สุจิตรา หมื่นไธสง : การเจริญของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากโอโอไซท์แช่แข็ง ด้วยวิธี Vitrification (DEVELOPMENT OF CLONED SWAMP BUFFALO EMBRYOS RECONSTRUCTED WITH VITRIFIED OOCYTES)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 127 หน้า. ISBN 974-533-473-1

จุดประสงค์ของงานวิจัยคือ การศึกษาความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนกระบือปลักจากโอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification โดยแบ่งการแช่แข็งโอโอไซท์เป็น 2 กลุ่ม คือ แช่แข็งโอโอไซท์ระยะเมตาเฟส ทู (กลุ่ม MII) และแช่แข็งโอโอไซท์หลังจากการ enucleation (กลุ่ม Enu) การแช่แข็งทำโดยนำโอโอไซท์ไป equilibrate ในน้ำยา 7.5% ethylene glycol (EG) + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) ที่ละลายใน TCM199-Hepes (TCM199H) + 20% fetal bovine serum (FBS) นาน 4, 7 หรือ 10 นาที จากนั้นนำไป vitrify ในน้ำยา 15% EG + 15% DMSO ที่ละลายใน TCM199H + 20% FBS นาน 1 นาที จัดกลุ่มโอโอไซท์ครั้งละ 5 ใบ วางที่ปลายของ Cryotop แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที การละลายโอโอไซท์ ทำโดยนำ Cryotop ออกจากไนโตรเจนเหลว แล้วจุ่มลง 0.5M ซูโครส ที่อุณหภูมิระหว่าง 22-24 °C นาน 5 นาที แล้วย้ายสู่น้ำยา TCM199H + 20%FBS จากนั้นคัดเลือกโอโอไซท์ที่มีความปกติมาใช้เป็นไซโตพลาสผู้รับในการทดลอง Parthenogenetic activation (PA) และการย้ายฝากนิวเคลียสด้วยเซลล์ร่างกาย (scNT) จากผลการทดลองหลังละลายโอโอไซท์แช่แข็งพบว่าประมาณ 71% มีชีวิตรอดหลังการละลายและประมาณ 83% ของการทดลองที่ไม่รวมกลุ่ม Enu พบว่ามี First polar body โดยหลังการทำ scNT พบว่าตัวอ่อนจากทั้งวิธี PA และ scNT ที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งมีความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนไปสู่ระยะบลาสโตซีสได้ ถึงแม้ว่าอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสน้อยกว่ากลุ่มโอโอไซท์สด ทั้งนี้ได้นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสวันที่ 6.5 ของการเลี้ยงมาย้อมสีตัวอ่อนเพื่อนับจำนวนเซลล์ระหว่าง inner cell mass cell และ trophectoderm cell พบว่าจำนวนเซลล์เฉลี่ยของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งเมื่อเทียบกับโอโอไซท์สดมีจำนวนเซลล์น้อยกว่า การทดลองนี้ได้แสดงว่าเวลาในการ equilibrate โอโอไซท์ในขั้นตอนการแช่แข็งมีผลต่ออัตราการอยู่รอดของตัวอ่อน โดยที่โอโอไซท์กระบือปลักมีความสามารถทนต่อความเป็นพิษของน้ำยาแช่แข็งได้นาน 5- 11 นาที ดังนั้นโอโอไซท์กระบือปลักสามารถนำมาใช้แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification เพื่อใช้สำหรับ Cryopreservation ได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนักศึกษา ____________
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ____________
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ____________

SUCHITRA MUENTHAISONG : DEVELOPMENT OF CLONED SWAMP BUFFALO EMBRYOS RECONSTRUCTED WITH VITRIFIED OOCYTES. THESIS ADVISOR : RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 127 PP.
ISBN 974-533-473-1

SWAMP BUFFALO/OOCYTE/VITRIFICATION/EMBRYOS/CLONING

The objective of this study was carry out in order to evaluate the developmental potential of cloned swamp buffalo embyos recontructed with cryopreserved matured oocytes by vitrification technique. The *in vitro* matured oocytes were separated into two groups, vitrified at metaphase II stage (MII) and vitrified after enucleated MII oocyte (Enu). The oocytes were equilibrated with 7.5% ethylene glycol (EG) + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) in TCM199-Hepes (TCM199H) + 20% fetal bovine serum (FBS) for 4, 7 or 10 min and vitrified in 15% EG + 15% DMSO in TCM199H + 20% FBS for 1 min. Five of each group of oocytes were placed on a sheet of cryotop device (Kitazato Supply Co., Tokyo) and immediately submerged in liquid nitrogen. One hour before starting the experiment, the vitrified oocytes were warmed by directly place the tip of cryotop in 0.5M sucrose in TCM199H + 20% FBS at 22-24$^{o}$C for 5 min then moved to TCM199H + 20% FBS. The normal morphology oocyte were used for toxicity test by parthenogenetic activation (PA) and also used for recipient cytoplasts in somatic cell nuclear transfer (scNT) experiment. After warming, appproximately 71% of the vitrified oocytes survived and found that 83% of these contain first polar body. The scNT embryos derived from vitrified oocytes can develop to blastocyst stage as fresh oocytes. However, cleavage and blastocyst development rates of vitrified oocytes

However, cleavage and blastocyst development rates of vitrified oocytes following PA and scNT were lower than the fresh oocytes. At day 6.5, embryos at blastocyst stage were differentially stained for the inner cell mass cell and trophectoderm cell. The mean cell number in the blastocysts derived from vitrified oocytes was lower than the fresh oocytes. In conclusion, the equilibration time of vitrified buffalo oocytes effect the survival rate of the embryos. The matured swamp buffalo oocytes could tolerate the toxicity of cryoprotectants for 5-11 minutes. The vitrified buffalo oocytes could develop to blastocysts. Therefore, swamp buffalo oocytes can be cryopreserved by using vitrification technique.

School of Biotechonology

Academic Year 2005

Student's Signature ______

Advisor's Signature ______

Co-advisor's Signature ______