เทคนิคการแช่แข็งและตรวจสอบความอยู่รอดของคัพภะกระต่าย

จำเนียร สัตยาพันธุ์ สมพร ดวนใหญ่ อุไรวรรณ ชีวเจริญ

ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บทคัดย่อ

การศึกษาการทำคัพภะกระต่ายแช่แข็งจากกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ลูกผสมจำนวน 8 ตัว ที่ทำการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองด้วยฮอร์โมน *PMSG* 60 ถึง 150 *i.u.* จากนั้น 72 ช.ม. กระตุ้นด้วย *LCG* 60, 75 และ 100 *i.u.* ให้กระต่ายได้รับการผสมพันธุ์แล้วทำการเก็บคัพภะจากท่อนำไข่ หลังจากฉีด *LCG* แล้ว 63 ช.ม. คัพภะที่เก็บได้ทั้งหมด 48 ฟอง นำมาทำการแช่แข็ง 5 ฟอง ส่วนที่เหลือ ตรวจสอบด้วยสารวิธีใช้สารเรืองแสง *(FDA)* เพาะเลี้ยง *in Vitro* และตรวจสอบความอยู่รอดของคัพภะ ผลของการทดลองคัพภะได้ตายไปทั้งหมด ซึ่งอาจจะเกิดเนื่องจากวิธีการทดลองยังไม่ถูกต้องและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

การถ่ายฝากคัพภะเป็นวิธีการหนึ่งที่อาจใช้ได้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เช่นเดียวกับการผสมเทียมโดยจะช่วยให้แม่พันธุ์ที่ดี สามารถให้ลูกได้มากขึ้น เฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ที่ให้ลูกตัวเดียวอาทิ โค กระบือหากจะเปรียบเทียบการถ่ายฝากคัพภะกับการผสมเทียม จะเห็นว่าในการถ่ายฝากคัพภะนั้น แม่พันธุ์ที่ดีก็เปรียบเหมือนพ่อพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว แม่พันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วจะถูกชักนำให้ตกไข่หลาย ๆ ฟอง แล้วได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่ดี ต่อมาเมื่อถึงกำหนดเวลาที่เหมาะสมก็จะทำการเก็บคัพภะจากแม่พันธุ์นั้น แล้วนำมาเก็บรักษาให้มีคุณภาพดี จนกว่าจะทำการถ่ายฝากคัพภะนั้นให้ตัวรับต่อไป ในประเทศไทยเทคโนโลยีการถ่ายฝากคัพภะยังเป็นเรื่องใหม่ ซึ่งก็น่าทำการศึกษาและประยุกต์เอาเทคโนโลยีนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ควบคู่ไปกับการผสมเทียม

การทดลองนี้ก็เพื่อทำการศึกษาวิธีการ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยใช้กระต่ายเป็นสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เพราะกระต่ายมีปริมาณคัพภะมาก หาง่ายกว่าคัพภะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ที่มีขนาดใหญ่ เช่น โค กระบือ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง ใช้กระต่ายเพศเมียโตเต็มวัยลูกผสมพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์× พื้นเมืองจำนวน 8 ตัว พ่อพันธุ์ใช้กระต่ายลูกผสมพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ xพื้นเมือง จำนวน 2 ตัว

2. อุปกรณ์ในการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองและล้างเก็บคัพภะ ได้แก่ ฮอร์โมน *PMSG,HCG, tuberculin syringe,watch glass,Ringer's solution+20%rabbit serum*[6]

3. อุปกรณ์ในการตรวจหาคัพภะ ได้แก่ กล้อง *stereoscope,pasteur pipette, watch glass,petri dish*

4. อุปกรณ์ในการตรวจคุณภาพคัพภะ ได้แก่ กล้อง *light microscope,* กล้อง *fluorescence microscope, stock sol.* ของ 1 *mg/ml FDA* ใน *Acetone,petri dish, pasteur pipette*

