รหัสโครงการ SUT3-304-51-36-01

รายงานการวิจัย

ผลของสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคแช่แข็งโดยวิธี direct transfer

(Effects of recipients breed on the conception rate after direct transfer of frozen cattle embryos)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-51-36-01

รายงานการวิจัย

ผลของสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคแช่แข็งโดยวิธี direct transfer

(Effects of recipients breed on the conception rate after direct transfer of frozen cattle embryos)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาระดับปริญญาโท ปริญญาเอกและผู้ช่วยวิจัยตลอดจนบุคลากรในฟาร์มของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดทุกท่าน สำหรับการดูแลสุขภาพโค การชะล้างตัวอ่อน การแช่แข็งตัวอ่อน การย้ายฝากตัวอ่อนและดูแลลูกเกิดโค ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คุณปรางค์ขาว ปรุเขตต์ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 (F1) ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการวิจัย

มิถุนายน 2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การแช่แข็งตัวอ่อนที่ผลิตในร่างกายและในหลอดแก้วด้วยวิธี slow-freezing มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสายพันธุ์โคตัวรับ bovine serum albumin (BSA) ในน้ำยาแช่แข็งและการฉีดฮอร์โมน human chlorionic gonadotropin (hCG) ต่ออัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคเนื้อแช่แข็ง ผลิตตัวอ่อนโคเนื้อด้วยการผสมเทียมน้ำเชื้อโคบราห์มันให้กับโคบราห์มันตัวรับที่กระตุ้นให้ตกไข่เป็นจำนวนมาก ในวันที่ 7 หลังการผสมเทียมทำการชะล้างตัวอ่อนออกมาด้วยน้ำยา Dulbecco phosphate buffer saline ที่มี 1% fetal bovine serum จากการชะล้างตัวอ่อน 82 ครั้ง ได้ตัวอ่อนทั้งหมด 528 ใบ ซึ่งเป็นตัวอ่อนเกรด 1 และ 2 จำนวน 369 ใบ (69.9%) ตัวอ่อนเกรด 3 และ 4 จำนวน 71 ใบ (13.4%) ตัวอ่อนที่สลายตัวจำนวน 39 ใบ (7.4%) และไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ 49 ใบ (9.3%) ทำการแช่แข็งตัวอ่อนเกรด 1 และ 2 ในน้ำยาแช่แข็งที่มี 1.5 M ethylene glycol 0.1 M sucrose และ 4 mg/ml BSA หรือ 6 mg/ml BSA ด้วยวิธี slow freezing จากนั้นทำการย้ายฝากตัวอ่อนภายใน 8 นาทีหลังจากทำละลายให้กับโคตัวรับพันธุ์พื้นเมืองผสมบราห์มัน โคพันธุ์กำแพงแสน โคนมลูกผสมที่ฉีด hCG 1500 ยูนิต อัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนสดให้กับโคตัวรับทั้ง 3 สายพันธุ์ (50-55%) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและไม่พบความแตกต่างของอัตราการตั้งท้องระหว่างโคที่ฉีดและไม่ฉีด hCG สำหรับอัตราการตั้งท้องของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งในน้ำยาแช่แข็งที่มี 4 mg/ml หรือ 6 mg/ml BSA ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งให้กับโคตัวรับสายพันธุ์ต่างๆ ทั้งฉีดและไม่ฉีด hCG (35-40%) อย่างไรก็ตามอัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดให้โคพันธุ์พื้นเมืองผสมบราห์มันที่ฉีด hCG โคพันธุ์กำแพงแสนที่ฉีด hCG และโคนมลูกผสมทั้งที่ฉีด hCG และไม่ฉีด hCG เท่ากับ 55% ซึ่งมีค่าสูงกว่าอัตราการตั้งท้องของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งในน้ำยาที่มี 4 mg/ml ย้ายฝากให้โคนมลูกผสมที่ไม่ฉีด hCG (30%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ สายพันธุ์โคตัวรับและการฉีด hCG ไม่มีผลต่ออัตราคลอดในกลุ่มตัวอ่อนสด ตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 4 mg/ml BSA และตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 6 mg/ml BSA (50-55%, 30-35% และ 35-40% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อัตราคลอดของกลุ่มตัวอ่อนสดที่ย้ายฝากให้โคตัวรับพันธุ์กำแพงแสนและโคนมลูกผสมที่ฉีด hCG (55%) มีค่าสูงกว่าอัตราคลอดของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 4 mg/ml BSA หลังย้ายฝากให้โคพื้นเมืองผสมบราห์มันและโคนมลูกผสมที่ไม่ได้ฉีด hCG (30%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวโดยสรุป สายพันธุ์โคตัวรับ การเติม BSA ในน้ำยาแช่แข็ง การฉีด hCG ไม่ส่งผลต่ออัตราคลอดของโคตัวรับหลังย้ายฝากตัวอ่อนโคเนื้อแช่แข็งด้วยวิธี direct transfer

Abstract

Conventional slow-freezing method has been widely used for cryopreservation of *in vivo* produced embryos. This study was designed to determine the effects of recipients breed, bovine serum albumin (BSA) in freezing medium and human chlorionic gonadotropin (hCG) treated recipients on the conception rate after direct transfer of beef cattle frozen embryos. The *in vivo* fertilized embryos of Brahman cattle were produced by performing artificial insemination (AI) with Brahman semen after superovulated. On day 7 after AI, the embryos were flushed out using modified Dulbecco phosphate buffer saline supplemented with 1% fetal bovine serum. Total of 82 flushing could get 528 embryos, there were 369 grade 1-2 blastocysts (69.9%), 71 grade 3-4 blastocysts (13.4%), 39 degenerated embryos (7.4%) and 49 unfertilized eggs (9.3%). The grade 1-2 blastocysts were frozen by slow freezing in the freezing medium that consisted of 1.5 M ethylene glycol, 0.1 M sucrose and 4 mg/ml or 6 mg/ml BSA. The frozen embryos were direct- transferred to different recipients breed including Brahman-native hybrid cattle, Komphaengsaen cattle and hybrid milking cattle that receive 1,500 IU of hCG injection or no injection immediately after transferred embryos. The pregnancy rates of fresh embryos were no significantly difference on different recipients breed (50-55%) and no beneficial effect was found in hCG injected recipients. In frozen embryos, there was no significant difference on pregnancy rate of all recipient breed, hCG-treated and non hCG-treated recipients after transferring embryos frozen by 4 mg/ml or 6 mg/ml BSA medium (35-40%). However, the pregnancy rates of hCG-treated Brahman-native hybrid cattle, hCG-treated Komphaengsaen cattle, hCG-treated and non hCG-treated hybrid milking cattle that received fresh embryos (55%) were significantly higher than non hCG-treated hybrid milking cattle that received embryos frozen with 4 mg/ml BSA (30%). Moreover, recipients breed and hCG injection showed no beneficial effect on calving rate of fresh embryos, 4 mg/ml BSA-treated frozen embryos and 6mg/ml BSA-treated frozen embryos (50-55%, 30-35% and 35-40%, respectively). However, calving rates of fresh embryos transferred to hCG-treated Komphaengsaen cattle and hybrid milking cattle (55%) were significantly higher than that of frozen embryos which was treated with 4 mg/ml BSA and transferred to non hCG-treated Brahman-native hybrid cattle and hybrid milking cattle (30%). In conclusion, recipients breed, BSA concentration in freezing medium and hCG-treated recipients did not have any beneficial effect on the conception rate after direct transfer of frozen Brahman cattle embryos.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ……ก
บทคัดย่อภาษาไทย……ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ……ค
สารบัญ ……ง
สารบัญตาราง ……จ
สารบัญภาพ ……ฉ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย……1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย……1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย……2
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น……2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับจากการวิจัย ……2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร……3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 การเร่งการตกไข่ตัวให้และการเหนี่ยวนำการเป็นสัดตัวรับ……5
3.2 การชะล้างตัวอ่อน……6
3.3 การแช่แข็งตัวอ่อน……7
3.4 การละลายตัวอ่อนและการย้ายฝากตัวอ่อน……8
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์
4.1 ผลการทดลอง……9
4.2 ข้อวิจารณ์……12
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ……14
บรรณานุกรม ……15
ประวัติผู้วิจัย ……20

