารางที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยงคัพภะระยะ *2 cell, 4 cell* และ *8 cell*

media การเตรียม *pH*	*paraffin* ที่ใช้	จำนวนหนู (ตัว)	ระยะเริ่มเพาะเลี้ยง (ฟอง) *2 cell*	*4 cell*	*8 cell*	ระยะหลังเพาะเลี้ยง (ฟอง) *2 cell*	*4 cell*	*8 cell*	*cell* 10	10	18	–
			218	–	–	66	132	–	10	10	–	–
1. *bulk 7.4*	*non-*	40	–	6	–	–	–	–	1	4	–	1
	Equilibrate		–	–	34	–	–	–	–	15	18	1
7.35	*Equlibrate*	8	11	–	–	11	–	–	–	–	–	–
2. *bulk*			–	12	–	–	12	–	–	–	–	–
7.35	*non-Equilibrate*	15	106	–	–	106	–	–	–	–	–	–
3. เตรียมจาก 7.31	*Equilibrate*	13	42	–	–	20	22	–	–	–	–	–
Stock 7.29	*non-Equilibrate*		41	–	–	41	–	–	–	–	–	–
sol		24	–	38	–	–	38	–	–	–	–	–
			–	–	29	–	–	29	–	–	–	–
			418	–	–	244	154	–	10	10	–	–
รวม		100	–	56	–	–	50	–	1	4	–	1

M = morula, B = blastocyst, H = hatched, D = degenerate

ไทย โดยใช้ *culture media* เช่นเดียวกับในภาพทดลองนี้ จันทร์เพ็ญ (2528) รายงานว่า สามารถเพาะเลี้ยงคัพภะระยะ 2 *cells* ให้เจริญไปเป็นระยะ *blastocyst* หลังจากปรับสภาพต่าง ๆ ให้ดีเพียงพอแล้วถึง 39.08% ซึ่งสาเหตุที่การเพาะเลี้ยงคัพภะได้ผลต่ำมากก็น่าจะเนื่องมาจาก 1. ไม่ได้ทำการปรับ *pH* ของ *media* ก่อนนำมาใช้ ซึ่งในการปรับ *pH* ของ *media* หลังจากเตรียมจากการทดลองครั้งนี้จะปรับด้วย 100 % CO_2, *1N HCI* และ *1N NaOH pH* หลังจากปรับแล้วจะอยู่ในช่วง 7.3-7.4 ซึ่งก็เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงคัพภะ[8] *media* ที่ปรับแล้ว จะเก็บไว้ในตู้เย็น - 20 *C* ก่อนใช้จะนำมาละลาย แต่ไม่มีการปรับหรือวัด *pH* ก่อนใช้ซึ่งตามปกติแล้ว การเก็บ *media* ที่เตรียมแล้วแนะนำให้เก็บที่ 5 % CO_2 *in Air*[3] หรือเก็บที่ *5°C* แต่ภายในหลอดที่เก็บ *media* ต้องอัดด้วย 5% CO_2 *in Air* และก่อนใช้ต้องปรับ *pH* โดยการอัดอากาศที่มี 5 % CO_2 *in Air* เข้าไปใน *culture media* ทุกครั้งก่อนที่จะมีการใช้หรือทุกครั้งที่เปิดขวดเก็บ *media*[2,6]

ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า ในขณะที่มีการเก็บ *culture media* จะมีการเปลี่ยนแปลง *pH* ไปซึ่งจะมีผลต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะ และจากการวัด *pH* ของ *media* ชุดที่เตรียมครั้งที่ 3 หลังจากที่นำมาใช้แล้ว ปรากฏว่า *pH* ของ *media* สูงถึง 8.1

2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม *media* ไม่บริสุทธิ์พอ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีบางส่วนที่เป็น *Lab Grade* คือ *NaCl, KCI* และ $Na\,HCO_3$ ซึ่ง *Whittingham* (1971) รายงานว่า การที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงคัพภะได้ผลดี ควรใช้สารเคมีที่เป็น *Reagent grade*

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคัพภะไม่พร้อมและอยู่กระจัดกระจายไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงาน อาทิเช่น ขาด 5 % CO_2 *in Air* ที่จะใช้ในการปรับ *pH* ของ *media* แม้ว่าเคยพยายามปรับ *pH* ของ *media* โดยการเก็บไว้ในตู้ CO_2 *incubator* ซึ่งปรับบรรยากาศภายในไว้ 5 % CO_2 *in Air* และอุณหภูมิ *37°C* ไว้นาน 12 ชม. ก่อนนำมาใช้ ตามวิธีการของ *Dandekar* และ *Quigley* (1984) ก็ตาม แต่ก็ปรากฏว่า *pH* ของ *media* เป็นกรดโดยดูจากสีของ *phenol red* ซึ่งกลายเป็นสีเหลือง และเนื่องจากอุปกรณ์อยู่กระจัดกระจายกัน เช่น การล้างเก็บคัพภะ และ CO_2 *incubator* อยู่ห่างกันคนละหน่วย (ห่างกันประมาณ 20 เมตร) เวลาที่นำคัพภะที่จะเพาะเลี้ยงใส่ *micro drop* แล้วต้องเดินมาที่ *incubator* ก็อาจทำให้เกิดการกระทบกระเทือนต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะได้