5. อุปกรณ์ในการทำคัพภะแช่แข็ง ได้แก่ หลอด *ampule, alcohol bath (ethanol 95%* และ *dryice), cryothermometer* ที่วัดอุณหภูมิได้ตั้งแต่ -200°c ถึง 30° c, *forceps,* ถังบรรจุไนโตรเจนเหลวและไนโตรเจนเหลว, *freezing medium* คือ *PBS+50% rabbit serum*[5]

6. อุปกรณ์ในการละลายคัพภะแช่แข็ง ได้แก่ *petri dish,pasteur pipette,* กล้อง *Stereoscope*

7. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงคัพภะ *in vitro* ได้แก่ *plastic culture disk (10x35 mm),paraffin oil, pasteur pipette, culture medium* คือ *Ringer's sol.+ 50% rabbit serum*

วิธีการ

1. การทำ *superovulation* และ การเก็บคัพภะ ชักนำการตกไข่ครั้งละหลาย ๆฟอง ในกระต่ายตัวเมียด้วยฮอร์โมน *PMSG 60 iu* จำนวน 3 ตัว,150 *iu* จำนวน 3ตัว ไม่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน *PMSG* จำนวน 2 ตัว ต่อมาอีก 72 ชั่วโมง ฉีด *HCG* เข้าเส้นเลือด 60 *iu,75 iu,100 iu,100 iu* และ 100 *iu* ให้แก่กระต่ายที่ได้รับการฉีด *PMSG 60 iu* จำนวน 2 ตัว,*150 iu* จำนวน 2 ตัว,60 *iu* จำนวน 1 ตัว, 150 *iu* จำนวน 1 ตัว และไม่กระตุ้นด้วย *PMSG* จำนวน 2 ตัว ตามลำดับ หลังจากฉีด *HCG* แล้วนำไปผสมพ่อพันธุ์ จากนั้นอีก 63 ชั่วโมงทำการเก็บคัพภะระยะ *late morula* โดยฆ่ากระต่ายด้วยวิธีดึงคอเปิดผนังท้อง ใช้ด้ายผูกท่อนำไข่และมดลูก นำมาใส่ใน*petri dish* ที่สะอาด ตัดแยกท่อนำไข่และปีกมดลูกออกจากกัน ใช้ *pasteur pipette* ดูด *Ringer's sol+20% rabbit serum* สอดเข้าท่อนำไข่ล้างคัพภะออกจากท่อนำไข่ลงในสไลด์หลุม การล้างคัพภะจากปีกมดลูกทำเช่นเดียวกับท่อนำไข่

2. การตรวจคุณภาพและการทำคัพภะแช่แข็ง คัพภะที่เก็บได้จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 นำไปตรวจคุณภาพด้วย *FDA,* กลุ่มที่ 2 นำไปทำคัพภะแช่แข็ง ตามวิธี *Nieman,et al (1982)* และตรวจความอยู่รอดของคัพภะหลังจากแช่แข็งด้วยวิธี *in-vitro* และเพาะเลี้ยง

2.1 การประเมินคุณภาพด้วย *FDA* มีขั้นตอนคือ ก่อนทำการตรวจจะหมักคัพภะด้วย 5*ul stock sol. FDA* และ 2 *ml Freezing medium* นาน 5 นาที จากนั้นใช้ *pasteur pipette* ดูดคัพภะมาไว้ในสไลด์หลุมที่มี *Fresh Freezing medium* อยู่และนำไปตรวจด้วยกล้อง *fluorescence microscope* หลังจากตรวจแล้วจะแบ่งคัพภะออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ให้ *FDA+* ทั้งเซล(สี *brilliant green*),กลุ่มที่ 2ให้ *FDA* เป็นบางส่วนของเซล,กลุ่มที่ 3 ให้ *FDA-*