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

4.1 ผลการชะล้างตัวอ่อนโค……..….10

4.2 ผลของ Bovine serum albumin ในน้ำยาแช่แข็ง การฉีด hCG แก่โคตัวรับ และสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องและอัตราคลอดหลังการย้ายฝาก ตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งให้กับแม่โคตัวรับ ……..……11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1	โคตัวให้พันธุ์บราห์มัน…….....…….5
3.2	โคตัวรับสายพันธุ์ต่างๆ…….6
3.3	การชะล้างตัวอ่อนโดยวิธีไม่ผ่าตัด……6
3.4	หลอดแช่แข็งตัวอ่อน……7
3.5	เครื่องแช่แข็งตัวอ่อนแบบ slow freezing ……7
3.6	การย้ายฝากตัวอ่อนเข้ามดลูกโคตัวรับ……..8
3.7	ตัวอ่อนระยะคอมแพคมอรูล่าและเออร์ลี่บลาสโตซีสที่ชะล้างได้……9
3.8	ลูกโคที่ได้จากการย้ายฝากตัวอ่อน……..12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันเทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอ่อนและการย้ายฝากตัวอ่อนในโคมีการศึกษาและพัฒนากันอย่างต่อเนื่อง เพราะวิธีดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนโคที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมได้หลายตัวในระยะเวลา 1 ปี ด้วยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีแช่แข็งตัวอ่อนทำให้ขนส่งตัวอ่อนพันธุกรรมดีไปได้ไกล ทำให้สามารถผลิตโคสายพันธุ์ดีจากต่างประเทศได้สะดวกและรวดเร็วกว่าในอดีต โดยการนำตัวอ่อนแช่แข็งจากต่างประเทศ แล้วนำมาละลายเพื่อย้ายฝากให้กับตัวรับ การแช่แข็งแบบดั้งเดิมใช้ Glycerol เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งจำเป็นต้องล้างน้ำยาแช่แข็งก่อนนำไปย้ายฝากตัวอ่อน วิธีนี้มีข้อจำกัดคือ ผู้ปฏิบัติงาน ต้องมีความชำนาญในการส่องตรวจตัวอ่อน อีกทั้งต้องมีอุปกรณ์และเครื่องมือ ที่จำเป็น ในการส่องตรวจ ดังนั้นเพื่อรองรับความต้องการของ ผู้ทำการย้ายฝากตัวอ่อน จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอ่อนโดยการใช้ Ethylene glycol ซึ่งสามารถทำการย้ายฝากตัวอ่อนหลังละลายได้ทันที (Direct embryo transfer: DET) โดยไม่ต้องล้างน้ำยาแช่แข็งออกจากตัวอ่อน วิธีนี้มีประโยชน์มากในภาคสนาม ซึ่งสามารถทำได้โดยไม่ต้องมีประสบการณ์ในการส่องตรวจตัวอ่อน อีกทั้งยังรวดเร็วและประหยัดเวลาอีกด้วย ในอนาคตเราจะสามารถส่งตัวอ่อนแช่แข็งจากโคสายพันธุ์ดีไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆได้

ในการแช่แข็งตัวอ่อนมีการเติมโปรตีนต่างๆเช่น Fetal bovine serum (FBS) หรือ Bovine serum albumin (BSA) ลงไปในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนเพื่อเป็นการป้องกัน เยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอ่อนถูกทำลาย มีรายงานว่าการเติม BSA ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องของโคตัวรับ การตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดของโคตัวรับมีหลายปัจจัยเกี่ยวเนื่องกัน จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า plasma progestererone, human chorionic gonadotropin (hCG) และ gonadotropin releasing hormone ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการแท้งในช่วงต้นของการตั้งท้อง นอกจากนี้โคแต่ละสายพันธุ์มีความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ต่างกัน ดังนั้นการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BSA ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนและการฉีด hCG ให้รับตัวรับ สายพันธุ์ของโคตัวรับที่เหมาะสมในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งจะช่วยเพิ่มอัตราความสำเร็จในการผลิตโคสายพันธุ์ดีได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของ BSA ที่เหมาะสมในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน โคด้วยวิธี slow freezing

1.2.2 เพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโดยวิธี DET โดยเปรียบเทียบการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่แช่แข็งด้วยวิธี slow freezing และตัวอ่อนสด

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องของ โคตัวรับหลังย้ายฝากตัวอ่อน โคแช่แข็งและตัวอ่อนสด

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน hCG ต่ออัตราการตั้งท้อง ของโคตัวรับ หลังการย้ายฝากตัวอ่อน โคแช่แข็งและตัวอ่อนสด

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองจะนำตัวอ่อนโคมาแช่แข็งโดยวิธีลดอุณหภูมิลงช้าๆ (Slow freezing) แบบใช้ Ethylene glycol เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของ BSA ในน้ำยาแช่แข็ง จากนั้นนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับโดยวิธี DET โดยใช้โคสายพันธุ์ต่างๆเป็นตัวรับ ได้แก่ โคลูกผสมพันธ์พื้นเมืองกับบราห์มัน โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน และโคนมลูกผสม โดยฉีด hCG 1,500 ยูนิต หลังจากเป็นสัด 7 วัน และกลุ่มที่ไม่ฉีด hCG จะใช้เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นบันทึกอัตราการตั้งท้องและคลอด เพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของ BSA ในน้ำยาแช่แข็ง สายพันธุ์ของโคตัวรับ และการฉีด hCG ที่มีต่ออัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคแช่แข็งโดยวิธี DET

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

ทำการศึกษาผลของสายพันธุ์โคตัวรับที่มีต่อการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแบบ DET และศึกษาผลของ BSA ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนและผลของการฉีด hCG ให้แก่โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนแช่แข็งโดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนสด

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ทราบความเข้มข้นของ BSA ที่เหมาะสม ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน โคด้วยวิธี slow freezing

1.5.2 ทราบอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโดยวิธี DET โดยเปรียบเทียบการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่แช่แข็งด้วยวิธี slow freezing และตัวอ่อนสด

