รหัสโครงการ IRD3-304-45-36-01

รายงานการวิจัย

การวิจัยและการประยุกต์ใช้การแยกเพศตัวอ่อนโคนมโดยวิธี PCR Y-specific DNA

Research and application of sexing dairy cattle embryo by PCR Y-specific DNA

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ IRD3-304-45-36-01

รายงานการวิจัย

การวิจัยและการประยุกต์ใช้การแยกเพศตัวอ่อนโคนมโดยวิธี PCR Y-specific DNA

Research and application of sexing dairy cattle embryo by PCR Y-specific DNA

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2547-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2564

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2547-2549 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้งานการวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง นอกจากนี้ขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี รวมทั้งโรงฆ่าสัตว์พระพุทธบาท จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

ตุลาคม 2564

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ตามปกติแล้วการเลี้ยงโคนมเกษตรกรต้องการลูกโคเพศเมีย การใช้เทคโนโลยีการกระตุ้นให้โคพันธุกรรมดีตกไข่หลายใบเพื่อผสมเทียมแล้วชะล้างตัวอ่อนออกมาย้ายฝากให้โคตัวรับที่พันธุกรรมทั่วไปจะทำให้ได้ลูกโคพันธุกรรมดีมากกว่าการผสมเทียมอย่างต่ำ 10 เท่า การเลือกเพศตัวอ่อนโคนมก่อนนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับ จะทำให้ได้ลูกเพศเมียมากขึ้น ดังนั้นเราจึงควรมีการวิจัยวิธีการแยกเพศตัวอ่อนให้มีประสิทธิภาพ เพื่อจะได้นำไปใช้ในการผลิตโคนมของประเทศไทย การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง

การทดลองที่ 1: ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเลี้ยงร่วมด้วย การทดลองนี้ใช้ไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ หลังจากเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิแล้ว นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคร่วมด้วยให้อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีส 30.8% (37/120) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเล็กน้อย (35/120, 29.16%) และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

การทดลองที่ 2: ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลของการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยใช้ microblade และการแช่แข็งตัวอ่อนหลังการตัดเก็บเซลล์ ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนในหลอดแก้ว การทดลองนี้ใช้ไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ หลังจากเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิแล้ว นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค หลังจากเลี้ยง 7 วัน คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วย microblade หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แล้วทำละลายตัวอ่อนออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดและตัดเก็บเซลล์ และไม่ได้นำไปแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส ไม่แตกต่างกัน (29/30, 96.66% และ 28/30, 93.33% ตามลำดับ) ตัวอ่อนกลุ่มที่ตัดเก็บเซลล์และไม่ได้แช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (28/30, 93.33%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง (23/30, 76.66%) ตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (26/30, 86.66%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง (23/30, 76.66%)

การทดลองที่ 3: ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โค

ตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification จากการทดลองพบว่าได้ประสิทธิภาพการทำ PCR 91.86% (79/86) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 50.63% (40/79) และตัวอ่อนเพศผู้ 49.37% (39/79) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดเพศเมียให้ตัวรับ 28 ตัว 42.85% (12/28) ในจำนวนนี้ตัวรับ คลอดลูกเพศเมีย 11 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 91.66% ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 12 ใบนำไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 75% (9/12) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากนำตัวอ่อนเพศเมียแช่แข็งไปย้ายฝากให้ตัวรับ 9 ตัว 33.33% (3/9) ตัวรับคลอดลูกเพศเมีย 3 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100%.

การทดลองที่ 4: ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากโคมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification จากการทดลองพบว่าได้ประสิทธิภาพการทำ PCR 90.00% (90/100) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 51.11% (46/90) และตัวอ่อนเพศผู้ 48.89% (44/90) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดเพศเมียให้ตัวรับ 23 ตัว 43.47% (10/23) ในจำนวนนี้ตัวรับ 1 ตัว (10.00%) แท้งลูก เหลือโคตัวรับ 9 ตัวตั้งท้องครบกำหนดคลอด ได้ลูกเพศเมีย 8 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 88.88% ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 23 ใบ นำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 82.60% (19/23) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็งไปย้ายฝากให้โคตัวรับ 19 ตัว มีการตั้งท้อง 31.57% (6/19) คลอดลูกเพศเมีย 6 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100%

การทดลองที่ 5: ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification เพื่อนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับ ผลการทำ PCR พบว่า สามารถแยกเพศได้ 90.90% (40/41) เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 52.50%, (21/40) และตัวอ่อนเพศผู้ 47.50% (19/40) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดเพศเมียให้ตัวรับ 10 ตัว 60% (6/10) ตัวรับคลอดลูกเพศเมีย 6 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100% ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 11 ใบ นำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 90.90% (10/11) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็ง 10 ใบไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 40.00% (4/10) คลอดลูกเพศเมีย 4 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100%

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า การแช่แข็งตัวอ่อนหลังจากการตัดเก็บเซลล์โดยวิธี vitrification ให้อัตราการรอดต่ำกว่าตัวอ่อนสด การแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการปฏิสนธิใน หลอดแก้ว และการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำสูงในการผลิตลูกโคนมเพศเมียจากการย้ายฝากตัวอ่อน ควรมีการทำการทดลองเพื่อเพิ่มอัตราการรอดของตัวอ่อนหลังจากการตัดเก็บเซลล์ แล้วแช่แข็งโดยวิธี vitrification

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

In general, dairy farmers needed female calves. Multiple ovulation and embryo transfer technology have obviously shown to speed up the production of superior genetics calves at least 10 times when compared with artificial insemination. Sexing dairy cattle embryos before transfer to recipients will give the great opportunity to get more female calves. Thus, we should do research to find out the efficient technique of embryo sexing in order to utilize in dairy production in Thailand. The research divided into five experiments.

Experiment 1: This research aimed to compare the *in vitro* culture of embryo in medium with and without bovine oviductal epithelial cells (BOEC). The slaughterhouse derived oocytes were *in vitro* matured (IVM) and *in vitro* fertilized (IVF) with frozen-thawed dairy cattle semen. The development of embryos to blastocyst stage in the medium with and without BOEC was examined at day 7. The results showed that co-cultured of embryos with BOEC gave slightly higher number of blastocysts than those without BOEC co-cultured (37/120, 30.8% and 35/120, 29.16% respectively) but was not significant different.

Experiment 2: This research aimed to compare the effects of biopsy embryos at blastocyst stage with microblade and subsequent freezing after biopsied on *in vitro* development of embryos. The slaughterhouse derived oocytes were IVM and IVF with frozen-thawed dairy cattle semen. The embryos were cultured in medium without BOEC for 7 days and grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade. The biopsied blastocysts were frozen by vitrification technique. The vitrified embryos were thawed and cultured *in vitro* for 24 h and examined the development to hatching blastocyst stage. The results showed that non-biopsied and biopsied embryos without freezing had similar development to hatching blastocysts (29/30, 96.66% and 28/30, 93.33%, respectively). The biopsied embryos without freezing showed development to hatching blastocysts (28/30, 93.33%) which were significantly higher than those biopsied and vitrified embryos (23/30, 76.66%). The non-biopsied and vitrified embryos showed significant higher development to hatching blastocysts than those in biopsied and vitrified embryos (26/30, 86.66% and 23/30, 76.66%, respectively).

Experiment 3: This research aimed to sexing *in vitro* produced embryos which derived from slaughterhouse oocytes by PCR Y-specific DNA technique. Grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade and the collected cells were determined sex by PCR. The fresh female embryos were transferred to recipients at day 7-8 after estrous. In case of not enough recipients for fresh embryos, the female embryos were vitrified. The results showed that efficiency of PCR was 91.86% (79/86), from these were female embryos 50.63% (40/79) and male embryos 49.37% (39/79). The pregnancy rate after transferred fresh female embryos to 28 recipients was 42.85% (12/28), from these; recipients gave birth to 11 female calves which achieved 91.66% accuracy of sexing. The 12 female embryos were vitrified and warmed, 75% (9/12) good quality embryos were detected. The pregnancy rate after transferred vitrified-warmed female embryos to 9 recipients was 33.33% (3/9), from these; recipients gave birth to 3 female calves which achieved 100% accuracy of sexing.

Experiment 4: This research aimed to sexing *in vitro* produced embryos which derived from ultrasound ovum-picked up oocytes by PCR Y-specific DNA technique. Grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade and the collected cells were determined sex by PCR. The fresh female embryos were transferred to recipients at day 7-8 after estrous. In case of not enough recipients for fresh embryos, the female embryos were vitrified. The results showed that efficiency of PCR was 90.00% (90/100), from these were female embryos 51.11% (46/90) and male embryos 48.89% (44/90). The pregnancy rate after transferred fresh female embryos to 23 recipients was 43.47% (10/23), from these; 1 recipient aborted, remaining 9 recipients gave birth to 8 female calves which achieved 88.88% accuracy of sexing. The 23 female embryos were vitrified and warmed, 82.60% (19/23) good quality embryos were detected. The pregnancy rate after transferred vitrified-warmed female embryos to 19 recipients was 31.57% (6/19), from these; recipients gave birth to 6 female calves which achieved 100% accuracy of sexing.

