เอกสารอ้างอิง

ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์. 2550. สรีรวิทยาการสืบพันธุ์ขั้นสูง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา. 157 หน้า.

มงคล เตชะกำพุ. 2543. เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 681 หน้า.

Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. J. Anim. Sci. 281:1322-1326.

Allison, C. G., A. A. Colette, D. Phillip, D. Beremand, C. Youngsok, L. F. Jennifer, L. A. David, L. T. Terry, and W. B. Fuller. 2006. Identification of Endometrial Genes Regulated by Early Pregnancy, Progesterone, and Interferon Tau in the Ovine Uterus. Biol. Reprod. 74:383-394.

Arosh , J. A., S. K. Banu, S. Kimmins, P. Chapdelaine, L. A. Maclaren, and M. A. Fortier. 2004. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and Signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. Endocrinology 145:5280-5293.

Asselin, E., D. Lacroix, and M. A. Fortier. 1997. IFN-τ increases PGE Production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. Mol. Cell Endocrinol. 132:117-126.

Bazer, F. W. 1975. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. J. Anim. Sci. 41:1376-1382.

Bazer, F. W., T. E. Spencer, and T. L. Ott. 1997. Interferon-τ: a novel pregnancy recognition signal. J. Reprod. Immunol. 37:412-420.

Bartol, F. F., R. M. Roberts, F. W. Bazer, G. S. Lewis, J. D. Godkin, and W. W. Thatcher 1985. Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. Biol. Reprod. 32:681-693.

Bekisz, J., H. Schmeisser, J. Hernandez, N. D. Goldman, and K. C. Zoon. 2004. Human interferons alpha, beta and omega. Growth Factors 22:243-251.

Betts D. H., and W. A. King. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. Theriogenology 55:171-191.

Bergeron, L., G. I. Perez, G. Macdonald, G. Shi x, Y. Sun, A. Jurisicova, S. Varmuza, K. E. Latham, J. A. Flaws, J. C. Salter, H. Hara, M. A. Moskowitz, E. Li, A. Greenberg, J. L. Tilly, and J. Yuan. 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Dev. Genetics 12:1304-1314.

Binelli, M., P. Subramaniam, T. Diaz, G. A. Johnson, T. R. Hansen, L. Badinga, and W. W. Thatcher. 2001. Bovine Interferon-τ Stimulates the Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway in Bovine Endometrial Epithelial Cells. Biol. Reprod. 64:654-665.

Brad, A. M, E. M. Katherine, and P. J. Hansen. 2007. The block to apoptosis in bovine two-cell embryos involves inhibition of caspase-9 activation and caspase-mediated DNA damage. J. Reprod. Fertil. 134:789-797.

Byrne, A. T., J. Southgate, D. R. Brison, and H. J. Leese. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) super family. Mol. Reprod. Dev. 62:489-495.

Capon, D. J., H. M. Shepard, and D. V. Goeddel. 1985. Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. Mol. Cell. Biol. 5:768-779.

Caroline, W., A. Lo, and P. M. Summers. 2002. In vitro culture and interferon-tau secretion by ovine blastocysts. Anim. Reprod. Sci. 70:191-202

Charlier, M., D. Hue, M. Boisnard, J. Martal, and P. Gaye. 1991. A Novel and Atypical Type One Interferon Gene Expressed by Trophoblast during Early Pregnancy. Mol. Cell. Endocrinology 76:161-171.

Charlier, M., R. L. Haridon, M. Boisnard, J. Martal, and P. Gaye. 1993. Identification of the Expressed Forms of Ovine Interferon-Tau in the Periimplantation Conceptus: Sequence Relationships and Comparative Biological Activities. Interferon. Res. 13:313-322.

Choi, Y., G. A. Johnson, R. C. Burghardt, L. R. Berghman, M. M. Joyce, K. M. Taylor, M. D. Stewart, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2001. Interferon Regulatory Factor-Two Restricts Expression of Interferon-Stimulated Gene to the Endometrial Stroma and Glandular Epithelium of the Ovine Uterus. Biol. Reprod. 65:1038-1049.

Demmers, K. J., K. Derecka, and A. Flint. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. Reproduction 121:41-9.

Exley, G. E., C. Tang, S. Abigail, M. C. Elhinny, and M. W. Carol. 1999. Expression of Caspase and BCL-2 Apoptotic Family Members in Mouse Preimplantation Embryos. Biol. Reprod. 61:231-239.