1.5.3 ทราบผลของสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องของ โคตัวรับหลังย้ายฝากตัวอ่อน โคแช่แข็งและตัวอ่อนสด

1.5.4 ทราบผล ของฮอร์โมน hCG ต่ออัตราการตั้งท้อง ของโคตัวรับ หลังการย้ายฝากตัวอ่อน โคแช่แข็งและตัวอ่อนสด

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอ่อนและการย้ายฝากตัวอ่อนมีความสำคัญในการผลิตโคที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ดี ในปี 1984 Leibo ได้ค้นพบวิธีการทำแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยใช้ glycerol จากนั้นนำตัวอ่อนแช่แข็งมาละลาย แล้วล้างในน้ำยาที่มี sucrose ก่อนนำไปย้ายฝากให้ตัวรับ ต่อมาวิธีนี้ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามอัตราการตั้งท้องขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ทำการย้ายฝาก (Leibo, 1984) ซึ่งอาจจะเกิดจากวิธีการล้าง glycerol ออกจากตัวอ่อน ซึ่งมีความยุ่งยาก ผู้ทำต้องมีความเชี่ยวชาญ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อให้ได้อัตราการตั้งท้องที่สูงขึ้นและมีความสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น ในปี 1984 Masssip และ Van Der Zwalmen ได้ทำการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยใช้ glycerol ร่วมกับ sucrose แล้วนำไปย้ายฝากโดยวิธี DET โดยไม่ต้องล้างน้ำยาแช่แข็งออก พบว่าได้อัตราการตั้งท้องที่สูง (Dochi และคณะ, 1995) ในปี 1990 Suzuki และคณะรายงานว่าอัตราการตั้งท้องของโคที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วย propylene glycol สูงกว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วย glycerol ต่อมาในปี 1992 Voelkel และ Hu ได้รายงานว่าการใช้ ethylene glycol แช่แข็งตัวอ่อนโค แล้วนำไปย้ายฝากให้ตัวรับโดยวิธี DET ได้อัตราการตั้งท้องที่สูง ซึ่งต่อมาได้มีรายงานสนับสนุนว่า ethylene glycol สามารถใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกในแข็งในกระบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโคได้ (Dochi และคณะ, 1995; Duchi และคณะ, 1997) จากรายงานหลายฉบับพบว่าอัตราการตั้งท้องของโคตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งที่ได้จากการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยใช้ ethlylene glycol ไม่ต่างจากการใช้ glycerol ร่วมกับ sucrose (Lange, 1995; Hinshaw และคณะ, 1996; Looney และคณะ, 1996; Nibart และ Humblot, 1997, Arreseigor และคณะ, 1998; Leibo และ Mapletoft , 1998) เนื่องจากคุณสมบัติของ ethylene glycol ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและสามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอ่อนได้เร็วกว่า glycerol ดังนั้น ethylene glycol จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้แช่แข็งตัวอ่อนเพื่อนำไปย้ายฝากโดยวิธี DET (Hasler, 2001) การย้ายฝากตัวอ่อนโคแช่แข็งโดยวิธี DET นี้ ช่วยลดปัญหาที่เกิดจากขั้นตอนการละลายและล้างตัวอ่อนก่อนนำไปย้ายฝาก วิธีนี้สามารถทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว สามารถทำได้จริงในฟาร์มที่มีเครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์จำกัด ความสำเร็จของการแช่แข็งตัวอ่อนขึ้นอยู่กับอัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนแช่แข็งหลังการทำละลาย จากรายงานก่อนหน้านี้ มีการเติมโปรตีนเช่น FBS และ BSA ลงไปในน้ำยาแช่แข็ง Leibo และคณะ (1988) พบว่า BSA ช่วยในการป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายหลังการทำละลายอีกทั้งยังช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเสถียรอีกด้วย นอกจากนี้ Pugh และคณะ (1998) รายงานว่าการเติม BSA ลงไปในน้ำยาแช่แข็งช่วยเพิ่มอัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนหลังการทำละลาย อีกทั้งตัวอ่อนระยะมอรูล่าและเออร์ลี่บลาสโตซีสที่แช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี BSA มีอัตรารอดชีวิตหลังการทำละลายสูงกว่าตัวอ่อนที่แช่แข็ง

ในน้ำยาที่มี FBS ในการแช่แข็งตัวอ่อนมีการเติมโปรตีนต่างๆเช่น FBS หรือ BSA ลงไปในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนเพื่อเป็นการป้องกัน เยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอ่อนถูกทำลาย มีรายงานว่าการเติม BSA ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องของโคตัวรับ

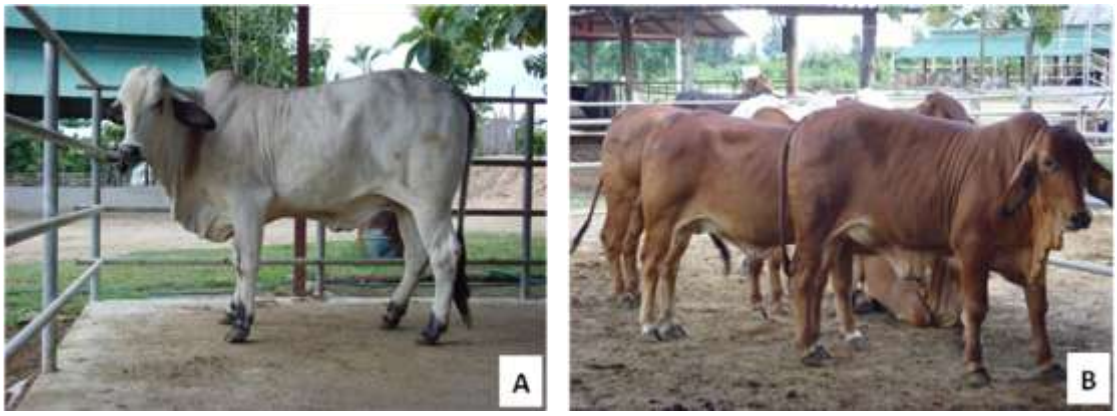
ในขบวนการย้ายฝากตัวอ่อน พบว่าปัญหาสำคัญคือตัวอ่อนมีอัตราการตายสูงในช่วงเวลา 9-17 วันหลังจากทำการย้ายฝากตัวอ่อน (16-24 วันหลังจากการเป็นสัด) (Thatcher และคณะ, 1985) จากการศึกษาพบว่าสาเหตุที่ทำให้ตัวอ่อนเกิดการตายหลังจากการย้ายฝากอาจเกิดจากตัวอ่อนมีคุณภาพต่ำ (Donaldson, 1985) รอบการเป็นสัดของโคตัวให้และโคตัวรับไม่ตรงกัน (Nelson และคณะ, 1982) สภาวะอากาศร้อนขณะที่ทำการย้ายฝาก (Putney และคณะ, 1989) เยื่อบุมดลูกของโคติดเชื้อแบคทีเรีย (Bouters, 1985) ภาวะโภชนาการของโคตัวรับ (Broadbent และคณะ, 1991) หรือโคมีระยะลูเตียลที่ไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะรักษาการตั้งท้องไว้ได้ (Remsen และ Roussel, 1982; Stubbings และ Walton, 1986) จากการศึกษาของ Lukaszewska และ Hansel ในปี 1980 พบว่าการลดลงของฮอร์โมน progesterone มีความสัมพันธ์กับการมีระยะลูเตียลที่ไม่สมบูรณ์ในโคตัวรับ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อัตราการตั้งท้องหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนในโคตัวรับลดลง มีการศึกษาว่าการเพิ่มปริมาณฮอร์โมน progesterone โดยใช้ hCG (Greve และ Lehn-Jensen, 1982; Looney และคณะ, 1984; Santos-Valadez และคณะ, 1982) หรือ gonadotropin releasing hormone (GnRH) (Drost และคณะ, 1989; Ellington และคณะ, 1991; Fernandez และ Larcocca, 1999; Macmillan และคณะ, 1986) ช่วยป้องกันการตายของตัวอ่อนหลังจากการย้ายฝากที่มีสาเหตุมาจากระยะลูเตียลที่ไม่สมบูรณ์ในโคตัวรับ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนด้วย จากรายงานของ Nishigai ในปี 2002 พบว่า การฉีด hCG 1,500 ยูนิต เข้ากล้ามเนื้อของโคตัวรับสายพันธุ์ Japanese Black ในวันที่ 6 หลังจากการเป็นสัด ช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องของโคตัวรับหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง โดย hCG จะช่วยทำให้เกิดการพัฒนาของ corpus luteum (CL) ที่สมบูรณ์และช่วยยับยั้งการหลั่งของ estradiol-17β นอกจากนี้ Rossetti และคณะ (2011) พบว่า การฉีด hCG 2500 ยูนิต ในวันที่ 7 หลังจากการเป็นสัด ช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนในโคสายพันธุ์ เนลเลอร์ ได้ ดังนั้นเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอ่อน การย้ายฝากตัวอ่อนให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ในการทดลองนี้จึงทำการศึกษา หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ BSA และการฉีด hCG ให้กับตัวรับ สายพันธุ์ของโคตัวรับที่เหมาะสมในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธี DET

