RESEARCH ARTICLE

Effect of Serum Types on Interferon-Tau and B-cell Lymphoma 2 Expression in Bovine Embryo Production

Apiradee Swannakorn[1], Chainarong Navanukraw[1,2*], Saruttiwong Boonkong[1], Vilaivan Khanthusaeng[1], Suthipong Uriyapongson[1], Kanokwan Jarukamjorn[3], Pissamai Yuenyao[4]

Abstract

Objective—The study was conducted to determine the effect of serum types on Interferon-Tau (IFN-τ) and BCL-2 expression in bovine embryos production.

Materials and Methods—Bovine ovaries (n=54) were obtained at a local slaughterhouse. Oocytes were cultured in TCM-199 supplemented with serum type as treatments (10% BSA, 10% FCS, and 10% ECS, respectively). Mature oocytes were placed in Fert-TALP media for fertilization. Total cellular RNA samples were extracted from frozen embryos. RNA samples were used for cDNA synthesis using a reverse transcription. A relative abundance mRNA of IFN-τ and BCL-2 was determined by a quantitative real-time RT-PCR.

Results—The recovery rates of oocytes and the percentages of healthy oocytes were significantly greater in 3-8 mm follicles than in <3 mm follicles ($P<0.01$). Percentages of mature oocytes in TCM-199 supplemented with 10% FCS, ECS and BSA were not significantly different ($P>0.05$) compared to the control. Percentages of fertilized embryos supplemented with 10% FCS, ECS and BSA were also not significantly different ($P>0.05$) compared to the control. Cleavage rates of 4-8 cells and morula stage supplemented with 10% FCS, ECS and BSA were significantly greater than ($P<0.01$) that of the control. However, relative abundance mRNA of IFN-τ and BCL-2 expression among treatments were not significantly different ($P>0.05$).

Conclusion—Although serum types in this study did not affect IFN-τ and BCL-2 mRNA expression, they affected the maturation of oocytes and *in vitro* embryos production.

KKU Vet J. 2012;22(1):29-40. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: *In vitro* embryo production; Serum; IFN-τ; BCL-2

[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002. [2]Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, 10900 and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy: (ABRCSE), Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002. [3]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002. [4]Department of obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002.

[*]**Corresponding author** E-mail: chanav@kku.ac.th

ผลของชนิดซีรัมต่อการแสดงออกของโปรตีนอินเทอร์เฟียรอนทาว และบีเซลล์ลิมโฟมา 2 ในการผลิตเอ็มบริโอของโค

อภิรดี สวรรค์นคร[1], ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์[1,2*], ศรุติวงศ์ บุญคง[1],
วิไลวรรณ ขันธุแสง[1], สุทธิพงศ์ อุริยะพงศ์สรรค์[1], กนกวรรณ จารุกำจร[3], พิสมัย ยืนยาว[4]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของชนิดซีรัมต่อการแสดงออกของโปรตีนอินเทอร์เฟียรอนทาว และ B-cell lymphoma 2 (BCL-2) ในการผลิตเอ็มบริโอของโค

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ (n=54) และนำเอาโอโอไซต์ทำการเพาะเลี้ยงใน TCM-199 แบ่งออกเป็น 4 ทรีทเมนต์ ดังนี้ ทรีทเมนต์ที่ 1 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงไม่มีการเสริมซีรัม ทรีทเมนต์ที่ 2 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเสริมด้วย BSA 10% ทรีทเมนต์ที่ 3 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเสริมด้วย FCS 10% และทรีทเมนต์ที่ 4 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเสริมด้วย ECS 10% โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำยา Fert-TALP ทำการแช่แข็งเอ็มบริโอและสกัด RNA จากนั้นนำตัวอย่าง RNA เพื่อทำ reverse transcription จนกระทั่งได้ cDNA และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC ศึกษาปริมาณของ mRNA ของโปรตีน IFN-τ และ BCL-2 ในตัวอย่างเอ็มบริโอด้วยวิธี quantitative real-time RT-PCR