Flint, A. P., H. J. Stewart, G. E. Lamming, and J. H. Payne. 1992. Role of the oxytocin receptor in the choice between cyclicity and gestation in ruminants. J. Reprod. Fertil. 45:53-58.

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

Garret, J. E., R. D. Geisert, M. T. Zafy, and G. L. Morgan. 1998. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. J. Reprod. Fertil. 84:437-446.

Gandhi, A. P., M. L. Lane, D. K. Gardner, and R. L. Krisher. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Hum. Reprod. 15:395-401.

Grazul-Bilska. A. T., J. T. Choi, J. J. Bilski, R. M. Weigl, J. D. Kirsch, K. C. Kraft, L. P. Reynolds, and D. A. Redmer. 2003. Effect of epidermal growth factor on early embryonic development after in vitro fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. Theriogenology 59:1449-1457.

Guesdon, F. M, H. J. Stewart, and A. P. Flint. 1996. Negative regulatory domains in a trophoblast interferon promoter. J. Mol. Endocrinol. 16:99-106.

Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Dev. Genetics 13:1899-1911.

Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Cab international, Wallingford, UK.

Gomez, E., and C. Diez. 2000. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. Anim. Reprod. Sci. 58:23-37.

Hansen, T. R., D. W. Leaman, J. C. Cross, N. Mathialagan, J. A. Bixby, and R. M. Roberts. 1991. The genes for the trophoblast interferons and the related interferon-alpha-II possess distinct 5′-promoter and 3′-flanking sequences. Biol. Chem. 266:3060-3067.

Hernandez-Ledezma, J. J., J. D. Sikes, C. N. Murphy, A. J. Watson, G. A. Schultz, and R. M. Roberts. 1992. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. Biol. Reprod. 47:374-80.

Himmler, A., R. Hauptmann, G. R. Adolf, and P. Swetly. 1986. Molecular cloning and expression in Escherichia coli of bovine type I interferons. DNA. 5:345-356.

Hochi, S., K. Ito, M. Hirabayashi, M. Ueh, K. Kimura, and A. Hanada. 1998. Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes. Theriogenology 49:787-796.

Hsu, S. Y., R. J. Lai, M. Finegold, and A. J. Hsueh. 1996. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. Endocrinology 137:4837-4843.

Ixaman, D. W., and Roberts. R. M. 1992. Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat, and musk ox and distribution of related genes among mammals. Interferon Res. 12:1-11.

Johnson, G. A., T. E. Spencer, R. C. Burghardt, M. M. Joyce, and F. W. Bazer. 2000. Interferon-tau and progesterone regulate ubiquitin cross-reactive protein expression in the ovine uterus. Biol. Reprod. 62:622-627.

Johnson, G. A. 2005. Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. Endocrinology 146:675-684.

Kubisch, H. M. , M. A. Larson, A. D. Ealy, C. N., Murphy, and R.M. Roberts. 2001. Genetic and environmental determinants of interferon-τ secretion by in vitro and in vitro-derived bovine blastocyst. Anim. Reprod. 66:1-13.

Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. J. Anim. Sci. 2004. 82:E14-E23.

Kristina, J. D., K. Derecka, and A. Flint. 2001 Trophoblast interferon and pregnancy. Reproduction 121:41-49.

Lonergan, P., P. Monaghan, D. Rizos, M. P. Boland, and I. Gordon. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Mol. Reprod. Dev. 37:48-53.

Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Critser., and N. L. First. 1986. Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. Biol. Reprod. 35:850-857.

Li, H. J., D. J. Liu, M. Cang, L. M. Wang, M. Z. Jin, Y. Z. Ma, and B. Shorgan. 2009. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. Anim. Reprod. Sci. 114:89-98.

Mann, G. E., and G. E. Lamming. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. J. Reprod. Fertil. 121:175-180.

Matikainen, T., G. I. Perez, T. S. Zheng, T. R. Kluzak, B. R. Rueda, R. A. Flavell, and J. L. Tilly. 2001. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specifity for programmed cell death signaling in the ovary. Endocrinology 142:2468-2480.

Ocana, Q., J. M., M. M. Millan, M. P. Merlin, M. A. Ortega Mariscaly, and A. R. Franganillo. 1999. In vitro bovine embryos production: influence of serum and hormonal supplementation. Arch. Zootec. 48:71-74.

Opiela, J., L. Katska-Ksiazkiewicz, D. Lipnski, R. Slomski, M. Bzowska, and B. Rynska. 2008. Interactions among activity of glucore-6-phosphate dyhydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related gene Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. Theriogenology 69:546-555.