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเร่งการตกไข่ตัวให้และการเหนี่ยวนำการเป็นสัดตัวรับ

ใช้โคบราห์มันพันธุ์แท้อายุระหว่าง 2-6 ปี มาทำเป็นโคตัวให้ (ภาพที่ 3.1) ทำการเร่งการตกไข่ ตามวิธีที่รายงานโดย รังสรรค์ (2530) โดยฉีดฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH, Folltropin®, Bioniche) 25 ยูนิต เข้ากล้ามเนื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง รวม 8 ครั้ง ในครั้งที่ 5 ของการฉีด FSH จะฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา (PGF, Iliren®, Intervet) 375 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งของโคบราห์มัน 3 ครั้งห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง โดยผสมเทียมครั้งแรกขณะที่โคเป็นสัดนิ่ง และในการผสมเทียมครั้งที่สองจะฉีดด้วยฮอร์โมน Human Chlorionic Gonadotropin (hCG, Chlorulon®, Intervet) 1,500 ยูนิต เข้ากล้ามเนื้อ

ใช้โคลูกผสมพื้นเมืองกับบราห์มัน โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน และโคนมลูกผสม ที่มีอายุระหว่าง 2-5 ปี มาทำเป็นตัวรับ โดยทำการฉีด PGF 375 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และตรวจการเป็นสัดหลังจากฉีดฮอร์โมน 48-72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.1 โคตัวให้พันธุ์บราห์มันเทา (A) และบราห์มันแดง (B)

ภาพที่ 3.2 โคตัวรับสายพันธุ์ต่างๆ (A) ลูกผสมพื้นเมืองกับบราห์มัน (B) โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน และ (C) โคนมลูกผสม

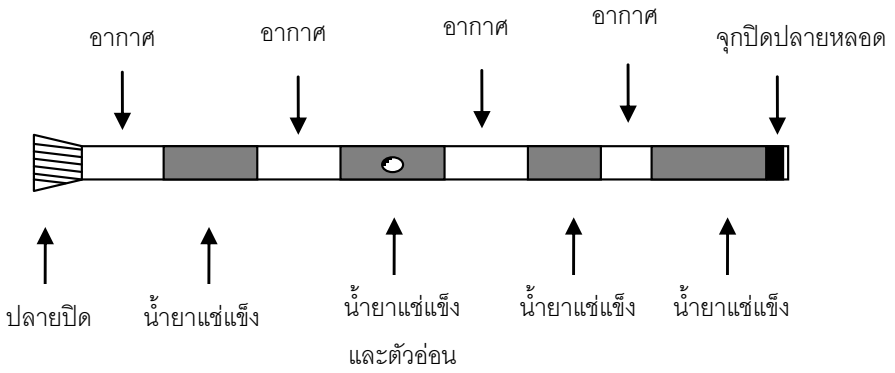
3.2 การชะล้างตัวอ่อน

หลังจากเป็นสัด 7-7.5 วัน ทำการชะล้างตัวอ่อนโดยวิธีไม่ผ่าตัดตามวิธีที่รายงานโดย รังสรรค์และสรรเพชญ (2530) โดยใช้น้ำยา modified Dulbecco phosphate buffer saline (mDPBS) ที่เติมด้วย 1% FBS ชะล้างตัวอ่อน 500 ซีซี/ปีกมดลูก ทำการตรวจหาตัวอ่อนที่ชะล้างได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเก็บตัวอ่อนที่ตรวจพบไว้ในน้ำยา Emcare Holding (ICP Bio) ดังภาพที่ 3.3

ภาพที่ 3.3 การชะล้างตัวอ่อนโดยวิธีไม่ผ่าตัด

3.3 การแช่แข็งตัวอ่อน

น้ำยาแช่แข็งประกอบด้วย 1.5 M Ethylene glycol และ 0.1 M Sucrose ละลายใน base solution ซึ่งมี 2 ชนิดคือ Emcare holding ที่มี 4 mg/ml BSA และ Emcare holding ที่มี 6 mg/ml BSA จากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และ 2 มาไว้ในน้ำยาแช่แข็ง แล้วทำการบรรจุตัวอ่อนใส่หลอดพลาสติก การบรรจุตัวอ่อนจะบรรจุ 1 ตัวอ่อนต่อ 1 หลอดจากนั้นปิดปลายหลอดด้วยปากคีบลนไฟหนีบปลายหลอด (ภาพที่ 3.4) จากนั้นนำหลอดพลาสติกที่บรรจุตัวอ่อนแล้วไปใส่ในเครื่องแช่แข็ง (Cryologic, CL5500) ที่ตั้งอุณหภูมิเครื่องที่ -6 °C จากนั้น 1 นาที จึงเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Seeding) ทิ้งไว้ 4 นาที จึงเริ่มการทำงานของเครื่อง เมื่อเครื่องเริ่มทำงานเครื่องจะยังคงอยู่ที่ -6 °C อีก 10 นาที จากนั้นจึงลดอุณหภูมิในอัตราเร็ว 0.5 °C ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ -35°C (ภาพที่ 3.5) จากนั้นจึงนำหลอดพลาสติกจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวและเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