2.2 การทำคัพภะแช่แข็ง ซึ่งมีขั้นตอนคือ

การทำแช่แข็ง *(Deep freezing)*

ก. ดูดคัพภะที่ทำการแช่แข็งและ *Freezing medium 0.1 ml*ลงในหลอด *ampule*

ข. เติม *Freezing medivm* และ 3*M DMSO 0.03 ml, 0.03 ml* และ 0.04 *ml* ลงในหลอด *ampule* ที่มีคัพภะอยู่โดยเติมห่างกันช่วงละ 10 นาที และปล่อยให้หมักไว้ประมาณ 15 นาที หลังจากเติมครั้งสุดท้ายแล้ว (ความเข้มข้นของ *Freezing medium* จะเป็น *PBS+50% rabbit serum+1.5 M DMSA*) จากนั้นทำการ *seal* ปลายหลอด *ampule* ด้วยเปลวไฟที่ใช้เป่าแก้ว

ค. นำหลอด *ampule* ที่บรรจุคัพภะใส่ลงไปใน *alcohol bath* จากนั้นค่อย ๆเติม *dry ice*ที่ทุบเป็นก้อนเล็ก ๆ ลงไป พยายามคน *alcohol* ให้หมุนเวียนตลอดเวลา ควบคุมอุณหภูมิให้ลดลงตามต้องการโดยการเติม *dry ice* ให้เร็วขึ้นหรือช้าลง ในการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้อง ถึง $-7^{\circ}c$ ให้ลดในอัตรา $1^{\circ}c$ / นาที ที่อุณหภูมิ $-7^{\circ}c$ ทำการ *seeding* โดยใช้ปลาย *forceps* ที่ทำให้เย็นจัด (โดยจุ่ม *forceps* ลงในไนโตรเจนเหลว) แตะหลอด *ampule*

ง. จาก $-7^{\circ}c$ ลดอุณหภูมิถึง $-28^{\circ}c$ ในอัตรา $0.3^{\circ}c$ /นาที

จ. จาก $-28^{\circ}c$ ลดอุณหภูมิถึง $-35^{\circ}c$ ในอัตรา $0.1^{\circ}c$ /นาที

จากนั้นย้ายหลอด *ampule* จุ่มลงในถังไนโตรเจนเหลว *(-196° c)*

การทำละลาย *(Thawing)*

นำหลอด *ampule* ที่บรรจุคัพภะแช่แข็งมาจุ่มในน้ำอุ่น $30^{\circ}c$(อัตราการละลาย $300^{\circ}c$ /นาที)

เมื่อละลายแล้วดูดคัพภะออกจากหลอด *ampule* มาใส่ในสารละลาย *PBS+1.5M DMSO+0.5M Sucrose* 2 นาที จากนั้นดูดคัพภะมาใส่ในสารละลาย *PBS+0.5M Sucrose*อีก 2 นาที[2] คัพภะที่ทำละลายและเจือจางเอา *DMSO* ออกแล้ว จะนำไปตรวจความอยู่รอดด้วย *FDA* และ เพาะเลี้ยง *in Vitro* ต่อไป

3. การตรวจความอยู่รอดโดยวิธี เพาะเลี้ยง *in Vitro* มีขั้นตอนคือ ใส่ *paraffin* ประมาณ *6 ml* ลงใน *plastic petri dish* จากนั้นใช้ *Fine pasteur pipette* ดูดคัพภะและ *Culture medium 0.5 ml* ไปใส่ไว้ใต้ *paraffin* และตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง และตรวจการพัฒนาของคัพภะทุก 24 ชั่วโมง