Perez, G. I., C. M. Knudson, L. Leykin , S. J. Korsmeyer , and J. L. Tilly. 1997. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. Nat. Med. 3:1228-1232.

Perez, G. I., R. Robles, C. M. Knudson, J. A. Flaws, S. J. Korsmeyer, and J. L. Tilly. 1999. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. Nat. Genet. 21:200-203.

Pratt, B. R., R. L. Butcher, and E. K. Inskeep. 1977. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE2 in ewes. J. Anim. Sci. 45:784-91.

Pratt, B. R., R. L. Butcher, and E. K. Inskeep. 1979. Effect of continuous intrauterine administration of prostaglandin E2 on life span of corpora lutea of nonpregnant ewes. J. Anim. Sci. 48:1441-6.

Pontzer, C. H., T. L. Ott, F. W. Bazer, and H. M. Johnson. 1990. Localization of an antiviral site on the pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein 1. Proceedings National Academy of Sciences USA. 87:5945-5949.

Ratts, V. S., J. A. Flaws, R. Kolp, C. M. Sorenson and J. L. Tilly. 1995. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 136:3665-3668.

Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, J. De la Fuente, M. P. Boland, and P. Lonergan. 2003. Bovine Embryo Culture in the Presence or Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. Biol. Reprod. 68:236-243.

Roberts, R. M., S. Xie, and N. Mathialagan. 1996. Maternal recognition of pregnancy. Biol. Reprod. 54:294-302.

Roberts, R. M., L. Liu, and A. Alexenko. 1997. New and atypical families of Type1 interferons in mammals: comparative functions, structures, and evolutionary relationships. J. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 56:287-325.

Roberts, R. M., T. Ezashi, C. S. Rosenfeld, A. D. Ealy, and H. M. Kubisch. 2003. Evolution of the interferon-tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. Reproduction (Supplement) 61:51-239.

Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming, and D. C. Wathes. 1999. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. Endocrinology 160:21-33.

Robinson, R. S., G. E. Mann, G. E. Lamming, and D. C. Wathes. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. Reproduction 122:965-79.

Rowen, D. F.,W. L. Wilke, and A. D. Fails. 2009. Anatomy and Physiology of Farm Animals. SNP Best-set Typeretter, Ltd. Ames. lowa. USA. 519 pp.

Saadeldin, I. M. B. H. Kim, B. C. Lee, G. Jang. 2011. Effect of different culture media on the temporal gene expression in the bovine developing embryos. Theriogenology 75:995-1004.

Sandra, O., I. Bataillon, P. Roux, J. Martal, G. Charpigny, P. Reinaud, P. Bolifraud, G. Germain, and K. H. Al-Gubory. 2005. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) genes are expressed in the endometrium and regulated by conceptus signals during early pregnancy in the ewe. J. Mol. Endocrinol. 34:637-644.

SAS. 2001. SAS/STAT: User guide for the International Database. SAS Inst., Cary NC.

Sanjeev, K., D. Wendy, B. David, R. Wolf, and F. Robert. 2001. Culture of Preimplantation Mouse Embryo Affects Fetal Development and the Expression of imprinted Genes. Biol. Reprod. 64:918-926.

Senger, P. L. 1997. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conception, Inc. Pullman, WA, USA. 271 pp.

Senger, P. L. 2005. Pathways to pregnancy and parturition 2nd edition. Cadmus Professional Communications, Science Press Division. Ephrata, PA, USA. 373 pp.

Spencer, T. E., and F. W. Bazer. 2004. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. J. Anim. Sci. 82:4-13.

Spencer, T. E., G. A. Johnson, R. C. Burghardt, and F. W. Bazer. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. Biol. Reprod. 71:2-10.

Spencer, T. E., O. Sandra, and E. Wolf. 2007. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. Reproduction 135:1-16.

Steel, R. G., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 666 pp.

Stojkovic, M., E. Wolf, M. Btittner, U. Berg, G. Charpigny, A. Schmitt, and G. Brem. 1995. Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. Biol. Reprod. 35:1500-1507.

Takahashi, M., H. Takahashi, S. Hamano, S. Watanabe, S. Inumaru, M. Geshi, K. Okuda, Y. Yokomizo, and A. Okano. 2003. Possible role Interferon-tau on In Vitro development of bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 49:297-305.

Thatcher, W. W., M. D. Meyer, and G. Danet-Desnoyers. 1995. Maternal recognition of pregnancy. Reproduction 49:15-28.

