รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-57-36-11

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตลูกโคนมเพศเมียโดยการย้ายฝากตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วจากไข่เจาะเก็บด้วยวิธี ovum pick-up

Improvement of female dairy cattle production after transferred *in vitro* fertilized embryos derived from ovum pick up oocytes

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-57-36-11

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตลูกโคนมเพศเมียโดยการย้ายฝากตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วจากไข่เจาะเก็บด้วยวิธี ovum pick-up

Improvement of female dairy cattle production after transferred *in vitro* fertilized embryos derived from ovum pick up oocytes

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. ศิวัช สังข์ศรีทวงษ์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2557-2559 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะผู้วิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี รวมทั้งโรงฆ่าสัตว์พระพุทธบาท จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

ตุลาคม 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วจากไข่ที่เก็บจากโคนมโดยวิธี OPU แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับจะสามารถผลิตลูกโคเกิดมามากกว่าการผสมเทียมได้ถึง 10-20 เท่า การวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 ทำการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU ในโคนม 10 ตัว โดยทำทุก 7 วันติดต่อกัน 8 ครั้ง ฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 mm. ที่ตรวจพบทั้งหมด 932 ใบ สามารถเจาะเก็บไข่ได้ไข่ทั้งหมด 657 ใบ (70.49%) ในกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศ ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว 23.5% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อแยกเพศ (13.1%) ผลการนำตัวอ่อนระยะ บลาสโตซีสไปย้ายฝากให้โคตัวรับ กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศมีอัตราการตั้งท้อง 41.6% (25/60) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศเพียงเล็กน้อย (38.7%, 12/31) โดยกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศมีลูกคลอด 96.0% (24/25) โดยมีตัวรับแท้งลูก 1 ตัว และเป็นลูกเพศผู้ 45.8% (11/24) และเพศเมีย 54.1% (13/24) กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อแยกเพศโคตัวรับทุกตัวคลอดลูกครบไม่มีการแท้ง ได้ลูกเพศผู้ 8.3% (1/12) และเพศเมีย 91.6% (11/12)

การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำบลาสโตเมียร์ที่แยกเจากตัวอ่อนโคไปฝังลงในแท่งเจลแล้วนำไปเลี้ยง โดยเปรียบเทียบกับนำบลาสโตเมียร์ที่ไม่ฝังในแท่งเจลไปเลี้ยงในระบบ Well-of-Well (WOW) เพื่อหาข้อมูลการเจริญของตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส เริ่มโดยนำตัวอ่อนระยะไซโกตไปฝังในแท่งเจล 1% agarose หรือ 1% calcium alginate ก่อนนำไปเลี้ยง ซึ่งได้อัตราการเจริญของตัวอ่อนไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ฝังในแท่งเจล และกลุ่มควบคุม คัดเลือกวิธีการฝังในแท่งเจล 1% calcium alginate ไปใช้ทำการทดลองต่อ พบว่ากลุ่มที่แยกบลาสโตเมียร์ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสมากกว่าตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์ ในกลุ่มที่แยกบลาสโตเมียร์ (ระยะ 2 และ 8 เซลล์) WOW และ 1% calcium alginate ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน ยกเว้นระหว่างระยะ 2 เซลล์ด้วยกันที่ฝังใน 1% calcium alginate และ WOW สำหรับไข่จากการทำ OPU แล้วนำมาผลิตตัวอ่อนแล้วแยกบลาสโตเมียร์ที่ระยะ 2 เซลล์ การเลี้ยงในระบบ WOW ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองนี้สรุปได้ว่าการฝังในเจลที่เป็น 1% calcium alginate สามารถทำให้บลาสโตเมียร์ที่แยกจากตัวอ่อนระยะ 2 และ 8 เซลล์ เจริญต่อไปได้ นอกจากนี้เทคนิคการฝังในเจลสามารถใช้ทดแทนการเลี้ยงบลาสโตเมียร์ในระบบการเลี้ยงแบบ WOW

Abstract

In vitro embryo production using oocytes collected by OPU and transfer embryos to recipients will produce calves born more than artificial insemination 10-20 times. This research divided into 2 experiments. Experiment 1, collected oocytes from 10 dairy cows every 7 days for 8 consecutive times. The total 932 follicle diameter 3-8 mm. could collect 657 oocytes (70.49%) by OPU. The blastocyst production rates were 23.5% in normal semen group which was non-significant different from sexed semen group (13.1%). The pregnancy rates after transfer embryos were 41.6% (25/60) in normal semen group and 38.7% (12/31) in sexed semen group. The calving rates were 24/25 (96.0%) in normal semen group and 100% (13/13) in sexed semen group. In normal semen group had male calves 45.8% (11/24) and female calves 54.1% (13/24). In sexed semen group had male calf 8.3% (1/12) and female calves 91.6% (11/12).

Experiment 2, this study aimed to examine how gel embedding compared with the Well-of-Well (WOW) system when culturing bovine separated blastomeres, in terms of developmental competence rates and blastocyst quality. We first optimized the gel-embedding method via culturing intact zygotes in either 1% agarose or 1% calcium alginate gel. Gel-embedded groups and control did not differ in development rates, but the 1% calcium alginate group was selected for subsequent experiments due to higher blastocyst recovery. The separated blastomeres group had higher potential for blastocyst production than the intact embryo group. Among separated blastomeres (2- and 8-cell), WOW and 1% calcium alginate did not differ in blastocyst formation rate, except between the 2-cell 1% calcium alginate and WOW groups, with the latter exhibiting the highest rate of blastocyst formation. Within the WOW system, the separated 2-cell embryo resulted in significantly higher rates of OPU (ovum pick-up)-derived blastocysts than the intact 2-cell embryo. In conclusion, the 1% calcium alginate gel can support cell growth of separated 2- and 8-cell bovine embryos during blastomere aggregation. Moreover, the gel-embedded technique is a suitable replacement for WOW in producing blastocysts from bovine separated blastomeres.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	5
3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	5
3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU เพื่อนำไข่มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้ว เปรียบเทียบการใช้น้ำเชื้อแยกเพศเมีย และน้ำเชื้อไม่แยกเพศ แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้ ให้โคนมตัวรับเพื่อดูข้อมูลการตั้งท้องและการคลอด	5
3.2.1 โคตัวให้ การเจาะเก็บไข่และเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว	5
3.2.2 การเตรียมเซลล์บุท่อนำไข่	5
3.2.3 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว	6
3.2.4 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว	6
3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว	6
3.2.6 การย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ	6
3.3 การทดลองที่ 2 การแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนโครระยะ 2 และ 8 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่ได้จาก OPU และวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์จนถึงระยะบลาสโตซีส	7
3.3.1 การเจาะเก็บไข่โคโดยวิธี OPU และการเตรียมไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์	7
3.3.2 การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการเลี้ยงตัวอ่อนโค	7
3.3.3 การฝังตัวอ่อนโคลงในแท่งเจล	8
3.3.4 การเตรียมตัวอ่อนโคแยกบลาสโตเมียร์	8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.5 การประเมินคุณภาพตัวอ่อนโครยะยะบลาสโตซีส	9
3.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	9
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	10
4.1.1 ผลการทดลองที่ 1	10
4.2.2 ผลการทดลองที่ 2	12
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	19
5.1 สรุปผลการวิจัย	19
5.2 ข้อเสนอแนะ	19
บรรณานุกรม	20
ประวัติผู้วิจัย	23
ผลงานตีพิมพ์	34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลการทำ OPU เก็บไข่โค การทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ 11

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนโครยะยะ 1-เซลล์ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วหลังจากฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล และนำไปเลี้ยงต่อในหลอดแก้ว 15

ตารางที่ 3 แสดงในจำนวนเซลล์ในตัวอ่อนระยะแอกซ์แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วหลังจากฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจลและนำไปเลี้ยงต่อในหลอดแก้ว 15

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ และ 8-เซลล์ ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยก จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW หรือเลี้ยงโดยฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate 16

ตารางที่ 5 แสดงในจำนวนเซลล์ในตัวอ่อนระยะแอกซ์แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ และ 8-เซลล์ ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยก จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW หรือ เลี้ยงโดยฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate 17

ตารางที่ 6 แสดงความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยก จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW 18

ตารางที่ 7 แสดงในจำนวนเซลล์ในตัวอ่อนระยะแอกซ์แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยกจากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW 18

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การเลี้ยงโคนมของประเทศไทยมีมาแล้วกว่า 50 ปี มีความก้าวหน้าเป็นลำดับ แต่โคนมลูกผสมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงในระดับตั้งแต่ 6,000 กิโลกรัมต่อปีขึ้นไปยังมีไม่มาก อีกทั้งลูกโคนมเพศผู้ไม่เป็นที่ต้องการเนื่องจากรีดนมไม่ได้ ทำให้การเพิ่มจำนวนโคนมเพศเมียพันธุ์ดีทำได้ช้า อีกทั้งการผลิตน้ำนมในประเทศยังไม่พอต้องนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2554 มีการนำเข้าคิดเป็นจำนวนเงินถึง 15,500 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) มีรายงานการผลิตโคพันธุ์ดีทั้งโคเนื้อและโคนมเชิงพาณิชย์ด้วยการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี ovum pick up (OPU) จากนั้นนำไข่มาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วกับน้ำเชื้อโคแยกเพศ เพื่อผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับ (Pontes และคณะ, 2011) ดังนั้นจึงควรเร่งการผลิตโคนมพันธุ์ดีด้วยการคัดเลือกโคนมที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงมาเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU เพื่อนำไข่มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อแยกเพศเฉพาะเพศเมีย แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้ให้โคนมตัวรับที่ให้น้ำนมไม่สูง และนำตัวอ่อนที่เหลือใช้ไปทำตัวอ่อนแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป การใช้เทคโนโลยีนี้จะสามารถเพิ่มจำนวนโคนมพันธุ์ดีเฉพาะเพศเมียมากขึ้นกว่าการผสมเทียม 10-20 เท่า และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวอ่อนโคนมเพศเมียด้วยวิธีนี้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดของลูกโคจากการนำตัวอ่อนมาแยกบลาสโตเมียร์แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดแก้วใน ก่อนนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไปย้ายฝากให้โคตัวรับ (Tagawa และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ ที่ผลิตจากการปฏิสนธิในหลอดแก้วโยใช้ไข่ที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU เพื่อเพิ่มจำนวนตัวอ่อน และนำไปเลี้ยงในหลอดแก้ว เพื่อดูอัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีส เพื่อนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU เพื่อนำไข่มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วเปรียบเทียบการใช้น้ำเชื้อแยกเพศเมียและน้ำเชื้อไม่แยกเพศ แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้ให้โคนมตัวรับเพื่อดูข้อมูลการตั้งท้องและการคลอด

1.2.2 ศึกษาผลของการแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนโครระยะ 2 และ 8 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่ได้จากการทำ OPU และวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนต่ออัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการเจาะเก็บไข่จากโคนมเพศเมีย จากนั้นนำมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วกับน้ำเชื้อโคนมแยกเพศเมีย และน้ำเชื้อไม่แยกเพศ เมื่อได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส จะนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับ นอกจากนี้จะทำการทดลองเก็บไข่โดยวิธี OPU และเจาะเก็บไข่จากรังไข่ที่ได้จากจากโรงฆ่าสัตว์แล้วนำไข่ไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยน้ำเชื้อไม่แยกเพศ แล้วนำตัวอ่อนระยะ 2 และ 8 เซลล์ มาแยกบลาสโตเมียร์เพื่อให้ได้จำนวนตัวอ่อนเพิ่มขึ้น จากนั้นทำการศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนให้เจริญสู่ระยะบลาสโตซีส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ข้อมูลการเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU เพื่อนำไข่มาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วเปรียบเทียบน้ำเชื้อแยกเพศเมียและน้ำเชื้อไม่แยกเพศ และได้ข้อมูลการตั้งท้องและการคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อน