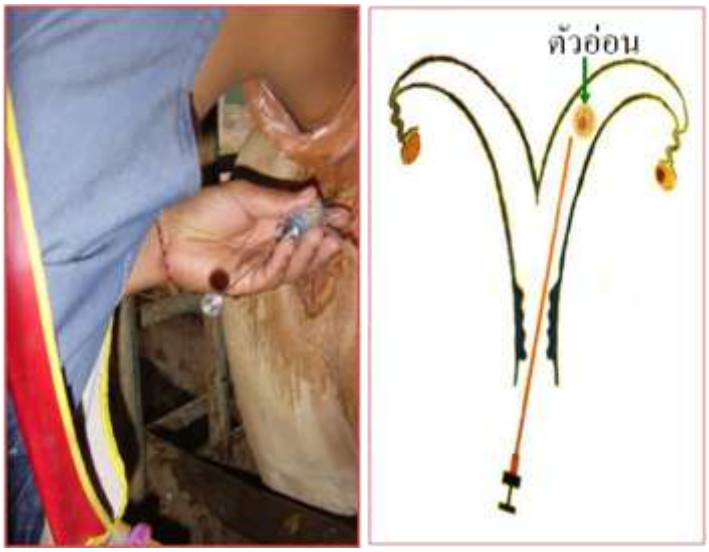


ภาพที่ 3.4 หลอดแช่แข็งตัวอ่อน ภายในหลอดพลาสติกจะมีน้ำยาแช่แข็งอยู่ 4 ส่วน โดยแบ่งน้ำยาแช่แข็งโดยใช้อากาศ ตัวอ่อนจะถูกบรรจุในส่วนที่ 3 ของน้ำยาแช่แข็ง เมื่อบรรจุตัวอ่อนและน้ำยาครบแล้วจะใช้ปากคีบลนไฟหนีบปลายหลอดเพื่อปิดปลาย

ภาพที่ 3.5 เครื่องแช่แข็งตัวอ่อนแบบ slow freezing

3.4 การละลายตัวอ่อนและการย้ายฝากตัวอ่อน

การละลายตัวอ่อนแช่แข็งทำได้โดยการนำตัวอ่อนออกจากถังไนโตรเจนเหลว แล้วถือค้างในอากาศนาน 10 วินาที จากนั้นจุ่มหลอดพลาสติกลงในน้ำอุณหภูมิ 30 °C นาน 10 วินาที เช็ดฆ่าเชื้อหลอดพลาสติกด้วย 70% แอลกอฮอล์ แล้วจึงตัดปลายหลอดพลาสติกด้านที่หนีบปิดด้วยความร้อนออกด้วยกรรไกรที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำหลอดพลาสติกไปไว้ในปืนฉีดตัวอ่อน (IMV) ซึ่งสวมด้วย ET sheath และ sanitary sheath แล้วนำไปย้ายฝากให้ตัวรับแต่ละตัวที่เป็นสัดโดยการฉีดฮอร์โมนหรือเป็นสัดตามธรรมชาติมาแล้ว 7-7.5 วัน ตามวิธีที่รายงานโดย รังสรรค์ และสรรเพชญ (2530) การย้ายฝากตัวอ่อนแบบ DET จะย้ายฝากให้ตัวรับภายในระยะเวลาไม่เกิน 8 นาที หลังทำละลาย (ภาพที่ 3.6) จะฉีด hCG 1,500 ยูนิต หรือไม่ฉีด หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนเสร็จ

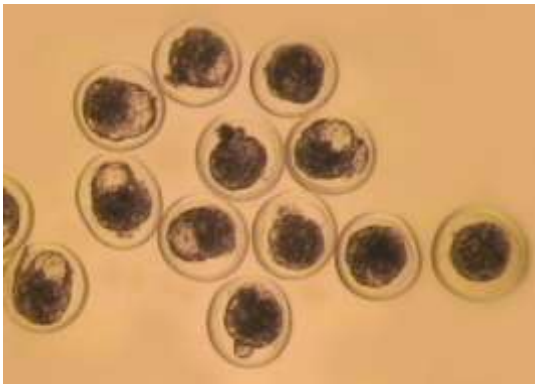


ภาพที่ 3.6 การย้ายฝากตัวอ่อนเข้ามดลูกโคตัวรับ

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

เมื่อทำ การฉีดฮอร์โมนเพื่อ เร่งการตกไข่ ในโคบราห์มันพันธุ์แท้ จำนวน 29 ตัว แล้วทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อโคบราห์มัน หลังจากนั้น 7-7.5 วัน ทำการชะล้างตัวอ่อน ทั้งหมด 82 ครั้ง ได้ตัวอ่อนทั้งหมด 528 ใบ (ภาพที่ 3.7) โดยได้ตัวอ่อนเกรด 1-2 จำนวน 369 ใบ (69.9%) เกรด 3-4 จำนวน 71 ใบ (13.4%) ตัวอ่อนที่สลายตัว จำนวน 39 ใบ (7.4%) และไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ 49 ใบ (9.3%) ดังแสดงในตารางที่ 1 จากนั้นแบ่งตัวอ่อนเฉพาะเกรด 1-2 ออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มตัวอ่อนสด และตัวอ่อนแช่แข็ง โดยในกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็ง จะทำการแช่แข็งตัวอ่อนในน้ำยาแช่แข็งที่มี 4 mg/ml BSA หรือ 6 mg/ml BSA ด้วยวิธี slow freezing จากนั้นทำการย้ายฝากตัวอ่อนทั้ง 3 ชนิด ให้แก่โคตัวรับสายพันธุ์ต่างๆ



ภาพที่ 3.7 ตัวอ่อนระยะคอมแพคมอรูล่าและเออร์ลี่บลาสโตซีสที่ชะล้างได้

จากตารางที่ 2 ในกลุ่มตัวอ่อนสดย้ายฝากให้โคตัวรับสายพันธุ์พื้นเมืองผสมบราห์มัน โคกำแพงแสน หรือโคนมลูกผสม และฉีดหรือไม่ฉีด hCG พบว่าอัตราการตั้งท้องของทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งมีค่าระหว่าง 50-55% เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยาที่มี 4 mg/ml BSA พบอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนให้กับโคตัวรับสายพันธุ์ต่างๆที่ฉีดหรือไม่ฉีด hCG อยู่ที่ระหว่าง 30-35% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ สายพันธุ์ของโคตัวรับและการฉีด hCG ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยาที่มี 6 mg/ml BSA โดยอัตราการตั้งท้องอยู่ระหว่าง 35-40% เมื่อพิจารณาในทุกกลุ่มการทดลองพบว่า อัตราการตั้งท้องอยู่ที่ระหว่าง 30-55% โดยอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนสดให้โคพันธุ์พื้นเมืองผสมบราห์มันที่ฉีด hCG โคพันธุ์กำแพงแสนที่ฉีด hCG และโคนม

ลูกผสมทั้งที่ฉีด hCG และไม่ฉีด hCG เท่ากับ 55% ซึ่งมีค่าสูงกว่าอัตราการตั้งท้องของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งในน้ำยาที่มี 4 mg/ml ย้ายฝากให้โคนมลูกผสมที่ไม่ฉีด hCG (30%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อพิจารณาจำนวนคลอด พบว่าสายพันธุ์โคตัวรับและการฉีด hCG ไม่มีผลต่ออัตราคลอดในกลุ่มตัวอ่อนสด ตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 4 mg/ml BSA และตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 6 mg/ml BSA โดยอัตราคลอดในแต่ละกลุ่มการทดลองเท่ากับ 50-55%, 30-35% และ 35-40% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของชนิดตัวอ่อน พบว่าอัตราคลอดของกลุ่มตัวอ่อนสดที่ย้ายฝากให้โคตัวรับพันธุ์กำแพงแสนและโคนมลูกผสมที่ฉีด hCG (55%) มีค่าสูงกว่าอัตราคลอดของกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 4 mg/ml BSA หลังย้ายฝากให้โคพื้นเมืองผสมบราห์มันและโคนมลูกผสมที่ไม่ได้ฉีด hCG (30%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ลูกเกิดโคที่ได้จากการย้ายฝากตัวอ่อนกลุ่มต่างๆดังแสดงในภาพที่ 3.8

ตารางที่ 4.1 ผลการชะล้างตัวอ่อนโค

จำนวนโคตัวให้	**จำนวนตัวอ่อนที่ได้จากการชะล้าง**	**คุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ชะล้างได้**			
		ตัวอ่อนเกรด 1-2	**ตัวอ่อนเกรด 3-4**	**ตัวอ่อนที่สลายตัว**	**ไข่ที่ไม่ปฏิสนธิ**
29	528	369 (69.9%)	71 (13.4%)	39 (7.4%)	49 (9.3%)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ผลของ Bovine serum albumin ในน้ำยาแช่แข็ง การฉีด hCG แก่โคตัวรับและสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องและอัตราคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งให้กับแม่โคตัวรับ

ชนิดตัวอ่อน*	สายพันธุ์โคตัวรับ	การฉีด hCG **	จำนวนตัวรับ	จำนวนตั้งท้อง (%)	จำนวนคลอด (%)
ตัวอ่อนสด	พื้นเมืองผสมบราห์มัน	+	20	11 (55)[a]	10 (50)[ab]
		-	20	10 (50)[ab]	10 (50)[ab]
	กำแพงแสน	+	20	11 (55)[a]	11 (55)[a]
		-	20	10 (50)[ab]	10 (50)[ab]
	โคนมลูกผสม	+	20	11 (55)[a]	11 (55)[a]
		-	20	11 (55)[a]	10 (50)[ab]
ตัวอ่อนแช่แข็ง 4 mg/ml BSA	พื้นเมืองผสมบราห์มัน	+	20	7 (35)[ab]	7 (35)[ab]
		-	20	7 (35)[ab]	6 (30)[b]
	กำแพงแสน	+	20	7 (35)[ab]	7 (35)[ab]
		-	20	7 (35)[ab]	7 (35)[ab]
	โคนมลูกผสม	+	20	7 (35)[ab]	7 (35)[ab]
		-	20	6 (30)[b]	6 (30)[b]
ตัวอ่อนแช่แข็ง 6 mg/ml BSA	พื้นเมืองผสมบราห์มัน	+	20	8 (40)[ab]	8 (40)[ab]
		-	20	7 (35)[ab]	7 (35)[ab]
	กำแพงแสน	+	20	8 (40)[ab]	8 (40)[ab]
		-	20	8 (40)[ab]	8 (40)[ab]
	โคนมลูกผสม	+	20	9 (45)[ab]	8 (40)[ab]
		-	20	8 (40)[ab]	8 (40)[ab]

*ตัวอ่อนสด = ตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง, ตัวอ่อนแช่แข็ง 4 mg/ml BSA = ตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งที่มี 4 mg/ml BSA, ตัวอ่อนแช่แข็ง 6 mg/ml BSA = ตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งที่มี 6 mg/ml BSA ** + = ฉีด hCG, - = ไม่ฉีด hCG

ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$), Chi-square.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 3.8 ลูกโคที่ได้จากการย้ายฝากตัวอ่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ข้อวิจารณ์

การทดลองครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการผลิตลูกโคจำนวนมากทั้งในกลุ่มของตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง ในการทดลองนี้ทำการศึกษาผลของ BSA ที่เติมในน้ำยาแช่แข็งต่ออัตราการตั้งท้องและลูกเกิดหลังย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี BSA ความเข้มข้น 4 mg/ml ไม่แตกต่างกับตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วย 6 mg/ml BSA จากการทดลองก่อนหน้านี้พบว่า BSA สามารถเพิ่มอัตราการตั้งท้องของโคตัวรับหลังย้ายฝากตัวอ่อนได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ FBS ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน (Leibo และคณะ, 1988; Aoyagi และคณะ, 1996; Pugh และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตามอัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดของตัวอ่อนแช่แข็งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มตัวอ่อนสด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า คือ Purcell และคณะ (2005) โคตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนสดมีอัตราการตั้งท้องสูงกว่าโคตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า สามารถเติม BSA ที่ความเข้มข้น 4 mg/ml หรือ 6 mg/ml ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนได้

นอกจากนี้ อัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดของโคตัวรับที่ได้รับการฉีด hCG 1500 ยูนิต ในวันที่ 7 หลังการเป็นสัดไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวรับที่ไม่ได้ฉีด hCG ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างจากที่มีรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งรายงานว่า โคตัวรับที่ได้รับการฉีด hCG มีอัตราการตั้งท้องสูงขึ้นกว่าโคตัวรับที่ไม่ได้ฉีด hCG (Sianangama และคณะ, 1996; Santos และคณะ, 2001; Stevenson และคณะ, 2007, Sianangama และคณะ, 1992) Nishigai และคณะ (2002) ทำการศึกษาผลของ hCG ต่ออัตราการตั้งท้องของโค Japanese black หลังย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในวันที่ 7 หลังการเป็นสัด พบว่า ในกลุ่มโคตัวรับที่ฉีด hCG 1500 IU ในวันที่ 6 หลังการเป็นสัด มีเปอร์เซ็นต์การตั้งท้องสูงสุด (67.5%) เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีด hCG ในวันที่ 1 หลังการเป็นสัด (42.5%) และไม่ฉีด hCG (45%) Machado และคณะ (2008) รายงานว่าการฉีด hCG ให้กับโคตัวรับในระหว่างวันที่ 4-7 หลังการเป็นสัด ช่วยเหนี่ยวนำให้เกิด CL และเพิ่มระดับของ progesterone อีกด้วย นอกจากนี้ Rossetti และคณะ (2011) พบว่าการฉีด hCG 2500 ยูนิต ในวันที่ 7 หลังการเป็นสัดช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องของโค

ในการทดลองนี้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี DET ภายในระยะเวลาไม่เกิน 8 นาที หลังละลาย เนื่องจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า การฝากตัวอ่อนที่แช่แข็งวิธี slow freezing ภายหลังจากทำละลายแล้วเกิน 11 นาที ส่งผลให้อัตราการตั้งท้องของโคตัวรับลดลง (Dochi และคณะ, 1998) ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาผลของโคตัวรับ พื้นเมืองกับบราห์มัน โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน และโคนมลูกผสม ต่ออัตราการตั้งท้องและลูกเกิดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งและตัวอ่อนสด พบว่า อัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องและลูกเกิดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งรายงานแรกของประเทศไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