ผลการศึกษา พบว่าความสามารถในการเก็บได้ของโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลขนาด 3-8 มิลลิเมตร สูงกว่าฟอลลิเคิลขนาดน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เปอร์เซ็นต์การเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วย TCM-199 เสริมด้วย FCS, ECS และ BSA 10 เปอร์เซ็นต์ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของเอ็มบริโอในกลุ่มที่เสริมด้วย FCS, ECS และ BSA 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม (P>0.05) นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอในระยะ 4-8 เซลล์และมอรูล่า ที่เสริมด้วย FCS, BSA และ ECS 10 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.01) อย่างไรก็ตามปริมาณ mRNA ของ IFN-τ และ BCL-2 ในการผลิตเอ็มบริโอของโคในแต่ละทรีทเมนต์ไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05)

ข้อสรุป ชนิดซีรัมที่เสริมไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน IFN-τ และ BCL-2 อย่างไรก็ตามชนิดซีรัมที่เสริมส่งผลต่อการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์และการผลิตเอ็มบริโอของโคภายนอกร่างกาย

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2555;22(1):29-40. http://vmj.kku.ac.th/

คำสำคัญ: การผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย ซีรัม อินเทอร์เฟียรอนทาว บีซีแอลทู

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
[3]ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
[4]ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002
[*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: chanav@kku.ac.th

บทนำ

การผลิตโคเนื้อในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมีการนำเทคโนโลยีการย้ายฝากเอ็มบริโอ (embryo transfer) เข้ามาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์กว้างขวางขึ้น เนื่องจากวิธีการดังกล่าวเป็นการกระจายพันธุกรรมที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว แต่พบว่าการย้ายฝากเอ็มบริโอมีข้อจำกัดอยู่ ส่งผลให้การย้ายฝากเอ็มบริโอไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร โดยในขั้นตอนของการย้ายฝากเอ็มบริโอมีกระบวนการที่สำคัญ คือการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอก่อนที่จะทำการย้ายฝากเอ็มบริโอเข้าไปในตัวแม่ [1] โดยน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอภายนอกร่างกายเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีส่วนประกอบของสารสำคัญต่างๆ เช่น โปรตีน ฮอร์โมน ยาปฏิชีวนะ เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปใช้ในการพัฒนาระบบต่างๆ ของเซลล์ การสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการฝังตัว และการพัฒนาการของเอ็มบริโอ ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีการเสริมแหล่งโปรตีนให้กับเอ็มบริโอโดยทำการเสริมในน้ำยาเพาะเลี้ยงในแต่ละระยะของการพัฒนาของเอ็มบริโอ ยกตัวอย่าง เช่น fetal calf (FCS), estrous cow (ECS) และ bovine serum albumin (BSA) เป็นต้น โดยการที่เอ็มบริโอจะเข้าฝังตัวในมดลูกของแม่ได้นั้นจะต้องเกิดกระบวนการที่เรียกว่า การยอมรับการตั้งท้อง (maternal recognition of pregnancy) โดยพบว่าเอ็มบริโอโคและแกะในระยะ บลาสโตซีสมีการสร้างโปรตีน คือ อินเทอร์เฟียรอนทาวจากโทรโฟบลาส และส่งสัญญาณไปกระตุ้นผนังมดลูกชั้นใน ซึ่งมีตัวรับสัญญาณอยู่ เช่น CXCL10, LGALS15 [2] โดยพบว่า IFN-τ จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ $PGF_2\alpha$ และสนับสนุนการคงสภาพของ corpus luteum (CL) ซึ่งเป็นแหล่งในการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน เพื่อรักษาสภาพภายในมดลูกให้เหมาะสมต่อการฝังตัวของเอ็มบริโอ นอกจากนั้นโปรตีนตระกูล BCL-2 ยังแบ่งออกได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการตายของเซลล์ (BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCl-1) และกลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการตายของเซลล์ (BAX, BAK, BAD, BCL-XS) จากการทดลองของ Rizos et al. [1] พบว่ามีปริมาณของ BCL-2 โปรตีนสูงในกลุ่มโอโอไซต์และเอ็มบริโอที่มีคุณภาพดี และมีการเกิดการตายของเอ็มบริโอในปริมาณที่น้อย ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณของ BAX โปรตีนมีปริมาณสูงในกลุ่มโอโอไซต์ และเอ็มบริโอที่มีคุณภาพไม่ดี ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดซีรัมต่อปริมาณของ mRNA ของ IFN-τ และ BCL-2 ในการผลิตเอ็มบริโอของโคภายนอกร่างกาย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วิธีการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านความเห็นชอบโดยคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Reference No. 0514.1.12.2/48) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงออกเป็น 4 ทรีทเมนต์ ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงไม่มีการเสริมซีรัม