1.4.2 ได้ข้อมูลการแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนโครยะ 2 และ 8 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่ได้จากการทำ OPU และได้วิธีการเลี้ยงตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์จนถึงระยะบลาสโตซีส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

การย้ายฝากตัวอ่อนโคเพื่อการค้าเริ่มตั้งแต่ปี 1970 ที่อเมริกาเหนือ (Betteridge, 1981; 2003) โดยกระตุ้นโคเพศเมียพันธุ์ดีด้วยฮอร์โมนเพื่อให้ตกไข่มากกว่า 1 ใบ แล้วทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อโคพันธุกรรมดี หลังจากนั้น 7 วัน ทำการชะล้างตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากมดลูกเพื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนไปยังโคตัวรับที่เตรียมไว้ แต่จำนวนและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับการตกไข่ของโคตัวให้ และบางครั้งตัวอ่อนที่ชะล้างได้มีคุณภาพต่ำ ทำให้ต้นทุนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีนี้ค่อนข้างสูง ต่อมามีการพัฒนาการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วโดยใช้ไข่สุกที่เก็บจากโคที่มีชีวิต และเมื่อนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคตัวรับได้ลูกโคเกิดมา (Brackett และคณะ, 1982) ในปี 1987 Callesen และคณะ ประสบความสำเร็จในการเจาะเก็บไข่จากรังไข่โคที่ยังมีชีวิตด้วยวิธี OPU จากนั้นในปี 2006 Xu และคณะ นำไข่ที่เจาะเก็บได้จากโคเพศเมียพันธุ์ดีที่ให้น้ำนมสูงมาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อแยกเพศโดยเครื่อง Flow Cytometer ร่วมกับเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ด้วยวิธีการนี้สามารถผลิตลูกโคนมเพศเมียที่ให้ปริมาณน้ำนมสูงได้ อีกทั้งการทำ OPU ในโค สามารถทำได้ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ติดต่อกันเป็นเวลา 2 เดือนโดยไม่ส่งผลเสียต่อระบบสืบพันธุ์ในภายหลัง (Aller และคณะ, 2010)

ต่อมาในปี 2011 Presicce และคณะ ทำการกระตุ้นโคเพศเมียด้วยฮอร์โมน Follicle-stimulating hormone (FSH) ก่อนการทำ OPU พบว่าตัวอ่อนโคหลังการปฏิสนธิในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อแยกเพศกับไข่ที่ได้จากโคที่ฉีด FSH มีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนที่ได้จากโคที่ไม่ฉีด FSH แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังไม่สามารถประยุกต์ใช้ในเชิงการค้าได้ เนื่องจากต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการผสมเทียม อย่างไรก็ตามปริมาณตัวอ่อนที่ได้จากการทำ OPU น้อยเมื่อเทียบกับตัวอ่อนที่ได้จากไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์เนื่องจากปริมาณไข่ที่เข้าเลี้ยงเริ่มต้นแตกต่างกัน การนำไข่เข้าเลี้ยงเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 20 ใบ ให้อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการเข้าเลี้ยงเพียงลำพังหรือน้อยกว่า (Donnay และคณะ, 1996; O'Doherty และคณะ, 1997) เนื่องจากโคเนื้อมีจำนวนฟอลลิเคิลมากกว่าโคนม โดยเฉลี่ยแล้วการทำ OPU 1 ครั้ง ในโคเนื้อจะได้ไข่ประมาณ 18-25 ใบ ในขณะที่โคนมได้ไข่ประมาณ 2-10 ใบ (Pontes และคณะ, 2011) ในปี 2007 Takawa และคณะ ทำการผลิตลูกโคแฝดแท้จากตัวอ่อนปฏิสนธิในหลอดแก้วจากไข่ OPU โดยแยกบลาสโตเมียร์ในตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ เปรียบเทียบกับการตัดตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสพบว่าทั้งสองวิธีสามารถผลิตลูกโคแฝด 83.3% และ 75% ตามลำดับ Lopes-da-Costa และคณะ (2011) พบว่า ในวันที่ 42 หลังการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการตัดครึ่งบลาสโตซีสสามารถพัฒนาและมีขนาดเท่ากับตัวอ่อนที่ไม่ได้ตัด

นอกจากนั้นตัวอ่อนเหล่านี้ยังสามารถหลั่งโปรตีน pregnancy-specific protein B (PSPB) ออกมาไม่แตกต่างกับตัวอ่อนที่ไม่ได้ตัดอีกด้วย

เนื่องจากปริมาณไข่ที่เจาะได้จากการทำ OPU น้อยกว่าไข่ที่เก็บได้จากรังไข่โรงฆ่าสัตว์ ซึ่งส่งผลต่ออัตราการเจริญและคุณภาพของตัวอ่อนเมื่อเลี้ยงในหลอดแก้ว การประยุกต์ใช้เทคนิค agarose embedded helper embryos โดยนำตัวอ่อนที่ได้จาก OPU มาเลี้ยงร่วมกันกับตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ที่ฝังไว้ใน 1% agrose พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อน OPU เพิ่มขึ้น อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวอ่อน OPU กับ helper embryos คือ 3 ต่อ 7 (Senatore และคณะ, 2010) นอกจากนี้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากไข่ OPU ที่ได้มีคุณภาพดีขึ้นเมื่อเทียบกับการเลี้ยงตัวอ่อนแบบปกติ (Deb และคณะ, 2011)

เมื่อนำเทคนิคต่างๆข้างต้นมาประยุกต์ใช้ร่วมกันจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตลูกโคนมเพศเมียเป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะศึกษาการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU เพื่อนำไข่มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วเปรียบเทียบการใช้น้ำเชื้อแยกเพศเมีย และน้ำเชื้อไม่แยกเพศ แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้ให้โคนมตัวรับเพื่อดูข้อมูลการตั้งท้องและการคลอด นอกจากนี้จะทำการศึกษาผลของการแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนโครยะ 2 และ 8 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่ได้จาก OPU และไข่ที่เจาะจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ และวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ในหลอดแก้วให้ได้ระยะบลาสโตซีส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาการเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU เพื่อนำไข่มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้ว เปรียบเทียบการใช้น้ำเชื้อแยกเพศเมียและน้ำเชื้อไม่แยกเพศ แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้โคนมตัวรับเพื่อดูข้อมูลการตั้งท้องและการคลอด

3.2.1 โคตัวให้ การเจาะเก็บไข่และเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว

นำแม่โคนมที่มีลูกมาแล้ว 1-3 ตัว และอยู่ระหว่างรีดนม จำนวน 10 ตัว ซึ่งมีการจัดการเลี้ยงดู การให้อาหาร และสภาพแวดล้อมเดียวกัน มาทำการเจาะดูดไข่โดยวิธี OPU ทุกๆสัปดาห์ รวม 8 ครั้ง จะไม่มีการฉีดฮอร์โมนใดๆให้โคก่อนเจาะเก็บไข่ โดยเจาะเก็บจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดระหว่าง 3-8 มิลลิเมตร การทำ OPU เจาะดูดไข่จากฟอลลิเคิลจะใช้เข็มโควา (Cova needle, Misawa Medical, Tokyo, Japan) โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (Prosound 2, Tokyo, Japan) ที่มีหัวอ่าน 7.5 MHz convex vaginal transducer ต่อกับเครื่องดูดสุญญากาศ 120 mmHg ไข่โคที่เก็บได้จะอยู่ในหลอดทดลอง ขนาด 50 ml ที่มีสารละลาย Lactate Ringer's เติมด้วย 1% calf serum (CS, Gibco-BRL) และ 10 IU/ml Novo-Heparin injection 1000 (Aventis Pharma Ltd, Tokyo, Japan) ขณะที่เจาะดูดไข่ให้ทำการชะล้างท่อเข็มด้วยสารละลายดูดเจาะไข่ทุกๆ 2 นาที หลังจากการดูดเจาะไข่เสร็จสิ้น นำน้ำยาที่ได้มากรองด้วยชุดกรอง (Emcon Filter, Spring Valley, WI, USA) ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสอย่างน้อย 2 ชั้นขึ้นไปเข้าเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil (Sigma) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µL น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma) ที่เติมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL), 50 IU/mL hCG (Intervet), 0.02 AU/mL Follicle Stimulating Hormone (FSH; Antrin-R 10; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) และ 1 µg/mL 17β-estradiol (Sigma) โดยเลี้ยงไข่ไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลานาน 23 ชั่วโมง

3.2.2 การเตรียมเซลล์บุท่อนำไข่

เก็บท่อนำไข่จากโรงฆ่าสัตว์ ท่อนำไข่ที่เก็บได้ต้องผ่านการชะล้างทำความสะอาดในสารละลาย 0.9% NaCl โดยแช่ในน้ำแข็งขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดภายนอกท่อนำไข่ด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง เก็บรวบรวมเซลล์บุท่อนำไข่โดยใช้ปากคีบขูดเซลล์จากภายในท่อนำไข่ออกมาล้างด้วยน้ำยา mDPBS 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ไม่ใช่เซลล์บุท่อนำไข่ออก จากนั้นล้างในน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS 2 ครั้ง จากนั้นทำการเลี้ยงโดยย้ายใส่ใน 100 µL หยดน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil

เพาะเลี้ยงภายในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เซลล์บุท่อนำไข่ที่เลี้ยงไว้นี้มีไว้สำหรับทำ co-culture กับตัวอ่อน

3.2.3 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำน้ำเชื้อโคนมไม่แยกเพศ และแยกเพศเฉพาะเพศเมียครั้งละ 1 หลอด มาทำละลาย โดยนำขึ้นมาจากถังไนโตรเจนเหลว ทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70 % ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลายแล้วไหลลงหลอด eppendorf แล้วปิเปตน้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด conical tube ที่มีน้ำยา BO medium ที่เติมด้วย 2.5 mM caffeine และ 100 µg/mL heparin (Suteevun และคณะ, 2006) ปริมาตร 1.5 mL แล้วนำไปวางเอียง 45 องศาในตู้อบอุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1 mL ไปไว้ในหลอด conical tube ที่มีน้ำยา BO 5 mL แล้วนำไปปั่นที่ 500x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะอสุจิที่ก้นหลอด เจือจางอสุจิที่ได้ด้วยน้ำยาสำหรับปฏิสนธิ (BO medium ที่เติมด้วย 4 mg/mL BSA) ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัว/ซีซี แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µL/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่

3.2.4 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว มาล้างด้วยน้ำยาสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง

3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

เมื่อบ่มไข่และอสุจิร่วมกันครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ไปล้างด้วยน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (modified synthetic oviduct fluid, mSOFaa ที่เติมด้วย 3 mg/mL BSA, mSOFaa-BSA) แล้วปิเปตขึ้นลงหลายๆ ครั้ง เพื่อให้อสุจิและเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่ออกให้มากที่สุด แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในสัดส่วน 20 ใบ/100 µL ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 5% CO_2 และ 90% N_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ เลี้ยงในน้ำยา mSOFaa-BSA ที่มีเซลล์บุท่อนำไข่ co-culture โดยเลี้ยงตัวอ่อนในสัดส่วน 10 ใบ/50 µL ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air ต่ออีกเป็นเวลา 5 วัน แล้วเก็บข้อมูลตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส

3.2.6 การย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

ทำการเหนี่ยวนำให้โคนมสาวเป็นสัดและตกไข่ด้วยการสอด CIDR (DEC International NZ Limited, Hamilton, New Zealand) ไว้ในช่องคลอดโค และฉีดฮอร์โมน E_2 หลังจากนั้น 8 วันจะดึง CIDR ออก แล้วฉีดฮอร์โมน Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$, Estrumate®, Vet Phama Friesoythe GmbH, Friesoyth, Germany) หลังจากฉีด $PGF_{2\alpha}$ 60 ชั่วโมงจะฉีดฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH, Fertagyl®, Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany) หลังจากนั้น 7-8 วัน

จะนำตัวอ่อนสดย้ายฝากให้โคตัวรับ 1 ตัวอ่อน/ตัว หลังจากย้ายฝากตัวอ่อน 42 วัน จะตรวจการตั้งท้องด้วยอัลตราซาวด์และล้วงตรวจการตั้งท้องอีกครั้งที่ 80 วันหลังย้ายฝากตัวอ่อน และเก็บข้อมูลเพศของลูกโคที่เกิด

