รหัสโครงการ SUT3-304-53-24-17

รายงานการวิจัย

โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว

Monoclonal Antibody against Bovine Y Sperm

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-53-24-17

รายงานการวิจัย

โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว

Monoclonal Antibody against Bovine Y Sperm

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

ดร. สุรชัย รัตนสุข

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้จัดสรรงบประมาณสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ กรุณาตรวจสอบ ให้ข้อเสนอแนะ ปรับปรุงแก้ไขรายงานวิจัยนี้ ทำให้รายงานวิจัยนี้ถูกต้อง และครบถ้วนสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้ออำนวยสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์สำหรับการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณ ทีมงาน ศูนย์วิจัยตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดทุกท่าน โดยเฉพาะ คุณนุชจรินทร์ ศรีปัญญา คุณต้น ย่อยสูงเนิน คุณกาญจนา ปัญญาวัย และ คุณกนกวรรณ ศรีรัตนา ที่ได้อนุเคราะห์แรงกาย แรงใจ ช่วยเหลือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานด้านตัวอ่อน สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณ คุณปรางค์ขาว ปรุเขตต์ เลขานุการสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อำนวยความสะดวกเรื่องเอกสารการขอใช้ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือต่าง ๆ ขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยดูแลทางด้านการเงินของโครงการวิจัยนี้

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554

รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
หัวหน้าโครงการ
ธันวาคม 2556

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การคัดแยกเพศอสุจิของโคมีความสำคัญต่อวงการอุตสาหกรรม และปศุสัตว์เป็นอย่างมาก การคัดแยกเพศอสุจิของโคนั้น มีหลายกระบวนการที่นำมาใช้ การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีในการคัดแยกเพศของอสุจิเป็นหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากการคัดแยกเพศด้วยวิธีนี้ จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิเพศที่ต้องการ การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค โดยโมโนโคลนัลแอนติบอดีนี้ ถูกสร้างขึ้นจากการฉีดกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีในหนูขาวเพศเมียสายพันธุ์ BALC/c จำนวน 2 ตัว ด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศเพศผู้ของโค หลังการกระบวนการเชื่อมเซลล์ ได้เซลล์ลูกผสมมากกว่า 2000 โคโลนี จากนั้นนำเซลล์ลูกผสมทั้งหมดมาตรวจสอบความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคด้วยวิธี ELISA และ ตรวจสอบการจับของแอนติบอดีที่ผิวของอสุจิเพศผู้ของโค ซึ่งพบว่าเซลล์ลูกผสมโคลน G16G14, G16E7 และ G16E8 เป็นเซลล์ลูกผสมที่สามารถผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคได้ จึงได้นำเซลล์ลูกผสมทั้งสามนี้มาผลิตโมโนโลนัลแอนติบอดี เพื่อใช้ในการคัดแยกเพศของอสุจิโค ในขั้นตอนของการแยกเพศของอสุจิโคนั้น อสุจิเพศผู้ของโคที่โมโนโคลนัลแอนติบอดีจับจะถูกทำลาย โดยการทำงานของคอมพลีเม็นต์ จากนั้นนำอสุจิที่ผ่านการแยกเพศที่เหลือไปปั่นล้างแล้วไปปฏิสนธิในหลอดทดลองเพื่อตรวจสอบความถูกต้อง และความแม่นยำของกระบวนแยกเพศอสุจิโค ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วจะถูกนำไปตรวจสอบเพศด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโคเพศผู้ และต่อโค ผลจากการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ได้จากการทดลอง พบว่าเซลล์ลูกผสมทั้งสามสามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคได้ โดยอสุจิที่ได้ผ่านการคัดแยกเพศสามารถเพิ่มอัตราส่วนของตัวอ่อนเพศเมียได้ที่ 78.4, 74.4 และ 76 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปฏิสนธิในหลอดแล้วตามลำดับ

Abstract

Bovine sperm sexing technology is important in industry and livestock sections. Various methods have been used for bovine sperm sexing. Immunological method is one of the favorable methods used, because this method does not affect the wanted sperm quality. This study aimed to produce monoclonal antibody (mAb) against bovine Y-sperm. The mAb were produced by stimulation of 2 female BALC/c mice by bovine Y-sperm. More than 2,000 hybridoma cells were grown after cells fusion. The cultured supernatant of the hybridoma cells were used to determine the specificity against bovine Y-sperm by ELISA and sperm surface binding method. It was found that 3 hybridoma cells, G16G14, G16E7 and G16E8 can produce mAb that are specific to bovine Y-sperm. These hybrid cells were used to produce mAb for sperm sexing. In the sperm sexing method, bovine Y-sperms were destroyed via cytotoxicity using guinea pig complement. The undestroyed X-sperms were used in *in vitro* fertilization (IVF) to determine the accuracy and precision of the sperm sexing method using the produced mAb. The sexes of embryos obtained from the IVF were determined by polymerase chain reaction (PCR) method using bovine and bovine Y-specific primers. The embryos sex determination indicated that the 3 hybridoma cells can produce mAbs, which are specific to bovine Y-sperm. They can increase the ratio of female to 78.4, 74.4 and 76% after sperm sexing and IVF.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี	8
- การเตรียมแอนติเจน	8
- การกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี	8
- การรวมเซลล์	8
- การตรวจสอบความจำเพาะ	9
- การตรวจสอบการจับที่ผิวของอสุจิ	9
- การเพิ่มปริมาณแอนติบอดี และการแช่แข็ง	9
การแยกเพศอสุจิโคนม และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว	10
การตรวจสอบเพศของตัวอ่อน	10
บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล	
การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี	11
การแยกเพศอสุจิและการปฏิสนธิในหลอดแก้ว	12
การตรวจสอบเพศตัวอ่อนโค	15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	22
ประวัติผู้วิจัย	26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วย G16G14 13

ตารางที่ 2 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วย G16E7 13

ตารางที่ 3 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วย G16GE8 14

ตารางที่ 4 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยอสุจิที่ไม่ผ่านการแยกเพศ 14

ตารางที่ 5 ตารางสรุปการพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยอสุจิที่ผ่านและไม่ผ่านการแยกเพศ 14

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะของแอนติบอดีทั้ง 5 กลุ่ม 4

รูปที่ 2 กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เจริญในอาหาร HAT ในวันที่ 7-10 หลังการหลอมรวมเซลล์ 11

รูปที่ 3 รูปแสดงการจับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีกับผิวอสุจิเพศผู้ 12

รูปที่ 4 PCR แสดงผลการแยกเพศตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลองด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี 15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

ในสัตว์จำพวกโคและกระบือ พบว่าสัดส่วนของเพศผู้และเพศเมียเป็น 50:50 ซึ่งตัวอสุจิเป็นตัวกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากอสุจิจะถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์แบบไมโอซิส และอสุจิแต่ละตัวจะมีโครโมโซมเพศเพียงชนิดเดียว กล่าวคือจะต้องมีโครโมโซมเพศเป็นเพศผู้ (Y-chromosome) หรือเพศเมีย (X-chromosome) อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ส่วนเซลล์ไข่จะมีโครโมโซมเป็นโครโมโซมเพศเมีย (X-chromosome) เท่านั้น ดังนั้นหากอสุจิที่มีโครโมโซมเพศผู้ (Y-chromosome) ผสมกับเซลล์ไข่ (X-chromosome) จะได้ตัวอ่อนที่มีเพศเป็นเพศผู้ (XY) และหากอสุจิที่มีโครโมโซมเพศเมีย (X-chromosome) ผสมกับเซลล์ไข่ (X-chromosome) จะได้ตัวอ่อนที่มีเพศเป็นเพศเมีย (XX) (http://biology.about.com/od/basicgenetics/p/chromosgender.htm)

ดังนั้นการคัดเลือกเพศของอสุจิจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญที่ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการคัดเลือกเพศทั้งของในคน และสัตว์เลี้ยง ในทางปศุสัตว์มีกระบวนการมากมายที่ใช้ในการคัดเลือกเพศอสุจิเพื่อที่จะให้ได้อัตราส่วนของอสุจิเพศที่ต้องการสูงขึ้น ซึ่งในการเลี้ยงโคนมเกษตรกรจะต้องการลูกโคที่เป็นเพศเมีย เพื่อที่จะสามารถผลิตน้ำนมได้ หากลูกที่เกิดขึ้นมาเป็นเพศผู้ก็จะถูกจำหน่ายในราคาถูก เพื่อนำไปทำเป็นอาหาร ดังนั้นฟาร์มโคนมจึงมีความต้องการอสุจิที่มีเพศเมียสูงกว่าอสุจิที่มีเพศผู้ เพื่อทำให้อัตราส่วนในการผสมระหว่างอสุจิกับเซลล์ไข่มีโอกาสที่จะเกิดตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียที่สูงกว่า แต่ในทางกลับกันฟาร์มโคเนื้อจะมีความต้องการตัวอ่อนที่เป็นเพศผู้มากกว่า เพื่อที่จะผลิตพ่อพันธุ์ไว้สำหรับขายน้ำเชื้อ หรือต้องการเนื้อเพื่อจำหน่าย จึงมีความต้องการอสุจิที่มีอัตราส่วนของอสุจิเพศผู้สูงกว่าอสุจิเพศเมีย