4. การบันทึกข้อมูล

ก. บันทึกจำนวนคัพภะที่เก็บได้

ข. บันทึกความอยู่รอดของคัพภะด้วยวิธี *FDA* และเพาะเลี้ยง *in Vitro*

ผลการทดลอง

จำนวนคัพภะที่เก็บได้จากการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองรวมทั้งสิ้น 48 ฟองโดยเก็บได้จากการชักนำให้ตกไข่ด้วย *PMSG 60 iu* และ *HCG 60 iu* จำนวน 6 ฟอง; *PMSG 60 iu* และ *HCG 100 iu* จำนวน 7 ฟอง ; *PMSG 150 iu* และ *HCG 100 iu* จำนวน 10 ฟอง และไม่ให้ *PMSG* แต่กระตุ้นการตกไข่ด้วย *HCG 100 iu* จำนวน 17 ฟอง (ตารางที่ 1) คัพภะที่เก็บได้เมื่อนำไปทำการแช่แข็งจำนวน 5 ฟอง ตรวจคุณภาพด้วย *FDA* จำนวน 32 ฟอง, เพาะเลี้ยง *in Vitro* หลังจากทำการแช่แข็งแล้ว 5 ฟอง หรือเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกับการตรวจ *FDA* จำนวน 3 ฟอง ผลปรากฏว่าการตรวจคัพภะด้วยวิธี *FDA* หรือเพาะเลี้ยง *in Vitro* ไม่สามารถให้คำตอบได้ว่าคัพภะมีชีวิตรอดหรือไม่ เนื่องจากการปฏิบัติต่าง ๆ ในการตรวจด้วย *FDA* หรือเพาะเลี้ยง *in Vitro*ยังมีความชำนาญไม่เพียงพอ

ตารางที่ 1 ปริมาณคัพภะที่เก็บได้จากการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ใบ

กระต่ายตัวที่	ขนาดของฮอร์โมนที่ใช้ *(iu)*		ปริมาณ	คัพภะที่เก็บได้	หมายเหตุ
	PMSG	*HCG*	*CL*		
1	60	60	5	—	—
2	60	60	?	6	แช่แข็ง 5 ฟอง, เพาะเลี้ยง *in Vitro* 1 ฟอง
3	60	100	?	7	ตรวจ *FDA* 7 ฟอง
4	150	75	17	—	—
5	150	75	22	—	—
6	150	100	?	18	ตรวจ *FDA* 17 ฟอง, เพาะเลี้ยง *in Vitro* 1 ฟอง
7	—	100	?	9	ตรวจ *FDA* 8 ฟอง, เพาะเลี้ยง *In Vitro* 1 ฟอง
8	—	100	11	8	—
			รวม	48 ฟอง	

วิจารณ์

คัพภะที่เก็บได้จากการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลายๆใบด้วย *HCG 60 iu* (ตัวที่ 1-3) หรือด้วย *PMSG 150iu* และ *HCG 75iu* ค่อนข้างต่ำหรือเก็บไม่ได้เลย ขัดแย้งกับที่มีรายงานว่าการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองในกระต่ายปริมาณฮอร์โมนที่เหมาะสมคือ *PMSG 150iu* และ *HCG 50iu*[1] หรือ *PMSG 60iu*[4] อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระดับของ *HCG* เป็น 100*iu* ก็ทำให้สามารถเก็บคัพภะได้สูงขึ้นดังเช่นกระต่ายตัวที่ 3 และ 6 อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อใช้ *PMSG 60iu* หรือ 150*iu* ระดับ *HCG* ที่ใช้ร่วมด้วยต่ำเกินไปทำให้การตกไข่ลดลงซึ่ง *Varian,et al* (1967) รายงานว่าเมื่อชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองในกระต่ายด้วย *FSH* หากได้รับ *LH* น้อยกว่า 0.5 *mg/kg* จะทำให้การตกไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ *($P < 0.10$)* นอกจากนั้น ในกระต่ายตัวที่ 4-5 ซึ่งได้รับ *PMSG150iu* เก็บคัพภะไม่ได้เลย อาจเป็นเพราะได้รับขนาดของ *PMSG* สูงเกินไป ดังที่ *Kennelly and Foote 1965)* ได้รายงานว่าในการชักนำให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองด้วย *FSH* หากใช้ระดับของ *FSH* สูงเกินไป จะทำให้เก็บคัพภะได้ลดลงเนื่องจากเกิด *cytic follicle* หรือ *haemorrhagic follicle*