Experiment 5: This research aimed to sexing *in vivo* produced embryos which derived from multiovulation by PCR Y-specific DNA technique. Grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade and the collected cells were determined sex by PCR. The fresh female embryos were transferred to recipients at day 7-8 after estrous. In case of not

enough recipients for fresh embryos, the female embryos were vitrified. The results showed that efficiency of PCR was 90.90% (40/41), from these were female embryos 52.50%, (21/40) and male embryos 47.50% (19/40). The pregnancy rate after transferred fresh female embryos to 10 recipients was 60.00% (6/10), and recipients gave birth to 6 female calves which achieved 100% accuracy of sexing. The 11 female embryos were vitrified and warmed, 90.90% (10/11) good quality embryos were detected. The pregnancy rate after transferred vitrified-warmed female embryos to 10 recipients was 40.00% (4/10), from these; recipients gave birth to 4 female calves which achieved 100% accuracy of sexing.

The experiments can be concluded that vitrified biopsied embryos gave lower survival rate than fresh embryos. PCR sexing of *in vitro* and *in vivo* derived embryos could achieved high efficiency and accuracy of predicted female calves. Need to do further research to improve survival rate of biopsied embryos after vitrification.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูป	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2. การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	2
1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	3
2.1. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	3
2.2. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง	3
2.3. การผลิตตัวอ่อนเพื่อใช้ในการทดลอง	3
2.3.1. การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*In vitro* Embryo Production)	3
2.3.1.1. การเก็บไข่อ่อน	3
2.3.1.2. การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว (*In vitro* maturation, IVM)	4
2.3.1.3. การเตรียมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค (Bovine oviductal epithelial cells)	4
2.3.1.4. การเตรียมอสุจิเพื่อการปฏิสนธิในหลอดแก้ว	4
2.3.1.5. การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*In vitro* fertilization, IVF)	5
2.3.1.6. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*In vitro* embryo culture, IVC)	5
2.4. การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification	5
2.5 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโคตัวรับ	5
2.6. การแยกเพศตัวอ่อน โดยวิธี PCR Y-specific DNA	6
2.6.1. การตัดเก็บเซลล์จากตัวอ่อน	6
2.6.2. Primer ที่ใช้ในการทำ PCR	6
2.6.3. การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังโคเพศผู้เพื่อใช้เป็น positive control	6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.4. การทำ PCR	7
2.7. การผลิตตัวอ่อนโดยการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ (Multiovulation)	8
2.8. การวางแผนการทดลอง	8
2.9. การวิเคราะห์ทางสถิติ	9
บทที่ 3 ผลการทดลอง	10
ผลการทดลองที่ 1	10
ผลการทดลองที่ 2	10
ผลการทดลองที่ 3	12
ผลการทดลองที่ 4	13
ผลการทดลองที่ 5	14
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21
ประวัติหัวหน้าโครงหารวิจัย	26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ข้อมูลการผลิตน้ำนมภายในประเทศและการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นม ปีพ.ศ. 2558-2562 1

ตารางที่ 2 Master mix ในการทำ PCR 7

ตารางที่ 3 การเจริญของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วที่เลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มีและไม่มี BOEC 10

ตารางที่ 4 การเจริญของตัวอ่อนโคในหลอดแก้วหลังจากตัดเก็บเซลล์และแช่แข็งด้วยวิธี vitrification 11

ตารางที่ 5 ผลการเจาะเก็บไข่โคนม 5 ตัว ตัวละ 4 ครั้ง ด้วยอัลตราซาวด์ 14

ตารางที่ 6 การเจริญของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตราซาวด์ 14

ตารางที่ 7 ผลการชะล้างตัวอ่อนจากโคที่ผ่านการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ 15

ตารางที่ 8 ผลการแยกเพศตัวอ่อนด้วยวิธี PCR Y-specific DNA 15

ตารางที่ 9 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนเพศเมียให้โคตัวรับ 16

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 โปรแกรมการฉีดฮอร์โมน FSH และ การผสมเทียม เพื่อชะล้างตัวอ่อน 8
รูปที่ 2 การตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วย microblade 11
รูปที่ 3 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA 12
รูปที่ 4 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA 12
รูปที่ 5 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA 13
รูปที่ 6 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA 13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กิจการเลี้ยงโคนมของประเทศไทยเริ่มต้นมากว่า 60 ปี แต่จำนวนโคนมในประเทศยังมีไม่เพียงพอ อีกทั้งอัตราการผลิตน้ำนมจากแม่โคยังต่ำ ทำให้ต้องนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมจากต่างประเทศ ซึ่งในรอบ 5 ปีที่ผ่านมามีมูลค่าถึง 28,010 ล้านบาท (ดังตารางที่ 1) นับเป็นการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศอย่างมหาศาล กิจการเลี้ยงโคนมที่จะให้ได้กำไรสูงนอกจากจะต้องมีการให้อาหารและการจัดการที่ดีแล้ว พันธุกรรมของโคเป็นสิ่งที่มีความสำคัญมาก โคนมประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นสายเลือดผสมเกิดจากการผสมพันธุ์ยกระดับสายเลือดโคนม ซึ่งจะมีโคนมพันธุ์ดีส่วนหนึ่งเท่านั้นที่มีอัตราให้น้ำนมสูงและสามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม การนำโคนมพันธุ์ดีเหล่านี้มาขยายพันธุ์ด้วยวิธีผสมเทียมมีข้อจำกัดว่าครึ่งหนึ่งของลูกโคที่เกิดมาจะเป็นเพศผู้ ซึ่งมีคุณค่าต่ำและเสียโอกาสได้ลูกเพศเมียไว้ขยายพันธุ์และผลิตน้ำนม ในระยะเวลาประมาณ 30 ปีที่ผ่านมา ประเทศที่พัฒนาแล้วและเลี้ยงโคนมเป็นอุตสาหกรรม ได้นำเอาเทคโนโลยีการแยกเพศตัวอ่อนด้วยวิธี PCR Y-specific DNA ร่วมกับเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อนำตัวอ่อนที่ทราบเพศแล้วไปย้ายฝากให้โคตัวรับ ซึ่งเมื่อพิสูจน์ผลจากเพศลูกโคที่เกิดมาได้อัตราความถูกต้องในการแยกเพศมากกว่า 95 % ดังนั้นจึงสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องนำเอาเทคโนโลยีการแยกเพศตัวอ่อนด้วยวิธีที่กล่าวแล้ว มาใช้เป็นวิธีหลักในการผลิตโคนมในบ้านเราซึ่งจะทำให้ได้เฉพาะลูกโคเพศเมียและสายพันธุ์ดีเยี่ยม เพื่อเพิ่มกำลังผลิตนมให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ อันจะทำให้เพียงพอต่อความต้องการบริโภคได้ในอนาคต แต่ก่อนที่จะนำเทคโนโลยีการแยกเพศตัวอ่อนมาใช้ในภาคการผลิตเราควรจะมีการศึกษาวิจัยการนำไปใช้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยโดยทำการศึกษาวิจัยอย่างเข้มข้น มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็นหน่วยงานที่มีความพร้อมที่จะทำการศึกษาวิจัยในเรื่องนี้เนื่องจากมีบุคลากรที่มีประสบการณ์สูงทั้งการย้ายฝากตัวอ่อนในโคนมและการทำ PCR นอกจากนี้ยังได้ร่วมกับนักวิชาการและผู้ที่ทำงานอยู่ในภาคการผลิตโคโดยตรงจากหน่วยงานต่างๆมาร่วมงานด้วยซึ่งจะทำให้ได้ผลการทดสอบเทคโนโลยีนี้รวดเร็วขึ้นและเป็นการนำไปใช้จริงในระดับฟาร์ม

ตารางที่ 1 ข้อมูลการผลิตน้ำนมภายในประเทศและการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นม ปีพ.ศ. 2558-2562

รายการ	2558	2559	2560	2561	2562
จำนวนโคนมทั้งหมด (ตัว)	608,094	626,193	645,305	676,415	691,349
จำนวนน้ำนมดิบผลิตได้ทั้งหมด (ตัน)	1,179,338	1,214,193	1,210,584	1,254,767	1,295,348
มูลค่าน้ำนมดิบที่ผลิตได้ (ล้านบาท)	22,407	23,069	23,001	23,840	24,611
มูลค่านมและผลิตภัณฑ์นมที่นำเข้า (ล้านบาท)	7,022	4,225	5,620	5,127	6,016

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (http://mis-app.oae.go.th/product/โคนม)

1.2. การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ได้มีความพยายามเพื่อแยกเพศตัวอ่อนด้วยวิธีตรวจหาโครโมโซมเพศของตัวอ่อน (King, 1984) แต่ได้ผลความแม่นยำต่ำเนื่องจากไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมียได้ทั้งหมดเนื่องจากโครโมโซมทับซ้อนกันและใช้เวลาในการตรวจนาน นอกจากนี้ได้มีการใช้ H-Y antibody ในการแยกเพศตัวอ่อน (Utsumi และคณะ, 1984, 1991; White และคณะ, 1982, 1983, 1987) แต่ได้ผลความแม่นยำไม่คุ้มค่ากับการนำไปใช้จริง ในระยะเวลาประมาณ 30 ปีที่แล้วได้มีการพัฒนาวิธีการแยกเพศตัวอ่อนโคด้วยวิธี PCR Y-specific DNA (Agrawala et al., 1992; Bredbacka และคณะ, 1994; Miller, 1991; Peura และคณะ, 1991; Utsumi และคณะ, 1992; Tominaga และ Hamada, 2004) ซึ่งให้ผลแม่นยำสูงมากกว่า 95% ในการแยกเพศตัวอ่อน และมีการนำไปใช้จริงในการแยกเพศตัวอ่อนโครระดับฟาร์มของเกษตรกร (Geldhof และคณะ, 2000; Jindra และคณะ, 2000; Thibier และ Nibart, 1995; Roschlau และคณะ, 1997; Shea, 1999) มีการทดสอบการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผ่านการตัดเก็บเซลล์เพื่อนำเซลล์ที่เก็บได้ไปทำ PCR พบว่าตัวอ่อนโคที่ถูกตัดเก็บเซลล์แต่ไม่ได้แช่แข็งมีอัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วไม่แตกต่างจากตัวอ่อนโคที่ไม่ได้ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง (Leibo และ Loskutoff, 1993; Thibier และ Nibart, 1995) มีรายงานการทดลองนำตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสที่ผลิตในหลอดแก้วมาตัดเก็บเซลล์แล้วแช่แข็งโดยวิธี vitrification และ slow freezing ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งมีอัตราอยู่รอดไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็งโดยวิธี vitrification ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์แล้วแช่แข็งโดยวิธี slow freezing (Najafzadeh และคณะ, 2021) จากข้อมูลเหล่านี้จะเห็นได้ว่าการแยกเพศตัวอ่อนโคด้วยวิธี PCR Y-specific DNA เป็นวิธีที่ให้ผลความแม่นยำสูง จึงควรที่จะทำการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการผลิตโคนมของประเทศไทยต่อไป