ในปัจจุบันการใช้อสุจิที่ผ่านการแยกเพศ (sexed semen) ก่อนการผสมกับเซลล์ไข่ ได้ถูกนำมาใช้ในทั้งฟาร์มโคนม และโคเนื้อ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการตัวอ่อนของเพศที่แตกต่างกัน กระบวนการคัดแยกเพศอสุจินั้นมีมากมายหลายวิธี เช่น การคัดแยกด้วยวิธีแยกด้วยเจล (gel filtration) วิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) วิธีแยกด้วยการว่ายของอสุจิ (swimming up) การแยกด้วยความแตกต่างของสารพันธุกรรม (sperm sorting) วิธีการปั่นแยก (centrifugation) และวิธีการแยกทางวิทยาภูมิคุ้มกัน หรือการใช้แอนติบอดี (immunological method) วิธีแยกอสุจิดังกล่าวจะอาศัยความแตกต่างของอสุจิในแต่ละเพศ เช่น อาศัยความแตกต่างของความว่องไวต่อความเป็นกรดด่าง (pH

sensitivity) (Rothschild, 1960) ความแตกต่างของความเร็วของการว่ายของอสุจิในแต่ละเพศ (swimming speed) (Ericsson et al., 1973; Rohde et al., 1973) ความแตกต่างของการว่ายของอสุจิ (motility) (Sarkar, 1984; Sarkar et al., 1984) ความแตกต่างของความหนาแน่น (density) (Haevey, 1946; Sumner and Robinson, 1976) ความแตกต่างของประจุที่ผิวของอสุจิ (surface charge) (Kaneko et al., 1984; Cartwright et al., 1993) ความแตกต่างของโปรตีนที่ผิวเซลล์ของอสุจิ (sperm surface protein) (Prasad et al., 2010) ขนาดของหัวอสุจิ และน้ำหนักของอสุจิ (Windsor et al., 1993; Gledhill, 1988) การจับเกาะของอสุจิกับเซฟาเดกซ์ (adherence to Sephadex) (Steeno et al., 1975; Adimoelja, 1987) ความแตกต่างของการมีแอนติเจนเอชวาย (H-Y antigen content) (Goldberg et al., 1971; Peter et al.,1993; Sills et al., 1998) และความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอ (DNA content) (Pinkel et al., 1982; Johnson et al., 1989).

อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีไหนที่สามารถแยกอสุจิที่มีเพศผู้ และเพศเมียออกจากกันได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ซึ่งปัญหาอาจเกิดจากปริมาณอสุจิที่มีมาก แต่มีอสุจิเพียงตัวเดียวที่จะเข้าผสมกับเซลล์ไข่ (Pace, 1990) การคัดแยกเพศอสุจิสามารถกระทำได้โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะในแต่ละเพศ กล่าวคือใช้ความแตกต่างของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ของอสุจิเป็นพื้นฐานในการคัดแยกอสุจิทั้งสองเพศออกจากกัน

เป้าหมายของงานวิจัยนี้ คือ ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคนม เพื่อที่จะเลือกทำลายอสุจิเพศผู้ ส่วนอสุจิที่เหลือส่วนใหญ่จะเป็นอสุจิที่มีเพศเมียนั้น จะถูกนำไปใช้ในการปฏิสนธิในห้องทดลอง เพื่อให้ได้ตัวอ่อนวัวแล้วนำตัวอ่อนที่ได้ไปตรวจความแม่นยำของการทำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในการแยกเพศอสุจิโคนม โดยการตรวจสอบเพศตัวอ่อนด้วยกระบวนการพีซีอาร์

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคนม

2.1.1 คัดเลือกโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคนม

2.1.2 ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการทำลายอสุจเพศผู้ของโคนม

2.1.3 ตรวจสอบคุณภาพของอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธีวัดความสามารถของการปฏิสนธิ (fertilization efficiency)

2.2 เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง และแม่นยำของอสุจิที่ผ่านการแยกเพศ ด้วยโมโนโคลนัล-แอนติบอดี ที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ

3. ขอบเขตของการวิจัย

3.1 ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีตามกระบวนการมาตรฐาน โดยจะใช้หนูขาว BALB/C และใช้อสุจิโคนมแยกเพศผสมกับแอดจูแวน (adjuvant) ในการฉีดกระตุ้นเพื่อสร้างโมโนโคลนัลแอนติบอดี

3.2 ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการคัดแยกเพศอสุจิโคนม ด้วยการทำลายอสุจิเพศผู้แล้วนำอสุจิที่เหลือไปทำการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ

3.3 ตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิที่ผ่านการแยกเพศ ด้วยโมโนโคลนัล-แอนติบอดี และตรวจสอบความถูกต้อง และแม่นยำของกระบวนการแยกเพศ ด้วยโมโนโคลนัล-แอนติบอดีด้วยการตรวจสอบเพศของตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

4.1 ได้เทคนิคในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี เพื่อประยุกต์ใช้ในการวิจัย

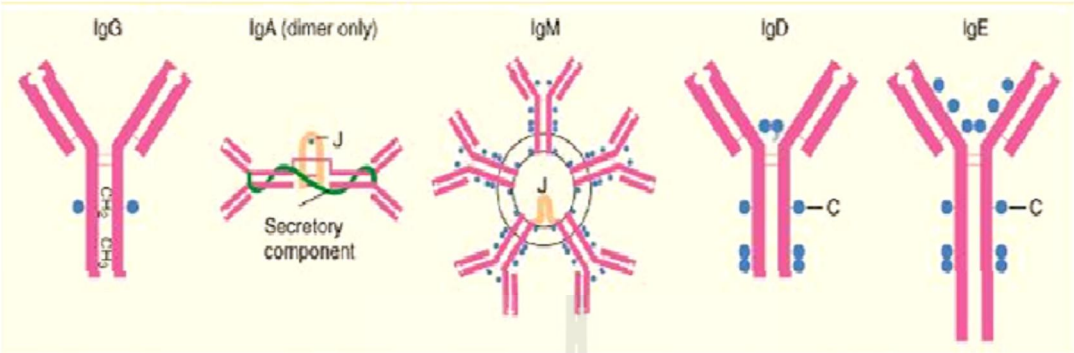
4.2 ได้โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่สามารถใช้แยกเพศอสุจิโคได้จริง

4.3 ใช้การแยกเพศด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีเป็นต้นแบบในการแยกเพศของสิ่งมีชีวิตอื่น

4.4 งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนั้นความรู้และเทคโนโลยีในการศึกษาจะถูกถ่ายทอดโดยตรงให้กับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จึงเป็นการพัฒนากำลังคนทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งตรงกับนโยบายของประเทศ

5. การทบทวนวรรณกรรม (Literature reviews)

แอนติบอดีเป็นกลุ่มของไกลโคโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากเจ้าบ้าน (host) และปลดปล่อยโดย B-lymphocyte และเซลล์พลาสมาในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งแอนติบอดีนี้จะถูกผลิตขึ้นเพื่อตอบสนองต่อโมเลกุลที่แปลกปลอม และจะทำลายโมเลกุลแปลกปลอมนั้นให้หมดไปจากร่างกาย ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะสร้างแอนติบอดีได้ 5 กลุ่ม คือ IgG, IgM, IgA, IgE และ IgD ความแตกต่างของแอนติบอดีแต่ละกลุ่มนั้นถูกกำหนดด้วยโครงสร้างของสายหลัก (heavy chain) ซึ่งประกอบไปด้วยสายหลักที่เป็น γ, δ, ε, α และ μ ตามลำดับ



รูปที่ 1 ลักษณะของแอนติบอดีทั้ง 5 กลุ่ม

5.1 โมโนโคลนัลแอนติบอดี

คือ แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมาซึ่งกำเนิดจาก B lymphocyte เซลล์เดียว โดยทุก ๆ โมเลกุลของแอนติบอดีนี้จะมีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ กระบวนการผลิตโมโนโลนัลแอนติบอดีจะต้องอาศัยการผลิตด้วยเทคโนโลยีจำเพาะ และกระบวนการทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ซึ่งผลิตได้โดยการฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันสัตว์ทดลองคือ หนูขาวพันธุ์ BALB/c ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ เพื่อให้หนูขาวสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการ หลังจากนั้นจะทำการฆ่าหนูขาวเพื่อผ่าแยกนำเซลล์ม้าม (splenocyte) มาหลอมรวมกับพลาสมาเซลล์ที่เป็นมะเร็ง (myeloma cell line) ให้ได้เซลล์ลูกผสม (hybrid cell) แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ลูกผสมในอาหารจำเพาะ (selective media, HAT medium) เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่หลอมรวมกัน หลังจากนั้นจะทำคัดเลือกเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการ (screening step) ซึ่งวิธีนี้ถูกค้นพบเมื่อปี 1975 โดยนักวิทยาศาสตร์ที่ชื่อว่า Georges J.F. และ César Milstein และต่อมาก็ได้รับรางวัลโนเบลสาขาสรีรวิทยาหรือการแพทย์ ในปี 1984 (The Noble Prize in Physiology or Medicine 1984) (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/).