สำหรับการนำคัพภะไปทำแช่แข็ง,ตรวจด้วย *FDA* หรือเพาะเลี้ยง *in Vitro* ที่ไม่สามารถให้คำตอบได้แน่ชัดก็เนื่องจาก สาเหตุต่าง ๆ คือ

1. การขาดประสบการณ์และความชำนาญของผู้ทำการวิจัย อาทิ การตรวจคุณภาพคัพภะด้วย *FDA*การตรวจที่ได้ผลนั้น มีคำแนะนำให้ใช้ *exciter filter* และ *barrier filter* ของกล้อง *fluorescence* เบอร์ *KP 490* และ *Lp 500* จึงจะทำให้เห็นการเรืองแสงของคัพภะได้ แต่ในขณะที่ไม่พบการเรืองแสงของคัพภะได้อย่างเด่นชัด อาจเนื่องจากประสบการณ์ในการใช้กล้อง *fluorescence* ไม่ดีพอ และในการตรวจแต่ละครั้งก็ใช้เวลาค่อนข้างนาน

2. อุปกรณ์ไม่เพียงพอ อาทิ ในการเพาะเลี้ยงคัพภะ *in Vitro* นั้นสภาพที่เหมาะสมต้องเพาะเลี้ยงในตู้อบ ที่ปรับอุณหภูมิ 37°c และบรรยากาศในตู้อบเท่ากับ 5% CO_2 *in Air* ดังนั้นการที่นำคัพภะใส่ในหยดของ *Culture medium* ภายใต้ *paraffin* และทิ้งไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องก็ไม่น่าที่จะช่วยให้คำตอบว่าคัพภะมีชีวิตรอด

เอกสารอ้างอิง

1. *Hafez,E.S.E.1971. Rabbits. Pages 273-298. In: Reproduction and Breeding Technique for Laboratory Animals. Lea & Febiger, Philadelphia.*
2. *Kasai,M; Niwa K; and Iritani,A.1980. Survival of mouse embryos, and thawed rapidly.J.Reprod.Fert.59: 51-56.*
3. *Kennelly,J.J.; and Foote,R.H. 1965. Superovulatory response of pre-and post-pubertal rabbits to commercially available gonadotrophins.J. Reprod.Fert.9:177-188.*
4. *Rottomann, O.-J.; and Lampeter,W.W.1981. Davelopment of early mouse and rabbit embryos without Zona pellucida.J.Reprod.Fert.61:303-306.*
5. *Tsunoda,Y.;and Sugie,T.1977. Effect of the freezing medium on the survival of rabbit eggs after deep freezing. J.Reprod.Fert.50:123-124.*
6. *Tsunoda,Y;Soma ;T;and Sugie,T. 1982.Effect of post-ovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae.J.Reprod.Fert.65:483-487.*
7. *Varian,N.B.;Maurer,R.R.;and Foote,R.H.1967. Ovarian response and cleavage rate of ova in control and primed rabbit receiving varying levels ofLuteinizing hormone. J.Reprod.Fert.13:67-73.*

Deep Freezing Technigue and Survival Test of Rabbit Embryo

Chamnean Satarapunt Somporn Donyai Uriwan Chevacharoen

Department of Animal Science, College of Agriculture,
Kasetsart University, Bangkhen , Thailand

On the study of deep frozen rabbit embryoes 8 New Zealand White crossbreed does were used. The does were induced to ovulate several eggs at a time using PMSG(60/150 i.u.) followed by LCG (60 , 75 and 100i.u.) 72 hours there after. Forty-eight embryoes were recovered from the oviducts 63 hours after the last injection. Five of these embryoes were deepfrogen (-196 °c) while the rest were checked for quality using the method ofFDA., in-vitro culture and test for survival ability, respectively. All embryoes were dead. However, the regults obtained could have arisen from the lack of experience of the operator.