3.3. การทดลองที่ 2 การแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนโครยะ 2 และ 8 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่ได้จาก OPU และวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์จนถึงระยะบลาสโตซีส

3.3.1 การเจาะเก็บไข่โคโดยวิธี OPU และการเตรียมไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ใช้เข็มเบอร์ 19G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 5 ml ดูดไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มจากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 มิลลิเมตร

สำหรับการเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU แม่โคที่มีวงรอบปกติอยู่ระหว่างรีดนม และไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จะถูกเจาะเก็บไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 mm ด้วยเข็ม OPU ขนาด 17G x 500 mm (Cova needle; Misawa Medical, Tokyo, Japan) โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (HS-2000, Honda Electronics Co. Ltd, Toyohashi, Japan) ที่มีหัวอ่าน 7.5 MHz convex vaginal transducer ต่อกับเครื่องดูดสุญญากาศ 120 mmHg ไข่โคที่เก็บได้จะอยู่ในหลอดทดลองขนาด 50 ml ที่มีสารละลาย Lactate Ringer's เติมด้วย 1% calf serum (CS, Gibco-BRL) และ 10 IU/ml Novo-Heparin injection 1000 (Aventis Pharma Ltd, Tokyo, Japan)

นำไข่โคที่เก็บได้จากโรงฆ่าสัตว์และวิธี OPU มาล้าง 3-4 ครั้ง ในน้ำยา Dulbecco's phosphate buffer (DPBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) เติมด้วย 1% CS นำไข่ที่ได้ล้าง 3-4 ครั้ง ในน้ำยาเลี้ยงไข่ที่ประกอบด้วย TCM-199 (Gibco-BRL) ที่เติมด้วย 5% CS, 0.02 AU/ml FSH (Antrin-R 10; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) จากนั้นนำไข่ย้ายลงในน้ำยาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย paraffin oil (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 รn air นาน 20 ชั่วโมง

3.3.2 การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการเลี้ยงตัวอ่อนโค

การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว ทำตามขั้นตอนของ Imai และคณะ (2006) โดยนำหลอดน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งพันธุ์ Holstein มาละลายในน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ตัดหลอดน้ำเชื้อหยดลงบนผิวของน้ำยา 45-90% Percoll gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 4 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 670 x gนาน 20 นาที จากนั้นนำตะกอนใส่ลงในน้ำยา BO (Brackett and Oliphant, 1975) ที่เติมด้วย 10 mM Hypotaurine (Sigma), 4 ul/ml Heparin ปั่นเหวี่ยงที่ 543 x gนาน 5 นาที นำตะกอนอสุจิที่ได้ไปปรับความเข้มเป็น 3 ล้านตัว/ml ด้วยน้ำยา BO ที่เติมด้วย 5 mM Hypotaurine, 4 ul/ml Heparin และ 10 mg/ml BSA (Sigma) จากนั้นนำไปใช้ปฏิสนธิในหลอดแก้วกับไข่ที่สุกแล้ว ในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 6 ชั่วโมง

เมื่อครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอ่อนโคที่ผ่านการปฏิสนธิแล้วมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกโดยใช้ปิเปตแก้ว นำไปล้าง 3-4 ครั้ง ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน CR1aa ที่เติมด้วย 5% CS (Rosenkrans และคณะ 1993) จากนั้นนำตัวอ่อนโคย้ายลงในน้ำยาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย paraffin oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2 , 90% N_2 นาน 7-8 วัน หลังปฏิสนธินาน 31 และ 51 ชั่วโมง ตัวอ่อนโครระยะ 2 เซลล์ และ 8 เซลล์ ตามลำดับ นำไปเป็นกลุ่มควบคุมในการทดลองต่อไป

3.3.3 การฝังตัวอ่อนโคลงในแท่งเจล

3.3.3.1 แท่งเจล 1% Agarose

การเตรียมเจล 1% Agarose ทำตามขั้นตอนของ Senatore และคณะ (2010) โดยนำผง Agarose ชนิด low gelling และ low melting point (Takara Korea Biomedical Inc. Seoul, Korea) ละลายในสารละลาย PBS ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28° C) ในรูปแบบของแข็ง เมื่อต้องการนำตัวอ่อนโคฝังลงเจล นำเจลที่อุณหภูมิห้องมาทำให้ละลายเป็นของเหลวด้วยไมโครเวฟ 600 วัตต์ นาน 90 วินาที จากนั้นรอจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 39°C นำตัวอ่อนโค 5 ตัวอ่อนระยะ zygote ย้ายลงในน้ำยา 1% Agarose และดูดกลับด้วยปิเปตแก้ว จากนั้นนำตัวอ่อนโคที่อยู่ในแท่งเจลมาเลี้ยงต่อในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน CR1aa ที่เติมด้วย 5% CS นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2 , 90% N_2 นาน 7-8 วัน

3.3.3.2 แท่งเจล 1% Calcium alginate

การเตรียมเจล 1% Calcium alginate ทำตามขั้นตอนของ Kobayashi และคณะ (2006) เตรียมสารละลาย 1% Sodium alginate โดยนำผง Calcium alginate (Gibco-BRL) 1 g ละลายในสารละลาย 0.9% NaCl 100 ml และเตรียมสารละลาย 0.1% Calcium chloride โดยนำผง Calcium chloride dehydrate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan) 0.1 g ละลายในสารละลาย Lactate Ringer's 100 ml เมื่อต้องการนำตัวอ่อนโคฝังลงเจล นำตัวอ่อนโค 5 ตัวอ่อนระยะ zygote ย้ายลงในสารละลาย 1% Sodium alginate จากนั้นย้ายตัวอ่อนโคลงใน สารละลาย 0.1% Calcium chloride เพื่อสร้างเป็นแท่งเจล นำตัวอ่อนโคที่อยู่ในแท่งเจลมาเลี้ยงต่อในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน CR1aa ที่เติมด้วย 5% CS นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2 , 90% N_2 นาน 7-8 วัน

3.3.4 การเตรียมตัวอ่อนโคแยกบลาสโตเมียร์

การเตรียมตัวอ่อนโคแยกบลาสโตเมียร์ ทำตามขั้นตอนของ Nagai และคณะ (2013) โดยนำตัวอ่อนโครระยะ 2 เซลล์ และ 8 เซลล์ (หลังปฏิสนธิในหลอดแก้ว 31 และ 51 ชั่วโมง ตามลำดับ) ใส่ลงในสารละลาย 0.25% Protease (Kaken Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo, Japan) เป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อกำจัดเปลือกของตัวอ่อน จากนั้นแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนโคด้วยปิเปตแก้ว โดยแยกตัวอ่อนโครระยะ 2 เซลล์ แยกเป็น 1 บลาสโตเมียร์ 2 กลุ่ม และ ตัวอ่อนโครระยะ 8 เซลล์ เป็น 4 บลาสโตเมียร์ 2 กลุ่ม ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอ่อนโคแยกบลาสโตเมียร์และตัวอ่อนปกติไปเลี้ยงในจานเลี้ยงพิเศษ WOW (กลุ่มควบคุม) หรือนำไปฝังในแท่งเจล 1% Calcium alginate (กลุ่มทดลอง) จากนั้นนำตัวอ่อนโคย้ายลงในน้ำยาเลี้ยงบน

จานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย paraffin oil เลี้ยงในสัดส่วน 5 ใบ/50 µl นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2 , 90% N_2 นาน 6 วัน สำหรับตัวอ่อนโคระยะ 2 เซลล์ และ 5 วัน สำหรับตัวอ่อนโคระยะ 8 เซลล์ ตามลำดับ

3.3.5 การประเมินคุณภาพตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีส

การประเมินคุณภาพตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีส ทำตามขั้นตอนของ Thouas และคณะ (2001) โดยนำตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสมาล้างในสารละลาย DPBS ที่เติมด้วย 0.1 mg/ml Propidium iodide (PI), 0.2% v/v Triton X-100 นาน 1 นาที จากนั้นย้อมสีตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีส เป็นเวลา 5 นาที ด้วย 25 ug/ml Bisbenzimide (Hoechst 33342) ที่ละลายอยู่ใน 99.5% ethanol นำตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสที่ย้อมสีแล้วไปล้างในน้ำยา glycerol จากนั้นนำไปวางบนกระจกสไลด์และปิดด้วย coverslip จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Olympus, Tokyo, Japan) เพื่อนับจำนวนเซลล์ โดยที่เซลล์ trophectroderm จะเห็นเป็นสีแดง และ inner cell mass จะเห็นเป็นสีน้ำเงิน

3.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ทำการเปลี่ยนข้อมูลเปอร์เซ็นต์เป็น arcsine ก่อนทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเมื่อค่า P น้อยกว่า 0.05

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการทดลองที่ 1

จากตารางที่ 1 การเจาะเก็บไข่โดยวิธี OPU ในโคนม 10 ตัว ที่กำลังรีดนม โดยไม่มีการฉีดฮอร์โมนใดๆโดยทำทุก 7 วันติดต่อกัน 8 ครั้ง จากฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 mm. ที่ตรวจพบทั้งหมด 932 ใบ สามารถเจาะเก็บไข่ได้ไข่ทั้งหมด 657 ใบ (70.49%) ในการทำ OPU มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเก็บไข่ได้มากหรือน้อย ได้แก่พันธุ์โค ซึ่งมีรายงานว่าโคพันธุ์เนลลอร์ ซึ่งเป็นโคเนื้อเมืองร้อนจะมีฟอลลิเคิลในรังไข่มากกว่าโคพันธุ์อื่น ทำให้เก็บไข่โดยวิธี OPU ได้มากกว่าโคพันธุ์อื่น (Monteiro และคณะ, 2017) นอกจากนี้โคนมที่กำลังรีดนมจะได้ไข่น้อยกว่าโคนมที่ไม่ได้รีดนม (Vieira และคณะ, 2014) การฉีด GnRH ก่อนทำ OPU 48 ชั่วโมง ทำให้เก็บไข่ได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ฉีด GnRH (Ogata และคณะ, 2016) มีรายงานว่าการฉีด FSH ก่อนการทำ OPU ในโคนมทำให้เก็บไข่ได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีด (Vieira และคณะ, 2014, 2016) แต่รายงานของ Barboza da Silva และคณะ (2017) ซึ่งทำ OPU ในโคนมที่ไม่รีดนม พบว่าการฉีด FSH วันละ 2 ครั้ง 2 หรือ 4 วัน ก่อนการทำ OPU จำนวนไข่ที่เก็บได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้ฉีด FSH

จากตารางที่ 1 ในกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศ ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว 23.5% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อแยกเพศ (13.1%) สาเหตุที่น้ำเชื้อแยกเพศให้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต่ำอาจจะเนื่องมาจากในกระบวนการแยกเพศน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Flow cytometer น้ำเชื้อจะอยู่ในน้ำยาที่มีสี Hoecst 33342 อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ซึ่งจะไปมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิและอัตราการเจริญของตัวอ่อนลดลงเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่แยกเพศ มีรายงานอื่นที่ทำ OPU และนำไข่ไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้วได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส 33.9-34.2% (Monteiro และคณะ, 2017) ส่วนการใช้น้ำเชื้อแยกเพศได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสระหว่าง 23-26% (Barboza da Silva และคณะ, 2017) ซึ่งสูงกว่าการทดลองนี้