ทรีทเมนต์ที่ 2 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเสริมด้วย BSA 10%

ทรีทเมนต์ที่ 3 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเสริมด้วย FCS 10%

ทรีทเมนต์ที่ 4 ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเสริมด้วย ECS 10% ซึ่งเตรียมจากการเจาะเลือดโคตัวเมียที่เป็นสัดในช่วง standing heat นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกส่วนของซีรัม และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 ºC เป็นเวลา 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC

สัตว์ทดลอง

เก็บรังไข่จำนวน 54 รังไข่จากแม่โคลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองไทย อายุ 3-5 ปี น้ำหนักประมาณ 200-400 กิโลกรัม จากโรงฆ่าสัตว์ในเทศบาลนครขอนแก่น แล้วนำมายังห้องปฏิบัติการภายในเวลา 2 ชั่วโมง ระหว่างการขนส่งรังไข่ถูกรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 37 ºC เก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-8 มิลลิเมตร โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 18 จากนั้นนำของเหลวจากฟอลลิเคิลใส่ลงในจานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90 x15 มิลลิลิตร (Nuclon® Delta, Nalge Nunc International, Denmark) เติมสารละลาย dPBS (Gibco, N.Y., USA) 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาส่องหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereomicroscope, Olympus SZ-ST, Japan) ล้างโอโอไซต์ 3 ครั้งในน้ำยา dPBS ทำการประเมินคุณภาพของโอโอไซต์ตามวิธีการของ Gordon [3]

การเตรียมโอโอไซต์เพื่อพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ทั้งสองกลุ่มมาล้างในน้ำยาเพาะเลี้ยง (TCM-199; Sigma, St. Louis, M.O., USA เสริมด้วย 10% ซีรัมในกลุ่มทดลองและยาปฏิชีวนะ 1%) 3 ครั้ง เพาะเลี้ยงในจานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 x 10 มิลลิลิตร แล้วปิดทับด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 ºC CO_2 5% และความชื้น 99% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hochi et al. [4]

การเตรียมอสุจิและการปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิมาล้างด้วยสารละลาย dPBS ก่อนทำการปฏิสนธิ นำโอโอไซต์ไปใส่ในจานที่มี fertilization medium 250 ไมโครลิตร (Tyrode medium กับ 25 ไมโครลิตร Na-lactate 22 นาโนโมล Na-Py 1 นาโนโมล fatty acid-free BSA 6 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ heparin-sodium salt (184 units/mg heparin; Calbiochem, San Diego, A, USA) นำอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ดีมาปั่นเหวี่ยงด้วยสาร

Percoll ที่มีความเข้มข้น 90% (Pharmacia, Uppsala, Sweden) เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในที่สุดจะได้อสุจิที่มีชีวิตรอดและส่วนที่เป็นชิ้นเล็กๆประมาณ 90% นำไปทำความสะอาดด้วยเครื่อง Hepe-buffered Tyrode แล้วย้ายเข้าไปใส่ใน microdrops เพื่อทำการปฏิสนธิ หลังจากปฏิสนธินำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 ºC ความเข้มข้น CO_2 5% และความชื้น 99% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยดัดแปลงจากวิธีของ Rizos et al. [1]

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกายและการแช่เข็งเอ็มบริโอ

เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ปฏิสนธิแบบนอกร่างกายสัตว์โดยทำการแยกส่วนของน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่มโดยแยก microdrops และเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 ºC CO_2 5% และความชื้น 99% เป็นระยะเวลา 5-7 วัน เปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงทุกๆ 24 ชั่วโมง ศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเอ็มบริโอในแต่ละระยะ (ระยะ 4-8 เซลล์ ระยะมอรูล่า และระยะบลาสโตซีส) โดยประเมินสัณฐานวิทยาในวันที่ 3 4 และ 5 ตามลำดับ ตามวิธีของ Gandhi et al. [5] เมื่อได้เอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสนำมาแช่ในสารละลายแช่แข็ง ซึ่งประกอบด้วย TCM-199 เสริมด้วยกลีเซอรอล (Sigma, St. Louis, M.O., USA) 20% เป็นเวลา 1 นาที แล้วบรรจุลงในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร ยาว 2 เซนติเมตร ที่มี TCM-199 บรรจุอยู่และกั้นด้วยฟองอากาศ นำหลอดบรรจุเอ็มบริโอมาทำให้สัมผัสกับไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -170 ºC 3 นาที จากนั้นจึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาเพื่อรอการวิเคราะห์