Van, W., A. M. Leeuw, J. H. G. den Daas, A. M. Kruip, and W. F. Rall. 1995. Comparison of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. Cryobiology 32:157-167.

Vandaele, L., K. Goossens, L. Peelman, and A. Van Soom. 2008. mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as a marker for apoptosis in bovine blastocysts. Anim. Reprod. Sci. 106:168-173.

Watanabe, M., Y. Shirayoshi, U. Koshimizu, S. Hashimoto, S. Yonehara, Y. Eguchi, Y. Tsujimoto, and N. Nakatsuji. 1997. Gene transfection of mouse primordial germ cells in vitro and analysis of their survival and growth control. Exp. Cell. Res. 230:76-83.

Wang, S., Y. Liu, G. R. Holyoak, and T. D. Bunch. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre-and post cleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M 199 media. Anim. Reprod. Sci. 48:37-45.

Yang, M. Y., and R. Rajamahendran. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. Anim. Reprod. Sci. 70:159-169.

Yang, N. S., K. H. Lu, I. Gordon, and C. Polge. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro. Theriogenology 37:326.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

1. วิธีการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (In vitro maturation, IVM)

นำโอโอไซต์ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 3 มิลลิเมตรและขนาด 3 ถึง 8 มิลลิเมตร โดยทำการสุ่มโอโอไซต์เพื่อนำมาล้างด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยง (Tissue Culture Media, TCM-199 เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ และยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์) 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำโอโอไซต์ที่ได้จากการสุ่มมาเพาะเลี้ยงด้วย TCM-199 เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ และยาปฏิชีวนะ 1 เปอร์เซ็นต์ ภายในจานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35x10 มิลลิลิตร แล้วปิดทับด้วยน้ำมันแร่ (mineral oil) เพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Hochi et al. (1998) โดยมีสารเคมีและอุปกรณ์ ดังต่อไปนี้

1.1) ยาปฏิชีวนะ penicillin G sodium 1,000,000 ยูนิต (M&H manufacturing Co. Ltd., Thailand) streptomycin sulfate 1 กรัม (M&H manufacturing Co. Ltd., Thailand)

1.2) น้ำยาสำหรับตรวจหาโอโอไซต์ (dPBS, Gibco, N.Y., USA)

1.3) น้ำยาสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ TCM 199 (GibCo BRL life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)

1.4) Bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louise, MO)

1.5) Fetal calf serum (FCS, Gibco, N.Y., USA)

1.6) Estrus cow serum (ECS โดยเตรียมจากการเจาะเลือดโคตัวเมียที่เป็นสัดในช่วง standing heat)

1.7) ไมโครปิเปตพร้อมทิปปลอดเชื้อขนาด 0.5-2.5 μl. 20-200 μl. และ 100-1000 μl.

1.8) กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope, Olympus SZ-ST, Japan)

1.9) จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 x 10 ml. (Nunclon Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

2. วิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย (In vitro fertilization, IVF)

นำโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ จากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิมาล้างด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง หลังจากนั้นก่อนที่จะทำการปฏิสนธิต้องนำโอโอไซต์ไปใส่ในจานที่มี fertilization medium 250 μl (Tyrode medium กับ 25 μl, Na-lactate 22 nM, Na-Py 1 nM, และ heparin-sodium salt (184 units/mg heparin ; Calbiochem, San Diego, CA) เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ จากนั้นเตรียมอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ที่ดีมาปั่นเหวี่ยงด้วยสาร Percoll ให้มีความหนาแน่น (Percoll 90% มากกว่า 2.5 มิลลิลิตร) เมื่อนำมาทำการปั่นเหวี่ยง 700 รอบ เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะมีอสุจิที่รอดชีวิตและมีส่วนที่เป็น

ชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ นำไปทำความสะอาดด้วย Hepe-buffered Tyrode แล้วย้ายเข้าไปใส่ใน microdrops เพื่อทำการปฏิสนธิ หลังจากปฏิสนธินำมาเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Rizos et al. (2003) โดยมีสารเคมีและอุปกรณ์ ดังต่อไปนี้

2.1) fertilization medium

2.2) Bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louise, M.O., USA)

2.3) Fetal calf serum (FCS, Gibco, N.Y., USA)

2.4) Estrus cow serum (ECS โดยเตรียมจากการเจาะเลือดโคตัวเมียที่เป็นสัดในช่วง standing heat นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกส่วนของ serum และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 20^{o}C)

2.5) ยาปฏิชีวนะ penicillin G sodium 1,000,000 ยูนิต Streptomycin sulfate 1 กรัม (GibCo BRL life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)