5.2 เทคโนโลยีการคัดแยกเพศอสุจิ

5.2.1 ความแตกต่างของการทนทานต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH sensitivity)

ในปี 1960 Rothschild ได้เสนอว่าจะพบอสุจิเพศผู้ในสภาวะที่เป็นด่างมากกว่าอสุจิเพศเมีย ต่อมาในปี 2005 Hassan ได้ยืนยันการใช้สภาวะกรดด่างในการแยกอสุจิ โดยพบว่าที่ค่าความเป็นด่าง 9 (pH 9.0) ส่งผลให้อสุจิเพศผู้มีอัตราส่วนที่สูงขึ้นที่ 60.28% แต่ในทางตรงกันข้ามในปี 1971 Diasio และ

Glass ได้ทำการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการเคลื่อนย้ายของอสุจิ พบว่าไม่สามารถแยกอสุจิเพศผู้ และอสุจิเพศเมียออกจากกันโดยอาศัยการเคลื่อนที่ภายใต้สภาวะกรด-ด่างตามที่ได้นำเสนอไว้ก่อนหน้า

5.2.2 การเคลื่อนที่และความเร็วในการว่ายของอสุจิ (Motility and swimming speed)

ในปี 1973 Rhode และคณะ ได้รายงานว่าพบกลุ่มของอสุจิเพศผู้จำนวนหนึ่งเกิดขึ้นที่ส่วนบริเวณด้านหน้า ขณะที่มีการเคลื่อนย้ายของอสุจิเข้าเจาะเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง ในปีเดียวกัน Ericsson และคณะ ได้รายงานว่าสามารถแยกอสุจิเพศผู้ออกจากอสุจิเพศเมีย โดยใช้วิธีการปล่อยให้อสุจิว่ายอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนนมวัว (bovine serum albumin, BSA) สูง และในปี 1993 Check และ Katsoff ได้รายงานว่าพบตัวอ่อนเพศผู้เกิดขึ้นสูงถึง 88.5% จากการใช้เทคนิคแยกด้วยการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่จากการทดลองในปี 1993 ของ Han และคณะ ในปี 1997 ของ De Jouge และคณะ และในปี 1999 ของ De Jouge พบว่าวิธีนี้ไม่สามารถแยกอสุจิทั้งสองเพศออกจากกันได้อย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือสามารถเพิ่มความแตกต่างของอัตราส่วนอสุจิได้เพียง 1-2% เท่านั้น

5.2.3 ความหนาแน่น (Density)

จากงานวิจัยในปี 2002 พบว่าอสุจิเพศเมียจะมีปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าอสุจิเพศผู้ (Simson and Larson, 2002) จากความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอนั้นจึงส่งผลทำให้อสุจิเพศผู้ ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นน้อยนั้นมีความเบากว่าและเคลื่อนที่ได้รวดเร็วกว่าอสุจิเพศเมีย Cui และ Mathews (1993) พบว่าขนาดโดยเฉลี่ยของอสุจิเพศเมียมีขนาดที่ใหญ่ และยาวกว่าอสุจิเพศผู้ ซึ่งหากอสุจิเพศเมียมีขนาดหัวอสุจิที่ใหญ่กว่าจะทำให้สามารถแยกอสุจิทั้งสองเพศออกจากกันได้ด้วยความแตกต่างของขนาดหัว โดยใช้เพอร์คอลล์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (Percoll gradient) และในปี 1997 Samura และคณะ ได้รายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราส่วนของอสุจิเพศเมียได้ด้วยการใช้เพอร์คอลที่ 95% ต่อมาในปี 1986 Mohri และคณะ ได้รายงานการแยกอสุจิโดยใช้เพอร์คอลล์ 12 ชั้น (12 steps discontinuous Percoll gradient) ซึ่งสามารถเพิ่มอัตราส่วนของอสุจิเพศเมียได้สูงถึง 94% และในปี 2011 Resende และคณะ ได้รายงานผลของการใช้อสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วยเพอร์คอลล์ว่า เมื่อนำไปปฏิสนธิในห้องทดลองแล้ว ตัวอ่อนที่ได้จะมีอัตรส่วนของเพศเมียสูงขึ้นเป็น 62% แต่อย่างไรก็ตาม Chen และ Bongso (1999) ได้รายงานเรื่องของความเป็นพิษของเพอร์คอลล์ที่มีต่ออสุจิ การแยกอสุจิด้วยความแตกต่างของความหนาแน่นนั้นมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านที่ไม่ได้ใช้เพอร์คอลล์แต่ใช้น้ำเชื่อมที่ความเข้มข้นต่างกัน (sucrose gradient) (Rohde et al., 1975; Corson

et al., 1984; Dmowski et al., 1979) แต่ก็มีนักวิทยาศาสตร์ที่ชื่อว่า Evan และคณะ (1975) และ Rose และคณะ (1975) ได้โต้แย้งว่าวิธีดังกล่าวไม่สามารถใช้ในการแยกอสุจิทั้งสองเพศออกจากกันได้

5.2.4 ประจุที่ผิวอสุจิ (Surface charge)

จากความแตกต่างของปริมาณดีเอนเอนั้น อาจจะส่งผลต่อความแตกต่างของโปรตีนที่ผิวของอสุจิด้วย โดยในปี 1961 Bangham และ Nevo และคณะ มีความเห็นที่ตรงกันในเรื่องของอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ ทั้งนี้เนื่องจากอสุจินี้จะมีประจุลบอยู่ที่พื้นผิวชั้นนอก จึงทำให้ดูเหมือนอสุจินี้ไม่เคลื่อนที่ จากข้อคิดเห็นนี้บอกได้ว่าอสุจิเพศผู้ และเพศเมียนั้นมีความแตกต่างกันของประจุที่ผิว ซึ่ง Prasad และคณะ (2010) ได้เพิ่มเติมว่าอาจจะเป็นผลของความแตกต่างของกรดนิรามินิก (nearaminic acid) ที่มีไกลโคโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์อสุจิเพศเมีย วิธีที่ใช้แยกอสุจิที่ใช้ความแตกต่างของประจุที่ผิวเซลล์เรียกว่า free flow electrophoresis โดยใช้โทรเมทามีน (tromethamine) เป็นบัฟเฟอร์ Schroder (1941) รายงานว่าการปฏิสนธิด้วยอสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวส่งผลให้อัตราส่วนของเพศที่ได้เปลี่ยนแปลงไปซึ่ง Gordon (1957) ก็ได้ผลเหมือนกัน Ishijima และคณะ (1991) ได้รายงานว่าสามารถแยกอสุจิด้วยกระบวนการ 2 วิธี คือ Laser-rotating และ electrophoretic light scattering spectrophotometer ว่าสามารถเพิ่มอัตราส่วนของอสุจิเพสเมียได้สูงกว่า 95% และอสุจิเพศผู้ได้ 80% โดยใช้ zeta potential ที่ -20 และ -15 mV แต่อย่างไรก็ตามมีเพียงนักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มเท่านั้นที่บอกว่าสามารถแยกอสุจิทั้งสองเพศออกจากกันได้ด้วยวิธีนี้ และยังไม่มีการตรวจสอบที่ชัดเจนว่าสามารถแยกได้จริง ๆ ตามที่รายงานหรือไม่ (Siljander, 1936; Kordts, 1952; Vesselinovich, 1960) นอกจากนี้ยังพบว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนนี้จะมีความผิดปกติในการเคลื่อนที่ด้วย (Gledhill, 1988)

5.2.5 โปรตีนที่ผิวอสุจิ (Sperm surface protein)

แอนติเจนเอช-วาย (Histocompatibility Y-chromosome, H-Y) เป็นแอนติเจนที่จำเพาะกับโครโมโซมเพศผู้ ซึ่งจะพบบนเซลล์ของสัตว์เพศผู้ เซลล์ม้าม ลำไส้ และเม็ดเลือดขาว (Koo et al., 1979; Müller et al., 1978; Brunner et al., 1987) จากการที่พบแอนติเจนเอช-วายบนเซลล์ที่มีโครโมโซมเพศผู้ จึงทำให้สามารถบอกได้ว่าอสุจิที่มีโครโมโซมเพศผู้จะมีแอนติเจนเอช-วาย ซึ่งสามารถใช้ในการแยกระหว่างอสุจิเพศผู้ และอสุจิเพศเมียออกจากกันได้ การคิดแยกเพศโดยใช้คุณสมบัติการมีแอนติเจนเอช-วายได้ถูกนำมาใช้ในการคัดแยกเพศของอสุจิ และเพศของตัวอ่อน โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนเอช-วายเป็นตัวชี้วัด (Epstein, 1980; Wachtel, 1988; Avery and Schnidt, 1989; Patthanawong

et al., 2010) Bennett และ Boyse (1973) ได้รายงานการแยกเพศอสุจิด้วยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเอช-วาย (anti H-Y) และตามด้วยการเติมคอมพลีเมนต์ พบว่าทำให้อัตราส่วนของอสุจิเพศเมียสูงขึ้น 8% Koo และคณะ (1973) ได้ยืนยันการแยกเพศอสุจิโดยอาศัยแอนติเจนเอช-วาย และได้ชี้แจงว่าแอนติเจนเอช-วายมีการแสดงออกในอสุจิเพศผู้มากกว่า อย่างไรก็ตามได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ทำการทดลองในการแสดงออกของแอนติเจนเอช-วาย และได้ทำการทดลองใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนเอช-วายในการแยกเพสอสุจิ พบว่าแอนติเจนเอช-วายนั้นสามารถพบได้ที่ผนังเซลล์อสุจิทั้งสองเพศ (Burgoyne et al., 1986; Burgoyne, 1987; Hassan, 2005; Prasad et al., 2010) และพบการแสดงออกของแอนติเจนเอช-วายบนอสุจิเพศเมียด้วย (Sills et al.,1998)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี

1.1 การเตรียมแอนติเจน

ใช้อสุจิเพศผู้ของโคนมที่ผ่านการแยกเพศโดย Flow cytometry (bovine Y-sperm) ที่ได้ซื้อมาจาก China Mengniu Diary Company ltd, China เป็นแอนติเจนที่ใช้ในการฉีดกระตุ้นหนูขาวสายพันธุ์ BALB/c โดยอสุจิเพศผู้ที่ใช้เป็นแอนติเจนนั้นจะคัดเลือกเฉพาะอสุจิที่แข็งแรง โดยจะการคัดเลือกด้วยวิธี swim up ในอาหาร Tyrode albumin lactate pyruvate (TALP medium) ในการฉีดหนูขาวในครั้งแรก (first injection) และการฉีดกระตุ้นครั้งแรก (first boost) นั้น จะใช้ความเข้มข้นของอสุจิ 2.5 x 10^5 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร และการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายด้วยความเข้มข้น 2.5 x 10^6 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร

1.2 การกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (*In vivo* immunization)

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ BALB/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ โดยการฉีดครั้งแรกจะใช้ความเข้มข้นของอสุจิ 2.5 x 10^5 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับคอมพลีทฟรอยแอดจูแวนต์ (Complete Freund's Adjuvant, CFA) ด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วทำการฉีดเข้าที่ช่องท้อง (intraperitoneal, ip) ส่วนการฉีดกระตุ้นอีกสองครั้งจะใช้ความเข้มข้นของอสุจิ 2.5 x 10^5 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร สำหรับการฉีดกระตุ้นครั้งที่หนึ่ง และความเข้มข้นของอสุจิ 2.5 x 10^6 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร สำหรับการฉีดกระตุ้นครั้งต่อมา โดยฉีดประมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับอินคอมพลีทฟรอยแอดจูแวนต์ (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) ด้วยอัตราส่วน 1:1 ฉีดกระตุ้นที่เส้นเลือดดำที่โคนหาง (intravenous, iv) และใต้กล้ามเนื้อ (subcutaneous) โดยจะฉีดห่างกันทุก ๆ 2 สัปดาห์

1.3 การรวมเซลล์ (cell fusion)

เมื่อครบระยะเวลาจะทำการฆ่าหนูด้วยวิธีสงบ แล้วทำการแยกม้ามออกมาด้วยเทคนิคที่ปลอดเชื้อ แล้วนำใส่เพลทที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มี 70% เอทานอลอยู่ แล้วนำกลับไปที่ห้องทดลอง เพื่อทำการแยกเซลล์ม้าม ทำการตัดม้ามเพื่อแยกเอาเซลล์ม้ามด้วยการใช้เข็มรีดเซลล์ม้ามออกจากเยื่อหุ้มม้าม ทำการปั่นล้าง 3 รอบ ในอาหาร (Roswell Park Memorial Institute-1640, RPMI) แล้วทำการนับเซลล์ม้าม หลังจากนั้นนำไปผสมกับพลาสมาเซลล์ที่เป็นมะเร็ง (X63-Ag 8.653 myeloma cell line) ในอัตราส่วน

เซลล์มะเร็งต่อเซลล์ม้ามเท่ากับ 1:6.4 ทำการปั่นล้างด้วย RPMI อีกรอบ ทำการเท RPMI ทิ้งแล้วเติมพอ-ลีเอทิลีนไกคัล (polyethylene glycol-4000, PEG-4000) ลงไป แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 300 x *g* เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นเทของเหลวทิ้งแล้วเติมอาหารแฮท (HAT medium) ลงไปผสมเบา ๆ แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ 2-4.5 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วนำเซลล์ไปเลี้ยงให้เพลท 24 หลุม หลุมละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเพลทไปบ่มเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังจากเลี้ยงเซลล์ 4-5 วัน ทำการตรวจสอบการปนเปื้อน และหากพบการปนเปื้อนให้เติมสารละลายจุนสี ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 20%

1.4 การตรวจสอบความจำเพาะ (screening assay)

ในวันที่ 7-10 ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกมาตรวจสอบความจำเพาะ โดยจะใช้อสุจิเพศผู้ อสุจิเพศเมีย ไข่แดง (egg yolk) และอสุจิที่ไม่ได้แยกเพศเป็นแอนติเจน โดยการตรวจสอบความจำเพาะด้วยเทคนิคอีไลซา (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) เมื่อได้หลุมที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออสุจิโคนมเพศผู้แล้ว ดำเนินการทำเทคนิค limiting dilution เพื่อให้ได้เซลล์เดียว และทำการตรวจหาเซลล์เดี่ยวที่จำเพาะต่ออสุจิโคเพศผู้อีกครั้ง

1.5 การตรวจสอบการจับที่ผิวของอสุจิ

เพื่อเป็นการยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่สร้างขึ้น โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ จะถูกตรวจสอบการจับที่ผิวของอสุจิเพศผู้ เปรียบเทียบกับการจับผิวของอสุจิเพศเมีย โดยการใช้ anti-mouse IgG ที่เชื่อมจับกับสารเรืองแสง (fluorescein isothiocyanate, FITC) แล้วส่องดูการจับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

1.6 การเพิ่มปริมาณแอนติบอดี และการแช่แข็ง

เมื่อได้เซลล์ลูกผสมเซลล์เดี่ยวที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคนมแล้ว ทำการขยายหลุมในการเลี้ยง เพื่อที่จะให้ได้ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่เพียงพอต่อการทดลอง โดยทำการดูดเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ไว้ และย้ายเซลล์ด้วยการใช้ไปเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ แล้วดูดเซลล์ไปใส่เพลท 24 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยง และบ่มเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37°C หลักการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อจะนำไปตกตะกอนโมโนโคลนัลแอนติบอดีนั้น ให้เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่ออาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยนำอาหาร (ที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดีอยู่) ไปทดสอบต่อไป นำเซลล์ที่อยู่ในเพลทออกไปผสมกับ 20%

DMSO-RPMI ในอัตราส่วน 1:1 โดย 20% DMSO-RPMI จะต้องทำการแช่ที่ -20°C ก่อนการนำมาใช้ เมื่อผสมเข้ากันแล้วให้นำไปแช่ที่ -80°C เป็นเวลาหนึ่งวันก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จะนำไปตกตะกอนแอนติบอดี โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในอัตราส่วน 1:1 แล้วเก็บโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้งานครั้งต่อไป

2. การแยกเพศอสุจิโคนม และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (sperm sexing and *in vitro* fertilization)

นำอสุจิโคนมที่ต้องการแยกเพศไปทำการปั่นล้าง แล้วนำอสุจิที่ปั่นล้างได้ไปใส่ให้หลอดที่มี TALP ผสมกับโมโนโคลนัลแอนติบอดีในอัตราส่วนต่าง ๆ แล้วนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่ม 38.5°C ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการเติมคอมพลีเมนท์หนูตะเภา (guinea pig complement) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2% ทำการกวนเบา ๆ ด้วยปลายทิปพลาสติก แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนบนซึ่งเป็นส่วนที่มีอสุจิที่มีชีวิตอยู่ (อสุจิเพศเมียที่ไม่โดนทำลายจากกระบวนการ) ไปปั่นล้าง แล้วปรับให้ได้ความเข้มข้น 4 x 10^6 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร แล้วนำอสุจิที่ผ่านการแยกเพศไปทำการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ตัวอ่อน

3. การตรวจสอบเพศของตัวอ่อน

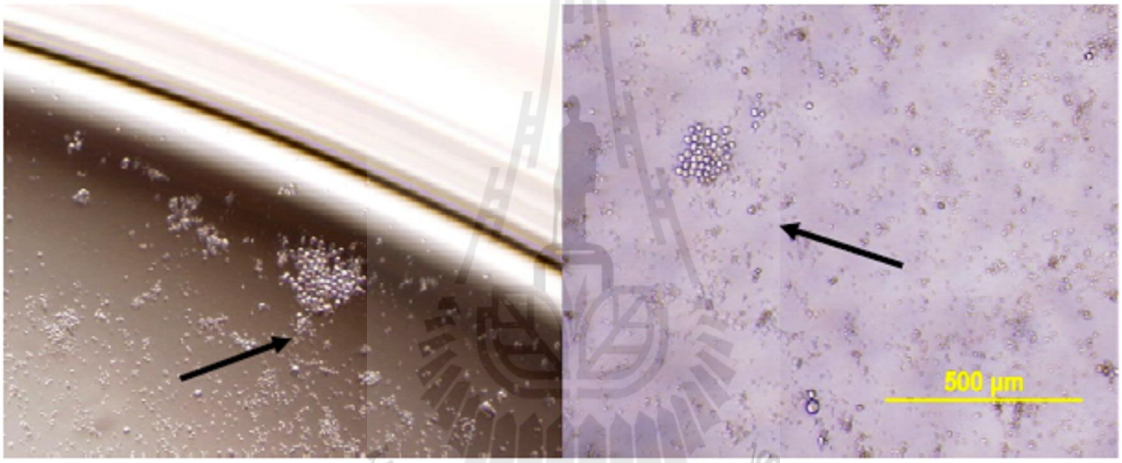
เพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้อง และความแม่นยำของการแยกเพศอสุจิ ด้วยโมโนโคลนัล-แอนติบอดีที่ผลิตขึ้น เพศของตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในห้องทดลอง จะเป็นตัวแทนของเพศอสุจิที่ผ่านการคัดแยกแล้วด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี การตรวจสอบจะเก็บตัวอ่อนที่หยุดการเจริญในทุกระยะจนกระทั่งถึงระยะแฮช (hatched blastocyst) แล้วตรวจสอบเพศของตัวอ่อนตามวิธีการของ Rattanasuk และคณะ (2011)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี

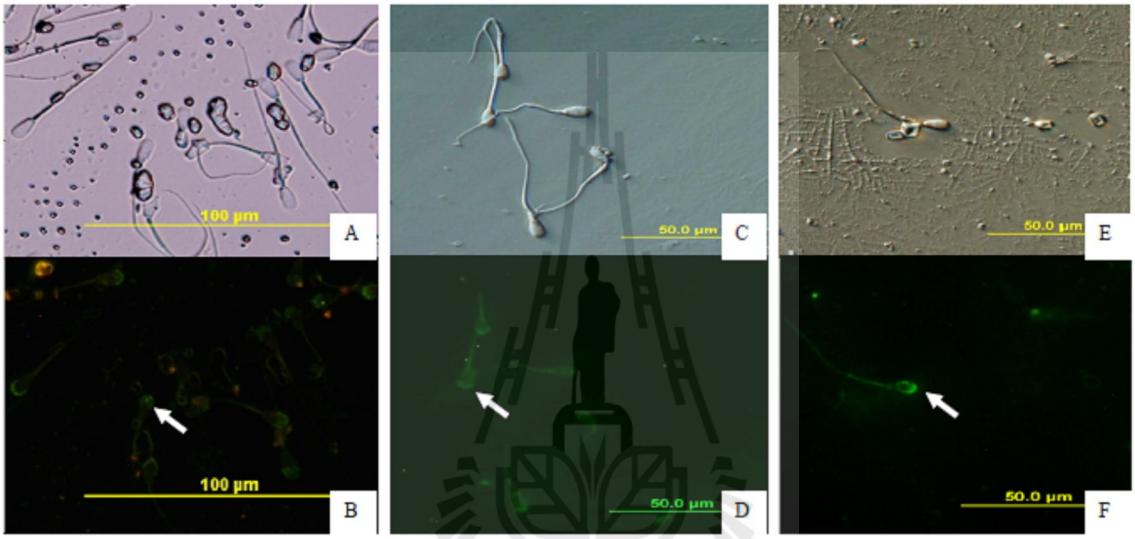
ในวันที่ 7-10 หลังจากการหลอมรวมเซลล์ จะพบกลุ่มเซลล์ลูกผสมเจริญอยู่ที่ก้นเพลท ดังรูปที่ 2 จากการทดลองพบกลุ่มเซลล์ลูกผสมมากกว่า 2,000 กลุ่ม



รูปที่ 2 กลุ่มเซลล์ลูกผสมที่เจริญในอาหาร HAT ในวันที่ 7-10 หลังการหลอมรวมเซลล์

โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ลูกผสมในแต่ละหลุมจะถูกนำไปทดสอบความจำเพาะต่ออสุจิโค และไข่แดง (egg yolk) พบว่ามี 17 หลุม ที่สร้างแอนติบอดีที่จับเฉพาะอสุจิโคแต่ไม่จับกับไข่แดง และอีก 16 หลุม ที่จับทั้งอสุจิโค และไข่แดง ซึ่งทั้ง 33 หลุมนี้ถูกย้ายไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ก่อนการทดสอบความจำเพาะอีกครั้ง และพบว่าหลังจากย้ายไปเลี้ยงในหลุมใหม่มีเพียง 12 หลุมที่ไม่มีการปนเปื้อน จึงเลือกมา 5 หลุม นำไปทำ limiting dilution เพื่อให้ได้เซลล์เดี่ยว โดย 5 หลุม ที่เลือกนี้เป็นหลุมที่ให้ผลการตรวจสอบครั้งแรกว่าสร้างแอนติบอดีที่จับเฉพาะอสุจิเท่านั้น จากการทำ limiting dilution ของแต่ละหลุมลงในเพลทที่มี 96 หลุม พบว่า 288 หลุม จาก 480 หลุม สร้างแอนติบอดีที่จับเฉพาะอสุจิโคแต่ไม่จับไข่แดง แล้วนำทั้ง 288 หลุม ย้ายไปเลี้ยงในเพลท 24 หลุม แล้วบ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการทดสอบความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ และอสุจิโค ผลการทดสอบพบว่าเพลทที่ G16 สามารถสร้างแอนติบอดีที่จับกับอสุจิเพศผู้ และให้ค่า OD สูงกว่าการจับกับอสุจิโค จึงเลือกมา 10 หลุม จากทั้งหมด

96 หลุม เพื่อทำการทดสอบกับอสุจิเพศผู้ และอสุจิเพศเมีย ผลการทดสอบพบว่ามี 3 หลุม คือ G16G14, G16E7 และ G16E8 ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออสุจิโคเพศผู้ และเพื่อยืนยันความจำเพาะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่สร้างขึ้น โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้จาก 3 หลุม นี้ถูกนำไปตรวจสอบการจับกับผิวอสุจิ ผลการจับแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 รูปแสดงการจับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีกับผิวอสุจิเพศผู้ A, C และ E เป็นรูปที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงปกติ B, D และ F เป็นรูปที่เห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน

2. การแยกเพศอสุจิและการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ในขั้นตอนของการแยกเพศอสุจินั้น ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี G16G14, G16E7 และ G16E8 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified monoclonal antibody) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงใน TALP 2 มิลลิลิตร และเติมอสุจิที่ต้องการจะแยกเพศลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากบ่มตามเวลาที่กำหนดแล้ว อสุจิเพศผู้ที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดีไปจับ จะถูกทำลายผ่านกลไลการทำให้เซลล์เป็นพิษ (cytotoxicity) โดยการเติมคอมพลีเมนท์ลงไปในหลอดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2% แล้วกวนเบา ๆ ก่อนที่จะนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นล้างอสุจิแล้วนำอสุจิที่ผ่านการแยกเพศแล้วไปปฏิสนธิในหลอดทดลอง โดยใช้อัตราส่วนอสุจิที่ผ่านการแยกเพศแล้ว 4 x 10^6 เซลล์อสุจิ/มิลลิลิตร ต่อโอโอไซต์วัว 20 โอโอไซต์ ในงานวิจัยครั้งนี้โมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้ง 3 ที่ผลิตได้ถูกใช้

ในการทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ไข่วัวซ้ำละ 50 ใบ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง ซึ่งผลของการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากอสุจิแยกเพศ และเพศของตัวอ่อนได้แสดงอยู่ในตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วย G16G14

No. of oocyte	No. (%) embryos developed at d 2		No. (%) embryos developed to	
cultured	Cleaved	>4 Cells	Morula	Blastocyst
50	35 (70)	17 (34)	5 (10)	2 (4)
50	29 (58)	15 (30)	5 (10)	1 (2)
50	31 (62)	14 (28)	4 (8)	4 (8)
50	30 (60)	19 (38)	2 (4)	6 (12)

ตารางที่ 2 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วย G16E7

No. of oocyte	No. (%) embryos developed at d 2		No. (%) embryos developed to	
cultured	Cleaved	>4 Cells	Morula	Blastocyst
50	21 (42)	14 (28)	3 (6)	1 (2)
50	11 (22)	7 (14)	4 (8)	1 (2)
50	21 (42)	14 (28)	2 (4)	5 (10)
50	19 (38)	13 (26)	3 (6)	5 (10)

ตารางที่ 3 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ด้วยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วย G16E8

No. of oocyte cultured	No. (%) embryos developed at d 2		No. (%) embryos developed to	
	Cleaved	>4 Cells	Morula	Blastocyst
50	16 (32)	10 (20)	1 (2)	3 (6)
50	16 (32)	14 (28)	0	4 (8)
50	22 (44)	12 (24)	1 (2)	3 (6)
50	30 (60)	19 (38)	6 (12)	3 (6)

ตารางที่ 4 การพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ด้วยอสุจิที่ไม่ผ่านการแยกเพศ

No. of oocyte cultured	No. (%) embryos developed at d 2		No. (%) embryos developed to	
	Cleaved	>4 Cells	Morula	Blastocyst
50	31 (62)	17 (34)	3 (6)	3 (6)

ตารางที่ 5 ตารางสรุปการพัฒนาเป็นของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ด้วยอสุจิที่ผ่านและไม่ผ่านการแยกเพศ

Treatments	No. of oocytes cultured	No. (%) embryos developed at d 2		No. (%) embryos developed to	
		Cleaved (%)	> 4 cells (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
G16G14	200	125 (62.5)[a]	65 (32.5)	16 (8)	13 (6.5)
G16E7	200	75 (37.5)[b]	48 (24)	12 (6)	12 (6.0)
G16E8	200	84 (42)[b]	55 (27.5)	8 (4)	13 (6.5)
Control	50	31 (62)[a]	17 (34)	3 (6)	3 (6.0)