การสกัดและการประเมินคุณภาพของ RNA

สุ่มตัวอย่างเอ็มบริโอมาทำละลายโดยการนำหลอดบรรจุเอ็มบริโอสัมผัสอากาศ 10 วินาที นำมาจุ่มในน้ำอุ่น 36 ºC 3 นาที ตั้งหลอดขึ้นแล้วเขย่าให้สารละลายทั้ง 2 เข้ากัน จากนั้นจึงนำเอ็มบริโอออกจากหลอดและล้างด้วยสารละลาย TCM-199 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ดัดแปลงตามวิธีการของ Van et al. [6] จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป High pure RNA tissue kit® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ทำการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ตามวิธีการของ Rizos et al. [1] แล้วนำตัวอย่าง RNA ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 ºC เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การทำ Reverse transcription

ทำ Reverse transcription (RT) โดยใช้ชุดสกัด Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) โดยเตรียม หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม RT reaction ปริมาตรรวม 11.4 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 4 ไมโครกรัม total RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2.5 ไมโครโมล Anchoredoligo (dT) 18 Primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 60 ไมโครโมล Random Hexamer Primer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำ PCR grade ปริมาตร 6.4 ไมโครลิตร) จากนั้นนำหลอด PCR นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 ºC เป็นเวลา 10 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4-6 ºC จากนั้นนำหลอด PCR มาเตรียมส่วนผสมอื่นๆให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2000 rpm เวลา 30 วินาที นำหลอด PCR เข้าไปในเครื่อง PCR ตาม

โปรแกรม Reverse Transcription ที่อุณหภูมิ 50 ºC 30 นาที 1 รอบ และ หยุดปฏิกิริยา 10 นาที นำตัวอย่าง cDNA มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ºC

การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดย Quantitative real-time RT-PCR ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ Chromo 4 TM Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad Laboratories Inc. California, USA) ประกอบด้วย 96-well reaction และตั้งโปรแกรม ดังนี้ Pre-Incubation 1 รอบ 95 ºC เป็นเวลา10 นาที Amplification 50 รอบ ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำมาทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) โดยใช้ PROC ANOVA [7] เปรียบเทียบขนาดของฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์ โดยการทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) [8] การพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ การปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอภายนอกตัวสัตว์ของโค และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ mRNA ของ IFN-τ และ BCL-2 ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ผลการศึกษา

ผลของขนาดฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์

จากการศึกษาพบว่าฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์ในการเก็บโอโอไซต์ สูงกว่าฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร (57.2 และ 49.3%, (P<0.01)) ดังแสดงใน **Table 1**

Table 1. The Recovery Rate of Oocyte Obtained from Bovine Ovaries

Follicle size (mm)	No. of follicle	No. of oocyte	% Recovery of healthy oocyte
3-8	1208	691	57.2[a]
< 3	827	408	49.3[b]
total	2035	1099	

[a, b] Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.01).

ผลของชนิดซีรัมที่เสริมในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ TCM-199 ต่อการพัฒนาความพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์โคในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกตัวสัตว์

จากการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงด้วย

TCM-199 เสริมด้วย 10% BSA สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมด้วย 10% FBS, 10% ECS และกลุ่มควบคุม (54.7, 50.0, 51.6 และ 43.2% ตามลำดับ) ดังแสดงใน **Table 2**

Table 2. Effect of Serum Types on *In Vitro* Maturation of Bovine Cumulus-oocyte Complexes

Supplementation	No. of collected oocyte	No. of mature oocyte	% Mature oocyte
Control	256	110	43.2[c]
10% BSA	256	140	54.7[a]
10% FCS	256	128	50.0[b]
10% ECS	256	131	51.6[b]

[a, b, c] Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.01).