1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการ

11.1. เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสมในการแยกเพศตัวอ่อนโคด้วยวิธี PCR Y-specific DNA

11.2. เพื่อนำเอาวิธีการแยกเพศที่พิสูจน์แล้วว่าได้ผลดี ไปใช้อย่างจริงจังในการเพิ่มผลผลิตโคนมในประเทศไทย

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

12.1. จะสามารถเพิ่มผลผลิตโคนมเพศเมียพันธุ์ดีได้ตามความต้องการ

12.2. จะสามารถประหยัดเงินตราในการนำเข้านมและผลิตภัณฑ์นมได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้โคนมของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และโคนมของเกษตรกรในจังหวัดนครราชสีมา และสระบุรี เพื่อชะล้างตัวอ่อนและเจาะดูดไข่อ่อนด้วยอัลตราซาวด์ และเป็นโคตัวรับฝากตัวอ่อน

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลิตตัวอ่อนและแยกเพศตัวอ่อน

2.2. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลองนี้ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) หากไม่ใช่จะระบุไว้

2.3. การผลิตตัวอ่อนเพื่อใช้ในการทดลอง

2.3.1. การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*In vitro* Embryo Production)

2.3.1.1. การเก็บไข่อ่อน

ในระยะแรกของการทดลองจะใช้ตัวอ่อนที่ผลิตจากวิธีนี้ ในการทดลองแยกเพศด้วย PCR Y–specific DNA เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ ซึ่งจะมีแหล่งของไข่อ่อน 2 แหล่ง เพื่อนำเข้าสู่การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วคือ

1. การเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์

เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดสระบุรี โดยนำรังไข่เก็บไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ที่อุณหภูมิห้องระหว่างขนส่งเข้าห้องปฏิบัติการภายใน 3 ชั่วโมงหลังจากเก็บรังไข่ได้ เมื่อถึงห้องทดลองจะล้างรังไข่ 3 ครั้งด้วยน้ำเกลือ จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 mL ดูดไข่ออกจากถุงไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 mm ทำการคัดเลือกไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้นขึ้นไปเพื่อนำไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ

2. การเจาะดูดไข่จากโคมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์

นำแม่โคนมที่มีลูกมาแล้ว 1-3 ตัว และอยู่ระหว่างรีดนม จำนวน 5 ตัว ซึ่งมีการจัดการเลี้ยงดู การให้อาหาร และสภาพแวดล้อมเดียวกัน มาทำการเจาะดูดไข่ด้วยอัลตราซาวด์ ทุกๆ 2 สัปดาห์ รวม 4 ครั้ง จะไม่มีการฉีดฮอร์โมนใดๆให้โคก่อนเจาะเก็บไข่ โดยเจาะเก็บจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดระหว่าง 3-8 mm การจาะดูดไข่จากฟอลลิเคิลจะใช้เข็มโควา (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) ขณะที่เจาะดูดไข่จะทำการชะล้างท่อเข็มด้วยสารละลายดูดเจาะไข่ทุกๆ 2 นาที หลังจากการดูดเจาะไข่เสร็จสิ้น นำน้ำยาที่ได้มากรองด้วยชุดกรอง (Emcon Filter, Spring Valley, WI, USA) ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสอย่างน้อย 2 ชั้นขึ้นไปเพื่อนำไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ

2.3.1.2. การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว (*In vitro* maturation, IVM)

นำไข่อ่อนที่เจาะดูดจากรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ และจากการเจาะดูดจากโคมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์มาเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µL น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 50 IU/mL hCG (Chlorulon®, Intervet International GmBH, Unterschleissheim, Germany), 0.02 AU/mL FSH (Antrin®, Kyoritsu Seiyaku, Japan) และ 1 µg/mL 17β-estradiol นำไข่ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (Parnpai และคณะ, 1999)

2.3.1.3. การเตรียมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค (Bovine oviductal epithelial cells)

เก็บท่อนำไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิ 4 °C ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำการตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดด้วย 70 % Ethanol 2 ครั้ง เก็บรวบรวมเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ โดยใช้ปากคีบขูดเซลล์จากภายในท่อนำไข่ออกมา ล้างด้วยน้ำยา modified Dulbecco Phosphate Buffer Saline (mDPBS) 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ไม่ใช่เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ออก จากนั้นล้างในน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS 2 ครั้ง ทำการเพาะเลี้ยงโดยย้ายใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm ในน้ำยา TCM 199 ที่มี 10% FBS แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil เพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่เพื่อเตรียมไว้ co-culture กับตัวอ่อน (Parnpai และคณะ, 1999)

2.3.1.4. การเตรียมอสุจิเพื่อการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำละลาย โดยนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 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 2.0 mL แล้วนำไปวางเอียง 45 องศาในตู้อบอุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1.6 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

2.3.1.5. การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*In vitro* fertilization, IVF)

นำไข่ที่เลี้ยงครบ 23 ชั่วโมง มากำจัดเซลล์คิวมูลัสออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างด้วยน้ำยา BO ที่เติมด้วย 4 mg/mL BSA 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1.4 แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง

2.3.1.6. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*In vitro* embryo culture, IVC)

หลังจากนำไข่เข้าปฏิสนธิกับตัวอสุจิครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ไปล้างด้วยน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (mSOFaa : modified synthetic oviduct fluid, Parnpai และคณะ, 1999) ที่เติมด้วย 10% FBS แล้วใช้ Pasteur pipette ที่ยืดให้ปลายมีขนาดใหญ่กว่าไข่เล็กน้อย ดูดขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้อสุจิและเซลล์คิวมูลัสที่เกาะรอบ ๆ ไข่ออกให้หมด แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (20 ใบ/น้ำยา 100 µL) ร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่ โดยปิดคลุมด้วย mineral oil ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C เป็นเวลา 5 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาออกครึ่งหนึ่งทุกวัน ตรวจสอบการเจริญของตัวอ่อน ทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนน้ำยา

2.4. การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification

ใช้วิธีที่รายงานโดย Laowtammathron และคณะ (2005) มีวิธีการดังนี้ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 22-23 °C เริ่มด้วยนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสพักไว้ในน้ำยา holding (TCM199-Hepes + 20% FBS) แล้วนำไปไว้ในน้ำยา equilibration (10% (v/v) ethylene glycol (EG) + 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ละลายในน้ำยา holding นาน 2 นาที แล้วนำไปไว้ในน้ำยา vitrification (20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose นาน 30 วินาที แล้วนำตัวอ่อน 1 ใบในน้ำยา vitrification 1 µL ไปไว้ที่ปลายของ Cryotop (Kitazato Co., Tokyo, Japan) แล้วนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

การทำละลายตัวอ่อน ทำโดยนำปลาย Cryotop ที่มีตัวอ่อนไปจุ่มในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm ที่มี 2 mL 0.5 M sucrose ที่ละลายในน้ำยา holding ที่อุณหภูมิ 22-23 °C นาน 5 นาที แล้วย้ายตัวอ่อนไปทำ serial dilution ใน 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 M sucrose นาน 2 นาที ในแต่ละความเข้มข้นของ sucrose หลังจากนั้นนำตัวอ่อนล้างในน้ำยา holding 3 ครั้ง แล้วพักไว้ในน้ำยา holding เพื่อรอนำไปทำการทดลองต่อ

2.5 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโคตัวรับ

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 จะนำตัวอ่อนย้ายฝากให้โคตัวรับ (รังสรรค์ และ สรรเพชญ, 2530b)

2.6. การแยกเพศตัวอ่อน โดยวิธี PCR Y-specific DNA

2.6.1. การตัดเก็บเซลล์จากตัวอ่อน

นำตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีสเกรด 1 และ 2 มาล้างในน้ำยา mDPBS ที่มี 10% FBS จากนั้นจึงย้ายตัวอ่อนไปไว้หยดน้ำยาชนิดเดียวกันนี้ แล้วทำการตัดเก็บเซลล์จากตัวอ่อนด้วย microblade (Bio-cut blade, Feather Safety Razor, Osaka, Japan) ซึ่งเป็นใบมีดขนาดเล็กปลายใบมีดมีขนาด 1 mm มีแกนสำหรับต่อกับเครื่อง micromanipulator ภายใต้กล้อง Inverted microscope (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) กำลังขยาย 200 เท่า โดยใช้เครื่อง micromanipulator (M0188NE, Narishige, Tokyo, Japan) โดยจะตัดเซลล์เฉพาะส่วนของ Trophectoderm ประมาณ 5-10% ของพื้นที่ตัวอ่อนทั้งหมด แล้วดูดตัวอย่างเซลล์ Trophectoderm ที่มีจำนวนระหว่าง 5-10 เซลล์ ไปล้างในหยดน้ำกลั่น (RNAse and DNAse-free) 3 ครั้ง แล้วนำเซลล์และน้ำกลั่น 5 μL ไปไว้ในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL เพื่อนำเข้าสู่ขั้นตอนการแยกเพศโดยวิธี PCR Y-specific DNA ตามวิธีการที่รายงานไว้แล้ว (Iwata และคณะ, 2002, Iwata และคณะ, 2008) จะนำตัวอ่อนที่เก็บแยกเซลล์แล้วไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยา mSOFaa+10% FBS ในสัดส่วน 1 ใบ/น้ำยา 20 μL แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบอุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air

2.6.2. Primer ที่ใช้ในการทำ PCR (Iwata และคณะ, 2002) **มีดังนี้**

1. Y-Chromosome specific primer (BY; 0.5 μM)

   Forward -5'-CTCAGCAAAGCACACCAGAC-3'

   Reverse -5'–GAACTTTCAAGCAGCTGAGGC-3' (male 300 bp)

2. Bovine specific primer (BSP; 0.3 μM)

   Forward -5'-TTTACCTTAGAACAAACCGAGGCAC-3'

   Reverse -5'-TACGGAAAGGAAAGATGACCTGACC-3' (bovine 538 bp)

2.6.3. การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังโคเพศผู้เพื่อใช้เป็น positive control

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังโคเพศผู้ในน้ำยา αMEM+10% FBS ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air แล้วทำการ trypsinize เพื่อเก็บเซลล์จำนวนประมาณ 2 ล้านเซลล์ ในหลอด conical ขนาด 15 mL แล้วปั่นที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้ง เติมด้วยน้ำกลั่น (RNAse and DNAse-free) 5 mL แล้วปั่นที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที หลังจากดูดส่วนใสทิ้ง เติมด้วยน้ำกลั่น (RNAse and DNAse-free) 400 μL แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลงหลายๆครั้งแล้วดูด 5 μL ใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 mL แล้วนำไปแช่แข็งที่ -20 °C

2.6.4. การทำ PCR

นำหลอดเก็บเซลล์ตัวอ่อนและเซลล์ไฟโบรบลาสต์โคเพศผู้ ไปลอยในไนโตรเจนเหลว แล้วนำออกมาลอยในน้ำอุ่น 37 °C แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำหลอดไปไว้ในเครื่อง Thermo cycle (Eppendorf 5331 Mastercycler Gradient) แล้วตั้งอุณหภูมิให้ได้ 95-100 °C นาน 5 นาที แล้วนำหลอดมาเตรียม master mix ในการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 2 หลังจากนั้นทำ PCR โดยเริ่มต้นที่ 95 °C นาน 2 นาที แล้วทำ 45 รอบโดยแต่ละรอบคือ 95 °C นาน 20 วินาที, 52 °C นาน 20 วินาที 72 °C นาน 40 วินาที หลังจากครบ 45 รอบแล้ว ทำที่ 72 °C 5 นาที นำ PCR product ไป run ด้วยเครื่อง electrophoresis ที่ 60 โวลท์ นาน 1 ชั่วโมง ใน 0.2% Agarose gel ที่มี Ethidium Bromide แล้วนำไปส่องตรวจและถ่ายรูปภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ตารางที่ 2 Master mix ในการทำ PCR

Reagents	Volume/reaction
5x Green buffer (Promega, USA)	5 µl
25 mM $MgCl_2$ (Promega, USA)	2 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
Tag® DNA Polymerase (Promega, USA)	0.125 µl
BY_F primer	0.8 µl
BY_R primer	0.8 µl
BSP_F primer	0.48 µl
BSP_R primer	0.48 µl
DNA ของเซลล์	5 µl
H_2O (RNAse and DNAse-free)	9.815 µl
รวม	**25 µl**

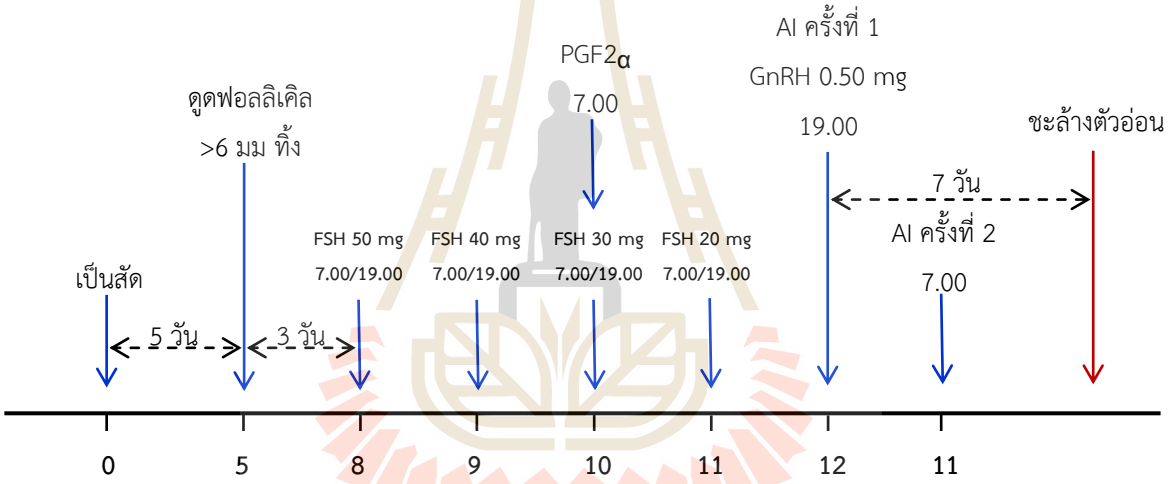
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ในระหว่างการตรวจสอบเซลล์ทีเก็บได้เพื่อแยกเพศซึ่งจะกินเวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง จะนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ในสัดส่วน 1 ใบ/น้ำยา 20 µL แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบอุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air เมื่อทราบผลการแยกเพศจะนำตัวอ่อนเพศเมีย ที่เป็นตัวอ่อนสดไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ย้ายฝาก 1 ตัวอ่อน/ตัวรับ เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนแล้วตัวรับไม่กลับเป็นสัดอีก จะตรวจการตั้งท้องโดยใช้อัลตราซาวด์ที่ 35, 45 และ 60 วันหลังจากเป็นสัด เมื่อตัวรับคลอดลูกออกมาจะตรวจสอบเพศลูกโค

เพื่อหาอัตราความถูกต้องของการแยกเพศตัวอ่อน หากมีตัวอ่อนเหลือเนื่องจากมีโคตัวรับไม่เพียงพอ จะนำตัวอ่อนไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อนำไปย้ายฝากให้ตัวรับต่อไป

2.7. การผลิตตัวอ่อนโดยการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ (Multiovulation)

เมื่อการทดลองแยกเพศตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วได้ผลดีแล้ว จะคัดเลือกโคนมพันธุ์ดี จำนวน 5 ตัวในฟาร์มของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มาฉีดด้วยฮอร์โมนFSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health Canada Inc., Ontario, Canada) วันละ 2 ครั้งติดต่อกัน 4 วัน รวม 280 mg/ตัว (ดังรูปที่ 1) เพื่อกระตุ้นให้ตกไข่ครั้งละหลายๆใบ แล้วผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมสายพันธุ์ดีเยี่ยม หลังจากนั้น 7 วันทำการชะล้างตัวอ่อนโดยวิธีไม่ผ่าตัด (Non-surgical embryo collection) ซึ่งจะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส การชะล้างตัวอ่อนจะใช้วิธีการที่รายงานไว้โดย รังสรรค์ (2530a,b); รังสรรค์และคณะ (2530a,b,c)



รูปที่ 1 โปรแกรมการฉีดฮอร์โมน FSH และ การผสมเทียม เพื่อชะล้างตัวอ่อน

2.8.การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองเปรียบเทียบการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเลี้ยงร่วมด้วย การทดลองนี้ใช้ไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ หลังจากเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิแล้ว นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค หลังจากเลี้ยง 7 วัน บันทึกอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยใช้ microblade และการแช่แข็งตัวอ่อนหลังการตัดเก็บเซลล์ ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนในหลอดแก้ว การทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นี้ใช้ไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ หลังจากเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิแล้ว นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค หลังจากเลี้ยง 7 วัน คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แล้วทำละลายตัวอ่อนออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส

การทดลองที่ 3 ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification เพื่อรอการย้ายฝากให้โคตัวรับต่อไป

การทดลองที่ 4 ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากโคมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification เพื่อรอการย้ายฝากให้โคตัวรับต่อไป

การทดลองที่ 5 ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification เพื่อรอการย้ายฝากให้โคตัวรับต่อไป

2.9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

บทที่ 3
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ในน้ำยา mSOFaa+10% FBS ที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่เลี้ยงร่วมด้วย

จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ร่วมด้วย ไม่มีความแตกต่างกันทั้งอัตราการแบ่งตัว ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ 8-เซลล์ มอรูลา และบลาสโตซีส (ตารางที่ 3) โดยระยะบลาสโตซีสเป็นระยะที่จะต้องนำไปทำการทดลองต่อ ซึ่งพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคร่วมด้วยให้อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีส (37/120, 30.8%) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเล็กน้อย (35/120, 29.16%) และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองต่อไปเพื่อความสะดวกจะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาอย่างเดียว โดยไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค

ตารางที่ 3 การเจริญของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วที่เลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มีและไม่มี BOEC

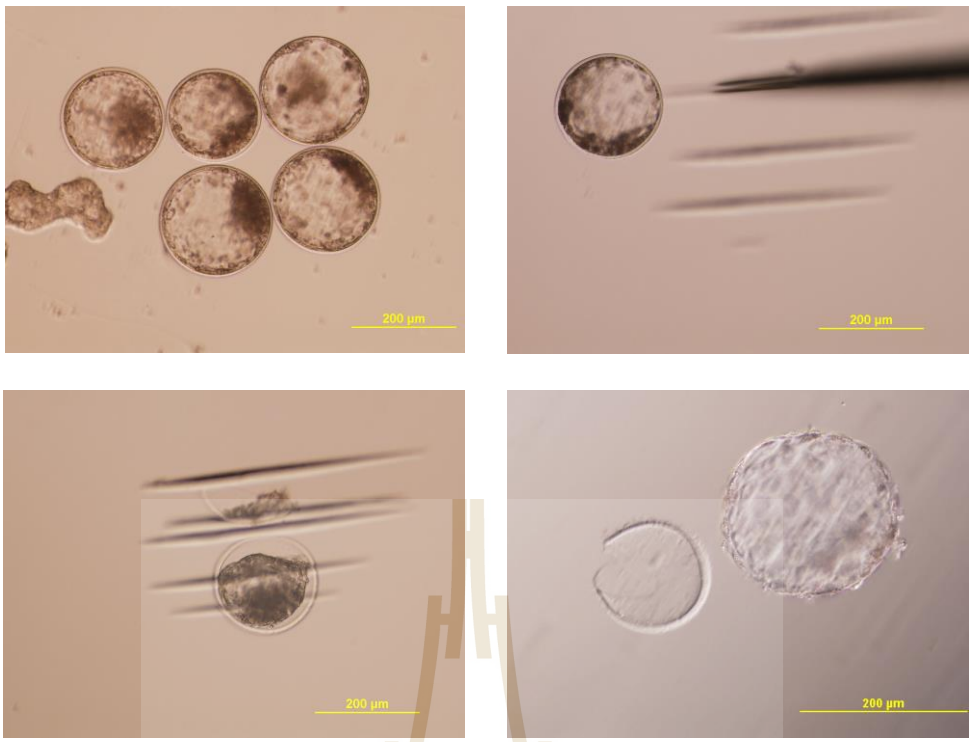
การเลี้ยงตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนนำเข้าเลี้ยง	จำนวน (%) ตัวอ่อนแบ่งตัว	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ		
			8-เซลล์	มอรูลา	บลาสโตซีส
มี BOEC	120	68 (56.66)	52 (43.33)	41 (34.16)	37 (30.83)
ไม่มี BOEC	120	64 (53.33)	50 (41.66)	39 (32.50)	35 (29.16)

ทำการทดลอง 4 ครั้ง

BOEC: Bovine oviductal epithetelial cells

ผลการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบผลของการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยใช้ microblade และการแช่แข็งตัวอ่อนหลังการตัดเก็บเซลล์ ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนในหลอดแก้ว

จากการเจาะเก็บไข่จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ มาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้ว แล้วทำปฏิสนธิในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็ง แล้วนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เป็นเวลา 7 วัน ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส 30.95% (152/491) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเกรด 1-2 (รูปที่ 2A) ที่สามารถนำไปตัดเก็บเซลล์ (รูปที่ 2B-D) ได้ 78.94% (120/152) จากตารางที่ 4 ตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดและตัดเก็บเซลล์ และไม่ได้นำไปแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส ไม่แตกต่างกัน (29/30, 96.66% และ 28/30, 93.33% ตามลำดับ) ตัวอ่อนกลุ่มที่ตัดเก็บเซลล์และไม่ได้แช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (28/30, 93.33%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง (23/30, 76.66%) ตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (26/30, 86.66%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง (23/30, 76.66%)



รูปที่ 2 การตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วย microblade

A ตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วโดยใช้ไข่จากโรงฆ่าสัตว์ ระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2

B ใช้ microblade กรีดบริเวณพื้น dish ให้เป็นเส้นตรง 3-4 เส้น เพื่อวัดระยะห่างของตัวอ่อนและพื้น dish ให้ตัวอ่อนสามารถยึดติดกับพื้น dish ได้ดีขึ้น

C ตัดเซลล์ส่วน Trophectoderm ออกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

D ตัวอ่อนที่รอดจากการตัดแบ่งเซลล์พบว่าสามารถเจริญต่อถึงระยะแฮชบลาสโตซีส หลังการเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 การเจริญของตัวอ่อนโคในหลอดแก้วหลังจากตัดเก็บเซลล์และแช่แข็งด้วยวิธี vitrification

การตัดเก็บเซลล์และการแช่แข็ง	**จำนวนตัวอ่อน**	**จำนวน (%) เจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส**
ไม่ตัด-ไม่แช่แข็ง	30	29 (96.66)[a]
ไม่ตัด-แช่แข็ง	30	26 (86.66)[b, c]
ตัด-ไม่แช่แข็ง	30	28 (93.33)[a, c]
ตัด-แช่แข็ง	30	23 (76.66)[d]

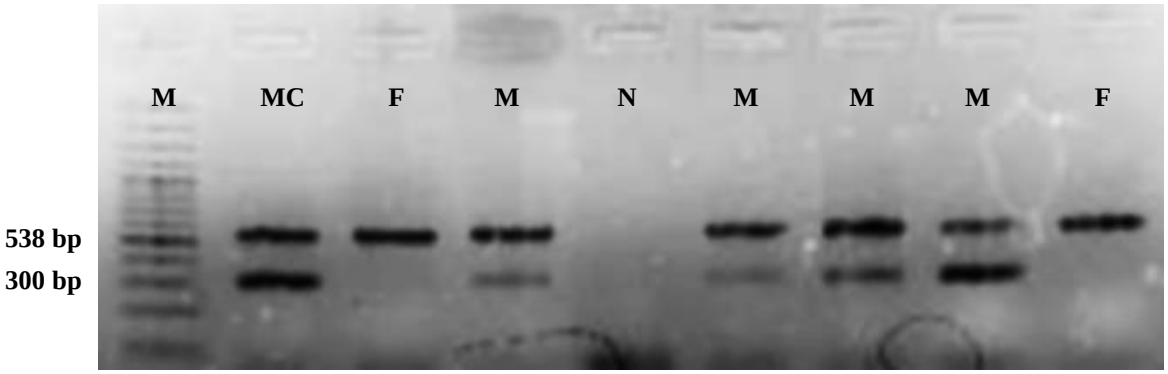
ทำการทดลอง 8 ครั้ง

[a, b, c, d] ที่คอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันที่ $P < 0.05$ (ANOVA)

ผลการทดลองที่ 3 การทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA

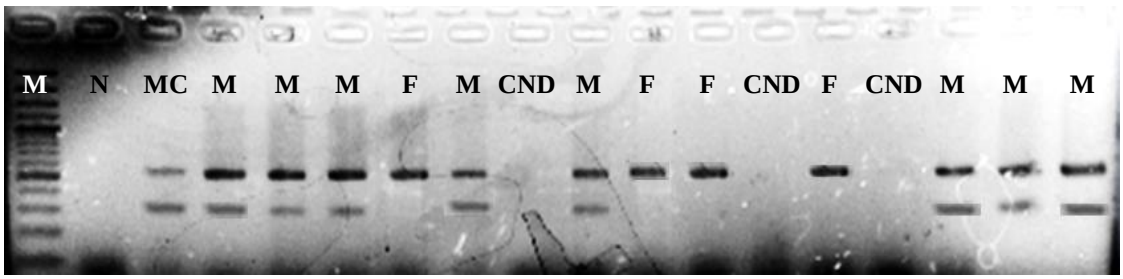
จากการเจาะเก็บไข่จากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ มาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้ว แล้วทำปฏิสนธิในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็ง แล้วนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เป็นเวลา 7 วัน ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส 31.25% (115/368) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเกรด 1-2 ที่สามารถนำไปตัดเก็บเซลล์เพื่อนำไปทำ PCR แยกเพศได้ 74.78% (86/115) ผลการทำ PCR พบว่า สามารถแยกเพศได้ 79/86 (91.86%) เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 40/79 (50.63%) และตัวอ่อนเพศผู้ 39/79 (49.37%) (รูปที่ 3-6, ตารางที่ 8) หลังจากนำตัวอ่อนสดเพศเมียจำนวน 28 ใบ ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 12 ตัว (42.85%) คลอดลูกเพศเมีย 11 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 91.66% (ตารางที่ 9) ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 12 ใบนำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 9/12 (75%) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็ง 9 ใบไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 3 ตัว (33.33%) คลอดลูกเพศเมีย 3 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100% (ตารางที่ 9)

รูปที่ 3 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA **M:** Marker **N:** Negative control **MC:** Male control **F:** Female **M:** Male **CND:** Can not detect

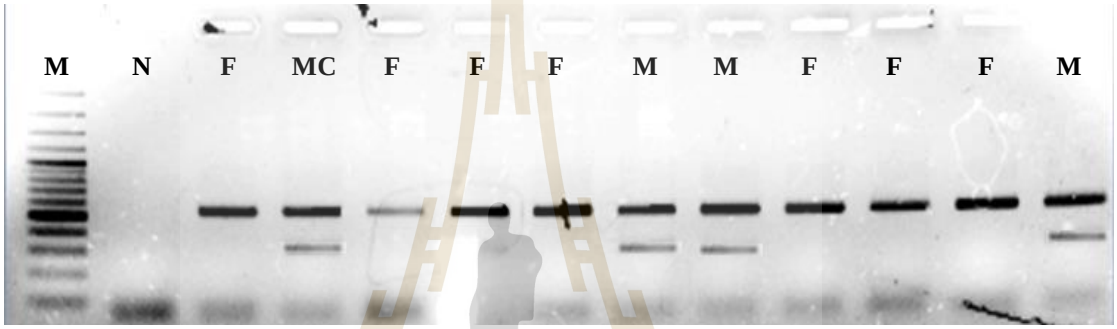


รูปที่ 4 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA **M:** Marker **N:** Negative control **MC:** Male control **F:** Female **M:** Male **CND:** Can not detect

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 5 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA **M:** Marker **N:** Negative control **MC:** Male control **F:** Female **M:** Male **CND:** Can not detect



รูปที่ 6 ผลการแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี PCR Y-specific DNA **M:** Marker **N:** Negative control **MC:** Male control **F:** Female **M:** Male **CND:** Can not detect

ผลการทดลองที่ 4 การทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากโคมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA

จากตารางที่ 5 การเจาะเก็บไข่จากโคนม 5 ตัว ด้วยอัลตราซาวด์ จากฟอลลิเคิล 667 ใบ ได้ไข่ทั้งหมด 490 ใบ ได้อัตราเก็บไข่ได้ 73.46% เป็นไข่ที่คุณภาพดี 422 ใบ (86.12%) ที่นำมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้ว แล้วทำปฏิสนธิในหลอดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็ง แล้วนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เป็นเวลา 7 วัน ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส 29.83% (125/419) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเกรด 1-2 80.00% (100/125) (ตารางที่ 6) ที่นำไปตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนเพื่อนำไปทำ PCR ผลการทำ PCR พบว่า สามารถแยกเพศได้ 90/100 (90.00%) เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 46/90 (51.11%) และตัวอ่อนเพศผู้ 44/90 (48.89%) (ตารางที่ 8) หลังจากนำตัวอ่อนสดเพศเมียจำนวน 23 ใบ ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 10 ตัว (43.47%) แท้งลูก 1 ตัว (10.00%) เหลือโคตัวรับ 9 ตัวตั้งท้องครบกำหนดคลอด ได้ลูกเพศเมีย 8 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 88.88% (ตารางที่ 9) ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 23 ใบ นำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 19/23 (82.60%) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็ง 19 ใบไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 6 ตัว (31.57%) คลอดลูกเพศเมีย 6 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100% (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 5 ผลการเจาะเก็บไข่โคนม 5 ตัว ตัวละ 4 ครั้ง ด้วยอัลตราซาวด์

ครั้งที่เจาะไข่	จำนวนฟอลลิเคิลขนาด 3-8 mm	จำนวน (%) ไข่ที่เจาะได้	จำนวน (%) ไข่คุณภาพดี
1	159	115 (72.32)	97 (84.34)
2	168	124 (73.80)	108 (87.09)
3	174	132 (75.86)	114 (86.36)
4	166	119 (71.68)	103 (86.55)
รวม	**667**	**490 (73.46)**	**422 (86.12)**

ตารางที่ 6 การเจริญของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วจากไข่ที่เจาะเก็บด้วยอัลตราซาวด์

ครั้งที่	จำนวนตัวอ่อนนำเข้าเลี้ยง	จำนวน (%) แบ่งตัว	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ			บลาสโตซีสเกรด 1-2 (%)
			8-เซลล์	มอรูลา	บลาสโตซีส	
1	97	52 (53.60)	48 (49.48)	37 (38.14)	30 (30.92)	25 (83.33)
2	106	57 (53.77)	52 (49.05)	39 (36.79)	32 (30.18)	24 (75.00)
3	113	58 (51.32)	50 (44.24)	38 (33.62)	31 (27.43)	25 (80.64)
4	103	54 (52.42)	47 (45.63)	36 (34.95)	32 (31.06)	26 (81.25)
รวม	419	**221 (52.74)**	**197 (47.01)**	**150 (35.79)**	**125 (29.83)**	**100 (80.00)**

ผลการทดลองที่ 5 การทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ โดยวิธี PCR Y-specific DNA

จากตารางที่ 7 ชะล้างตัวอ่อนจากโคตัวให้รวม 5 ตัว ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส 48 ใบ ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเกรด 1-2 จำนวน 41 ใบ ที่นำไปตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนเพื่อนำไปทำ PCR ผลการทำ PCR พบว่า สามารถแยกเพศได้ 40/41 (90.90%) เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 21/40 (52.50%) และตัวอ่อนเพศผู้ 19/40 (47.50%) (ตารางที่ 8) นำตัวอ่อนสดเพศเมียจำนวน 10 ใบ ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 6 ตัว (60.00%) ตัวรับ 6 ตัวตั้งท้องครบกำหนดคลอด ได้ลูกเพศเมีย 6 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100% (ตารางที่ 9) ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 11 ใบ นำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 10/11 (90.90%) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็ง 10 ใบไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 4 ตัว (40.00%) คลอดลูกเพศเมีย 4 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100% (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 ผลการชะล้างตัวอ่อนจากโคที่ผ่านการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ

หมายเลขโคตัวให้	**ตัวอ่อนที่ชะล้างได้**	**ตัวอ่อนสลายตัว**	**ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส**	**ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2**
1	13	1	12	11
2	12	3	9	8
3	8	2	6	5
4	11	3	8	6
5	15	2	13	11
รวม	**59**	**11**	**48**	**41**

ตารางที่ 8 ผลการแยกเพศตัวอ่อนด้วยวิธี PCR Y-specific DNA

การผลิตตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์แยกเพศ	แยกเพศสำเร็จ (%)	ตัวอ่อนเพศเมีย (%)	ตัวอ่อนเพศผู้ (%)
ในหลอดแก้ว-ไข่จากรังไข่โรงฆ่าสัตว์	86	79 (91.86)	40 (50.63)	39 (49.37%)
ในหลอดแก้ว-ไข่จากการทำอัลตราซาวด์	100	90 (90.00)	46 (51.11)	44 (48.89%)
ชะล้างจากการกระตุ้นให้โคตกไข่หลายใบ	41	40 (90.90)	21 (52.50)	19 (47.50%)
รวม	**227**	**209 (92.07)**	**107 (51.19)**	**102 (48.80)**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 9 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนเพศเมียให้โคตัวรับ

การผลิตตัวอ่อน	ชนิดตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อนแช่แข็ง	จำนวน (%) ตัวอ่อนคุณภาพดีหลังทำละลาย	จำนวนตัวรับ	จำนวน (%) ตัวรับตั้งท้อง	จำนวน (%) ตัวรับคลอด	จำนวน (%) ลูกโคเพศเมีย
ในหลอดแก้ว-ไข่จากรังไข่	สด	-	-	28	12 (42.85)[a]	12 (100)	11 (91.66)
โรงฆ่าสัตว์	แช่แข็ง	12	9 (75.00)[a]	9	3 (33.33)[b]	3 (100)	3 (100)
ในหลอดแก้ว-ไข่จากการ	สด	-	-	23	10 (43.47)[a]	9 (90.00)	8 (88.88)
ทำอัลตราซาวด์	แช่แข็ง	23	19 (82.60)[a, b]	19	6 (31.57)[b]	6 (100)	6 (100)
ชะล้างจากการกระตุ้นให้โค	สด	-	-	10	6 (60.00)[c]	6 (100)	6 (100)
ตกไข่หลายใบ	แช่แข็ง	11	10 (90.90)[b]	10	4 (40.00)[a]	4 (100)	4 (100)

[a, b, c, d] ที่คอลัมน์เดียวกันของแต่ละวิธีการผลิตตัวอ่อนมีความแตกต่างกันที่ $P < 0.05$ (ANOVA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคร่วมด้วย กลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคได้อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเล็กน้อย จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในกระบวนการผลิตตัวอ่อนโคในหลอดแก้ว จะมีปัญหาตัวอ่อนหยุดเจริญที่ระยะ 8 เซลล์ (8-cell block) จึงมีการทดลองใช้เซลล์ร่างกายของโคมาเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เช่น เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (Eyestone และ First, 1989; Gandolfi และคณะ, 1989; Xu และคณะ, 1992) เซลล์คิวมูลัสและเซลล์แกรนูโลซ่า (Carolan และคณะ, 1994; Goto และคณะ, 1988; Kajihara และคณะ, 1990) และไม่ใช้เซลล์ร่างกายเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน แต่ใช้น้ำยาที่ผ่านการเลี้ยงกับเซลล์ร่างกาย (conditioned medium) มาเลี้ยงตัวอ่อนโค (Eyestone and First, 1989; Eyestone และคณะ, 1991; Bavister และคณะ, 1992; Hernandez-Ledezma และคณะ, 1993; Mermillod และคณะ, 1993) เพื่อทำให้ตัวอ่อนเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสสูงขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่ารายงานการทดลองส่วนใหญ่นิยมใช้เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน หรือใช้ conditioned medium กับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเลี้ยงตัวอ่อน จากรายงานของ Sparks และคณะ (1992) พบว่าการนำตัวอ่อนโครระยะ 1 เซลล์ที่ปฏิสนธิในร่างกายโคไปเลี้ยงในน้ำยาที่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคร่วมด้วย ให้อัตราตัวอ่อนเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Shamsuddin และคณะ (1993) ได้รายงานการเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว โดยใช้น้ำยา TCM-199 ที่เติมด้วย estrous cow serum (ECS) ที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค ซึ่งได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน แต่กลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคให้คุณภาพตัวอ่อนดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Shamsuddin และคณะ (1994) ที่ปรับปรุงน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว โดยใช้น้ำยา TCM-199 ที่เติมด้วย bovine serum albumin (BSA) และ insulin-transferrin- selenium (ITS) และเลี้ยงโดยไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำยา TCM-199 ที่เติมด้วย ECS และเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค นอกจากจะมีการใช้น้ำยา TCM-199 ที่เป็นน้ำยาที่มีองค์ประกอบซับซ้อน (complex medium) เลี้ยงตัวอ่อนโคแล้ว ยังมีการพัฒนาสูตรน้ำยา synthetic oviduct fluid (SOF) ที่ทราบองค์ประกอบทุกตัว (defined medium) ที่เริ่มต้นใช้เลี้ยงตัวอ่อนแกะ (Tervit และคณะ, 1972) ต่อมามีการปรับปรุงสูตรใช้กับโค (Takagi และคณะ, 1991) ซึ่งต่อมาเป็นน้ำยาที่นิยมใช้เลี้ยงตัวอ่อนโคทั้งแบบมีและไม่มีเซลล์ร่างกายเลี้ยงร่วม (Fukui และคณะ, 1991; Takahashi และ First, 1992; Van Langendonckt และคณะ, 1994) Calolan และคณะ (1995) รายงานการใช้น้ำยา SOF เลี้ยงตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วในระบบที่ไม่มีเซลล์ร่างกายเลี้ยงร่วม พบว่าภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจนต่ำ (5% O_2) ได้ตัวอ่อนเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าเลี้ยงภายใต้บรรยากาศที่มีอ๊อกซิเจนสูง (20% O_2)

จากการทดลองตัดเก็บเซลล์จากตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วระยะบลาสโตซีสด้วย microblade แล้วนำตัวอ่อนไปทำการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification หลังจากทำละลายตัวอ่อนแล้วนำไปเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดและตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนแต่ไม่ได้แช่แข็ง มีอัตราการเจริญเติบโตถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน และมีอัตราสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง ส่วนตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนและแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่พบว่าตัวอ่อนโคที่ถูกตัดเก็บเซลล์แต่ไม่ได้แช่แข็งมีอัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วไม่แตกต่างจากตัวอ่อนโคที่ไม่ได้ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง (Leibo และ Loskutoff, 1993; Thibier และ Nibart, 1995) มีรายงานล่าสุดโดย Najafzadeh และคณะ (2021) ที่ได้ทดลองนำตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสที่ผลิตในหลอดแก้วมาตัดเก็บเซลล์ แล้วนำไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification และ slow freezing ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งมีอัตราอยู่รอดไม่แตกต่างจากกลุ่มที่แช่แข็งโดยวิธี vitrification ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์แล้วแช่แข็งโดยวิธี slow freezing และจากการนำตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์แล้วแช่แข็ง เมื่อนำมาทำละลายแล้วตรวจสอบความผิดปกติของ DNA ในเซลล์ตัวอ่อนโดยวิธี TUNEL assay ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่ตัดเก็บเซลล์แล้วแช่แข็งโดยวิธี slow freezing มี DNA ผิดปกติสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ไม่ตัดเก็บเซลล์และตัดเก็บเซลล์แต่ไม่แช่แข็ง และสูงกว่ากลุ่มตัดเก็บเซลล์ที่แช่แข็งโดยวิธี vitrification แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ มีรายงานว่าวิธีการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องระมัดระวัง และทักษะของผู้ทำมีผลต่ออัตราความอยู่รอดของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ตัดเก็บเซลล์แล้วนำไปแช่แข็ง จะส่งผลต่ออัตรารอดหลังทำละลายจนถึงอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ (Cenariu และคณะ, 2012)

ในการทดลองนี้การตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนไปแยกเพศด้วยวิธี PCR มีความสำเร็จในการแยกเพศ 92.07% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Thibier และ Nibart (1995) ที่ได้ความสำเร็จ 94.7% จากตัวอ่อน 1,660 ใบที่ทำในภาคสนาม ความสำเร็จในการทำ PCR เพื่อแยกเพศขึ้นกับปัจจัยสำคัญได้แก่จำนวนเซลล์ที่นำไปทำ PCR ความสะอาดในการเก็บเซลล์ที่ต้องไม่มีการปนเปื้อน DNA ของตัวอ่อนใบอื่น และชนิดของไพรเมอร์ในการทำ PCR (Lopes และคณะ, 2001)

ผลการทดลองย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผ่านการตัดเก็บเซลล์ไปแยกเพศโดยวิธี PCR ซึ่งเป็นตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้ว ทั้งจากไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์และโดยการใช้อัลตราซาวด์ และตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นให้โคตกไข่หลายใบซึ่งเป็นตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในร่างกายโค โดยนำเฉพาะตัวอ่อนที่ตรวจพบว่าเป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับ พบว่าตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วจากไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์และโดยการใช้อัลตราซาวด์ที่ไม่ได้แช่แข็ง มีอัตราการตั้งท้องสูงกว่าตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง ส่วนตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นให้โคตกไข่หลายใบที่ไม่ได้แช่แข็งมีอัตราการตั้งท้องสูงกว่าตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วที่ไม่ได้แช่แข็ง นอกจากนี้ตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นให้โคตกไข่หลายใบที่แช่แข็งมีอัตราการตั้งท้องสูงกว่าตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้วที่แช่แข็ง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thibier และ Nibart (1995) ที่พบว่าการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่ได้จากการกระตุ้นให้โคตกไข่หลายใบที่ผ่านการตัดเก็บเซลล์แล้วแช่แข็งมีอัตราการตั้งท้องต่ำกว่าตัวอ่อนที่ไม่ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง ตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดแก้ว จะมีการสะสมของเม็ดไขมัน (lipid droplet) มากกว่าตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในตัวโคแล้วชะล้าง

ออกมา (Gardner และคณะ, 1994) ซึ่งการมี lipid droplet มากในเซลล์ของตัวอ่อนจะมีผลทำให้มีอัตรารอดหลังแช่แข็งต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในตัวโคแล้วชะล้างออกมา (Leibo และ Loskutoff, 1993; Agca และคณะ, 1998)

จากการทดลองนำตัวอ่อนเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับ ได้ลูกโคเกิดมา 40 ตัว เป็นเพศเมีย 38 ตัว ได้ความถูกต้องของการแยกเพศด้วยวิธี PCR 95% ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Thibier และ Nibart (1995) ที่ได้ความถูกต้องของเพศลูกที่เป็นเพศผู้ 97.36% และเพศเมีย 98.65%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 สามารถแช่แข็งตัวอ่อนหลังจากการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade โดยวิธี vitrification แล้วตัวอ่อนมีอัตรารอดหลังทำละลายต่ำกว่าตัวอ่อนสด

5.1.2 การแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และจากการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ ด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำสูงในการผลิตลูกโคนมเพศเมียจากการย้ายฝากตัวอ่อน

5.1.3 ได้มีการต่อยอดงานวิจัยนี้ไปทำวิจัยต่อ ซึ่งได้ตีพิมพ์เผยแพร่ ในวารสาร Journal of Reproduction and Development ดังนี้

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.

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการทำการทดลองเพื่อเพิ่มอัตราการรอดของตัวอ่อนหลังจากการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วแช่แข็งโดยวิธี vitrification

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530a. อดีต ปัจจุบัน และ อนาคตของการย้ายฝากตัวอ่อน. เวชสารสัตวแพทย์ 16: 258-269.

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

รังสรรค์ พาลพ่าย, สรรเพชญ โสภณ, มณีวรรณ กมลพัฒนะ, กำธร มีบำรุง, กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ, ประชุม อินทรโชติ, ธวัชชัย สุวรรณกำจาย, ประภากร วัฒโนดร, พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530a. การย้ายฝากตัวอ่อน(E.T.) ในประเทศไทย. *แก่นเกษตร* 15: 271-280.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530b. 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. 2530c. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 273-288.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. http://mis-app.oae.go.th/product/โคนม

Agca, Y., Monson, R.L., Northey, D.L., Peschel, D.E., Schaefer, D.M. and Rutledge, J..J. 1998. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified ivp bovine embryos. *Theriogenology* 50: 129-145.

Agrawala, P.L., Wagner, V.A. and Geldermann, H. 1992. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology* 38: 969-978.

Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A., Pinyopummintr, T. 1992. Development of in vitro matured in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 57: 127- 146.

Bredbacka, P., Velmala, R., Peippo, J. and Bredbacka, K. 1994. Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos. *Theriogenology* 41: 1023-1031.

Carolan, C., Monaghan, P., Gallagher, M. and Gordon, I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 41: 1068-1061.

Calolan, C., Lonergan, P., Van-Langendonckt, A. and Mermillod, P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 43: 1115-1128.

Cenariu, M., Pall, E., Cernea, C., and Groza, I. 2012. Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *J. Biomed. Biotech.* 541384

Eyestone, W.H. and First, N.L. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 85: 715-720.

Eyestone, W.H., Jones, J.M. และ First, N.L., 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 92: 59-64.

Fukui, Y., McGowan, L.T., James, R.W., Pugh, P.A., Tervit, H.R. 1991. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 92: 125-131.

Gandolfi, F., Brevini, T.A.L, Moor, R.M. 1989. Effects of oviduct environment on embryonic development. *J. Reprod. Fertil*. Suppl 38: 107-115.

Gardner, D.K., Lane, M., Spitzer, A., Batt, P.A., 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acid, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50: 390-400.

Geldhof, A., Goossens, L., Moyaert, I., Cuelenaere, M., Roschlau, K., Roschlau, D., Nivot, A., Beckers, J.F. and Ectors, F. 2000. Sex determination in bovine embryos by micro-aspiration: Technical aspects and results under farm conditions. *Theriogenology* 53: 479.

Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 83: 753-758.

Hernandez-Ledezma, J.J., Villanueva, C., Sikes, J.D. and Roberts, R.M. 1993. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by in vitro maturation in vitro fertilization procedures. Theriogenology 39: 1267-1277.

Iwata, H., Kimura, K., Hashimoto, S., Oota, M., Tominaga, T., Minami, N. 2002. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of IVM/IVF/IVC bovine embryos is related to the sex and developmental competence under suboptimal gas condition. *J. Reprod. Dev.* 48: 447–453.

Iwata, H., Shiono, H., Kon, Y., Matsubara, K., Kimura, K., Kuwayama, T. and Monji, Y. 2008. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 105: 234-244.

Jindra, M., Lopatarova, M., Krontorad, P. and Fiala, M. 2000. Practical use of bovine embryo sexing by PCR under field conditions in the Czech and Slovak Republics. *Theriogenology* 53: 481.

Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka Y, Koshiba Y, Hishiyama K, Shiraiwa K, Goto K. 1990. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Theriogenology* 33: 264-264.

King, W.A. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 21: 7-17.

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

Leibo, S.P. and Loskutoff, N.M. 1993. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 81-94.

Lopes, R.F.F., Forell, F., Oliveira, A.T.D. and J.L. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.

Mermillod, P., Vansteenbrugge, A., Wils, C., Moureaux, J-L., Massip, A. and Dessy, F. 1993. Characterization of embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol. Reprod.* 49: 582-587.

Miller, J.R. 1991. Isolation of Y chromosome-specific sequences and their use in embryo sexing. *Reprod. Dom. Anim.* 26: 58-65.

Najafzadeh, V., Bojsen-Møller Secher, J., Pihl, M., Anna Ærenlund, A., Natasha Jørgensen, N., Kjærsgaard Jensen, K., Træholt Jensen, M., Friederike Fenner, M., Lotte Strøbech, L. and Hyttel, P. 2021. Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology.* 171: 44-54.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison in vitro cultured with or without buffalo and cattle epithelial cells. *Buffalo J.* 15: 371-384.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Peura, T., Hyttinen, J.M., Turunen, M. and Janne, J. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35: 547-555.

Roschlau, K., Roschlau, D., Roselius, R., Dexne, U., Michaelis, U., Strehl, R., Unicki, P. and Rink, N. 1997. Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. *Theriogenology* 47: 273.

Shamsuddin, M., Larsson, B., Gustafsson, H. and Rodriguez-Martinez, H. 1993. In vitro development up to hatching of bovine in vitro-matured and fertilized oocytes with or without support from somatic cells. *Theriogenology* 39: 1067-1079.

Shamsuddin, M., Larsson, B., Gustafsson, H. and Rodriguez-Martinez, H. 1994. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology* 41: 1033-1043.

Shea, B.F. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: A six-year retrospective study *Theriogenology* 51: 841-854.

Sparks, A.E.T., Gwazdauskas, F.C. and McGilliard, M.L. 1992. Culture of one-cell bovine embryos in explanted mouse oviduct and bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology* 37: 587-594.

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.

Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S. and Masaki, J. 1991. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology* 35: 1197-1207.

Takahashi, Y. and First, N.L. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos:i nfluence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.

Tervit, H.R., Whittingham, D.G. and Rowson, L.E.A. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30: 493-497.

Thibier, M. and Nibart, M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.

Tominaga, K. and Hamada, Y. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. *Theriogenology* 61: 1181-1191.

Utsumi, K. Satoh, E. and Yuhara, M. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. *Proc. of 10th Int. Congr. on Anim. Reprod. and AI.* 2: 234.

Utsumi, K., Satoh, E. and Iritani, A. 1991. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *J. Exp. Zool.* 260: 99-105.

Utsumi, K., Kawamoto, T., Kim, J.H., Iritani, A., Sakai, A. and Komano, T. 1992. Sex determination of bovine embryos by the polymerase chain reaction using Y-specific primers. *J. Reprod.Dev.* 38: 35-43.

Van Langendonckt, A., Scutenaire, C., Massip, A. and Dessy, F. 1994. Effect of fetal calf serum on the development of day-3 in vitro bovine embryos. *Theriogenology* 41: 324.

White, K.L., Linder, G.M., Anderson, G.B. and BonDurant, R.H. 1982. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology* 18: 655-662.

White, K.L., Linder, G.M., Anderson, G.B. and BonDurant, R.H. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 19: 701-705.

White, K.L., Anderson, G.B., Pashen, R.L. and BonDurant, R.H. 1987. Detection of histocompatibility-Y antigen: identification of sex of preimplantation ovine embryos. *J. Reprod. Immunol.* 10: 27-32.

Xu, K.P., Yadav, B.R., Rorie, R.W., Plante, L., Bettridge, K.J. and King, W.A. 1992. Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine epethelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 94: 33-43.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เกิดวันที่ 7 มีนาคม 2502

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ยื่นผลงานเพื่อขอกำหนดตำแหน่งศาสตราจารย์เมื่อวันที่ 19 กันยายน 2560 และผ่านการประเมินจากมหาวิทยาลัยแล้ว ขณะนี้อยู่ระหว่างรอพระบรมราชโองการโปรดเกล้าโปรดกระหม่อมแต่งตั้ง

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. Certificate 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. รางวัลที่ได้รับ

8.1. รางวัลนักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ประจำปีงบประมาณ 2564 จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ

8.2. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560

8.3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

8.4. รางวัลศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

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

8.6. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

8.7. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

9. 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 โฮลดิ้ง, 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.

10. ผลงานตีพิมพ์ย้อนหลัง 7 ปี

2021

Yodrug, T., **Parnpai, R.***, Hirao, Y. and Somfai, T. 2021. Effect of vitrification at different meiotic stages on epigenetic characteristics of bovine oocytes and subsequently developing embryos. ***Anim. Sci. J.*** Accepted 24 June, 2021.

Suttirojpattana, T., Juanpanich, T., **Parnpai, R.** and Vutyavanich, T. 2021. Vitrification of mouse 2-cell and blastocyst stage embryos in simplified closed system using either a hemi-straw or a hollow fiber device. ***Anim. Sci. J.*** Accepted 31 May, 2021.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Hassan, F.A., Anouassi, A., Thueng-in, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2021. Generation of a single-domain antibody against isolated Escherichia coli that causes camel-calf death. ***J. Vet. Healthcare.*** doi: 10.14302/issn.2575-1212.jvhc-21-3767

Khampang, S., **Parnpai, R.**, Mahikul, W., Easley IV, C.A., In Ki Cho, I.K. and Chan, A.W.S. 2021. CAG repeat instability in embryonic stem cells and derivative spermatogenic cells of transgenic Huntington's disease monkey. ***J. Assist. Reprod. Genet.*** doi.org/10.1007/s10815-021-02106-3

2020

Theerakittayakorn, K., Nguyen, H.T., Musika, J., Kunkanjanawan, H., Imsoonthornruksa, Somredngan, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2020. Differentiation induction of human stem cells for corneal epithelial regeneration. ***Int. J. Mol. Sci.*** 21, 7834.

Kunkanjanawan, H., Kunkanjanawan, T., Khemarangsan, V., Yodsheewan, R., Theerakittayakorn, K. and **Parnpai, R.***. 2020. A xeno-free strategy for derivation of human umbilical vein endothelial cells and Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: a feasibility study toward personal cell and vascular based therapy. ***Stem Cell International.*** doi.org/10.1155/2020/8832052

Yodrug, T., **Parnpai, R.*.**, Hirao, Y. and Somfai, T. 2020. The effects of vitrification after equilibration in different concentrations of cryoprotectants on the survival and quality of bovine blastocysts. ***Anim. Sci. J.*** doi.org/10.1111/asj.13451

Liang, Y.Y., Yoisungnern, T., Huang, Y. **Parnpai, R*.** 2020. Effects of Lcarnitine on embryo development of vitrified swamp buffalooocytes following in vitro fertilization. ***Livestock Sci.*** 232: 103933**2019**

2019

Hassan, F.A., Wernery, U., Joseph, M., Anouassi, A., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2019. Molecular identification of 20 Escherichia coli isolates from dead neonatal camel calves (*Camelus dromedarius*) in the United Arab Emirates. ***J. Camel Pract. Res.*** 26: 259-260.

Panta, W., Imsoonthornruksa, S., Yoisungnern, T., Suksaweang, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.***. 2019. Enhanced hepatogenic differentiation of human Wharton's jelly–derived mesenchymal stem cells by using three-step protocol. ***Int. J. Mol. Sci.*** 20: 3016.

2018

Wipassa, V. and **Parnpai, R.*** 2018. The effects of permeating cryoprotectant combination and IGF-1 supplementation for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. ***J. Applied Anima. Sci.*** 11 (Supplement): 72-75.

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.*** 89: 1201-1206.

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.

Juanpanich, T., Suttirojpattana, T, Takayama, M., Liang, Y., Dochi, O., **Parnpai, R.*** and and Imai, K.* 2018. Survival and developmental competence of bovine embryos at different developmental stages and separated blastomeres after vitrification in different solutions. ***Anim. Sci. J.*** 89: 42-51

Paul, A.K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2018. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. ***Anim. Sci. J.*** 89: 307-315.

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.

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 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.

11. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11.10. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมงหลังคลอด

12. การจดสิทธิบัติ

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