จากตารางที่ 1 ผลการนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไปย้ายฝากให้โคตัวรับ กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศมีอัตราการตั้งท้อง 41.6% (25/60) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศเพียงเล็กน้อย (38.7%, 12/31) โดยกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศมีลูกคลอด 24/25 (96.0%) โดยมีตัวรับแท้งลูก 1 ตัว และเป็นลูกเพศผู้ 45.8% (11/24) และเพศเมีย 54.1% (13/24) กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อแยกเพศโคตัวรับทุกตัวคลอดลูกครบไม่มีการแท้ง ได้ลูกเพศผู้ 8.3% (1/12) และเพศเมีย 91.6% (11/12) Ogata และคณะ (2016) รายงานการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่ได้จากการทำ OPU และทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว ได้อัตราตั้งท้อง 42-57% ส่วนรายงานของ Vieira และคณะ (2016) ได้อัตราการตั้งท้อง 33-60% ในรายงานนี้การได้ลูกโคเพศเมียเกิดจากการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ 91.6% อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งน้ำเชื้อแยกเพศจะให้ลูกโคเพศเมีย 90-95% หลังการทำผสมเทียม

ตารางที่ 1 ผลการทำ OPU เก็บไข่โค การทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

Type of semen	Donor ID	Follicle 3-8 mm.	No. oocytes collected[a]	No. IVF	No. (%) IVC[b]	No. (%) Cleaved[c]	No. (%) 8-cell[d]	No. (%) BL Day 7[e]	No. ET	Pregnancy	Calving	Male calves	Female calves
Non-sexed	1	88	66 (75.0)	58	57 (98.2)	35 (61.4)	14 (24.5)	6 (10.5)	5	2 (40.0)	2 (100)	1	1
	2	109	63 (57.7)	52	52 (100)	30 (57.6)	10 (19.2)	9 (17.3)	9	4 (44.4)	4 (100)	2	2
	3	90	70 (77.7)	66	66 (100)	34 (51.5)	25 (37.8)	11 (16.6)	9	3 (33.3)	3 (100)	1	2
	4	117	86 (73.5)	77	76 (98.7)	46 (60.5)	40 (52.6)	29 (38.1)	27	12 (44.4)	11 91.6)	5	6
	5	76	30 (39.4)	30	29 (96.6)	17 (58.6)	15 (51.7)	11 (37.9)	10	4 (40.0)	4 (100)	2	2
	Total	**480**	**315 (65.6)**	**283**	**280 (98.9)**	**162 (57.8)**	**104 (37.1)**	**66 (23.5)**	**60**	**25 (41.6)**	**24 (96.0)**	**11**	**13**
Sexed	6	74	60 (81.0)	56	54 (96.4)	23 (42.5)	12 (22.2)	6 (11.1)	5	2 (40.0)	2 (100)	0	2
	7	89	74 (83.1)	61	60 (98.3)	31 (51.6)	21 (35.0)	9 (15.0)	7	3 (42.8)	3 (100)	0	3
	8	104	81 (77.8)	77	77 (100)	34 (44.1)	29 (37.6)	8 (10.3)	6	2 (33.3)	2 (100)	0	2
	9	98	79 (80.6)	75	73 (97.3)	35 (47.9)	30 (41.0)	10 (13.6)	8	3 (37.5)	3 (100)	1	2
	10	87	48 (55.1)	42	40 (95.2)	22 (52.3)	18 (45.0)	7 (17.5)	5	2 (40.0)	2 (100)	0	2
	Total	**452**	**342 (75.6)**	**311**	**304 (97.7)**	**145 (47.6)**	**110 (36.1)**	**40 (13.1)**	**31**	**12 (38.7)**	**12 (100)**	**1**	**11**

[a] % of total number of follicle diameter 3-8 mm.

[b] % of No. IVF

[c] % of No. IVC

[d] % of No. IVC

[e] % of No. IVC

ผลการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.1.2 ผลการทดลองที่ 2

4.1.2.1 ผลของแท่งเจล (1% Agarose และ 1% Calicium alginate) ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะ zygote

จากการทดลองพบว่าอัตราการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ในกลุ่มทดลองที่ฝังตัวอ่อนระยะ 1-เซลล์ ลงในแท่งเจล 1% Agarose และแท่งเจล 1% Calicium alginate กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฝังตัวอ่อนระยะ 1-เซลล์ ลงในแท่งเจล ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) และยังพบอีกว่าคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อพิจารณาจากจำนวนเซลล์ทั้งหมดแล้วไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) โดยที่อัตราเฉลี่ยของการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ของทั้ง 3 กลุ่ม อยู่ที่ประมาณร้อยละ 30 จากการทดลองนี้พบว่าแท่งเจลจากวัสดุทั้ง 2 ชนิด ไม่ส่งผลเสียต่ออัตราการแบ่งตัวและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kobayashi และคณะ (2006) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าหากต้องการนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากกลุ่มที่ฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Agarose จะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเป็นอย่างมาก ในการทดลองถัดไปจึงเลือกใช้แท่งเจล 1% Calicium alginate มาใช้ในการทดลอง

4.1.2.2 ผลของแท่งเจลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์

จากตารางที่ 3 พบว่าตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ ที่เลี้ยงในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW มีอัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส สูงกว่าตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่เลี้ยงโดยการฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตดังกล่าวกับกลุ่มอื่นๆพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าจำนวนเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ ในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดมากกว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ โดยการฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate อีกด้วย

จากการทดลองพบว่าความสามารถในการผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์สูงกว่าตัวอ่อนปกติที่ไม่ได้ทำการแยกบลาสโตเมียร์ แต่ในทางกลับกันจำนวนเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากตัวอ่อนปกติที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์ สูงกว่ากลุ่มที่แยกบลาสโตเมียร์ (ตารางที่ 5) เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากตัวอ่อนแยก บลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่เลี้ยงโดยการฝังลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate ต่ำกว่ากลุ่มของตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์กลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังพบอีกว่า อัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์จากตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ โดยเลี้ยงในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกลับกลุ่มอื่นๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการแยกบลาสโตเมียร์ในตัวอ่อนสามารถเพิ่มอัตราการผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้สูงกว่าการเลี้ยงตัวอ่อนแบบปกติ แต่จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จะลดน้อยลง เนื่องจากการแยกบลาสโตเมียร์ในตัวอ่อนออกมาเลี้ยงนั้น ทำให้ปริมาณเซลล์ตั้งต้นของตัวอ่อนลดลงเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Tang และคณะ (2012) ที่ทำการทดลองในตัวอ่อนหนู และ Tagawa และคณะ (2008) ที่ทำการทดลองในตัวอ่อนโค จากการทดลองนี้พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ และ 8-เซลล์ เมื่อเลี้ยงด้วยจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW หรือเลี้ยงโดยการฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate ไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้นในกลุ่ม ของตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ที่ได้จากตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ โดยเลี้ยงด้วยการฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate ซึ่งพบว่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Tagawa และคณะ (2008) เช่นกัน

โดยสรุปแล้วการฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate ตัวอ่อนที่ฝังอยู่ในแท่งเจลยังสามารถเจริญเติบโตตามปกติ เทคนิคนี้สามารถช่วยในเรื่องการเพิ่มอัตราความหนาแน่นในการเลี้ยงตัวอ่อนโคคุณภาพดีที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU แล้วนำมาปฏิสนธิในหลอดแก้วได้ ในบางครั้งจำนวนไข่ที่เจาะเก็บได้มีปริมาณน้อย ทำให้อัตราความหนาแน่นในการเลี้ยงตัวอ่อนลดลง ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่ำลงเช่นกัน กรณีนี้สามารถใช้ตัวอ่อนที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาฝังลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate เพื่อเพิ่มอัตราความหนาแน่นของตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ในหยดน้ำยาได้ ซึ่งวิธีนี้เป็นอีกทางเลือกเพื่อเพิ่มอัตราความหนาแน่นของการเลี้ยงตัวอ่อนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม นอกจากการใช้จานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW ซึ่งมีราคาที่แพงกว่า แต่อย่างไรก็ตามยังพบปัญหาในขั้นตอนการฝังตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate เช่น การแยกตัวออกจากกันของบลาสโตเมียร์ที่แยกออกจากตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ ในช่วงที่ลงน้ำยา $CaCl_2$ เพื่อขึ้นรูปเป็นแท่งเจล ส่งผลให้จำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ต่ำลงอีก ในการทดลองลองเรื่องผลของระบบการเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการเจาะเก็บไข่โคคุณภาพดีด้วยวิธี OPU จึงเลือกใช้ตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ และการเลี้ยงตัวอ่อนด้วยจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW ในการศึกษา

4.1.2.3 ผลของรูปแบบการเลี้ยงตัวอ่อนต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่โคคุณภาพดีด้วยวิธี OPU

จากการเจาะเก็บไข่แม่โคสายพันธุ์ Holstein คุณภาพดีด้วยวิธี OPU โดยไม่ได้ใช้ฮอร์โมนในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ เป็นจำนวน 12 ครั้ง พบว่ามีไข่จำนวน 145 ใบถูกปฏิสนธิโดยน้ำเชื้อพ่อโคแช่แข็ง จากจำนวนไข่คุณภาพดีทั้งสิ้น 172 ใบ หลังจากปฏิสนธิเป็นเวลา 31 ชั่วโมง ได้ทำการแบ่งตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ จำนวน 46 ใบ ทำการแยกบลาสโตเมียร์

และตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ จำนวน 45 ใบ เลี้ยงเป็นกลุ่มควบคุมปกติ โดยทั้ง 2 กลุ่มนี้ เลี้ยงในระบบการเลี้ยงตัวอ่อนเดียวกันในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW พบว่ากลุ่มที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์ มีอัตราการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) แต่อย่างไรก็ตาม จำนวนเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) แต่เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ ICM ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ พบว่าไม่แตกต่างกันระหว่าง 2 กลุ่มการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Johnson และคณะ (1995) และ Tagawa และคณะ (2008) จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ แม้ว่าจะมีจำนวนเซลล์ทั้งหมดน้อยกว่าตัวอ่อนปกติร้อยละ 50 แต่ยังสามารถฝากตัวอ่อนในแม่โคให้ลูกเกิดได้ตามปกติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนโครยะ 1-เซลล์ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล และนำไปเลี้ยงต่อในหลอดแก้ว

กลุ่มทดลอง	จำนวนตัวอ่อนระยะ 1-เซลล์	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน (% ค่าเฉลี่ย ± SEM)	การเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส วันที่ 7-8 (% ค่าเฉลี่ย ± SEM)
กลุ่มควบคุม	100	86 (86.0 ± 5.6)	48 (48.0 ± 3.7)
กลุ่มที่ฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Agarose	100	72 (72.0 ± 5.8)	44 (44.0 ± 5.8)
กลุ่มที่ฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calcium alginate	100	85 (85.0 ± 1.6)	49 (49.0 ± 5.8)

ข้อมูลข้างต้นแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SEM และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต เมื่อทดสอบด้วย one-way ANOVA

ตารางที่ 3 แสดงในจำนวนเซลล์ในตัวอ่อนระยะแอกซ์แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจลและนำไปเลี้ยงต่อในหลอดแก้ว

กลุ่มทดลอง	จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่นำมาตรวจ	จำนวนนิวเคลียส ± SEM		
		เซลล์ ICM	เซลล์ TE	จำนวนเซลล์ทั้งหมด
กลุ่มควบคุม	48	35.7 ± 5.0	87.8 ± 4.9	123.5 ± 3.2
กลุ่มที่ฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Agarose	44	38.2 ± 3.9	115.5 ± 15.3	153.7 ± 13.9
กลุ่มที่ฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calcium alginate	49	35.8 ± 4.9	92.6 ± 11.4	128.5 ± 15.2

ข้อมูลข้างต้นแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SEM และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต เมื่อทดสอบด้วย one-way ANOVA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ และ 8-เซลล์ ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยก จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW หรือ เลี้ยงโดยฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate

ระยะของตัวอ่อน	รูปแบบของตัวอ่อน	ลักษณะการเลี้ยงตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนที่ใช้ในการศึกษา	การเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส วันที่ 7-8 (% ค่าเฉลี่ย ± SEM)
ตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์	ตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์	WOW	50	28 (56.0 ± 2.4)[ab]
		1% Calcium Alginate	50	23 (46.0 ± 2.4)[a]
	ตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์	WOW	50	61 (125.6 ± 4.2)[d]
		1% Calcium Alginate	50	41 (88.3 ± 9.6)[c]
ตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์	ตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์	WOW	50	34 (68.0 ± 2.0)[b]
		1% Calcium Alginate	50	30 (60.0 ± 0.0)[ab]
	ตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์	WOW	50	56 (115.0 ± 10.6)[d]
		1% Calcium Alginate	50	55 (111.7 ± 5.6)[d]