Table 3. Effect of Serum Types on *In Vitro* Fertilization and *In Vitro* Culture in Bovine Embryos Production

Supplementation	% Embryos fertilization	% Cleavage of embryos		
		4-8 cell	morula	blastocyst
Control	38.2[b] (42/110)	100.0 (15/15)	24.6[c] (4/15)	0.0[c] (0/15)
10% BSA	41.2[a] (58/140)	100.0 (57/57)	38.6[a] (22/57)	8.8[a] (5/57)
10% FCS	41.1[a] (53/128)	100.0 (50/50)	26.0[b] (13/50)	6.0[b] (3/50)
10% ECS	39.8[b] (54/131)	100.0 (54/54)	27.8[b] (17/54)	7.4[b] (4/54)

[a, b, c] Means in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.01).

ผลของชนิดซีรัมที่เสริมในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอภายนอกตัวสัตว์

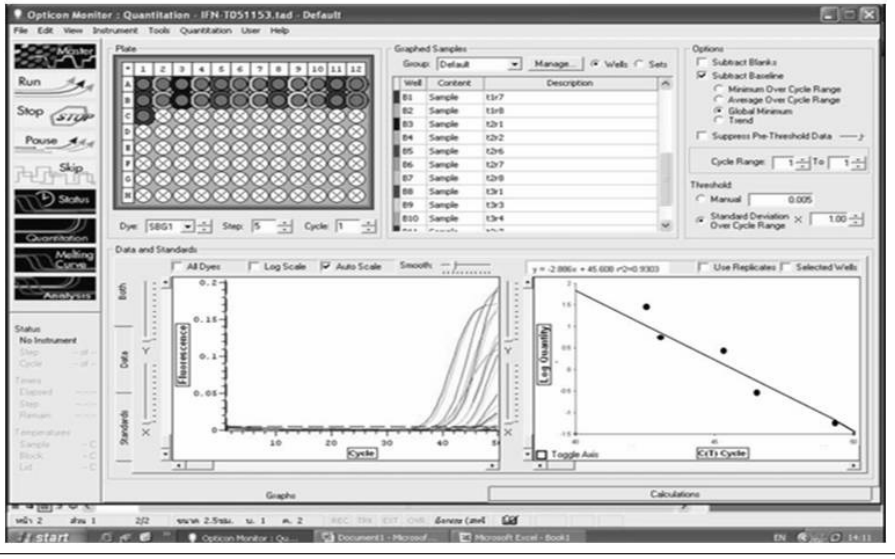
จากการศึกษาสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกตัวสัตว์ โดยเสริมซีรัม 3 ชนิด พบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของเอ็มบริโอในกลุ่มที่ทำการเสริม 10% FCS และ 10% BSA สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมด้วย 10% ECS และกลุ่มควบคุม (41.2, 41.1, 39.8 และ 38.2% ตามลำดับ)

การเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอโคที่เสริมด้วย BSA มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอระยะมอรูล่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ในกลุ่มที่เสริม FCS ECS และกลุ่มควบคุม (38.6, 26.0, 27.8 และ 24.6% ตามลำดับ) และระยะบลาสโตซีสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ในกลุ่มที่เสริม FCS ECS และกลุ่มควบคุม (8.8, 6.0, 7.4 และ 0.0 % ตามลำดับ) ดังแสดงใน **Table 3**

ผลของซีรัมที่เสริมในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณของ mRNA ของIFN-t และ BCL-2 ในโค

จากการศึกษาผลของชนิดซีรัมที่เสริมในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ในโค จากภาพการส่งสัญญาณของ mRNA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Quantitative Real-time RT-PCR ดังแสดงใน **Figure 1**

Figure 1. The Quantitative mRNA Expression[a]



[a]Using The Chromo 4 TM Four Color Read-Time Detector (Bio-Rad, California, USA)

การเปรียบเทียบผลของชนิดซีรัมที่เสริมต่อปริมาณ mRNA ของเอ็มบริโอ พบว่า ปริมาณ mRNA ของเอ็มบริโอที่เสริมซีรัมทั้งสามชนิด คือ BSA FCS และ ECS ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณ mRNA ของ IFN-τ พบว่า การเสริม ECS มีปริมาณของ mRNA ของ IFN-τ ที่สูงสุด รองลงมาได้แก่ FCS และ BSA ตามลำดับ (1.39, 0.43 และ 0.09 ตามลำดับ) ดังแสดงใน **Figure 2**