2.6) น้ำมันแร่ (mineral oil) (Sigma chemical C.O., USA)

2.7) จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 x 10 ml. (Nuclon® Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

2.8) จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90 x 15 ml. (Nuclon® Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

2.9) ไมโครปิเปตพร้อมทิปปลอดเชื้อขนาด 0.5-2.5 μl. 20-200 μl. และ 200-1000 ไมโครลิตร

2.10) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Shel, TC 2323)

2.11) สารละลาย Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden)

2.12) ถุงมือยาง ปลอดเชื้อ

3. วิธีการการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (In vitro culture, IVC)

ทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ปฏิสนธิแบบนอกร่างกายโดยทำการแยกส่วนของน้ำยาเพาะเลี้ยง synthetic oviductal fluid (SOF) เสริมด้วย serum 10 เปอร์เซ็นต์ในกลุ่มทดลองทั้ง 4 ทรีทเมนต์ โดยแยก microdrops และเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5-7 วัน โดยทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงทุก ๆ 24 ชั่วโมง บันทึกการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอโดยการประเมินทางทางสัณฐานวิทยา ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Gandhi et al. (2000) โดยมีสารเคมีและอุปกรณ์ ดังต่อไปนี้

3.1) น้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ Synthetic oviductal fluid (SOF)

3.2) Bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louise, M.O., USA)

3.3) Fetal calf serum (FCS, Gibco, N.Y., USA)

3.4) Estrus cow serum (ECS โดยเตรียมจากการเจาะเลือดโคตัวเมียที่เป็นสัดในช่วง standing heat นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกส่วนของ serum และนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 56 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 20^{o}C)

3.5) ยาปฏิชีวนะ penicillin G sodium 1,000,000 ยูนิต Streptomycin sulfate 1 กรัม (GibCo BRL life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)

3.6) น้ำมันแร่ (mineral oil) (Sigma chemical C.O., USA)

3.7) จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 x 10 ml. (Nuclon® Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

3.8) จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90 x 15 ml. (Nuclon® Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

3.9) ไมโครปิเปตพร้อมทิปปลอดเชื้อขนาด 0.5-2.5 µl. 20-200 µl. และ 200-1000 ไมโครลิตร

3.10) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Shel, TC 2323)

3.11) ถุงมือยาง ปลอดเชื้อ

4. วิธีการแช่แข็งและทำละลายเอ็มบริโอ

การแช่แข็งเอ็มบริโอ โดยนำเอ็มบริโอระยะมอรูล่า และระยะบลาสโตซีส มาแช่ในสารละลายแช่แข็งซึ่งประกอบไปด้วย TCM-199 เสริมด้วยกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วบรรจุลงในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตรยาว 2 เซนติเมตร ประกอบด้วย TCM-199 ยาว 2 เซนติเมตร กั้นด้วยฟองอากาศ 0.5 เซนติเมตร นำหลอดบรรจุเอ็มบริโอมาทำให้สัมผัสกับไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -170 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นจึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาเพื่อรอการวิเคราะห์ ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีการของ Yang et al. (1992)

วิธีการทำละลายเอ็มบริโอ โดยการนำหลอดบรรจุเอ็มบริโอสัมผัสอากาศ 10 วินาที นำมาจุ่มในน้ำอุ่น 36 องศาเซลเซียส 3 นาที ในระหว่างนี้ให้ตั้งหลอดขึ้นแล้วเขย่าให้สารละลายทั้ง 2 เข้ากัน จากนั้น จึงนำเอ็มบริโอออกจากหลอด และล้างในสารละลาย TCM-199 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ดัดแปลงตามวิธีการของ Van et al. (1995) โดยมีสารเคมีและอุปกรณ์ดังต่อไปนี้

4.1) น้ำยาแช่แข็งเอ็มบริโอ (TCM-199 ร่วมกับ glycerol 20 เปอร์เซ็นต์)

4.2) กลีเซอรอล (glycerol) (Sigma, St. Louis, M.O., USA)

4.3) ไนโตรเจนเหลวและถังเก็บไนโตรเจนเหลว

4.4) ไมโครปิเปตพร้อมทิปปลอดเชื้อขนาด 0.5-2.5 μl. และ 20-200 μl.

4.5) หลอดเก็บเอ็มบริโอขนาด 0.25 ml. (Din® 58953)

4.6) จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90x15 ml. (Nuclon® Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

4.7) กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope, Olympus SZ-ST, Japan)

5. การสกัดและการประเมินคุณภาพของ RNA

นำตัวอย่างเอ็มบริโอที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างในทุกทรีทเมนต์มาทำละลายโดยการนำหลอดบรรจุเอ็มบริโอสัมผัสอากาศ 10 วินาที นำมาจุ่มในน้ำอุ่น 36 องศาเซลเซียส 3 นาที ในระหว่างนี้ให้ตั้งหลอดขึ้นแล้วเขย่าให้สารละลายทั้ง 2 เข้ากัน จากนั้นจึงนำเอ็มบริโอออกจากหลอดและล้างในสารละลาย TCM-199 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที ดัดแปลงตามวิธีการของ Van et al. (1995) จากนั้นทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป High pure RNA tissue kit® ตามวิธีการของบริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany เมื่อได้ RNA จากการสกัดนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และประเมินคุณภาพของ RNA ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer, M-350 double beam, Camspec วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนของแสง 260/280 nm จากนั้นทำการเจือจางสารละลายในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase เพื่อเป็นการป้องกันการสลายตัวของ RNA จากนั้นทำการอ่านค่าการดูดกลืนของช่วงแสง 260 nm และนำค่าที่ได้มาประเมินคุณภาพของ RNA ตามวิธีการของ Lab FAQS – Find a Quick Solution (2nd Edition), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) โดยใช้ชุดสกัด High pure RNA tissue kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ดังต่อไปนี้

5.1) Lysis/Binding Buffer total volume 25 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย - 4,5 M guanidine-HCl
- 100 mM sodium phos-phate
- pH 6.6

5.2) DNase I total volume 10 มิลลิลิตร

5.3) DNase Incubation Buffer total volume 10 ml.

ประกอบด้วย - 1 M NaCl
- 20 mM Tris-HCl
- 10 mM MnCl2,
- pH 7.0

5.4) Wash Buffer I total volume 53 ml (Wash Buffer I 33 ml.เติม absolute ethanol 20 ml.)

ประกอบด้วย - 5 M guanidine-HCl

- 20 mM Tris-HCl

- pH 6.6

5.5) Wash Buffer II total volume 50 ml (Wash Buffer II 10 ml. เติม absolute ethanol 40 ml.)

ประกอบด้วย - 20 mM NaCl

- 2 mM Tris-HCl, pH 7.5

5.6) Elution Buffer

ประกอบด้วย - น้ำกลั่น (double distilled water) ปราศจาก Nuclease-free ผ่านการฆ่าเชื้อ

5.7) High Pure Filter Tubes ปริมาตร 700 µl. จำนวน 50 ชิ้น

5.8) Collection Tubes ปริมาตร 2 ml. จำนวน 50 ชิ้น

6. การทำ Reverse transcription

ทำ Reverse transcription โดยใช้ชุดสกัด Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit® ตามวิธีการของบริษัท Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany โดยเตรียม PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม RT reaction ปริมาตรรวม 11.4 µl (ประกอบด้วย 4 µg total RNA ปริมาตร 2 µl, 2.5 µM Anchoredoligo (dT) 18 Primer ปริมาตร 1 µl, 60 µM Random Hexamer Primer ปริมาตร 2 µl, และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำ PCR grade ปริมาตร 6.4 µl) จากนั้นนำหลอด PCR นำมาเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ PCR tube มาเตรียม RT mix ปริมาตรรวม 20 µl (ประกอบด้วย 1x 8 mM $MgCl_2$ Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer ปริมาตร 4 µl, 20 U Protector RNase Inhibitor ปริมาตร 0.5 µl, 1 mM Deoxynucleotide Mix ปริมาตร 2 µl, 5 mM DTT ปริมาตร 1 µl, และ 10 UTranscriptor High Fidelity Reverse Transcriptase ปริมาตร 1.1 µl) ทำการปั่นเหวี่ยง 2000 rpm เวลา 30 วินาที จากนั้นนำเอา RT- reaction tube เข้าไปในเครื่อง PCR ตามโปรแกรม Reverse Transcription อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที 1 รอบ และ Stop reaction 10 นาที นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยมีสารเคมี ดังต่อไปนี้

6.1) Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase total volume 55 µl.

ประกอบด้วย - 200 mM potassium phosphate

- 2 mM dithiothreitol

- 0.2% Triton X-100 (v/v)

- 50% glycerol (v/v)
- pH ประมาณ 7.2

6.2) Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer total volume 1 ml.

ประกอบด้วย - 250 mM Tris/HCl
- 150 mM KCl
- 40 mM MgCl2
- pH ประมาณ 8.5

6.3) Protector RNase Inhibitor total volume 50 μl.

ประกอบด้วย - 20 mM Hepes-KOH
- 50 mM KCl, 8 mM dithiothreitol
- 50% glycerol (v/v)
- pH ประมาณ 7.6

6.4) Deoxynucleotide Mix total volume 200 μl.

ประกอบด้วย - 10 mM ของ dATP, dCTP, dGTP, dTTP

6.5) Anchoredoligo (dT) 18 Primer total volume 100 μl.

6.6) Random Hexamer Primer total volume 100 μl.

6.7) DTT total volume 1 มิลลิลิตร

6.8) Water, PCR grade total volume 1 มิลลิลิตร

6.9) Control RNA total volume 20 μl.

6.10) Control Prime Mix PBGD total volume 20 μl.

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดย Quantitative Real-time RT-PCR

วิเคราะห์ปริมาณ mRNA โดย Quantitative real-time RT-PCR ดัดแปลงให้เหมาะสมตามวิธีของ Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany ใช้เครื่องวิเคราะห์ Chromo4™ Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad, Laboratories Inc. USA) ประกอบด้วย 96-well reaction โดยทำการเตรียม 10 μM primer forward (อัตราส่วน 1: 10) เตรียมโดย stock primers (100 μM) 1 μl: PCR water grade 9 μl ส่วนในการเตรียม 10 μM primer reverse (อัตราส่วน 1: 10) เตรียมโดย stock primers (100 μM) 1 μl: PCR water grade 9 μl จากนั้นเตรียมทำการเตรียม master mix ใน micro tube 1.5 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรรวม 45 μl ต่อ 1 reaction (ประกอบด้วย Faststart SYBR Green Master® ปริมาตร 25 μl, 0.33 μM primer forward ปริมาตร 1 μl, 0.33 μM primer reverse ปริมาตร 1 μl, และ น้ำ PCR grade 18 μl) จากนั้นนำไป spin dawn เป็นเวลา 15 วินาที ทำการแบ่ง master mix ใส่ PCR tube จำนวน 45 μl จากนั้นทำการเติม cDNA template โดยใช้ cDNA สังเคราะห์จากเอ็มบริโอ จำนวน

30 เอ็มบริโอ (อัตราการเจือจาง 1:50) จำนวน 5 μl และนำไปเข้าเครื่อง real time PCR และตั้งโปรแกรม ดังนี้ Pre-Incubation 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที Amplification 50 รอบ Segment 1 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Segment 2 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที Segment 3 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ Melting curve 1 รอบ 65-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที โดยมีสารเคมี ดังต่อไปนี้

7.1) FastStart SYBR Green Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

7.2) Micro pipette

7.3) Micro tips ปลอดเชื้อ

7.4) PCR tube ปลอดเชื้อ (Nuclon®Delta, Nalge Nunc International, Denmark)

7.5) Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร

7.6) cDNA template

7.7) Primer forward และ primers reverse (Sigma, Aldrich & Supelco, Bangkok, Thailand)

7.8) PCR water grade (Sigma, Aldrich & Supelco, Bangkok, Thailand)

ภาคผนวก ข
ส่วนประกอบในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1. **สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer slide)**

เตรียมจากชั่งสาร (ตารางภาคผนวก ข-1) ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นไม่มีประจุ (deionized water) 300 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารละลายใส่ volumetric flask ขนาด 500 ml. ปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml. ค่า pH เท่ากับ 7.4 ค่า osmolality ประมาณ 300 mOsmol/kg ทำการกรองด้วยกระดาษกรองรูพรุน 0.22 ไมครอน เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ตารางภาคผนวก ข-1 ส่วนประกอบของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
NaCl (g/l)	8.0
KCl (g/l)	0.2
Ka_2PO_4 (g/l)	1.15
KH_2PO_4 (g/l)	0.2
$MgCl_26H_2O$ (g/l)	0.1

ที่มา: Gordon (2003)

2. **น้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ Synthetic oviductal fluid (SOF)**

ชั่งสาร (ตารางภาคผนวก ข-2) ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม Deionized water 2300 ml. คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารละลายใส่ volumetric flask ขนาด 1000 ml. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml. ค่า pH เท่ากับ 7.4 ค่า osmolality ประมาณ 300 mOsmol/kg เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ตารางภาคผนวก ข-2 ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Sodium pyruvate (g)	0.33
NaHCO3 (g)	1.0
Glutamine (g)	1.5
Glucose (g)	10
Serum* (mg/ml)	0.1
EDTA (g)	0.1
Streptomycin (g)	0.1