[a ,b, c, d] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $P < 0.05$ โดยทดสอบด้วย one-way ANOVA และข้อมูลข้างต้นแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 5 แสดงในจำนวนเซลล์ในตัวอ่อนระยะแอกซ์แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ และ 8-เซลล์ ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยก จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW หรือ เลี้ยงโดยฝังตัวอ่อนลงในแท่งเจล 1% Calicium alginate

ระยะของตัวอ่อน	รูปแบบของตัวอ่อน	ลักษณะการเลี้ยงตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่นำมาตรวจ	จำนวนนิวเคลียส ± SEM		
				เซลล์ ICM	เซลล์ TE	จำนวนเซลล์ทั้งหมด
ตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์	ตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์	WOW	28	22.1 ± 1.6^{b}	80.1 ± 2.2^{c}	102.2 ± 1.3^{c}
		1% Calcium Alginate	23	29.3 ± 2.0^{c}	106.7 ± 1.7^{d}	136.0 ± 1.0^{d}
	ตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์	WOW	34	16.0 ± 0.4^{a}	53.7 ± 0.9^{b}	69.7 ± 0.6^{b}
		1% Calcium Alginate	13	17.7 ± 1.3^{a}	49.4 ± 2.0^{ab}	67.1 ± 1.0^{b}
ตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์	ตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์	WOW	34	33.0 ± 1.0^{d}	115.2 ± 1.2^{e}	148.2 ± 1.1^{e}
		1% Calcium Alginate	30	35.5 ± 1.4^{d}	123.2 ± 2.5^{f}	158.7 ± 1.7^{f}
	ตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์	WOW	27	16.0 ± 0.4^{a}	51.0 ± 1.3^{b}	67.1 ± 1.6^{b}
		1% Calcium Alginate	20	15.5 ± 0.5^{a}	45.5 ± 0.5^{a}	61.0 ± 0.5^{a}

$^{a, b, c, d}$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $P < 0.05$ โดยทดสอบด้วย one-way ANOVA และข้อมูลข้างต้นแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± SEM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 6 แสดงความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยก จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อ ในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW

ระยะของตัวอ่อน	รูปแบบของตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนที่ใช้ในการศึกษา	การเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส วันที่ 7-8 (% ค่าเฉลี่ย ± SEM)
ตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์	ตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์	45	12 (24.4 ± 5.1)[a]
	ตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์	46	38 (81.8 ± 16.5)[b]

[a, b, c, d] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า P < 0.05 โดยทดสอบด้วย one-way ANOVA และข้อมูลข้างต้นแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM

ตารางที่ 7 แสดงในจำนวนเซลล์ในตัวอ่อนระยะแอกซ์แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วของตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการเจาะเก็บไข่ด้วยวิธี OPU ทั้งที่ทำการแยกบลาสโตเมียร์และไม่แยกจากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงตัวอ่อนแบบ WOW

ระยะของตัวอ่อน	รูปแบบของตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่นำมาตรวจ	จำนวนนิวเคลียส ± SEM		
			เซลล์ ICM	เซลล์ TE	จำนวนเซลล์ทั้งหมด
ตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์	**ตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์**	12	31.5 ± 2.0[a]	88.5 ± 3.7[a]	120.0 ± 4.9[a]
	ตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์	36	14.5 ± 0.4[b]	45.1 ± 0.5[b]	59.6 ± 0.8[b]

[a, b, c, d] แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า P < 0.05 โดยทดสอบด้วย one-way ANOVA และข้อมูลข้างต้นแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สามารถเก็บไข่โคนมโดยวิธี OPU ได้

5.1.2 สามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากไข่ที่เก็บโดยวิธี OPU โดยกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อไม่แยกเพศให้อัตราตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อแยกเพศ

5.1.3 สามารถผลิตลูกโคนมจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการทำ OPU และปฏิสนธิในหลอดแก้ว ทั้งจากน้ำเชื้อไม่แยกเพศและไม่แยกเพศ

5.1.4. นำการทดลองที่ 2 เขียน manuscript ส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร Livestock Science และได้รับการตีพิมพ์ดังนี้ Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., Parnpai, R. and and Imai, K. 2018. Effects of gel-embedded embryos on developmental competence of separated bovine blastomeres. Livestock Sci. 207: 25-29.

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการทำการทดลองฉีดฮอร์โมน FSH โคก่อนการทำ OPU เพื่อดูปริมาณฟอลลิเคิลก่อนเก็บไข่ จำนวนไข่ที่เก็บได้ และจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อแยกเพศ

5.2.2. ควรมีการนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการแยกบลาสโตเมียร์ตัวอ่อนระยะ 2 และ 8 เซลล์ไปย้ายฝากให้โคตัวรับเพื่อดูอัตราการตั้งท้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2555. รายงานการผลิตโคนมของประเทศไทย

Aller, J.F., N.C. Mucci, G.G. Kaiser, G. Rios, S.S. Callejas and R.H. Alberio. (2010). Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. ***Ani Rerod Sci.*** 119: 1-8.

Barboza da Silva, J.C., Ferreira, R. M., Filho M. M., Naves, J.R., Santin, T., Pugliesi, G., Madureira, E. H. 2017. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. ***Theriogenology.*** 90: 65-73.

Betteridge, K.J. (1981). An historical look at embryo transfer. ***J Reprod Fert***. 62: 1-13.

Betteridge, K.J. (2 0 0 3). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. ***Anim Reprod Sci.*** 79: 203-244ใ

Brackett, B.G., Oliphant, G., 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. ***Biol. Reprod.*** 12: 260–274.

Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in cow. ***Biol Reprod*** 27: 147-158.

Callesen, H., Greve, T. and Christensen, F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. ***Theriogenology*** 27: 217.

Deb, G.K., Jin, J.J., Kwon, T.H., Choi, B.H., Bang, J.I., Dey, S.R., Cho, I.R. and Kong, I.K. 2011. Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. ***Reproductive Biology and Endocrinology*** 9 :121.

Donnay, I., Langendonckt, A.V., Auquier, P.,Grisart, B., Vansteenbrugge, A., Massip, A. and Dessy, F. 1996. Effect of co-culture and embryo number on the In vitro development of bovine embryos. ***Theriogenology.*** 47*:* 1549-1561.

Imai, K., Tagawa, M., Yoshioka, H., Matoba, S., Narita, M., Inaba, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, S., 2006. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle. ***J. Reprod. Dev.*** 52 (Suppl), S19–S29.

Johnson, W.H., Loskutoff, N.M., Plante, Y., Betteridge, K.J. 1995. Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an in vitro derived four-cell embryo. *Vet. Rec.* 137: 15-16.

Kobayashi, S., Sakatani, M., Kobayashi, S., Takahashi, M., 2006. Alginate-encapsulated bovine embryos support in vitro development of a small number of embryos. ***Reprod. Fertil. Dev.*** 18: 248-248.

Lopes-da-Costa, L., Silva, J.C., Deloche, M.C., Jeanguyot, N., Humblot, P. and Horta A.E.M. 2011. Effects of embryo size at transfer (whole versus demi) and early pregnancy progesterone supplementation on embryo growth and pregnancy-specific protein bovine concentrations in recipient dairy heifers. ***Theriogenology.*** 76*:* 522-531.

Monteiro, F.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Bayeux, B.M., Accorsi, M., Campanholi, S.P., Dias, E.A.R., Souza, A.H., Baruselli, P.S. 2017. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. ***Theriogenology.*** 90: 54-58.

Nagai, M., Hori, N., Miyamoto, M., Sakaguchi, M., Hayakawa, Y., Kawai, M., Furuya, T., Imai, K., 2013. Effect of co-culture with intact embryos on development of bovine separated blastomeres. ***Anim. Sci. J.*** 84: 461–465.

O'Doherty, E.M., Wade, M.G., Hill, J.L. and Boland, M.P. 1997. Effect of culturing bovine oocytes either singlyor in groups on development to blastocysts. ***Theriogenology.*** 48*:* 161-169.

Ogata, Y., Yu, G.M., Hidaka, T., Matzushige, T., Maeda, T. 2016. Effective embryo production from Holstein cows treated with gonadotropin-releasing hormone during early lactation. ***Theriogenology.*** 86: 1421-1426.

Pontes, J.H., Silva, K.C., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., Santos, G.M., Sanches, B.V., Porcionato, J.P., Vieira, P.H., Faifer, F.S., Sterza, F.A., Schenk, J.L. and Seneda, M.M. 2010. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 74: 1349-1355.

Pontes J.H.F., F.A. Melo Sterza, A.C. Basso, C.R. Ferreira, B.V. Sanches, K.C.P. Rubin and M.M. Seneda. 2011. Ovum pick up*, in vitro* embryo production and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle. ***Theriogenology***. ***75***: 1640-1646.

Presicce, G.A., Xu, J., Gong, G., Moreno, J.F., Chaubal, S., Xue, F., Bella, A., Senatore, E.M., Yang, X., Tian, X.C. and Du, F. 2011. Oocyte Source and hormonal Stimulation for In

vitro Fertilization Using Sexed Spermatozoa in Cattle. ***Veterinary Medicine International*** 2011: 1-8.

Rosenkrans Jr., C.F., Zeng, G.Q., MC Namara, G.T., Schoff, P.K., First, N.L., 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. ***Biol. Reprod.*** 49: 459–462.

Senatore, E.M., Xu, J., Suarez, N.M.V., Gong, G., Lin, T., Bella, A., Moreno, J.F., Mannino, M.E., Tian, X., Presicce, G.A., Wu, S.C., Du, F., 2010. Improved in vitro development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. ***Theriogenology*** 74: 1643–1651.

Suteevun, T., Parnpai, R., Smith, S.L., Chang, C.C., Muenthaisong, S., Tian, X.C. 2006. Epigenetic characteristics of cloned and *in vitro*-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. ***J Anim Sci.*** 84: 2065-2071.

Tang, H.H., Tsai, Y.C., Kuo, C.T. 2012. Embryo splitting can increase the quantity but not the quality of blastocysts. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 51: 236-239.

Tagawa, M., Matoba, S,. Narita, M., Saito, N., Nagai, T. and Imai, K. 2008. Production of monozygotictwin claves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. ***Theriogenology.*** 69*:* 574-582.

Thouas, G.A., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M., Trounson, A.O., 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. ***Reprod. Biomed.*** 3: 25–29.

Vieira, L.M., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., Guerreiro, B.M., Silveira, C.R.A., Moreira, R.J.C., Sá Filho, M.F., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improvein vitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. ***Theriogenology.*** 82: 318-324.

Vieira, L.M., Rodrigues, C.A., Castro Netto, A., Guerreiro, B.M., Silveira, C.R.A., Freitas, B.G., L.G.M. Bragança, K.N.G. Marques, M.F. Sá Filho, Bó, G.A., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S. 2016. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle ***Theriogenology.*** 85: 877-886.

Xu, J., Guo, Z., Su, L., Nedambale, T.L., Zhang, J., Schenk, J., Moreno, J.F., Dinnyés, A., Ji, W., Tian, X.C., Yang, X. and Du, F. 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. ***J Dairy Sci*** 89: 2510–2518.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เกิดวันที่ 7 มีนาคม 2502

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.
ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

5.5.4. Asian Reproductive Biotechnology Society

5.5.5. Thai Society for Biotechnology

5.5.6. Thai Society for Reproductive Medicine

5.5.7. Thai Society for Animal Reproduction

5.5.8. Thai Society for Gametes and Embryo Research

5.5.9. Society for Stem Cell Research

6. ประวัติการทำงาน:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 273-288.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2549. เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค. เอกสารคำสอนวิชา 304 553 Animal Cloning Technology และ 304 554 Selected Research in Animal Cloning Technology. 389 หน้า.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2553. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน. เอกสารคำสอนวิชา 314 533 Stem Cell Technology. 238 หน้า.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2560. การโคลนนิ่งโค โรงพิมพ์ หจก. เลิศศิลป์ สาส์ณ โฮลติ้ง, นครราชสีมา, 274 หน้า.