ส่วนการศึกษาการเปรียบเทียบผลของชนิดซีรัมที่เสริมต่อแสดงออกของ BCL-2 ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ผลิตแบบนอกตัวสัตว์ พบว่า ปริมาณ mRNA ของ BCL-2 เมื่อทำการเสริม

ซีรัมทั้งสามชนิด คือ BSA FCS และ ECS มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณ mRNA พบว่า การเสริม ECS มีการแสดงออกของ BCL-2 สูงสุด รองลงมาคือ FCS และ BSA ตามลำดับ (4.22, 2.16 และ 0.70 ตามลำดับ) ดังแสดงใน **Figure 3**

Figure 2. Effect of Serum Types on Relative Abundance mRNA of IFN-τ Expression in Bovine Embryos

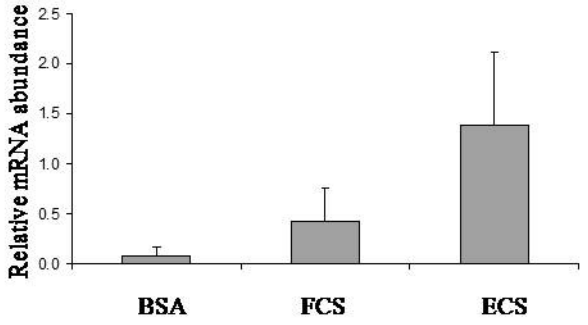
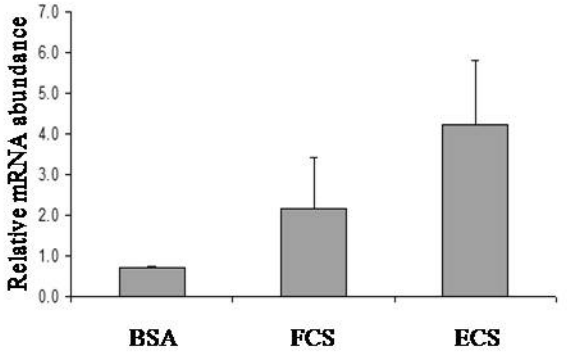


Figure 3. Effect of Serum Types on Relative Abundance mRNA of BCL-2 Expression in Bovine Embryos



วิจารณ์

จากการทดสอบผลของขนาดฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์ พบว่าฟอลลิเคิลขนาดน้อยกว่า 3 และ 3-8 มิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเก็บโอโอไซต์แตกต่างกัน (P<0.05) แสดงให้เห็นว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีผลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lonergan et al. [9] พบว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีผลต่อความสามารถใน

การเก็บโอโอไซต์แตกต่างกัน นอกจากนี้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 8 มิลลิเมตร จะใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงสั้นกว่า เนื่องจากมีการเจริญของโอโอไซต์ไปแล้วบางส่วน [5]

การเสริม FCS ECS และ BSA ในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ในการศึกษาครั้งนี้ ให้ผลต่อการพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โคไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า FCS และ ECS มีองค์ประกอบของสารต่างๆ ที่ส่งผลให้มีการพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โคได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ocana et al. [10] พบว่าการเสริม 20% ECS เปรียบเทียบกับ 20% FCS ส่งผลให้การพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โค และคุณภาพของโอโอไซต์ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมซีรัม

จากการศึกษาของ Leibfried-Rutledge et al. [11] ทำการเสริม FCS ที่ความเข้มข้น10% ในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ TCM-199 พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาการที่สมบูรณ์ของ โอโอไซต์โค เท่ากับ 73% นอกจากนี้การเสริม FCS และ ECS ยังส่งผลให้การพัฒนาของเอ็มบริโอถึงระยะบลาสโตซีสดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริม [5] ในขณะที่การศึกษาของ Wang et al. [12] ทำการเสริม FCS ที่ความเข้มข้น 5% ในสูตรน้ำยา TCM-199 ให้การพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซีส เท่ากับ 52% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ผลของชนิดซีรัมต่อการแบ่งตัวและพัฒนาการของเอ็มบริโอของโคระยะแรกไปจนถึงระยะพร้อมในการย้ายฝากเอ็มบริโอและสามารถฝังตัวในมดลูกของแม่โค (cleavage rate of embryos) พบว่าการเจริญและการพัฒนาของเอ็มบริโอโคตั้งแต่ระยะการแบ่งเซลล์ 4-8 เซลล์ไปจนถึงระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอ็มบริโอโคในระยะบลาสโตซีส มีการสร้างอินเทอร์เฟียรอนทาวจากโทรโฟบลาส และจะส่งสัญญาณไปกระตุ้นผนังมดลูกชั้นใน ซึ่งในชั้นนี้มีตัวรับสัญญาณอยู่ เช่น Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10) Galectin-15 (LGALS15) เป็นต้น [2] ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณการแสดงออกของจีน พบว่าการเสริม ECS มีแนวโน้มปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ที่สูง รองลงมาคือ FCS และ BSA ตามลำดับ (1.39, 0.43 และ 0.09 ตามลำดับ) สอดคล้องกับรายงานของ Rizos et al. [1] ได้ศึกษาการเสริมซีรัมสองชนิด คือ FCS และ BSA ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอพบว่า ปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ในกลุ่มของเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในการเสริมชนิดซีรัม มีปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมซีรัม

จากการทดลองของ Yang and Rajamahendran [13] พบว่ามีปริมาณ mRNA ของ BCL-2 สูงในกลุ่มโอโอไซต์และเอ็มบริโอที่มีคุณภาพดีและมีการเกิดการตายของเอ็มบริโอในปริมาณที่น้อย ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณของจีน BAX โปรตีนมีปริมาณสูงในกลุ่มโอโอไซต์และเอ็มบริโอที่มี

คุณภาพไม่ดี [14] จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปริมาณ mRNA ของ BCL-2 ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณการแสดงออกของจีนพบว่า การเสริม ECS มีแนวโน้มปริมาณ mRNA ของ BCL-2 ที่สูง รองลงมาคือ FCS และ BSA ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของชนิดซีรัมต่อปริมาณของ mRNA ของ IFN-τ และ BCL-2 ในการผลิตเอ็มบริโอของโค สรุปผลได้ดังนี้ (1) ขนาดฟอลลิเคิลส่งผลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์ (2) โอโอไซต์ที่คุณภาพดีส่งผลต่ออัตราการเจริญและการพัฒนาไปจนถึงระยะที่โอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิได้สูงกว่าโอโอไซต์คุณภาพไม่ดีนอกจากนี้ยังส่งผลต่อการลดลงของอัตราการตายของโอโอไซต์ (3) การเสริม FCS, ECS และ BSA ในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ส่งผลต่อการพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์และการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของโค และ (4) ชนิดซีรัมที่เสริมไม่ส่งผลต่อปริมาณของ mRNA ของ IFN-τ และ BCL-2 ดังนั้นชนิดซีรั่มที่เสริมในน้ำยาเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิและคุณภาพของโอโอไซต์ตลอดจนการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2551 ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)

เอกสารอ้างอิง

1. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or : implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003;68:236-243.
2. Allison CG, Colette AA, Phillip D, Beremand D, Youngsok C, Jennifer LF, David LA, Terry LT, Fuller WB. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. *Biol Reprod.* 2006;74:383-394.
3. Gordon I. *Reproductive technologies in farm animals.* Cab international, Wallingford, UK. 1994.
4. Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueh M, Kimura K, Hanada A. Effect of nuclear stages during *in vitro* maturation on the survival of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1998;49:787-796.
5. Gandhi AP, Lane ML, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod.* 2000;15:395-401.
6. Van W, Leeuw AM, Den Daas JHG, Kruip AM, Rall WF. Comparison of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology.* 1995;32:157-167.
7. SAS. SAS/STAT: User guide for the International Database. SAS Inst., Cary NC; 2001.
8. Steel R, Torrie J, Dickey D. *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach.* WCB/McGraw-Hill, Division of the McGraw-Hill Companies; 1997.
9. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality

and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol Reprod.* 1994;37:48-53.

10. Ocana Q, Millan MM, Merlin MP, Ortega Mariscaly MA, Franganillo AR. *In vitro* bovine embryos production: influence of and hormonal supplementation. *Arch Zootec.* 1999;48:71-74.
11. Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL. Effect of fetal calf and bovine albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod.* 1986;35:850-857.
12. Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD. The effects of bovine albumin and fetal bovine on the development of pre-and post cleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M 199 media. *Anim Reprod Sci.* 1997;48:37-45.
13. Yang MY, Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 2002;70:159-169.
14. Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *J Reprod Fertil.* 2001;121:175-180.