ที่ค่าความเชื่อมั่น $P<0.05$

จากตารางจะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากอสุจิที่ผ่านการแยกเพศ ด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี ไม่มีความแตกต่างในด้านการเจริญของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วด้วยอสุจิที่ไม่ผ่านการแยกเพศ

3. การตรวจสอบเพศตัวอ่อนโค

ในการตรวจสอบเพศตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่าค่าเฉลี่ยของตัวอ่อน 2 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิกับอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้ มีค่าสูงกว่าร้อยละ 50

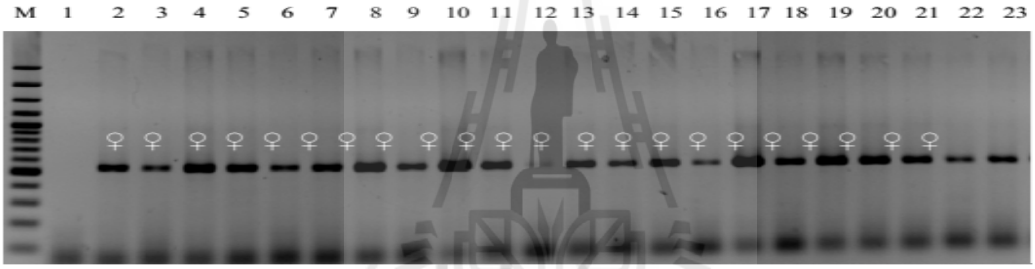


Figure 4.11 IVF derived embryos at 2-cell stage sex determination by the BY/BSP based PCR method. M: 100 bp DNA size marker. Lane 1: negative control; Lane 2-23: 2-cell IVF-derived embryos obtained from sexed sperm treated with G16E8 mAb

รูปที่ 4

จากการทดลองในรูปที่ 4 เป็นตัวอย่างของการแยกเพศตัวอ่อนที่ได้จากการทำ IVF โดยอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี G16E8 โดยใช้วิธี multiplex PCR ตามวิธีการของ Rattanasuk และคณะ 2011 การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า มีอัตราส่วนของตัวอ่อนเพศเมียสูงกว่าเพศผู้มาก เมื่อใช้ตัวอ่อนกว่า 600 ตัวอ่อน นำมาแยกเพศ ในขณะที่ตัวอ่อนแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ พบว่าโดยเฉลี่ยแล้วอสุจิที่ผ่านการแยกเพศด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี G16G14, G16E7 และ G16E8 มีค่าเท่ากับ 78.4$\pm$3.9, 74.4$\pm$1.5 และ 76.0$\pm$8.9 ตามลำดับ

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้หนูขาว BALB/c เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ 2 ตัว เป็นแหล่งในการผลิตแอนติบอดี โดยในการฉีดครั้งที่ 1 จะใช้อสุจิเพศผู้ของโคที่ผสมกับคอมพลีทฟลอยแอดจูแวน และการฉีดกระตุ้นอีกสองครั้งจะใช้อสุจิเพศผู้ของโคที่ผสมกับอินคอมพลีทฟลอยแอดจูแวน พบว่าหลังจากที่ทำการตรวจความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคมีเซลล์ลูกผสม G16G14, G16E7 และ G16E8 เป็นเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโคเพียงอย่างเดียว และจากการนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีไปใช้ในการแยกเพศอสุจิ แล้วนำอสุจิที่ผ่านการแยกเพศแล้วไปทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่าตัวอ่อนที่เจริญมีอัตราเพศมีสูงขึ้น คือ 78.4%, 74.4% และ 76.0% ตามลำดับ ซึ่งการทดลองพบว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ลูกผสม G16E7 เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีความจำเพาะและสามารถใช้ในการแยกเพศอสุจิแล้วได้ค่าความแปรปรวนต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีกโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้จาก G16G14 และ G16E8

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Adimoelja, F.X.A. (1987). Sephadex gel foe sex preselection. In New Horizons in Sperm Cell Research (Ed. H. Mohri.). Gordon and Breach Science Publishers, New York.

Avery, B., and Schmidt, M. (1989). Sex determination of bovine embryos using HY antibodies. Acta veterinaria Scandinavica. 30(2), 155.

Bangham, A. (1961). Electrophoretic characteristics of ram and rabbit spermatozoa. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences. 155(959), 292-305.

Bennett, D., and Boyse, E. A. (1973). Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. Nature. 246(5431), 308-309.

Brunner, M., Jaswaney, V., and Wachtel, S. (1987). Reaction of monoclonal H-Y antibody in the ELISA. Journal of Reproductive Immunology. 11(3), 181-191.

Burgoyne, P.S. (1987). The role of the mammalian Y chromosome in spermatogenesis. Development. 101(Supplement), 133-141.

Burgoyne, P.S., Levy, E.R., and McLaren, A. (1986). Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen. Nature. 320(6058), 170-172.

Cartwright, E.J., Harrington, P.M., Cowin, A., and Sharpe, P.T. (1993). Separation of bovine X and Y sperm based on surface differences. Molecular Reproduction and Development. 34, 323-328.

Check, J., and Katsoff, D. (1993). A prospective study to evaluate the efficacy of modified swim-up preparation for male sex selection. Human Reproduction. 8(2), 211-214.

Chen, M. J., and Bongso, A. (1999). Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. Human Reproduction. 14(3), 759-764.

Corson, S.L., Batzer, F.R., Alexander, N.J., Schlaff, S., and Otis, C. (1984). Sex selection by sperm separation and insemination. Fertility and Sterility. 42(5), 756.

Cui, K. H., and Matthews, C. D. (1993). X larger than Y. Nature. 366, 117-118.

De Jonge, C.J. (1999). Attributes of fertile spermatozoa: an update. Journal of Andrology. 20(4), 463.

De Jonge, C.J., Flaherty, S.P., Barnes, A.M., Swann, N.J., and Matthews, C.D. (1997). Failure of multitube sperm swim-up for sex preselection. Fertility and Sterility. 67(6), 1109-1114.

Diasio, R., and Glass, R. (1971). Effects of pH on the migration of X and Y sperm. Fertility and Sterility. 22(5), 303.

Dmowski, W.P., Gaynor, L., Rao, R., Lawrence, M., and Scommegna, A. (1979). Use of albumin gradients for X and Y sperm separation and clinical experience with male sex preselection. Fertility and Sterility. 31(1), 52.

Epstein, C.J., Smith, S., and Travis, B. (1980). Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Tissue Antigens. 15(1), 63-67.

Ericsson, R.J., Langevin, C.N., and Nisho, M. (1973). Isolation of fractions rich in human Y sperm. Nature. 246, 421-424.

Evans, J., Douglas, T., and Renton, J. (1975). An attempt to separate fractions rich in human Y sperm. Nature. 253(5490), 352-354.

Gledhill, B. L. (1988). Selection and separation of X- and Y-chromosome-bearing mammalian sperm. Gamete Research. 20(3), 377-395.

Goldberg, E.H., Boyse, E.A., Bennett, D., Scheid, M., and Carswell, E.A. (1971). Serological demonstratation of H-Y (male) antigen on mouse sperm. Nature (Lond). 232, 478-480.

Gordon, M.J. (1957). Control of sex ratio in rabbits by electrophoresis of spermatozoa. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. 43(10), 913.

Han, T.L., Flaherty, S., Ford, J., and Matthews, C. (1993). Detection of X-and Y-bearing human spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. Fertility and Sterility. 60(6), 1046.

Harvey, E.N. (1946). Can the sex of mammalian offspring be controlled. Journal of Heredity. 37, 71-73.

Hassan, D.A. (2005). Separation techniques for X and Y chromosome bearing human spermatozoa. Tshwane University of Technology.

Ishijima, S., Okuno, M., and Mohri, H. (1991). Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. International Journal of Andrology. 14(5), 340-347.

Johnson, L.A., Flook, J., and Hawk, H. (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. Biology of Reproduction. 41(2), 199-203.

Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T., Izuka, R., and MOhri, H. (1984). Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. Biochemical and Biophysical Research Communication. 124, 950-955.

Koo, G.C., Mittl, L.R., and Goldberg, C.L. (1979). Expression of H-Y antigen during spermatogenesis. Immunogenetics. 9(1), 293-296.

Koo, G.C., Stackpole, C.W., Boyse, E.A., Hämmerling, U., and Lardis, M.P. (1973). Topographical location of H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronmicroscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 70(5), 1502.

Kordts, E. (1952). Investigations on the suitability of electrophoresis for the separation of male and female-determining sperm in the rabbit. (Trans. Title). Z. Tierzucht. Zuchtungsbiol. 60, 221.

Mohri, H., Oshio, S., Kaneko, S., Kobayashi, T., and Iizuka, R. (1986). Separation and characterization of mammalian X- and Y- bearing sperm. Development, Growth & Differentiation. 28, 35-36.

Müller, U., Siebers, J.W., Zenzes, M.T., and Wolf, U. (1978). The testis as a secretory organ for H-Y antigen. Human Genetics. 45(2), 209-213.

Nevo, A., Michaeli, I., and Schindler, H. (1961). Electrophoretic properties of bull and of rabbit spermatozoa. Experimental cell research. 23(1), 69-83.