Parnpai, R., Minami, N. and Yamada, M. 1998. Current status of research for the establishment of bovine embryonic stem (ES) cells. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds.), Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity. Nakanishi Printing, Kyoto, pp. 383-388.

9. ผลงานตีพิมพ์ย้อนหลัง 5 ปี

2018

Liang, Y. and **Parnpai, R.*** 2018. Effect of vitrification procedures on the subsequent development of *in vitro* matured swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization. ***Anim. Sci. J.*** DOI: 10.1111/asj.13044

Licia Colli, Marco Milanesi, Elia Vajana, Daniela Iamartino, Lorenzo Bomba, Francesco Puglisi, Marcello Del Corvo, Ezequiel L. Nicolazzi, Sahar S. E. Ahmed, Jesus R. V. Herrera, Libertado Cruz, Shujun Zhang , Aixin Liang, Guohua Hua,Liguo Yang, Xingjie Hao, Fuyuan Zuo, Song-Jia Lai , Shuilian Wang, Ruyu Liu, Yundeng Gong, Mahdi Mokhber, Yongjiang Mao, Feng Guan, Augustin Vlaic, Bogdan Vlaic, Luigi Ramunno, Gianfranco Cosenza, Ali Ahmad, Ihsan Soysal, Emel Ö. Ünal, Mariena Ketudat-Cairns, José F. Garcia, Yuri T. Utsunomiya, Pietro S. Baruselli, Maria E. J. Amaral, **Rangsun Parnpai,** Marcela G. Drummond, Peter Galbusera, James Burton, Eileen Hoal 31, Yulnawati Yusnizar, Cece Sumantr, Bianca Moioli, Alessio Valentini, Alessandra Stella, John L. Williams and Paolo Ajmone-Marsan. 2018. New Insights on Water Buffalo Genomic Diversity and Post-Domestication Migration Routes From Medium Density SNP Chip Data. ***Frontiers Genetics.*** 9: 53: 1-17.

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2018. Effects of gel-embedded embryos on developmental competence of separated bovine blastomeres. ***Livestock Sci.*** 207: 25-29.

2017

Ye, D., Heraud, P., **Parnpai, R.*** and Li, T. 2017. Reversal of experimental liver damage after transplantation of stem-derived cells detected by FTIR spectroscopy. ***Stem Cell Intl.*** 4585169

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2017. Effect of storage tube material and resveratrol during liquid storage of matured bovine oocytes on subsequent development. ***Acta Veterinaria Hungarica*** 65: 546–555.

Paul, A.K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2017. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. ***Anim. Sci. J.*** doi: 10.1111/asj.12892.

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2017. Survival and developmental competence of bovine embryos at different developmental stages and separated blastomeres after vitrification in different solutions. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/asj.12890

Pitchayapipatkul, J., Somfai, T., Matoba, S., **Parnpai, R.,** Nagai, T., Geshi, M. and Vongpralub, T.* 2017. Microtubule stabilisers docetaxel and paclitaxel reduce spindle damage and maintain the developmental competence of in vitro-mature bovine oocytes during vitrification. ***Reprod Fertil Dev.*** doi: 10.1071/RD16193.

Tanthaisong P, Imsoonthornruksa S, Ngernsoungnern A, Ngernsoungnern P, Ketudat-Cairns M, Parnpai R.*. 2017. Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells by GSK-3 Inhibitors. ***PLoS One.*** 12: e0168059.

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2017. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 88: 231–240.

2016

Kunkanjanawan, T., Carter, R.L., Prucha, M., Yang, J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2016. miR-196a ameliorates cytotoxicity and cellular phenotype in transgenic Huntington's disease monkey neural cells. ***PloS One*** 11: e0162788.

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. ***J. Reprod. Dev.*** 62: 577-585.

Parnpai, R.*, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. ***Theriogenology.*** 86: 214-220.

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai. R.*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. ***Stem Cell Intl.*** 3038764.

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. ***Theriogenology.*** 85: 509-518.

2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.,** Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. ***J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*** 25: 372-380.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2015. Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology.*** 71: 216-223.

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.,** Punyawai, K., Sangsritavong. and Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. ***Theriogenology.*** 83: 891-896.

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** 61 : 431-437.

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. ***Sci. Rep.*** doi: 10.1038/srep11170.

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. ***Toxicol. Ind. Health.*** pii: 0748233715579805.

2014

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Reports*** 3: 1-9.

Chasombat, J., Nagai, T., Parnpai, R. and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24.

Parnpai, R.*, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. ***Thai J. Vet. Med.*** 44 (Supplement 1): 119-123.

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44 (Supplement 1): 237-240.

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44: 513-521.

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. ***Thai J. Vet. Med.*** 44 (Supplement 1): 241-243.

Putkhao, K.*, Chan, A.W.S.*, Yuksel, A. and **Parnpai, R.*** 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. ***Cloning and Transgenesis*** 2: 1000116.

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. ***Cryobiology*** 69: 496-499.

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.* and **Parnpai, R.*** 2014. Effects of Trichostatin A on in vitro development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 60: 336-341.

2013

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, in vitro embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. ***Asian-Australasian J. Anim. Sci.*** 26: 488-500.

Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured in vitro. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 617-621.

Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. ***Buffalo Bulletin*** 32 (Special Issue 1): 196-203.

Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 613-616.

Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C.* and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 84: 719-725.

2012

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. ***J. Reprod. Dev.*** http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2012-119

Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., Parnpai, R*. and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. Mitochondrion 12: 506-513.

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., Parnpai, R.*, 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: 79-87.

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*** 65: 151-156.

Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.*** 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01013.x

Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. ***Stem Cell Dev.*** 22: 1198-1205.

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R*.** 2012. Developmental potential of vitrified goat oocytes following

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** http://dx.doi.org/10.1016/j. smallrumres.2012.10.011

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: 248-257.

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.*** 58: 323-329.

Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. ***Analyst*** 135: 4774-4784.

2011

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.

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

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.

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.

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.

Noisa, P*. and **Parnpai, R.** 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. ***Stem Cells Int.*** 907961. 3

Parnpai, R., Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. ***Thai J. Vet. Med.*** Suppl. 41: 77-85.

Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 539-542.

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: 236-243.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16: 057005-1. 2010

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.

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384. (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

10.7. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด ขณะนี้ยังคงทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวป่า อย่างต่อเนื่อง

10.8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มี.ค. 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล”

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

10.10. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง “Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547

11.3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.4. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

11.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

11.6. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.7. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.8. ศิษย์เก่าดีเด่น มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560

12. การจดสิทธิบัตร

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือน เมษายน 2550

12.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

12.3. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.4. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดทดลอง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.5. รังสรรค์ พาลพ่าย ศิวัช สังศรีทวงษ์ กาญจนา ปัญญาไว “ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว” เลขทะเบียน 9367 อนุมัติวันที่ 28 พ.ย. 2557

Livestock Science 207 (2018) 25–29

Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/livsci

Effects of gel-embedded embryos on developmental competence of separated bovine blastomeres

Theesit Juanpanich[a,b], Tayita Suttirojpattana[a], Yuanyuan Liang[a], Osamu Dochi[b], Rangsun Parnpai[a,*], Kei Imai[b,*]

[a] Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand
[b] Department of Sustainable Agriculture, College of Agriculture, Food and Environmental Sciences, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:
Blastomere separation
Agar embedded embryo
Bovine
Embryo development

ABSTRACT

This study aimed to examine how gel embedding compared with the Well-of-Well (WOW) system when culturing bovine separated blastomeres, in terms of developmental competence rates and blastocyst quality. We first optimized the gel-embedding method *via* culturing intact zygotes in either 1% agarose or 1% calcium alginate gel. Gel-embedded groups and control did not differ in development rates, but the 1% calcium alginate group was selected for subsequent experiments due to higher blastocyst recovery. The separated embryo group had higher potential for blastocyst production than the intact embryo group. Among separated blastomeres (2- and 8-cell), WOW and 1% calcium alginate did not differ in blastocyst formation rate, except between the 2-cell alginate and WOW groups, with the latter exhibiting the highest rate of blastocyst formation. Within the WOW system, the separated 2-cell embryo resulted in significantly higher rates of OPU (ovum pick-up)-derived blastocysts than the intact 2-cell embryo; however, the latter had more total cells than the former. In conclusion, the 1% calcium alginate gel can support cell growth of separated 2- and 8-cell bovine embryos during blastomere aggregation. Moreover, the gel-embedded technique is a suitable replacement for WOW in producing blastocysts from bovine separated blastomeres.

1. Introduction

The combination of *in vitro* production (IVP) and ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) are more effective at producing progeny in cattle than multiple ovulation and embryo transfer (MOET) (Pontes et al., 2009). In 2014, approximately 614,464 bovine embryos were produced through *in vivo*-derived methods, while 630,202 embryos were produced through *in vitro* fertilization (IVF), with the number expected to increase in the future (Perry, 2015). Oocytes for the commercial production of bovine embryos are typically performed through OPU-IVF because the procedure can be repeated on donor cattle (Boni, 2012).

Despite the widespread use of OPU-IVF, oocyte retrieval rates are fairly low: 5–25 oocytes in Japanese black cattle, < 8 in non-stimulated Holstein cattle (Merton et al., 2009; Sugimura et al., 2013) and 3–20 in superstimulated Holstein cattle (Senatore et al., 2010). Furthermore, embryos cultured individually or in small groups resulted in lower blastocyst yield and quality than large-group cultures (Gopichandran and Leese, 2006; Senatore et al., 2010).

However, considerable advantages exist for using small-group cultures when producing separated blastomeres from intact embryos (Vajta et al., 2000; Tagawa et al., 2008; Tang et al., 2012). Early embryonic cells (zygote to morula stages) are totipotent stem cells (Schramm and Paprocki, 2004) that can differentiate into any cell type and even generate an entire organism. In cattle, separated embryos have produced twin (Tagawa et al., 2008), triplet (Willadsen and Polge, 1981), and quadruplet (Johnson et al., 1995) monozygotic calves. In humans, these methods involve generating separated blastomeres, a technique that also contributes to studying epigenetic reprogramming (Chavez et al., 2014) and generating embryonic stem cell lines for preimplantation genetic diagnosis (Klimanskaya et al., 2006). The zona pellucida must be removed for blastomere separation. Though traditionally achieved through micromanipulation (Willadsen and Polge, 1981), the expense of specialized equipment and the technical skill required has increased preferences for the more recent technique of removing zona pellucida through proteolytic-enzyme treatment (Tagawa et al., 2008). However, zona pellucida removal can result in the failure of separated blastomeres to aggregate properly (Tagawa et al., 2008). The Well of Well (WOW) culture system mitigates this problem through providing microenvironments with a very low volume (approximately 0.1 μL) of culture medium around the embryo; this

* Corresponding authors.
E-mail addresses: rangsun@g.sut.ac.th (R. Parnpai), imai@rakuno.ac.jp (K. Imai).

https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.010
Received 19 May 2017; Received in revised form 7 November 2017; Accepted 8 November 2017
1871-1413/ © 2017 Published by Elsevier B.V.

condition allows the establishment of autocrine and paracrine factors, while creating more constant and suitable conditions for embryo development than the original wells with 20 μL of medium (Vajta et al., 2000). These studies indicate that separated blastomeres should be grown in small cultures (Vajta et al., 2000; Tagawa et al., 2008; Tang et al., 2012).

One technique that addresses the suboptimal performance of individual or small-group cultures is gel embedding. Inserting embryos into materials such as calcium alginate gel (Kobayashi et al., 2006) or low-melting-point agarose gel (Senatore et al., 2010; Deb et al., 2011) appears to improve the developmental competence and quality of small-group-cultured embryos, with embedded embryos capable of becoming blastocysts (Tagawa et al., 2008; Nagai et al., 2013). We hypothesized that the reason for this improved performance is because the gel material functions as an artificial zona pellucida.

To the best of our knowledge, no reports are currently available on the efficacy of embedding separated blastomeres in gel material. Thus, our objective was to investigate the developmental rates and quality of separated bovine embryos produced through blastomere separation and gel embedding.

2. Materials and methods

2.1. Animal management

Non-lactating Holstein cows were used for OPU donors (n = 3; parity = 5.0 ± 1.0; body condition score [BCS] at start of experiment = 2.4 ± 0.1). All cows were housed in a loose housing barn and fed a basal diet according to the Japanese Feeding Standard for Dairy Cattle (National Agricultural Research Organization, 2006). The BCS was assessed on a 5-point scale (1: extremely thin and 5: extremely obese) with 0.25 increments (Ferguson et al., 1994).

2.2. Oocyte collection and in vitro maturation (IVM)

Bovine ovaries were transported from a slaughterhouse in 0.9% sodium chloride solution. Cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from follicles (diameter: 2–6 mm) using a 5-mL syringe with a 19-G needle.

Ovum pick-up was performed on non-stimulated Holstein cows using an ultrasound scanner (HS-2000, Honda Electronics Co. Ltd, Toyohashi, Japan) connected to a 7.5 MHz convex vaginal transducer. COCs were aspirated from follicles (2–6 mm) with a 17-G × 500 mm disposable needle (COVA needle; Misawa Medical, Tokyo, Japan). Oocyte collection was performed under high vacuum pressure (120 mm of Hg). Follicular contents were aspirated into 50-mL conical tube containing 5 mL of Lactate Ringer's solution, supplemented with 1% calf serum (CS, Gibco-BRL) and 10 IU/mL of Novo-Heparin injection 1000 (Aventis Pharma Ltd, Tokyo, Japan).

Both slaughterhouse and OPU-derived COCs were washed three times in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 3% CS. Next, COCs were washed twice in IVM medium, comprising TCM 199 (Gibco-BRL) supplemented with 5% CS and 0.02 armor units/mL follicular stimulating hormone (FSH, ANTORIN-R 10; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan). Twenty COCs were cultured in 100 μL droplets of IVM medium covered with paraffin oil (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), placed in a 35-mm plastic dish. Culture conditions were 38.5 °C under a humidified atmosphere of 5% CO_2 for 20 h.

2.3. In vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC)

Sperm preparation for IVF followed procedures from Imai et al. (2006). Frozen semen from one Holstein bull was thawed at 37 °C, placed in the top layer of 4 mL 45–90% Percoll gradient solution (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and centrifuged at 670 × *g* for 20 min. Sperm pellets were re-suspended in 6 mL BO medium (Brackett and Oliphant, 1975) supplemented with 10 mM hypotaurine (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and 4 μL/mL heparin (Novo-Heparin injection 1000; Aventis Pharma Ltd, Tokyo, Japan), then centrifuged at 543 × *g* for 5 min. The resultant precipitate was re-suspended in IVF medium (BO medium supplemented with 5 mM hypotaurine, 4 U/mL heparin, and 10 mg/mL bovine serum albumin [BSA]) and adjusted to a final concentration of 3×10^6 spermatozoa/mL. Droplets (100 μL) of sperm suspension were placed in a 35-mm plastic dish and covered with paraffin oil to prepare the fertilization drops. Matured COCs were washed three times in IVF medium before 20 COCs were added to the fertilization drop and cultured under a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 38.5 °C for 6 h.

After IVF, presumptive zygotes were denuded through gentle pipetting using a fine glass pipette, and then washed three times in CR1aa medium supplemented with 5% CS (Rosenkrans et al., 1993; Imai et al., 2002). To act as controls for comparisons of developmental competence with gel-embedded embryos, 20 presumptive zygotes were cultured in 100 μL droplets of CR1aa medium covered with paraffin oil; conditions were a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2, and 90% N_2 at 38.5 °C for 7–8 days. After 31 h post-insemination (hpi), intact 2-cell stage embryos and intact 8-cell stage embryos (51 hpi) were collected as a control for subsequent comparison with separated blastomeres (see Section 2.5).

2.4. Embedded bovine embryos

2.4.1. Agarose gel (1%) solution

Preparation of 1% agarose gel followed procedures from Senatore et al. (2010) with modifications. Agarose powder with low gelling and melting points (Takara Korea Biomedical Inc., Seoul, Korea) was prepared in phosphate buffer saline (PBS), autoclaved, and stored at 25–28 °C as a solidified gel. To embed embryos, agarose gel was melted in a 600-watt microwave oven for 90 s and then cooled to 39 °C. Using a fine glass Pasteur pipette, five randomly selected presumptive zygotes were transferred to the agarose solution and embedded as a sausage-like structure. Embryo gel chips were transferred to CR1aa medium and covered in paraffin oil, then cultured in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2, and 90% N_2 at 38.5 °C for 7–8 days.

2.4.2. Calcium alginate gel (1%) solution

Alginate encapsulation was performed following previously published procedures (Kobayashi et al., 2006). First, 1 g of alginate powder (Gibco-BRL) was dissolved into 100 mL 0.9% NaCl solution. Next, 0.1 g calcium chloride dihydrate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) was dissolved into 100 mL Lactate Ringer's solution to generate 0.1% $CaCl_2$ as a cross-link solution for gel formation. Embryo encapsulation was achieved through placing 1% sodium alginate solution containing five randomly selected presumptive zygotes into the cross-link solution. Alginate-encapsulated embryos were cultured in CR1aa medium supplemented with 5% CS and covered with paraffin oil, under the same conditions as the agarose-gel-embedded embryos.

2.5. Blastomere separation

The following procedure for blastomere separation was performed as described by Nagai et al. (2013). Embryos at the 2-cell (31 hpi) or 8-cell stages (51 hpi) were immersed in 0.25% protease solution (Kaken Pharmaceutical Co. Ltd, Tokyo, Japan) for 2–3 min to remove zona pellucida. Using a tapered Pasteur pipette, embryos were then gently separated into two single blastomeres (from 2-cell stage) or two quadruple blastomeres (from 8-cell stage) at 25–28 °C. Along with the intact 2- and 8-cell embryos (Section 2.3), a pair of each blastomere type was cultured in handmade WOW produced with a push pin (control) or embedded in 1% calcium alginate gel (treatment). Control and treatment intact embryos and separated blastomeres were placed in

a 50 μL droplet CR1aa medium (5 embryos/drop) supplemented with 5% CS. Cultures were covered with paraffin oil and grown in a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2, and 90% N_2 at 38.5 °C under paraffin oil for 6 days (single blastomere) or 5 days (quadruple blastomere).

2.6. Assessment of blastocyst quality and embryo developmental competence

Blastocyst quality was evaluated following procedures from Thouas et al. (2001). Expanded blastocysts were washed with 0.1 mg/mL propidium iodide (PI) and 0.2% (v/v) Triton X-100 dissolved in DPBS for 1 min. Blastocysts were then stained with 25 μg/mL bisbenzimide (Hoechst 33342) dissolved in 99.5% ethanol for 5 min, washed in glycerol, mounted on glass slides, and flattened with cover slips. The trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) were counted under fluorescence microscopy with UV light from a high-pressure mercury burner (Olympus, Tokyo, Japan). Respectively, ICM and TE appeared in blue and red. Cell cleavage, blastocyst formation, and total cell number were also determined to measure developmental competence.

2.7. Statistical analysis

Cleavage and blastocyst formation rates are shown as percentages. Total cell number is represented as means ± SEM. All data were analyzed with one-way ANOVA in SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of gel chips (1% agarose, 1% calcium alginate) on the developmental competence of intact embryos

Cleavage and blastocyst formation rates did not significantly differ between embryos embedded in 1% agarose, 1% calcium alginate, and the control (Table 1). Total cell numbers also did not significantly differ between embedded and control groups (Table 2). Although blastocyst developmental competence and quality were not different between gel-embedded groups, approximately 30% of the agarose-embedded blastocysts were broken after removal from the gel chip. Therefore, 1% calcium alginate gel was selected for the following experiments.

3.2. Effect of gel chips on the developmental competence of separated blastomeres

Blastocyst formation rates (Table 3) of intact 8-cell embryos cultured in WOW were significantly higher than intact 2-cell embryos embedded in 1% calcium alginate, but did not differ between other groups. Moreover, intact 8-cell embryos resulted in more blastocyst cells than intact 2-cell embryos.

Blastocyst production potential was significantly higher in separated embryos than in intact embryos. The total cell number in blastocysts derived from intact embryos was higher than in those derived from separated blastomeres (Table 4). Among separated blastomeres, the single (2-cell) blastomere embedded in 1% calcium alginate had significantly lower blastocyst formation rates than other groups. However, single blastomeres (from 2-cell) cultured in WOW exhibited the highest blastocyst percentage.

Table 2
Cell numbers in expanded blastocysts of IVF-derived intact bovine blastocysts after culture *in vitro*.

Group	No. blastocyst examined	No. nuclei ± SEM		
		ICM	TE	Total cell
Control	48	35.7 ± 5.0	87.8 ± 4.9	123.5 ± 3.2
1% Agarose gel	44	38.2 ± 3.9	115.5 ± 15.3	153.7 ± 13.9
1% Calcium alginate gel	49	35.8 ± 4.9	92.6 ± 11.4	128.5 ± 15.2

Data in parentheses are presented as Mean ± SEM. No significant difference was detected among treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA.

3.3. Effect of culture type on the developmental competence of 2-cell OPU-derived embryos

After 12 OPU cycles, we collected 172 OPU-derived oocytes from three non-stimulated Holstein cows and successfully fertilized 145 of them with thawed semen.

At 31 hpi, 46 separated 2-cell embryos were cultured in handmade WOW, and 45 intact 2-cell embryos were cultured in the same conditions as a control. Separated 2-cell embryos had significantly higher blastocyst formation potential than the intact 2-cell group (81.8 ± 16.5 *versus* 24.4 ± 5.1; Table 5). However, blastocysts derived from intact 2-cell embryos had significantly more total cells than blastocysts derived from separated 2-cell embryos (Table 6).

4. Discussion

Our results demonstrated that 1% calcium alginate gel could support cell growth during blastomere aggregation of separated bovine embryos from 2- and 8-cell stages. Embryos are traditionally cultured in an optimal embryo/volume ratio to maintain appropriate autocrine and paracrine signaling, thereby maximizing embryo development rates (Gopichandran and Leese, 2006). Recently, a co-culture system using gel embedding was developed that could maintain this embryo/volume ratio for even a small number of embryos (Senatore et al., 2010). In the present study, embryos embedded in two gel types successfully developed to the blastocyst stage. Further, embedded and non-embedded embryos did not differ in developmental rate or total cell number. These results are in agreement with studies showing that encapsulation with 1% calcium alginate gel was harmless to embryo development (Kobayashi et al., 2006), and that agarose-embedded embryos had similar developmental competence as normal intact embryos (Senatore et al., 2010). Gel-embedded embryos are effective in separating individual embryos from each other; this has applications as helper co-cultures in systems with limited numbers of OPU/IVF oocytes (Senatore et al., 2010; Deb et al., 2011).

This study is the first to successfully generate blastocysts from gel-embedded bovine blastomeres. Our blastomere-separated embryos (from 2-cell and 8-cell stages) resulted in a higher proportion of blastocysts than intact embryos, corroborating previous reports in mice (Tang et al., 2012) and cattle (Tagawa et al., 2008). We found that

Table 1
Developmental competence of gel embedded IVF-derived intact bovine zygotes after culture *in vitro*.

Group	No. oocytes inseminated	No. (% Mean ± SEM) cleaved embryos	No. (% Mean ± SEM) blastocyst on Day 7–8
Control	100	86 (86.0 ± 5.6)	48 (48.0 ± 3.7)
1% Agarose gel	100	72 (72.0 ± 5.8)	44 (44.0 ± 5.8)
1% Calcium alginate gel	100	85 (85.0 ± 1.6)	49 (49.0 ± 5.8)

Data in parentheses are presented as Mean ± SEM. No significant difference was detected among treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA.

Table 3
Developmental competence of intact and separated 2-cell and 8-cell embryos when culturing in WOW and 1% calcium alginate embedded culture method.

Stage of embryo	Type of embryo	Culture type	No. of embryos cultured	No. (% Mean ± SEM) blastocyst on Day 7–8
2-Cell	Intact embryo	WOW	50	28 (56.0 ± 2.4)^{ab}
		1%alginate	50	23 (46.0 ± 2.4)^{a}
	2 single blastomere	WOW	50	61 (125.6 ± 4.2)^{d}
		1%alginate	50	41 (88.3 ± 9.6)^{c}
8-Cell	Intact embryo	WOW	50	34 (68.0 ± 2.0)^{b}
		1%alginate	50	30 (60.0 ± 0.0)^{ab}
	2 quadruple blastomere	WOW	50	56 (115.0 ± 10.6)^{d}
		1%alginate	50	55 (111.7 ± 5.6)^{d}

^{a,b,c,d} Different superscripts in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Data in parentheses are presented as Mean ± SEM.

Table 4
Cell numbers in expanded blastocysts of IVF-derived intact and separated bovine blastocysts after culture in WOW and 1%calcium alginate.

Stage of embryo	Type of embryo	Culture type	No. blastocyst examined	No. nuclei ± SEM		
				ICM	TE	Total cell
2-Cell	Intact embryo	WOW	28	22.1 ± 1.6^{b}	80.1 ± 2.2^{c}	102.2 ± 1.3^{c}
		1%alginate	23	29.3 ± 2.0^{c}	106.7 ± 1.7^{d}	136.0 ± 1.0^{d}
	2 single blastomere	WOW	34	16.0 ± 0.4^{a}	53.7 ± 0.9^{b}	69.7 ± 0.6^{b}
		1%alginate	13	17.7 ± 1.3^{a}	49.4 ± 2.0^{ab}	67.1 ± 1.0^{b}
8-Cell	Intact embryo	WOW	34	33.0 ± 1.0^{d}	115.2 ± 1.2^{e}	148.2 ± 1.1^{e}
		1%alginate	30	35.5 ± 1.4^{d}	123.2 ± 2.5^{f}	158.7 ± 1.7^{f}
	2 quadruple blastomere	WOW	27	16.0 ± 0.4^{a}	51.0 ± 1.3^{b}	67.1 ± 1.6^{b}
		1%alginate	20	15.5 ± 0.5^{a}	45.5 ± 0.5^{a}	61.0 ± 0.5^{a}

^{a,b,c,d,e,f} Different superscripts in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Data in parentheses are presented as Mean ± SEM.

Table 5
Developmental competence of OPU-derived 2-cell intact and separated bovine embryos after culture in WOW.

Stage of embryo	Culture type	No. of embryos cultured	No. (% Mean ± SEM) blastocyst on Day 7–8
2-cell	Intact	45	12 (24.4 ± 5.1)^{a}
	2 single blastomere	46	38 (81.8 ± 16.5)^{b}

^{a,b} Different superscripts in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Data in parentheses are presented as Mean ± SEM.

Table 6
Cell numbers in expanded blastocysts of OPU-derived 2-cell intact and separated bovine embryos after culture in WOW.

Stage of embryo	Culture method	No. blastocyst examined	No. nuclei ± SEM		
			ICM	TE	Total cell
2-Cell	Intact	12	31.5 ± 2.0^{a}	88.5 ± 3.7^{a}	120.0 ± 4.9^{a}
	2 single blastomere	36	14.5 ± 0.4^{b}	45.1 ± 0.5^{b}	59.6 ± 0.8^{b}

^{a,b} Different superscripts in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Data in parentheses are presented as Mean ± SEM.

blastocyst percentage did not significantly differ between 2-cell and 8-cell separated blastomeres in either culture system, except the 2-cell separated blastomere in 1% calcium alginate. These results are generally in agreement with research showing that blastocyst formation rates are similar between WOW-cultured 2- and 8-cell-separated embryos (Tagawa et al., 2008). Our data also support studies indicating that the total cell number in blastocysts derived from separated blastomeres is only half that of normal embryos (Tang et al., 2012; Nagai et al., 2013). Moreover, the total cell number in blastocysts derived from 8-cell alginate-embedded blastomeres was lower than other groups. This outcome can be explained by our observation that quadruple blastomeres disaggregated from each other when transferred to the $CaCl_2$ cross-link solution (this phenomenon was not observed in the 2-cell group). Despite this decrease in cell number, we believe our results clearly demonstrate the effectiveness of 1% calcium alginate as a gel-embedding alternative to the WOW culture system.

Factors such as donor identity and hormonal treatment influence total oocyte number during OPU retrieval (Presicce et al., 2011). For instance, OPU-IVP in Holstein cattle (*Bos taurus*) results in lower embryo yields than in Nelore cattle (*Bos indicus*) because the former breed has a smaller number of viable follicles suitable for OPU (Segerson et al., 1984) and a negative energy balance (O'Doherty et al., 2014). Our results revealed that the number of oocytes retrieved differed across three Holstein donor cattle (data not shown). This finding corroborated a previous study indicating a donor effect on OPU-collected oocyte number (Su et al., 2009). However, cleavage, 2-cell formation, and blastocyst formation rates did not differ among the three OPU donors (data not shown). In addition, the formation rate of OPU-derived blastocysts from separated 2-cell embryos was higher than the rates of intact 2-cell embryos. Interestingly, the ICM proportion in blastocysts did not differ between intact and separated 2-cell groups, even though separated 2-cell embryos had a cell count that was approximately two times lower than intact 2-cell embryos. This result corresponds to previous reports demonstrating that blastocysts produced from blastomere separation had only 50% of the total cell number in blastocysts from intact embryos (Tagawa et al., 2008; Nagai et al., 2013). Thus, blastomere separation techniques generate a half embryo that can develop into a full blastocyst after transfer, exhibiting the same developmental competence as an intact embryo (Willadsen and Polge, 1981; Johnson et al., 1995; Tagawa et al., 2008). Taken together, our findings and previous studies all confirm that blastocysts generated through blastomere separation can successfully produce offspring despite a lower cell number in the resultant blastocysts, a standard indicator of embryo quality.

5. Conclusions

Our findings indicate that 1% calcium alginate gel could support cell division during blastomere aggregation of separated bovine embryos. Despite the fact that embedded separated-embryos had slightly lower developmental competence than WOW separated-embryos. In addition, gel embedding culture system could be an alternative method to apply when getting low number of IVF-derived embryos from single OPU session.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. Program (2.B.TS/53/F.1), the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, and Suranaree University of Technology (SUT). YY Liang was supported by an SUT post-graduate fellowship (FtR.21/2559). The authors would like to thank the Hayakita meat processing company for providing the ovaries used in this study.

References

Boni, R., 2012. Ovum-pick up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. Anim. Reprod. 9, 362–369.
Brackett, B.G., Oliphant, G., 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12, 260–274.
Chavez, S.L., McElroy, S.L., Bossert, N.L., De Jonge, C.J., Rodriguez, M.V., Leong, D.E., Behr, B., Westphal, L.M., Pera, R.A.R., 2014. Comparison epigenetic mediator expression and function in mouse and human embryonic blastomeres. Hum. Mol. Genet. 23, 4970–4984.
Deb, G.M., Jin, J.I., Kwon, T.H., Choi, B.H., Bang, J.I., Dey, S.R., Cho, I.R., Kong, I.K., 2011. Improved blastocyst development of single cow OPU-derived presumptive zygotes by group culture with agarose-embedded helper embryos. Reprod. Biol. Endocrinol. 9, 121.
Ferguson, J.D., Galligan, D.T., Thomsen, N., 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. J. Dairy Sci. 77, 2695–2703.
Gopichandran, N., Leese, H.J., 2006. The effect of paracrine/autocrine interactions on the *in vitro* culture of bovine pre-implantation embryos. Reproduction 131, 269–277.
Imai, K., Matoba, S., Dochi, O., Shimohira, I., 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. Vet. Med. Sci. 64, 887–891.
Imai, K., Tagawa, M., Yoshioka, H., Matoba, S., Narita, M., Inaba, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, S., 2006. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and *in vitro* fertilization in cattle. J. Reprod. Dev. 52 (Suppl), S19–S29.
Johnson, W.H., Loskutoff, N.M., Plante, Y., Betteridge, K.J., 1995. Production of four identical calves by the separation of blastomeres from an *in vitro* derived four-cell embryo. Vet. Rec. 137, 15–16.
Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.J., Lanza, R., 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomere. Nature 444, 481–485.
Kobayashi, S., Sakatani, M., Kobayashi, S., Takahashi, M., 2006. Alginate-encapsulated bovine embryos support *in vitro* development of a small number of embryos. Reprod. Fertil. Dev. 18 (248-248).
Merton, J.S., Ask, B., Onkundi, D.C., Mullaart, E., Colenbrander, B., Nielen, M., 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up *in vitro* production embryo production program. Theriogenology 72, 885–893.
Nagai, M., Hori, N., Miyamoto, M., Sakaguchi, M., Hayakawa, Y., Kawai, M., Furuya, T., Imai, K., 2013. Effect of co-culture with intact embryos on development of bovine separated blastomeres. Anim. Sci. J. 84, 461–465.
O'Doherty, A.M., O'Gorman, A., Nail, A.A., Brennan, L., Duffy, E.D.P., Fair, T., 2014. Negative energy balance affects imprint stability in oocytes recovered from post-partum dairy cows. Genomics 104, 177–185.
Perry, G., 2015. 2014 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. In: Proceedings of the 24th Annual Report of the IETS Data Retrieval Committee. pp. 1–10.
Pontes, J.H.F., Nonato, Jr., I., Sanches, B.V., Ereno, Jr., J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M., 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore cattle (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology 71, 690–697.
Presicce, G.A., Xu, J., Gong, G., Moreno, J.F., Chaubal, S., Xue, F., Bella, A., Senatore, E.M., Yang, X., Tian, X.C., Du, F., 2011. Oocyte source and hormonal stimulation for *in vitro* fertilization using sexed spermatozoa in cattle. Vet. Med. Int. 2011, 1–8.
Rosenkrans Jr., C.F., Zeng, G.Q., MC Namara, G.T., Schoff, P.K., First, N.L., 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. Biol. Reprod. 49, 459–462.
Schramm, R.D., Paprocki, A.M., 2004. Strategies for the production of genetically identical monkeys by embryo splitting. Reprod. Biol. Endocrinol. 16, 38–42.
Segerson, E.C., Hansen, T.R., Libby, D.W., Randel, R.D., Gets, W.R., 1984. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. J. Anim. Sci. 59, 1026–1046.
Senatore, E.M., Xu, J., Suarez, N.M.V., Gong, G., Lin, T., Bella, A., Moreno, J.F., Mannino, M.E., Tian, X., Presicce, G.A., Wu, S.C., Du, F., 2010. Improved *in vitro* development of OPU-derived bovine (*Bos taurus*) embryos by group culture with agarose-embedded helper embryos. Theriogenology 74, 1643–1651.
Su, L., Yang, S., He, X., Li, X., Ma, J., Wang, Y., Presicce, G.A., Ji, W., 2009. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick-up. Reprod. Domest. Anim. 47, 184–189.
Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Matsuda, H., Kobayashi, S., Kobayashi, E., Konishi, K., Imai, K., 2013. Effect of embryo density on *in vitro* development and gene expression in bovine *in vitro*-fertilized embryos cultured in a microwell system. J. Reprod. Dev. 59, 115–122.
Tagawa, M., Matoba, S., Narita, M., Saito, N., Nagai, T., Imai, K., 2008. Production of monozygotic twin claves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. Theriogenology 69, 574–582.
Tang, H.H., Tsai, Y.C., Kuo, C.T., 2012. Embryo splitting can increase the quantity but not the quality of blastocysts. Taiwan. J. Obstet. Gynecol. 51, 236–239.
Thouas, G.A., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M., Trounson, A.O., 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod. Biomed. 3, 25–29.
Vajta, G., Peura, T.T., Holm, P., Paldi, A., Greve, T., Trounson, A.O., Callesen, H., 2000. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. Mol. Reprod. Dev. 55, 256–264.
Willadsen, S.M., Polge, C., 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. Vet. Rec. 108, 211–213.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี