NUCHARIN SRIPUNYA : CRYOPRESERVATION OF GEMINAL VESICLE AND METAPHASE II STAGES BOVINE OOCYTES BY CRYOTOP AND SOLID SURFACE VITRIFICATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 61 PP.

BOVINE/OOCYTE/VITRIFICATION/SOLID SURFACE VITRIFICATION/ CRYOTOP

Cryopreservation of bovine oocytes is important for the preservation and management of genetic resources. In this study Cryotop (CT) and solid surface vitrification (SSV) were used to vitrify germinal vesical (GV) and metaphase II (MII) stages bovine oocytes. The effects of pretreatment with cytochalasin B (CB), toxicity of cryoprotectant agents (CPA), and embryos development following *in vitro* fertilization (IVF) were evaluated. In the first experiment, the efficiency of CT and SSV methods and CB pretreatment were examined on GV stage oocytes. Cumulus oocyte complexes (COCs) were placed in 10% DMSO + 10% EG for 1 min and then exposed to 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose for 30 sec. No significant differences were found among vitrified groups in maturation, cleavage and blastocyst rates after IVF. The GV stage bovine oocytes could be vitrified by CT and SSV methods with similar efficacy. Pre-treatment with CB did not increase the maturation and embryo development rates of vitrified oocytes. In the second experiment, the effects of CT and SSV vitrification methods, cryoprotectant (CPA) treatment on MII stage oocyte viability, IVF, pronucleus formation after IVF and subsequent *in vitro* development rate were assessed. After vitrified-warmed, lived oocytes were subjected to IVF and resultant embryos were cultured *in vitro*. After treatments the rates of lived oocytes were similar among the control, CPA, SSV and CT groups. There was no difference in rates of fertilization, pronuclear formation and monospermy among these groups. The cleavage rates for SSV (41.6%) and CT (53.2%) were significantly lower than

those in the control (65.9%) and CPA (61.3%) groups. The blastocyst rates in SSV (10.3%) and CT (12.8%) groups were not different, however, they were significantly lower than those in the control (36.4%) and CPA (24.8%) groups. Thus, MII stage bovine oocytes could be cryopreserved successfully using the CT and SSV methods.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2011

Student's Signature N. Sripunya

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา : การแช่แข็งโอโอไซท์โครยะ Germinal vesicle และ Metaphase II โดยวิธี Cryotop และ Solid Surface Vitrification (CRYOPRESERVATION OF GEMINAL VESICLE AND METAPHASE II STAGES BOVINE OOCYTES BY CRYOTOP AND SOLID SURFACE VITRIFICATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 61 หน้า.

การแช่แข็งไข่โคมีความสำคัญในการเก็บรักษาและจัดการแหล่งพันธุกรรม การศึกษานี้ทำการแช่แข็งไข่โคในระยะ germinal vesical (GV) และระยะ metaphase II (MII) โดยวิธี Cryotop (CT) และ Solod Surface Vitrification (SSV) โดยทำการตรวจสอบผลของการนำไข่แช่ใน cytochalasin B (CB) และความเป็นพิษของน้ำยาแช่แข็ง (CPA) รวมถึงศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากปฏิสนธิในหลอดแก้ว การทดลองแรก ทำการแช่แข็งไข่ระยะ GV ด้วยวิธี CT และ SSV โดยนำไข่ระยะ GV บ่มไว้ในน้ำยาซึ่งประกอบด้วย 10% DMSO + 10% EG เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปไว้ในน้ำยาซึ่งประกอบด้วย 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M Sucrose เป็นเวลานาน 30 วินาที พบว่าอัตราการเจริญของไข่ถึงระยะ MII การแบ่งตัวของตัวอ่อน และอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากการปฏิสนธิในหลอดแก้วไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในกลุ่มที่ทำการแช่แข็ง และยังพบอีกว่าการแช่แข็งด้วยวิธี CT และ SSV มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน การศึกษาที่สองนำไข่โครยะ MII มาทำการแช่แข็ง แล้วนำไปปฏิสนธิในหลอดแก้ว โดยตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตหลังจากการละลาย การเกิดขึ้นของโปรนิวเคลียสหลังจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และอัตราการเจริญของตัวอ่อน จากผลการทดลองพบว่า อัตราการรอดชีวิตของกลุ่มควบคุม กลุ่ม CPA กลุ่ม SSV และ กลุ่ม CT ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และยังพบอีกว่าอัตราการเกิดขึ้นของโปรนิวเคลียสหลังจากการปฏิสนธิในหลอดแก้วไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการแบ่งตัวของไข่ที่แช่แข็งด้วยวิธี SSV (41.6%) และ CT (53.2%) มีอัตราต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (65.9%) และกลุ่ม CPA (61.3%) อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของไข่ที่แช่แข็งด้วยวิธี SSV (10.3%) และ CT (12.8%) ไม่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญยังต่ำกว่ากลุ่มControl (36.4%) และ CPA (24.8%) การทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าการแช่แข็งไข่ระยะ MII ประสบผลสำเร็จได้ด้วยวิธี CT และ SSV

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม