

APPENDICES

1. Laparotomy



Figure 6 Laparotomy preparation in goat; (A-B), The instruments and inventory for surgery; (C-D), The arrangement for goat on the cradle; (E), The slitting cuts to abdomen; (F), The uterus of goat

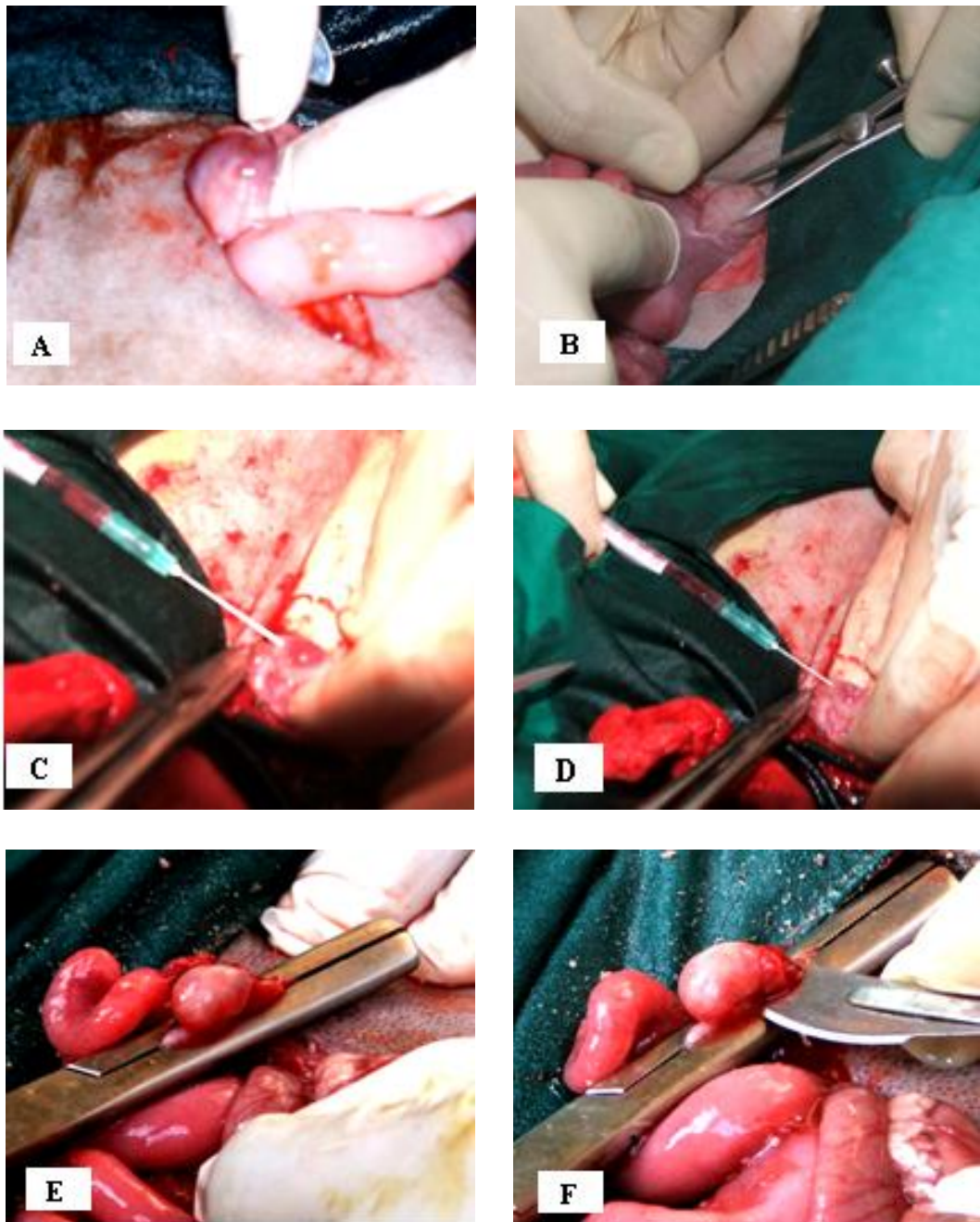


Figure 7 The procedure of ovarian aspiration and collection in this study; (A-B), Measurement of the ovary; (C-D), Oocyte aspiration from follicle; (E), The ovarian clamp by arteries forceps; (F), Cutting the ovary

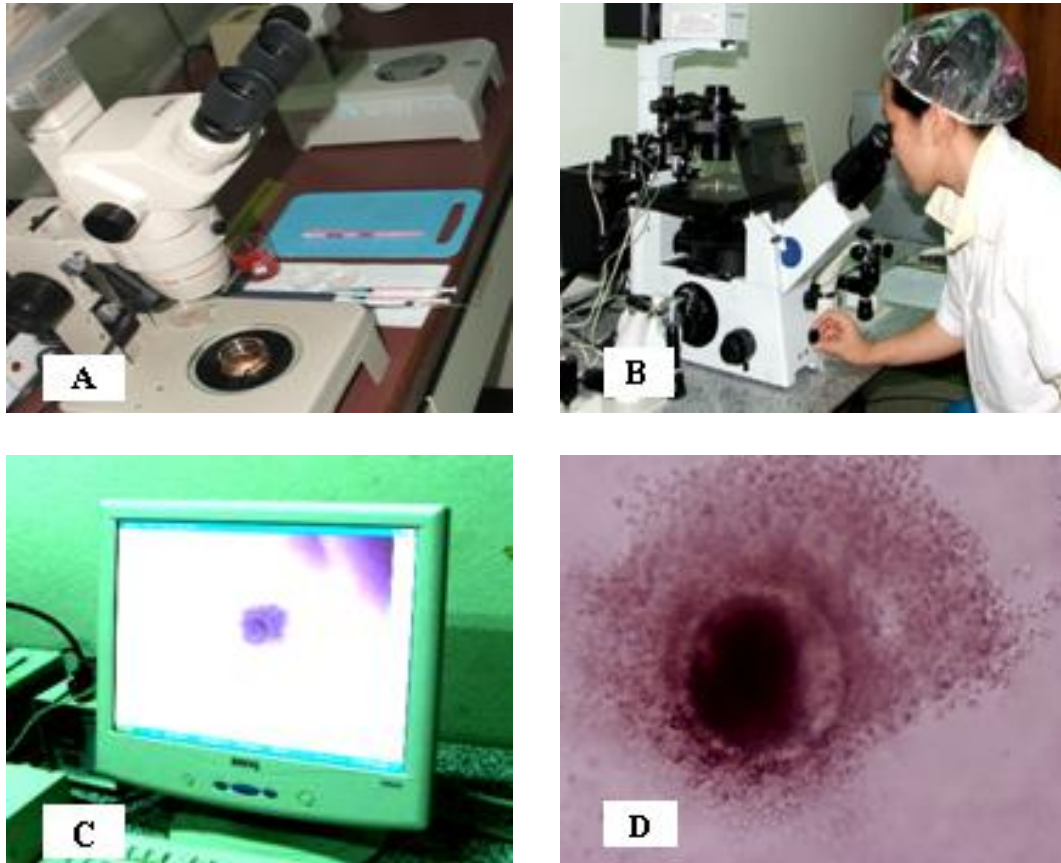


Figure 8 Oocyte quality assessment by microscope; (A-B), Microscopy for oocyte quality Assessment; (C-D), Oocyte image under the 40x objective lens

2. Immunohistochemical detection of PCNA

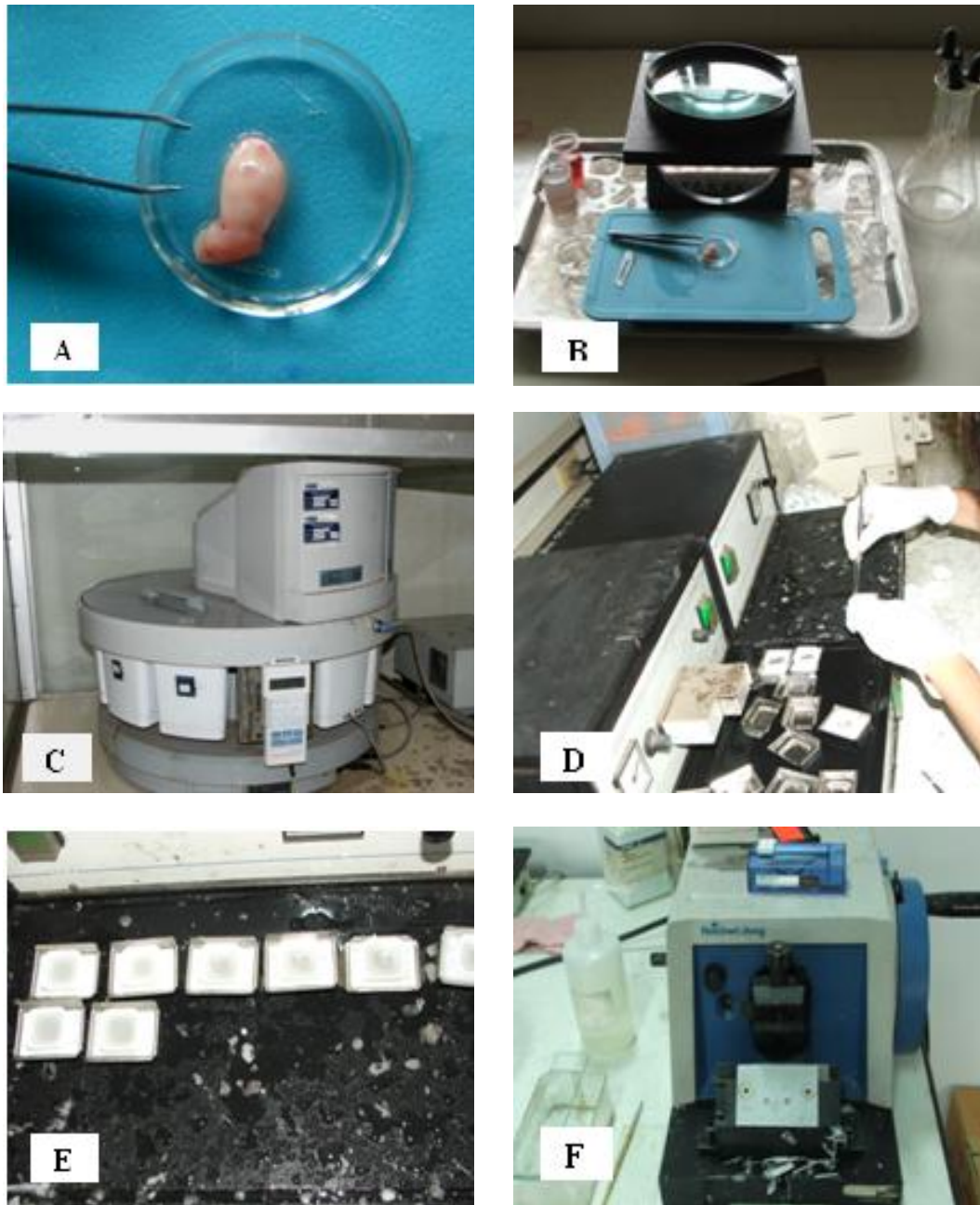


Figure 9 Ovary collection and preparation was used for PCNA detection and Bcl-2 gene expression; (A-B), Preparation of ovarian tissue sections; (C), Deparaffinnization; (D-E), Block paraffin embedded; (F), Preparation tissue sections by microtome

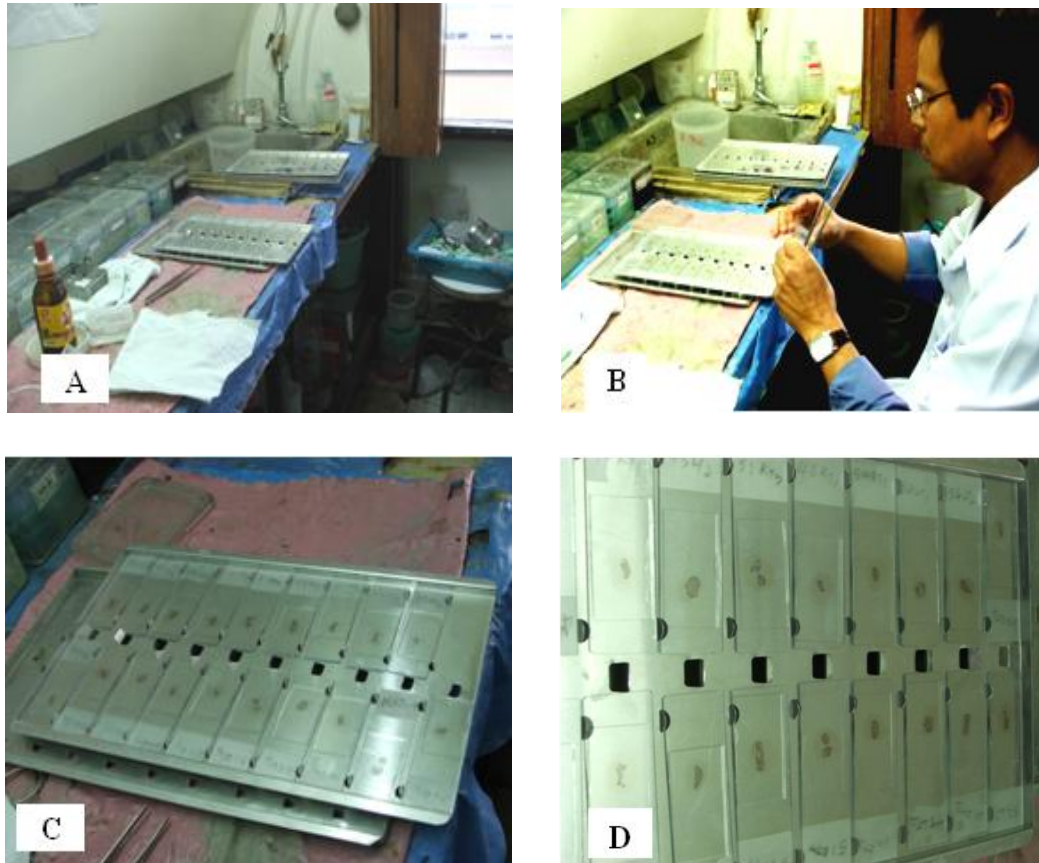


Figure 10 Immunohistochemical detection of proliferative cell nuclear antigen;
(A-B), Preparation before immunostaining; (C-D), Ovarian tissue sections
after immunostaining

3. Real time RT-PCR

Real time RT-PCR procedures

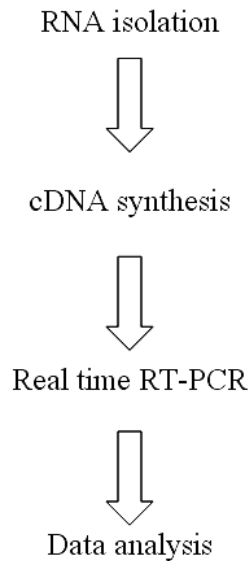


Figure 11 Overview of real time PCR procedures

3.1 RNA isolation (High Pure RNA Tissue Kit[®], Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

3.1.1 add 400 µl Lysis/Binding Buffer and the appropriate amount of frozen tissue (1-10 mg); disrupt and homogenize the tissue using a rotor-stator homogenizer.

3.1.2 Centrifuge lysate for 2 min at maximum speed (10,000 rpm) in a microcentrifuge and use only the collected supernatant for subsequent steps. Sometimes very small amounts of insoluble material will be present making this pellet invisible.

3.1.3. Add 200 µl (0.5 volumes) absolute ethanol to the lysate supernatant and mix well.

3.1.4 Combine the high pure filter tube with the collection tube and pipet the entire sample in the upper reservoir (maximal volume 700 μ l).

3.1.5 Centrifuge 30 s at maximal speed (13, 000 \times g) in a standard table top microcentrifuge.

3.1.6 Remove the filter tube from the collection tube, discard the flowthrough liquid. Combine the filter tube with the used collection tube.

3.1.7 For each isolation pipet 90 μ l DNase incubation buffer (white cap) into a sterile 1.5 ml reaction tube, add 10 μ l DNase I working solution, mix. Pipet the solution to the upper reservoir of the filter tube. Incubate for 15 min at +15 to +25°C.

3.1.8 Add 500 μ l Wash Buffer I to the upper reservoir of the filter tube. Centrifuge 15 s at 8,000 \times g. Remove the filter tube from the collection tube, discard the flow through liquid. Combine the filter tube with the used collection tube.

3.1.9 Add 500 μ l Wash Buffer II to the upper reservoir of the filter tube. Centrifuge 15 s at 8,000 \times g and discard the flow through. Combine the filter tube with the used collection tube.

3.1.10 Add 300 μ l Wash Buffer II to the upper reservoir of the filter tube. Centrifuge 2 min at full speed (approx 13, 000 \times g). The extra centrifugation time ensures removal of residual wash buffer.

3.1.11 Carefully remove the column from the collection tube so that the column does not contact the flow through as this will result in carryover of ethanol. Residual ethanol may interfere with subsequent reactions. Insert the filter tube into a nuclease free, sterile 1.5 ml microcentrifuge tube.

3.1.12 Add 100 μ l elution buffer to the upper reservoir of the filter tube. Centrifuge the tube assembly for 1 min at 8,000 \times g.

3.1.13 The microcentrifuge tube now contains the eluted RNA. Either use 10 μ l of the eluted RNA directly in RT-PCR or store the eluted RNA at -80°C for later analysis.

3.2 cDNA synthesis (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit[®], Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

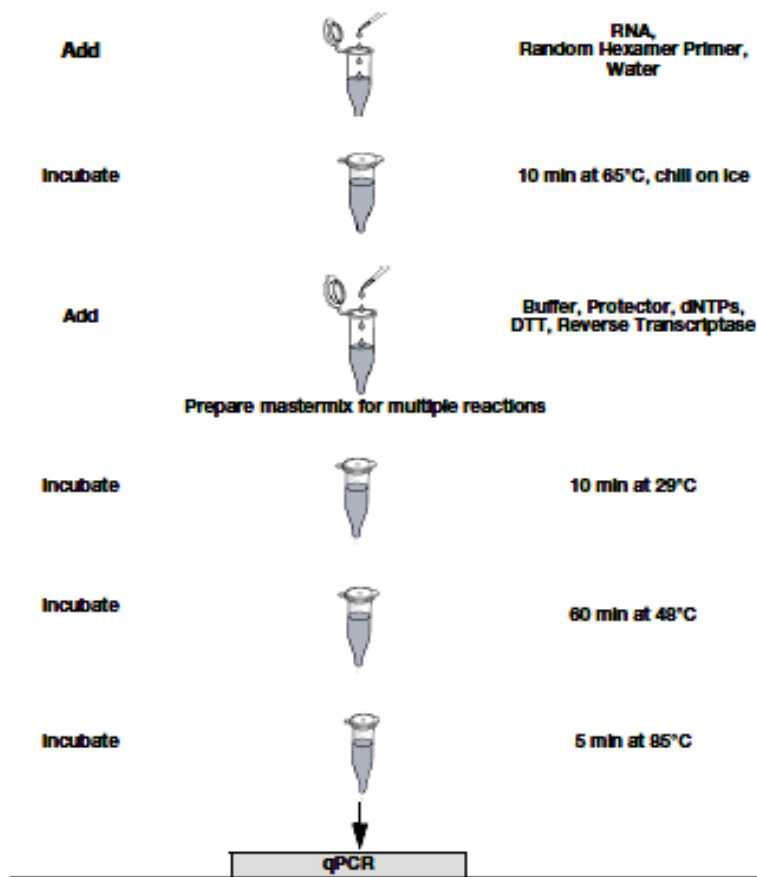


Figure 12 Overview of cDNA synthesis procedures

3.2.1 Thaw all frozen reagents before use.

- Briefly centrifuge them before starting the procedure.
- Keep all reagents on ice while setting up the reactions.

3.2.2 In a sterile, nuclease-free, thin-walled PCR tube on ice, prepare the template-primer mixture for one 20 μ l reaction by adding the components in the order listed below.

- Always wear gloves when handling RNA

Template-Primer Mix (for 1 reaction)

Component	Vol.	Final conc.
total RNA	Variable	1 pg up to 1µg
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl	2 µl	60 µM
Water, PCR-grade	Variable	to make total volume = 11.4 µl
Total volume	11.4 µl	

3.2.3 Denature the template-primer mixture by heating the tube for 10 min at 65°C in a block cycler with a heated lid (to minimize evaporation). This step ensures denaturation of RNA secondary structures.

- Immediately cool the tube on ice.

3.2.4 To the tube containing the template-primer mix, add the remaining components of the RT mix in the order listed below.

- There is also the possibility to prepare master mix for multiple reactions.

Component	Vol.	Final conc.
•Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase		
Reaction Buffer, 5×conc.	4 µl	1×(8 mM MgCl ₂)
•Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl	0.5 µl	20 U
•Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2 µl	1 mM each
•DTT	1 µl	5 mM
•Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1 µl	10 U
Final volume	20 µl	

3.2.5 Mix the reagents in the tube carefully.

- Place the tube in a block cycler with a heated lid (to minimize evaporation).

3.2.6 Incubate the reaction for 10 min at 29°C.

- Then incubate for 60 min at 48°C.
- Preheat the block cycler to the temperature of the RT reaction.

3.2.7 Inactivate Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase by heating to 85°C for 5 min.

- Stop the reaction by placing the tube on ice.
- At this point the reaction tube may be stored at +2 to +8°C for 1-2 h or at -15 to -25°C for longer periods.

3.2.8 The cDNA can be used for amplification without further purification or manipulation. For PCR use 1 - 5 µl of the reaction product in 20 µl or 50 µl final reaction volume.

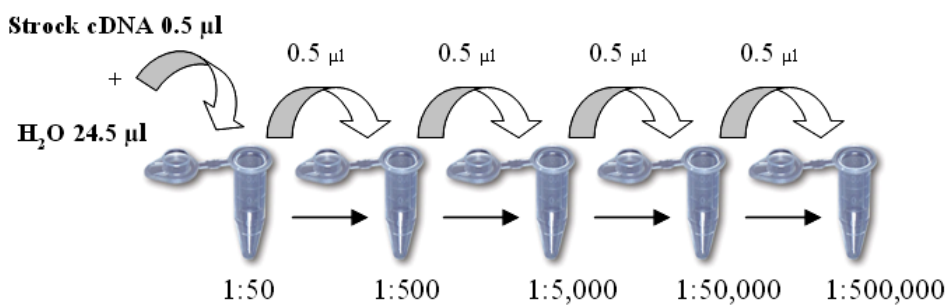
3.3 Real time RT-PCR

3.3.1 Standard curve

- Standard dilution 1:100; 1:1,00; 1:5,000; 1:10,00; 1:50,000

Stock cDNA	Net A (260)	Net A (280)	Con. cDNA (ng/µl)	Total cDNA (ng)
#40 T1	1.083	0.756	3573.9	71478
#54 T3	1.083	0.756	3573.9	71478
average			3573.9	71478

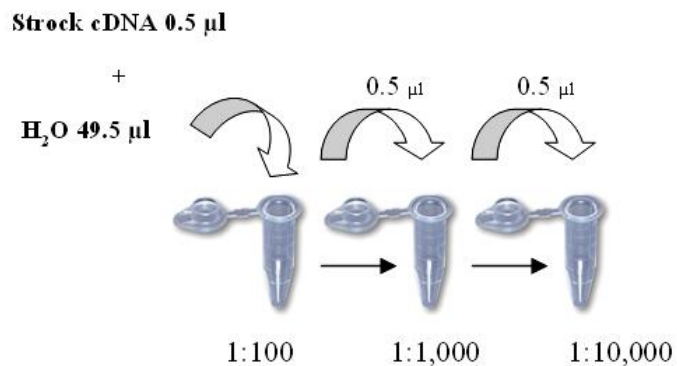
- Serial dilute 1:50



- Stock cDNA concentration

$$\begin{array}{lcl}
 1:50 & N_1V_1=N_2V_2; & = & 3573.9 \times 0.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l} = 71.48 \\
 1:500 & & = & 71.48 \times 0.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l} = 7.148 \\
 1:5,000 & & = & 7.148 \times 0.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l} = 0.714 \\
 1:50,000 & & = & 0.714 \times 0.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l} = 0.071
 \end{array}$$

- Serial dilute 1:100



- Stock cDNA concentration;

$$1:100 \quad N_1V_1=N_2V_2 \quad = \quad 3574 \times 0.5 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l} = 35.74$$

$$1:1,000 \quad = \quad 35.74 \times 0.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l} = 3.57$$

$$1:10,000 \quad = \quad 3.57 \times 0.5 \mu\text{l} / 25 \mu\text{l} = 0.35$$

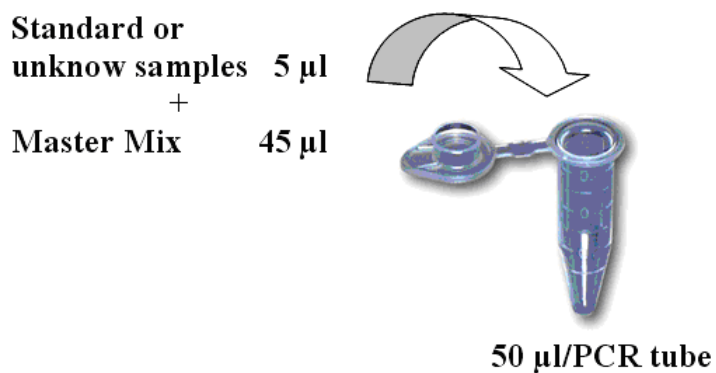
Standard	Stock Conc.cDNA	final conc. (ng/ μ l)	cDNA	Master Mix (μ l)
1	1:100	35.74	5	45
2	1:1,00	3.57	5	45
3	1:5,000	0.71	5	45
4	1:10,000	0.35	5	45
5	1:50,000	0.07	5	45

3.3.2 PCR Master Mix

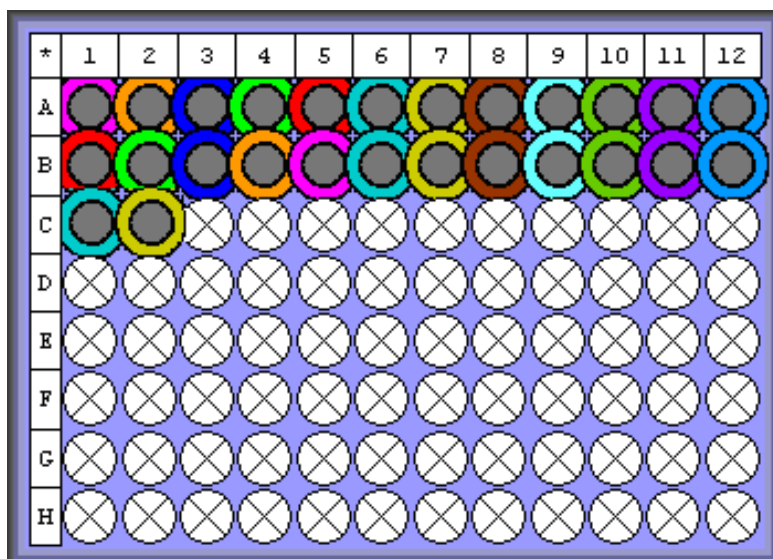
Reagents	Final conc.	1 reaction (μ l)	*27 reaction (μ l)
Faststart SYBR Green Master	1x	25	675
Primer forward (30 μ M)	300 nM	0.5	13.5
Primer reverse (30 μ M)	300 nM	0.5	13.5
Water, PCR grade	-	19	513
Total		45	1,215

3.3.3 Standard or unknown samples for reaction

- Volume per reaction;



- Plate diagram and label;



Standard dilution = A1-A5, unknown samples = A6-C1, Negative control = C2

3.3.4 Program set up

Detection Format	Real time PCR machine	Reaction Volume
SYBR Green I	-	50 μ l
Filter Setting	Dynamic mode, SYBR Green I (470-530)	

Program

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Pre-Incubation	1	None
Amplification	50	Quantification
Melting curve	1	Melting curve
Cooling	1	None

Temperature target

	Target ($^{\circ}$ C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate ($^{\circ}$ C/s)	Acquisition (per $^{\circ}$ C)
Pre-Incubation					
	95 $^{\circ}$ C	None	00:10:00		-
Amplification					
Segment1	95 $^{\circ}$ C	None	00:00:30		-
Segment2	55 $^{\circ}$ C	None	00:00:20		-
Segment3	72 $^{\circ}$ C	single	00:00:45		
Melting Curve					
Segment 1	95 $^{\circ}$ C	None	00:00:10		
Segment2	65 $^{\circ}$ C	None	00:01:00		
Segment3	95 $^{\circ}$ C	Continuous	-	0.1 $^{\circ}$ C/s	
Cooling					
	40 $^{\circ}$ C	None	00:00:30	1	-

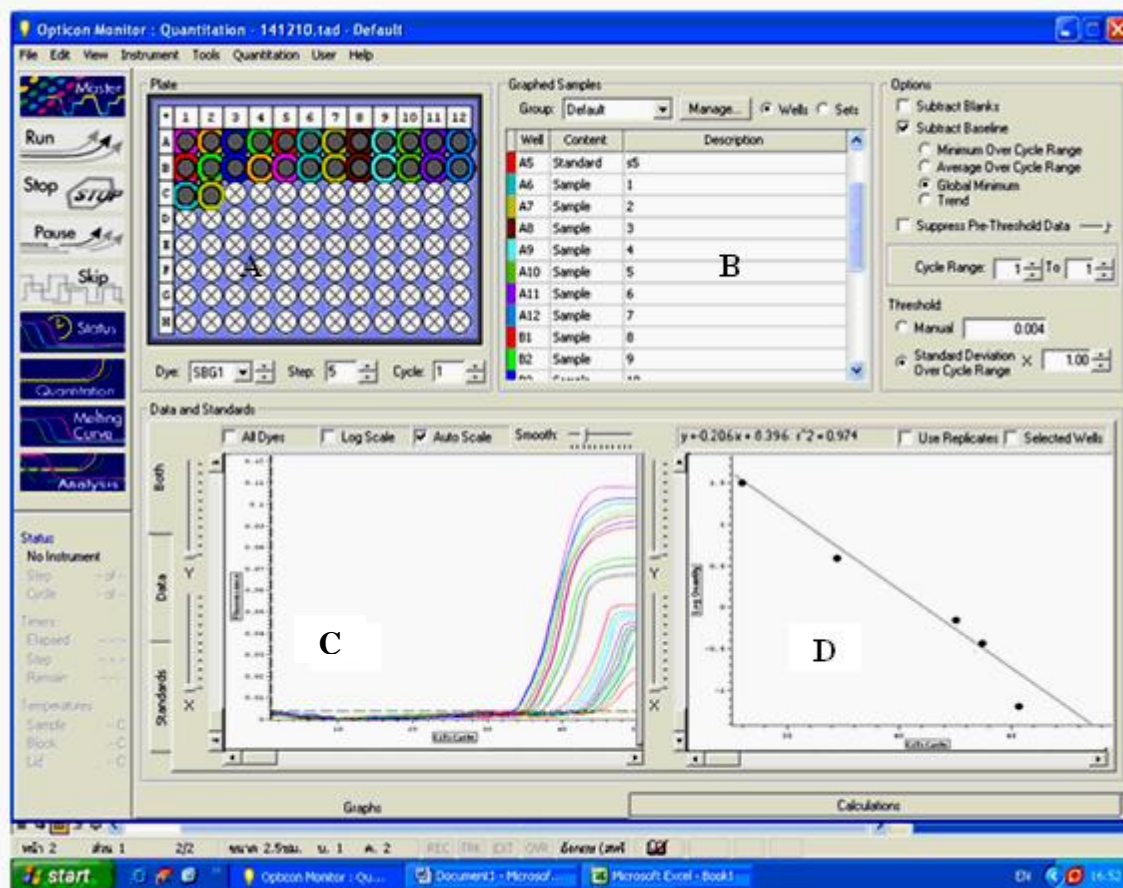


Figure 13 The Graphs screen of the Quantitation window of the mRNA levels of Bcl-2 in this study; (A), Plate diagram; (B), Graphed samples list; (C), Data graph; (D), Standard graph.



Figure 14 Preparation for detect of Bcl-2 gene expression by real time RT-PCR technique; (A-B), PCR master mix procedure for reaction; (C), Program setting for Real time PCR machine; (D), Plate diagram and Graphed samples list



KHON KAEN UNIVERSITY

This is certify that

The Project Entitled : Induction of multiple follicular development and ovulation in Thai native does using FSH and hCG

Researcher : Mr. Jaruk Nutthakornkul

Name of Department : Deparment of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

has been reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University, based on the Ethic of Animal Experimentation of National Research Council of Thailand.

Date of Approval : 25 March 2008

Assistant Professor Sunya Ruangsitt
Chairman,
Animal Ethic Committee of Khon Kaen University

Associate Professor Kittichai Trirattanasirichai
Vice President,
Research and Technology Transfer Affairs
Khon Kaen University

Record No. AEKKU 13/2551

Reference No. 0514.1.12.2/18

Research and Technology transfer Affairs, Khon Kaen University, THAILAND

Tel.-66-43-202011 Fax-66-43-202015



KHON KAEN UNIVERSITY

This is certify that

The Project Entitled : Effect of stair-step feeding regimen during estrous cycle on fertility of Thai Native goats

Researcher : Mr. Jaruk Nutthakornkul/Assoc.Prof.Chainarong navanukraw

Name of Department : Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

has been reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of Khon Kaen University, based on the Ethic of Animal Experimentation of National Research Council of Thailand.

Date of Approval : 22 October 2009

Assistant Professor Sunya Ruangsitt

Chairman,

Animal Ethic Committee of Khon Kaen University

Associate Professor Kittichai Trirattanasirichai

Vice President,

Research and Technology Transfer Affairs

Khon Kaen University

Record No. AEKKU 39/2552

Reference No. 0514.1.12.2/47

Research and Technology transfer Affairs, Khon Kaen University, THAILAND

Tel.-66-43-202011 Fax-66-43-202015

PUBLICATIONS

International publication

1. Oral presentation:

Guntaprom, S., C. Navanukraw, A. Boonsaom, K. Lertchunhakiat, **J. Nutthakornkul**, K.

Kaewprom, and S. Promkasikorn. 2008. Effect of day 5 administration of hCG in a timed artificial insemination (TAI) protocol on the conception rate of postpartum dairy cows. Proceedings of Greater Mekong Sub-region Agricultural Conference, Nakhon Phanom University, Thailand. 110-115.

Lertchunhakiat, K., C. Navanukraw, **J. Nutthakornkul**, T. Moonmanee, and W. Jaikan.

2008. Induction of estrus and puberty in Thai-native goat using vasectomized buck. Proceedings of Greater Mekong Sub-region Agricultural Conference, Nakhon Phanom University, Thailand. 121-127.

Oral presentation (In Thai)

จารึก อนุรักษ์กรกุล ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ และ กฤติยา เลิศชุนหะเกียรติ. 2552. การเหนี่ยวนำ การ พัฒนาการของฟอลลิเคิลและการตกไข่ในแพะเพศเมียพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้ฮอร์โมน FSH ร่วมกับ hCG. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 5 ปศุสัตว์ไทยในกระแสเศรษฐกิจ ถดถอย วันศุกร์ที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2552 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 149

จารึก อนุรักษ์กรกุล ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ ภาวดี ภักดี ฉลอง วชิราภากร ชูชาติ กมลเลิศ และ กฤติยา เลิศชุนหะเกียรติ. 2553. เทคนิคการเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ของแพะพื้นเมืองไทยโดยการให้อาหารแบบขี้มันได้. การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 11 อาเซียนกับ โอกาสธุรกิจปศุสัตว์สัตว์เลี้ยง และสัตวแพทย์ไทย วันศุกร์ที่ 11 มิถุนายน 2553 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพิเชษฐ เหลืองทองคำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 66.

กฤติยา เลิศชูณหะเกียรติ ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ ภาวดี ภัคดี ฉลอง วชิราภากร ชูชาติ กมลเลิศ และ **จารึก ัญญากรกุล, 2553.** กระบวนการตั้งท้องและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในระยะแรกของการตั้งท้องในแพะพื้นเมืองไทย. การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 11 อาเซียนกับโอกาสธุรกิจปศุสัตว์สัตว์เลี้ยง และสัตวแพทย์ไทย วันศุกร์ที่ 11 มิถุนายน 2553 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพิเชษฐ เหลืองทองคำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 72.

กฤติยา เลิศชูณหะเกียรติ ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ และ **จารึก ัญญากรกุล, 2552.** การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่ของแพะเทศเมียวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้โปรเจสเทอโรนสังเคราะห์ร่วมกับโกนาโดโทรปินส์. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 5 ปศุสัตว์ไทยในกระแสเศรษฐกิจถดถอย วันศุกร์ที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2552 ณ ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 143.