Patthanawong, W., Pongpiachan, P., and Mekchay, S. (2010). Production of monoclonal antibody against male specific antigen on cell membrane of bovine spermatozoa. Indian Journal of Animal Research. 44(1), 22-27.

Peter, A.T., Jones, P.P., and Robinson, J.P. (1993). Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: A rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. Theriogenology. 40(6), 1177-1185.

Pinkel, D., Lake, S., Gledhill, B.L., van Dilla, M.A., Stephenson, D., and Watchmaker, G. (1982). High resolution DNA content measurement of mammalian sperm. Cytometry. 3, 1-9.

Prasad, S., Ch., Rangasamy, S., and Satheshkumar, S. (2010). Sex Preselection in Domestic Animals - Current status and Future prospects. Veterinary World. 3(7), 346-348.

**** Rattanasuk, S., Parnpai, R., and Ketudat-Cairns, M. (2011). Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. Journal of Reproduction and Development. 57(4), 539-542. *****ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้

Resende, M.V., Lucio, A.C., Perini, A.P., Oliveira, L.Z., Almeida, A.O., Alves, B.C.A., Moreira-Filho, C.A., Santos, I.W., and Hossepian de Lima, V.F.M. (2011). Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 63, 544-551.

Rohde, W., Porstmann, T., and Dorner, G. (1973). Migration of Y-bearing human spermatozoa in cervical mucus. Journal of Reproduction and Fertility. 33, 167-169.

Rohde, W., Porstmann, T., Prehn, S., and Dörner, G. (1975). Gravitational pattern of the Y-bearing human spermatozoa in density gradient centrifugation. Journal of Reproduction and Fertility. 42(3), 587-591.

Rose, A., Robinson, J.A., and Evans, H. (1975). Failure to confirm separation of X-and Y-bearing human sperm using BSA gradients. Nature. 253, 354-355.

Rothschild (1960). The heat production of human spermatozoa and seminal plasma; with comparative observations on bull semen. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 152(948), 298-310.

Samura, O., Miharu, N., He, H., Okamoto, E., and Ohama, K. (1997). Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. Human Reproduction. 12(11), 2437-2442.

Sarkar, S. (1984). Motility, expression of surface antigen, and X and Y human sperm separation in *in vitro* fertilization medium. Fertility and Sterility. 42, 899-905.

Sarkar, S., Jolly, D.J., Friedmann, T., and Jones, O. (1984). Swimming behavior of X and Y human sperm. Differentiation. 27, 120-125.

Schroder, V. (1941). Artificial sex regulation of the off- spring of mammals and its biological control. (Trans, title). Z. Tierzucht. Zuchtungsbiol. 50, 1.

Siljander, A.A. (1936). Regulation of the sex of domesticated animal by meals of electophoretically separated sperm. (Trans. Tille). Sbornik Trudov Zootek. Kaf. S.h. Skol. Kirov. 148.

Sills, E.S., Kirman, I., Colombero, L.T., Hariprahad, J., Rosenwaks, Z., and Palermo, G. (1998). H-Y antigen expression patterns in human X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. American Journal of Reproductive Immunology. 40, 43-47.

Sills, E.S., Kirman, I., Thatcher S.S. 3rd, and Palermo, G.D. (1998). Sex-selection of human spermatozoa: evolution of current techniques and applications. Archives of Gynecology and Obstetrics. 261(3), 109-115.

Simson, J.L., and Larson, S.A. (2002). Sex selection. Assisted reproduction technology. Cambridge University. United Kingdom.

Steeno, O., Adimoelja, A., and Steeno, J. (1975). Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa with the sephadex gel-filtration method. Andrologia. 7(2), 95-97.

Summer, A.T., and Robinson, J.A. (1976). A difference in dry mass between the heads of X- and Y-bearing human spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility. 48, 915.

Vesselinovitch, S. (1960). Electrophoresis of spermatozoa and sex control. The Cornell veterinarian. 50, 326.

Wachtel, S., Nakamura, D., Wachtel, G., Felton, W., Kent, M., and Jaswaney, V. (1988). Sex selection with monoclonal H-Y antibody. Fertility and Sterility. 50(2), 355-360.

Windsor, D.P., Evans, G., and White, I.G. (1993). Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm. Reproduction Fertility and Development. 5, 155-171.

http://biology.about.com./od/basicgenetics/p/chromosgender.htm

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. RPMI-1640 (Gibco®) size 1 bag/1 L

-RPMI	1	ถุง
-$NaHCO_3$	2	กรัม
-Water for injection	1	ลิตร

ละลายผง RPMI-1640 และเติม $NaHCO_3$ 2 กรัม ในน้ำที่สำหรับฉีดเข้าเส้นปริมาตร 900 ไมโครลิตร กวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก แล้วปรับค่า pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 7.0 ด้วย 10 N HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น ตรวจสอบการปนเปื้อนของอาหารโดยแบ่งใส่เพลทเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร

2. Fetal bovine serum (HyClone FetalClone I, U.S. Origin)

ให้ความร้อนเพื่อ inactivate ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที และแบ่งใส่หลอด หลอดละ 50 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

3. Complete RPMI-1640 (cRPMI)

-RPMI	400	มิลลิลิตร
-100x L-glutamine	5	มิลลิลิตร
-1000x penicillin + streptomycin	0.5	มิลลิลิตร
-fetal bovine serum	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

4. Polyethylene glycol (PEG-4000)

อุ่น PEG-4000 ที่อุณหภูมิ 65°C จนกระทั่งละลายหมด เติม 15% DMSO ใน PBS ด้วยอัตราส่วน PEG-4000 ต่อ 15% DMSO เป็น 5 กรัม ต่อ 25 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

5. 100x Aminopterin (A) stock (Sigma®)

-Aminopterin	1.76	กรัม
-Water for injection	100	มิลลิลิตร

ละลาย aminopterin 1.76 กรัมในน้ำสำหรับฉีดเข้าเส้นปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยเติม 1 N NaOH ลงไปเล็กน้อยเพื่อช่วยในการละลาย แล้วปรับค่า pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 7.2 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดหลอดละ 10 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

6. 100x Hypoxanthine and thymidine (HT) stock (Sigma®)

-Hypoxanthine	136.1	mg
-Thymidine	38.75	mg
-Water for injection	100	มิลลิลิตร

ละลาย hypoxanthine และ thymidine ในน้ำสำหรับฉีดเข้าเส้นปริมาตร 90 มิลลิลิตร โดยเติม 1 N NaOH ลงไปเล็กน้อยเพื่อช่วยในการละลาย แล้วปรับค่า pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 8.1-8.5 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ทำการกรองแล้วแบ่งใส่หลอดหลอดละ 10 มิลลิลิตร หุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

7. HAT working media

-cRPMI	100	มิลลิลิตร
-100x HT stock	1	มิลลิลิตร
-100x A stock	1	มิลลิลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ให้เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

8. HT working media

-cRPMI	100	มิลลิลิตร
-100x HT st k	1	มิลลิลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ให้เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

9. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2

-NaCl	8.50	g
-Na_2HPO_4	1.07	g
-NaH_2PO_4	0.30	g
-Deionized H_2O to	1000	มิลลิลิตร

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เท่ากับ 7.2 แล้วกรองใส่ขวดเก็บที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

1 ชื่อ นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์
Mrs. Mariena Ketudat-Cairns
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน xxxxxxxxxxxxx
รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

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

4. ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology) 4.00
University of California, San Diego, USA
พ.ศ. 2538 ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH, Germany

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
- Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)
- Recombinant Protein Production
- Gene Expression in cloned animals and stem cells

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

6.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** :โครงการการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้เชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบกะ ส่งรายงาน

6.2 **ผู้ประสานงานชุดโครงการ** การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

6.3 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33) ส่งร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2556
- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ฉบับนี้
- การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
- การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากมทส ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2553
- การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2554
- การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551
- การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเสนจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus*ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
- การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคสิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
- การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
- การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
- การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions.

(National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545
- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537

6.4 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว** :

ดูหัวข้อ 7.3

6.5 **งานวิจัยที่กำลังทำ** :

- การผลิต *Pichia pastoris* ที่มีโอเมก้า 3 สูง สำหรับใช้เป็นอาหารปลา
  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2556 และได้ดำเนินการไปแล้ว 30%
- การพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจเชื้อก่อโรคปนเปื้อนในเนื้อไก่สด
  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2555 และได้ดำเนินการไปแล้ว 75%

Publications:

Kupradit, C., Ruamkuson, D., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M**. (2013) Novel multiplex polymerase chain reaction and an oligonucleotide array for specific detection of the dominant foodborne bacterial pathogens in chicken meat. African Journal of Microbiology Research 7 (24) 3085-3095 DOI: 10.5897/AJMR12.2102

Kupradit, C., Ruamkuson, D., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M.** (2013) Oligonucleotide macroarray for specific detection of bacterial foodborne pathogens Chiang Mai Journal of Science (accepted 4 June 2013)

Kupradit, C., Rodtong, S. and **Ketudat-Cairns, M**. (2013) Development of a DNA macroarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat World J Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s11274-013-1394-1 (accepted 31 May 2013)

Chittapun, S., Ruamkuson, D. and **Ketudat-Cairns, M**. (2013) Identification and Nutritional Value of Live Feeds for Ornamental Fish from Bangkok Metropolitan Markets in Thailand Chiang Mai Journal of Science 40 (3) 364-375

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Ling, Y-Y., **Ketudat-Cairns, M**., and Parnpai, R. (2012) Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. Small Ruminant Research. http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.10.011,

Imsoonthornruksa, S., K. Srirattana, W. Phewsoi, W. Tunwattana, R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2012) Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring Mitochrondrion Mitochondrion 12(5): 506–513

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

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

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Molecular Pathogens 2(4) 1-7

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

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

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

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

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

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

Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B Suranaree J. Sci Technol 16 (4) 283-290

Ruamkusol, D., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora Suranaree J. Sci Technol 16 (4) 311-317

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

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

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

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M**. and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev 54(5) 306-313

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

Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T ., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. (408) 241-249

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

Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpong, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned

Long- Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62

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

Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M**., Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a □-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. Protein Expression and Purification

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant β-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. Journal of Biotechnology (122) 86-98

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering (27) 399-406 *** Received Best paper of the year award. ****

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M**., Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology **(**64), 1185-1196

Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β-glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5 (1) 51-55

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M**., Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.

Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M**. (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. Thai J. of Biot 2 (1): 55-62

Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). Plant Molec. Biol.41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)

Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211

Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100

Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings

Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700

Ueda T, Waverczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709

Paper Presented at National and International Conferences (since 1998 > 80 titles)
Major advisor to 6 Ph.D. and 14 M.Sc. gratuates (since 2000)
Currently major advisor to 2 Ph.D. students and 1 M.Sc. student

mkc

ประวัติผู้วิจัย

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5 2094 00002 42 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-223164

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี	สาขาวิชา ชีววิทยา	ปีที่จบ 2523
	สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา	ประเทศ ไทย
5.2 ปริญญาโท	สาขาวิชา สัตววิทยา	ปีที่จบ 2525
	สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศ ไทย
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 พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5 สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

6. ประวัติการทำงาน:

- 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- 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 stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

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*** http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.108

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

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

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

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

Kunkanjanawan, T., Noisa, P. and **Parnpai, R.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131. Noisa, P. and Parnpai, R. 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. Stem Cells Int. 907961.

Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R.** and Takeda, K. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82(2): 236-243.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9. งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จแล้ว

1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

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

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

5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ดังนี้

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

ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

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

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

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

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

ประวัติส่วนตัว

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย สุรชัย รัตนสุข
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Surachai Rattanasuk

   เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3309900122714

   ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด

113 ม. 12 ต.เกาะแก้ว อ.เสลภูมิ จ.ร้อยเอ็ด 45120

โทรศัพท์ 043-556001-8

โทรสาร 043-556009

E-mail: surachai_med@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ 2545 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ (เกียรตินิยม) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ปีที่จบ 2554 ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Molecular biology, Genetic Engineering, recombinant protein

ประสบการณ์วิจัย

- **Genetic Engineering**
- **Protein Expression**
- **Molecular Biology**
- **Microbiology**
- **ผลของการพาสเจอร์ไรส์ต่อปริมาณไอโอดีนในน้ำนม**
- **การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนส**
- **จลศาสตร์การทำงานของเอนไซม์แมนนาเนส**
- **การแยกเพศตัวอ่อนวัวด้วยเทคนิค PCR**
- **การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ตระกูลแมวจากลำดับเบสของ cytochrome b**

- **การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ตระกูลกระทิง วัว และเลียงผาจากลำดับเบสของ cytochrome b**
- **Poly/Monoclonal Antibody Production**
- **Bovine embryo sex determination**
- **Bovine sperm sex selection using monoclonal antibody**
-

ผลงานวิชาการ

1. **Rattanasuk, S.** and Ketudat-Cairns, M. (2009). *Chryseobacteriumindologenes*, novel mannanase producing-bacteria. Songklanakarin J. Sci.Technol, 31(4): 395-399.
2. **Rattanasuk, S.** and Ketudat-Cairns, M.(2009). Genetic diversity of felids' cytochrome *b*.Suranaree J. Sci. Technol. 16(4):283-290.
3. **Rattanasuk, S**., Parnpai, R. and Ketudat-Cairns. (2011). Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. J. Reprod. Dev. 57:539-542.

การเสนอผลงานวิชาการ

1. **Rattanasuk, S.**, Tanomman S. and Ketudat-Cairns, M. Genetic Diversity of Felids' Cytochrome b. The 2nd SUT Graduate Conference 21st-22nd January 2009, Institute of Science, Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, Thailand (poster).
2. **Rattanasuk, S.** and Ketudat-Cairns, M. *Chryseobacteriumindologenes*, novel mannanase producing-bacteria. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008: Biotechnology for Global Care" 14th - 17th October 2008, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Thailand (poster).
3. **Rattanasuk, S.** and Ketudat-Cairns, M. Comparison of primers used for bovine sex determination. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology "TSB 2008: Biotechnology for Global Care" 14th - 17th October 2008, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Thailand **(Poster Award).**
4. **Rattanasuk, S.** and Yamabhai, M., Isolation of β-mannanase-producing Bacteria. The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable Development, and Secured Future" December 15-17, 2006 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (oral).
5. Buranabanyat, B., **Rattanasuk, S.**, Emrat, S. and Yamabhai, M., Cloning and Expression of β -mannanase from *Bacillus subtilis*. The 11th Biological Sciences Graduate Congress "Explorations Towards the Improved Quality of Life, Sustainable

Development, and Secured Future" December 15-17, 2006 Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (oral).

6. Yamabhai, M., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N., Jankangram, W., **Rattanasuk, S.**, and Emrat, S. (2003). Secretion of bacillus hydrolytic enzymes in *Escherichia coli* expression system. In *The 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. 24-28 June 2006, Prague, Czech Republic. (poster)
7. **สุรชัย รัตนสุข**, รังสรรค์ พาลพ่าย และ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์. 2551. การแยกเพศตัวอ่อนโค. วารสารเกษตรสุรนารี'51 หน้า 84-90.
8. **สุรชัย รัตนสุข**, รังสรรค์ พาลพ่าย และ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์. 2552. อยากได้ลูกสาว หรือลูกชาย การแยกเพศอสุจิวัว. วารสารเกษตรสุรนารี'52 หน้า 85-90.
9. **สุรชัย รัตนสุข.**2556. โยเกิร์ตเป็นทั้งอาหารและยาได้จริงหรือ. RERU Life. 1(1):p7.

Sequence submitted to NCBI

1. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome b complete cds. *Catopuma temminckii* cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ACCESSION FJ594957.

2. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome b complete cds. *Prionailurusplanicepscytochrome* b (cytb) gene, complete cds; ACCESSION FJ594958.

3. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome b complete cds. *Prionailurusviverrinus* cytochrome b (cytb) gene, complete cds; ACCESSION FJ594959.

4. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit I complete cds. *Catopuma temminckii* cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, complete cds; ACCESSION GQ458255.

5. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit II complete cds. *Catopumatemminckii* cytochrome c oxidase subunit II (COX2) gene, complete cds; ACCESSION GQ458256.

6. **Rattanasuk,S**. and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit I complete cds. *Prionailurusviverrinus* cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, complete cds; ACCESSION GQ458257.

7. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit II complete cds. *Prionailurusviverrinus* cytochrome c oxidase subunit II (COX2) gene, complete cds; ACCESSION GQ458258.

8. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit I complete cds. *Prionailurusplanicepscytochrome* c oxidase subunit I (COX1) gene, complete cds; ACCESSION GQ458259.

9. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit II complete cds. *Prionailurusplanicepscytochrome* c oxidase subunit II (COX2) gene, complete cds; ACCESSION GQ458260.

10. **Rattanasuk,S.** and Ketudat-Cairns,M. (2009). Sequence analysis of felid species' cytochrome c oxidase subunit III complete cds. *Prionailurusplanicepscytochrome* c oxidase subunit III (COX3) gene, complete cds; ACCESSION GQ458261.

การจดสิทธิบัตร

จดสิทธิบัตร เลขที่คำขอ:1201004011

ชื่อเรื่อง:กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดทดลอง

จดสิทธิบัตร เลขที่คำขอ: 1201004012

ชื่อเรื่อง:ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว

การบริการวิชาการ

1. ได้รับเชิญให้เป็นวิทยากรบรรยายในหัวข้อเรื่อง เทคโนโลยีการแยกเพศ
   - ในสัมมนาวิชาการ เรื่อง การย้ายฝากตัวอ่อนโค จัดโดย ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ณ ห้องประชุม 1 อาคารวิชาการ วันที่ 8-10 ธันวาคม 2550
2. ได้รับเชิญให้เป็น Reviewer ของวารสาร Agriculture Science Research Journal (6 มิ.ย. 2555)
3. ได้รับเชิญให้เป็น Reviewer ของวารสาร International Journal of Biology and Biological Sciences (29 ต.ค. 2555)
4. ได้รับเชิญให้เป็น Reviewer ของวารสาร British Microbiology Research Journalจำนวน 3 เรื่อง (13 เม.ย. 2556)
5. ได้รับเชิญให้เป็นกรรมการตรวจผลการนำเสนอผลงานในรูปแบบโพสเตอร์ จัดขึ้นโดย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปี พ.ศ. 2555