4. บรรยากาศภายใน CO_2 *incubator* ไม่ได้ปรับให้มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 % แม้ว่าจะปรับสภาพอากาศและอุณหภูมิเหมาะสมแล้วก็ตาม แต่ก็น่าจะมีผลต่อการเพาะเลี้ยงคัพภะมากกว่าปัจจัยอื่น ๆ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงคัพภะจะทำภายใต้ *paraffin* ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้มีการระเหยน้ำออกจาก *culture media*[4]

สำหรับสาเหตุที่การตกไข่ของหนูค่อนข้างต่ำ ซึ่งตามปกติแล้ว หากไม่มีการทำ *superovulation* หนูควรตกไข่ 12-15 ฟอง และหากทำ *superovulation* ก็ควรตกไข่ 20-40 ฟอง ที่เป็นเช่นนี้ก็อาจเนื่องมาจาก *hormone* เสื่อมคุณภาพไป เนื่องจากการเก็บรักษาและการนำมาใช้ไม่ดีพอ คือไม่ได้แบ่งเก็บ *hormone* ออกเป็นโด๊สย่อย ๆ สำหรับการใช้ในแต่ละครั้ง และอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่เลี้ยงหนูสูงเกินไป ตามปกติแล้ว หนูควรอยู่ในช่วงอุณหภูมิ *70-75°F*[2,7] แต่ในขณะทำการทดลอง ก.พ. - เม.ย. 29 อุณหภูมิจะผันแปรไปมาก คือ อยู่ระหว่าง 75-95 *°F* และการที่คัพภะสามารถเจริญได้เมื่อใช้ *paraffin* ที่ไม่ได้ทำการ *equilibrate* กับ *culture media* ก็สอดคล้องกับ *Whittingham* (1971) ซึ่งรายงานว่า เมื่อเพาะเลี้ยงคัพภะตั้งแต่ระยะ 2 *cells paraffin* ที่ใช้ไม่จำเป็นต้อง *equilibrate* กับ *culture media* ก็ได้

เอกสารอ้างอิง

1. จันทร์เพ็ญ พันธุ์สิน และ; มณีวรรณ กลมพัฒนะ.

2528. ความสัมพันธ์ระหว่างการเร่งการตกไข่การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลองของหนูไมล์. น 65 - 66 ในบทคัดย่อ การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 23 สาขาสัตวแพทย์, 6-7 กุมภาพันธ์ 2528. ม.เกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร

2. *Bigger, J.D; W.K.Whitten and D.G. Whittingham. 1971. The culture of mouse embryos in Vitro, p. 86-116. In J.C.Daniel, Jr(ed). Methods in mammalian embryology. W.H.Freeman and company, San Francisco.*
3. *Brinster, R.L. 1963. A Method for in Vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. Exp. cell Res. 32 : 205-208.*
4. *Brinster, R.L. 1969. Mammalian embryo culture, p. 419-444. In E.S.E. Hafez and R.J.Blandau (ed). The Mammalian Oviduct. The University of Chicago Press, Chicago.*
5. *Dandekar, P.V. and M.M.Quigley. 1984. Laboratory setup for human in Vitro fertilization. Fertil. Steril. 42(1) : 1 - 11.*
6. *Hoppe, P.C. and S.Pitts. 1973. Fertilization in Vitro and development of mouse ova. Biol Repro. 8 : 420 - 426.*
7. *Rafferty, K.A., Jr. 1970. Methods in Experimental embryology of the mouse. The Johns Hopkins press, Baltimore and London. 85 p.*
8. *Whittingham D.G. 1971. Culture of Mouse Ova. J. Reprod. Fert. 14 : 7-21.*

Study on Cultivation of Mouse Embryo in Vitro.

Somporn Donyai Chamnean Satayapan Uraiwan Chewacharoen

Dept of Animal Science, College of Agriculture, Kasetsart University.

Abstract

The purpose of this experiment was to study the cultivation of mouse embryo in Vitro according to the limited facilities in Thailand. One hundred eight-weeks old Swiss mice were superovulated by intra-peritoneal injection of 10 iu. PMSG, followed 48 hours later by 10 iu. HCG. The injected females were placed with fertiled male at the time of the second injection and checked for vaginal plugs the following morning. Two-cell, four-cell and eight-cell embryos were collected from fallopian tube by flushing with culture medium 48, 60 and 72 hours after HCG injection respectively. Embryos were cultured by microdroplet method maintained at 37 C under 5 % Co_2 in Air. The number of embryos developed to blastocyst after cultivation of two-cell, four-cell and eight-cell embryos were 10 out of 418, 4 out of 154 and 33 out of 63 embryos, respectively.