สายพันธุ์ของโคตัวรับและการฉีด hCG ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องและคลอดเมื่อย้ายฝากตัวอ่อนสดหรือตัวอ่อนแช่แข็ง อย่างไรก็ตามอัตราการตั้งท้องและคลอดของตัวอ่อนแช่แข็งต่ำกว่าการย้ายฝากตัวอ่อนสด นอกจากนี้ ความเข้มข้นของ BSA ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนไม่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องและคลอดของตัวอ่อนแช่แข็งหลังการย้ายฝาก จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี slow freezing ในน้ำยาที่มี BSA แล้วย้ายฝากแบบ DET สามารถผลิตลูกเกิดได้โดยอัตราความสำเร็จอยู่ประมาณ 30-40%

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำวิจัยต่อยอดโดยทำการปรับปรุงวิธีแช่แข็งตัวอ่อนแบบ vitrification เพื่อย้ายฝากแบบ DET เนื่องจากตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วยวิธี vitrification มีอัตรารอดมากกว่าตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธี slow freezing

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

รังสรรค์ พาลพ่าย . 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำอีทีในโค . มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* . โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 41-77.

รังสรรค์ พาลพ่ายและ สรรเพชญ โสภณ2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัดมณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

Aoyagi, Y., Konishi, M., Takedomi, T., Itakura, H., Itoh, T., Yazawa, S., 1996. Effect of lipid-rich bovine serum albumin on direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology** 45: 165.

Arreseigor, C., Sisul, A., Arreseigor, A. and Stahringer, R. 1998. Effect of cryoprotectant, thawing method, embryo grade and breed on pregnancy rates of cryopreserved bovine embryos. Theriogenology 49: 160.

Bouters, R. 1985. **Embryonic mortality in farm animals**. In: Sreenan, J. Diskin, M. (ed), The Netherlands: Martinus Nijhoff publishers. 249-258.

Broadbent, P., Stewart, M. and Dolman, F. 1991. Recipient management and embryp transfer. **Theriogenology** 35:125-139.

Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. **Anim. Reprod. Sci**. 38: 179-185.

Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshiba, N., Kano, N., Maeda, J., Miyata, K., Yamauchi, Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T. and Inohae S. 1998. Direct transfer of bovine embrypos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. **Theriogenology** 49: 1051-1058.

Donaldson, L. 1985. Matching of embryo staged and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. **Vet. Rec.** 9: 489-91.

Drost, M., Tan, K., Macmillan, K. and Thatcher, W. 1989. Successful asynchronous embryo transfer in cattle. **Theriogenology** 31: 186.

Ellington, J., Foote, R., Farrell, P., Hasler, J., Webb, J. and Hendson, W. 1991. Pregnancy rates after the use of a gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**. 36: 1035-1042.

Fernandez, T. and Larcocca, C. 1999. Pregnancy rates in embryo transfer recipients following GnRH administration on day 13 of the estrous cycle. **Theriogenology** 51: 404.

Greve, T. and Lehn-Jensen, H. 1982. The effect of hCG administration on pregnancy rate following non-surgical transfer of viable bovine embryos. **Theriogenology** 17:91.

Hasler, J. 2001. The freezing, thawing and transfer of cattle embryos. In: Fields, M., Sand, R. and Yelich, J. (ed.), **Factors affecting calf crop: Biotechnology of reproduction**. USA : CRC press. p.119-129.

Hinshaw, R. Beal, W., Whitman, S and Roberts, S. 1996. Evaluating embryo freezing methods and electronic estrus detection in a contract recipient bovine embryo transfer program. **Proc. Fifteenth Ann. Convention AETA**, Portland, OR. p. 11

Lange, H. 1995. Cryopreservation of bovine embryos and demi-embryos using ethylene glycol for direct transfer after thawing. **Theriogenology** 43: 258.

Leibo, S. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology** 21: 767-790.

Leibo, S. and Mapletoft. 1998. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. **Proc. Seventeen. Ann. Convention AETA,** San Antonio, TX. 91.

Leibo, S.P. 1988. Cryopreservation**. In: Proceedings of the Eleventh International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, vol. 5, Dublin, 370–377.

Looney, C., Oden, A., Massey, J., Johnson, C. and Godke, R. 1984. Pregnancy rates following hCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. **Theriogenology** 21: 246.

Looney, C., Broek, D., Gue, C., Funk, D. and Faber, D. 1996. Field experiences with bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. **Theriogenology** 45: 170.

Lukaszewska, J. And Hansel, W. 1980. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. **J. Reprod. Fertil.** 59: 485-493.

Machado, R., Bergamaschi, M.A., Barbosa, R.T., de Oliveira, C.A. and Binelli, M. 2008. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. Theriogenology 69: 798–804.

Macmillan, K., Taufa, V. and Day, A. 1986. Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone (buserelin) in cattle III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. **Anim. Reprod. Sci.** 11:1-10.

Massip, A. and Van Der Zwalmen, P. 1984. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. **Vet. Rec.** 115: 327-328.

Nelson, L., Elsdeen, R. and Seidel, G. 1982. Effect of synchrony between estrous cycles of donors and recipients on pregnancy rates in cattle. **Theriogenology** 17: 101.

Nibart, M. and Humblot, T. 1997. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. **Theriogenology**. 47: 371.

Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka, T. and Kaneda, Y. 2002. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. Theriogenology. 58: 1597-1606.

Nishigai, N., Kamomae, H., Tanaka, T. and Kaneda, Y. 2002. Improvement of pregnancy rate inn Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. **Theriogenology** 58: 1597-1606.

Pugh, P.A., Ankersmit, A.E., McGowan, L.T. and Tervit, H.R. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. **Theriogenology** 50: 495-506.

Purcell, S.H., Beal, W.E. and Gray, K.R. 2005. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. **Theriogenology** 64: 867–878.

Putney, D., Drost, M. and Thatcher, W. 1989. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology** 31: 765-778.

Remsen, L. and Roussel, J. 1982. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology** 18: 365-72.

Rossetti, R.C., Perdigão, A., Mesquita, F.S., Sá Filho, M., Nogueira, G.P., Machado, R., Membrive, C.M. and Binelli, M. 2011. Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. **Theriogenology** 76: 751–758.

Santos, J.E., Thatcher, W.W., Pool, L. and Overton, M.W. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. **J. Anim. Sci.** 79: 2881–2894.

Santos-Valadez, S., Seidel, G. and Elsden, R. 1982. Effect of hCG on pregnancy rates in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology** 17: 85.

Sianangama, P.C. and Rajamahendran, R. 1992. Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. **Theriogenology** 38: 85–96.

Sianangama, P.C. and Rajamahendran, R. 1996. Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. Theriogenology 45: 583-592.

Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba, S. and DeJarnette, J.M. 2007. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. **J. Dairy Sci.** 90: 331– 340.

Stubbings, R. and Walton, J. 1986. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. **Theriogenology** 26: 145-155.

Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka, K., Nishikata, Y and Okamoto, K. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycrol and 1,2-propanediol. **Theriogenology** 34:1051-1057.

Thatcher, W., Knickerbocker, J., Bartol, F., Bazer, F. Robert, R. and Drost, M. 1985. Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: endocrine aspects. **Theriogenology** 23: 129-43.

Voelkel, S. and Hu, Y. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology** 37: 23-37.

ประวัติผู้วิจัย

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5 2094 00002 42 3

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-223164

4. ประวัติการศึกษา

4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

4.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 25 41

สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

4.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council

สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

4.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

5. ประวัติการทำงาน:

- 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

6. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

6.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

6.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

6.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

6.4 Embryonic stem cells

6.5 Cryopreservation of gametes and embryos

7. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

7.1

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14(3): 248-257.

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. ***Cryobiology*** http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.006

Takeda, K., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of Intergeneric/interspecies Mitochondrial Injection; Parthenogenetic Development of Bovine Oocytes after Injection of Mitochondria Derived from Somatic Cells. ***J. Reprod. Dev.*** http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2011-013

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell. Reprogram.*** 14(1): 79-87.

Kunkanjanawan, T., Noisa, P. and **Parnpai, R.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131.

Noisa, P. and Parnpai, R. 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. Stem Cells Int. 907961.

Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R.** and Takeda, K. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in

intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82(2): 236-243.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., Heraud, P., and **Parnpai, R.** 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16(5): 057005.

Lorthongpanich, C, Chuti Laowtammathron, C and **Parnpai, R.** 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. ***Thai J. Vet. Med.*** 41: 11-22.

Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R**. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. ***Theriogenology*** 75: 1652-1660.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 385-392.

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant humen leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302.

Srirattana, K., Matsukawa,K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R**. and Takeda, K. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/j.1740-0929.2010.00827.x

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.** 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. ***Reprod. Domestic Anim.*** 46: e67-e73.

Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R**. and Heraud, P. 2010. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by FT-IR spectroscopy. ***J. Mol. Struct.*** 967: 189-195.

Laowtammathron, C., Cheng, E.C., Cheng, P.H, Snyder, B.R., Yang, S.H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.C., **Parnpai, R**. and Chan, A.W.S. 2010. Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. ***BMC Cell Biology*.** 11: 12.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2010. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. ***Reprod. Fertil. Dev.*** 22: 613-624.

Sripunya, N., Somfai, T., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R.** 2010. A comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. ***J. Reprod. Dev.*** 56: 176-181.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2010. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 56: 49-54.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Lorthongpanich, C., Heraud, P. and **Parnpai.** R. 2009. FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst. ***J. Mol. Struct.*** 933: 104-111.

Suteevun-Phermthai, T., Curchoe, C.L., Evans, A.C., Boland, E., Rizos, D., Fair, T., Duffy, P., Sung, L.Y., Du, F., Chaubal, S., Xu, J., Wechayant, T., Yang, X., Lonergan, P., **Parnpai, R.**, and Tian, X. 2009. Allelic switching of the imprinted *IGF2R* gene in cloned bovine fetuses and calves. ***Anim. Reprod. Science.*** 116: 19-27.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Development of single blastomere derived mouse embryos, outgrowths and embryonic stem cells. ***Reproduction*.**135: 805-813.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008.Chemical enhancement in embryo development and stem cell derivation from single blastomeres ***Cloning Stem Cells*** 10: 503-512.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A.W.S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development of interspecies cloned monkey embryo reconstructed with bovine enucleated oocyte. ***J. Reprod. Dev.*** 54: 306-313.

Parnpai, R. 2007. Production of cloned embryos in buffalo. ***Ital. J. Anim. Sci.*** 6. Suppl. 2: 102-106.

Chan, A.W.S., Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitche, K. and **Parnpai, R.** 2007. Competence of early embryonic blastomeres for establishment of embryonic stem cell line. ***Fertility and Sterility*** 88: S396-S396.

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., **Parnpai, R.** and Hochi, S. 2007. Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. ***Theriogenology*** 67: 893-900.

8. งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จแล้ว

1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก

4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384.

5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ดังนี้

1. “ตูมตาม2” เกิดมาเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2546
2. “ตูมตาม3” เกิดมาเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2546
3. “ตูมตาม4” เกิดมาเมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2546
4. “ตูมตาม5” เกิดมาเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม 2546
5. “ตูมตาม6” เกิดมาเมื่อวันที่ 28 ธันวาคม 2546
6. “ตูมตาม7” เกิดมาเมื่อวันที่ 5 มกราคม 2547
7. “ตูมตาม8” เกิดมาเมื่อวันที่ 7 มกราคม 2547

ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน “ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

6. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด

7. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มีนาคม 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล” และตัวที่สอง “เศวต” เกิดเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2555

8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รศ.ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns

2. รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. ที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
e-mail: ketudat@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology) 4.00
University of California, San Diego, USA

พ.ศ. 2538 ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH, Germany

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
Recombinant Protein Production

7. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., **Ketudat-Cairns, M.** and Parnpai, R. 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14(3): 248-257.

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns M.** (2011) Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring ***Cell Reprogram*** 14(1): 79-87.

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (Xanthomonas axonopodis pv. citri) ***Molecular Pathogens*** 2(3) 1-7 doi: 10.5376/mp.2011.02.0003

Ruamkuson, D., Tongpim, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) A Model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia ***Food Control*** 22: 1742-1747

Rattanasuk, S., Parnpai, R., and **Ketudat-Cairns, M.** (2011) Multiplex Polymerase Chain Reaction used for Bovine Embryo Sex Determination ***J Reprod Dev*** 57(4) 539-542

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, R. Parnpai (2011) The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplast on in vitro development of intraspecies and intergeneric felid embryos ***J Reprod Dev*** 57(3) 385-392

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns, M**. (2011) A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in Escherichia coli, ***Journal of Biotechnology*** (151): 295-302

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns,** R. Parnpai (2010) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos ***Reprod Fertil Dev*** 22(4): 613-24

Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2010). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (Bos taurus) and Swamp Buffalo (Bubalus bubalis) Cloned Embryos ***J Reprod Dev*** 56(1): 49-54.

Ruamkusol, D., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora ***Suranaree J. Aci Technol*** 16 (4)

Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B ***Suranaree J. Aci Technol*** 16 (4)

Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein ***Suranaree J. Aci Technol*** 16 (3) 245-251

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns,** R. Parnpai (2009) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos ***Reprod Fert Dev*** 22: 613-624.

Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2009). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos ***J Reprod Dev*** 56: 49-54.

Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin Jo. of Sci and Tech 31(4) 395-399

Kupradit, C., Charoenrat, T., and Ketudat-Cairns, M. (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by Pichia pastoris: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev accepted May 19th 2008

Phetsom, J., Jung, K., Ketudat-Cairns, M., and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.

Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T ., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M,** and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain ***Biochem. J.*** 408(2):241-9.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and. Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. ***Reproduction, Fertility and Development*** 19(1) 141

Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpong, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned Long- Tailed Monkey (Macaca fascicularis) Embryo. Reproduction, ***Fertility and Development*** 19(1) 149

Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.,** Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. ***Theriogenology.*** 67(4) 893-900.