ที่มา: Gandhi et al. (2000)

*Serum = เสริมตามชนิดของ serum ของกลุ่มทดลอง

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียม Estrus cow serum (ECS)

1. วัสดุและอุปกรณ์

1) เข็มขนาด 18G $1^{1/2}$ นิ้ว
2) ไซริงค์ขนาด 5 ซีซี
3) หลอดทดลองพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร
4) สำลี
5) แอลกอฮอล์ 70%
6) ปากกา Permanent
7) กระติกน้ำแข็ง
8) น้ำแข็ง
9) ตะแกรงสำหรับใส่หลอดทดลอง
10) ถุงมือยาง
11) Microcentrifuge
12) Micro tube 1.5 มิลลิลิตร

2. ขั้นตอนการเตรียม Estrus cow serum (ECS)

1) สังเกตอาการการเป็นสัด ของโคตัวเมียพันธุ์ลูกผสมที่แสดงอาการเป็นสัดในช่วง standing heat ช่วงเช้า และช่วงเย็น โดยเมื่อพบอาการเป็นสัดให้เตรียมเจาะเก็บเลือดโค
2) ทำการเจาะเลือดโค โดยใช้เข็มขนาด 18G $1^{1/2}$ นิ้ว ทำความสะอาดตำแหน่งที่เจาะเก็บตัวอย่างเลือดเส้นเลือดที่ลำคอ (jugular vein) ด้วยสำลีแอลกอฮอล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อน (contaminate)
3) เก็บเลือดปริมาณ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นำมาห้องปฏิบัติการโดยนำเลือดที่อยู่ในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเลือดแข็งตัวดีซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที
4) ปั่นแยก serum ที่ความเร็ว 2500-3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นทำการปั่นตกโดยใช้เครื่อง Microcentrifuge เพื่อทำการแยกตะตอนที่อยู่ใน serum ออกไป
5) ทำการดูดแยกเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดปลอดเชื้อ ปิดฝาให้สนิท เก็บรักษาในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

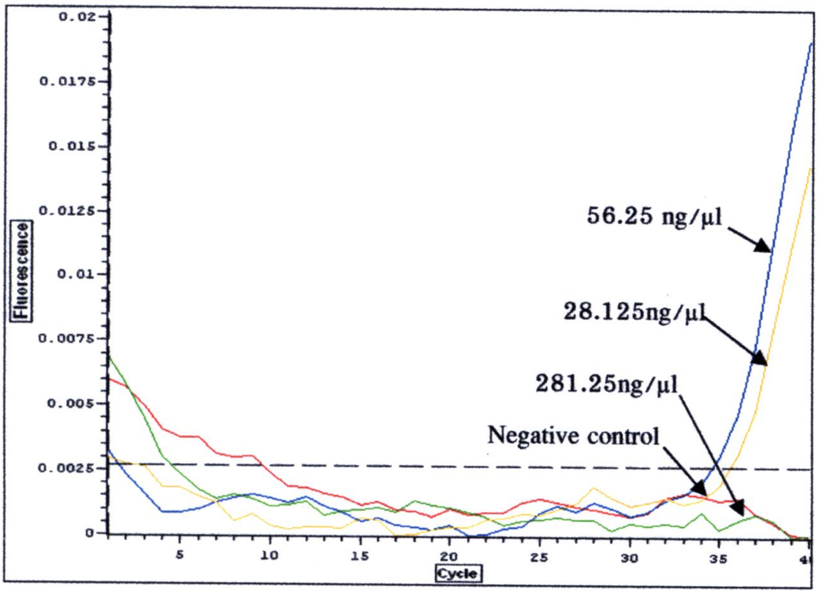
ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของจีน IFN-τ และ BCL-2 โดยวิธี Quantitative Real-time RT-PCR

1. การทำกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ IFN-τ

การทำกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ด้วยเครื่อง Chromo4™ Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad, Laboratories Inc. USA.) (ภาพภาคผนวก ง-1) ประกอบด้วย 96-well reaction โดยทำการทดสอบความเหมาะสมในการเจือจาง stock cDNA ที่ได้จากการทำ reverse transcription ใน micro tube ขนาด 1.5 ml. เติมน้ำ PCR grade ตามอัตราส่วนการเจือจาง คือ ความเข้มข้น 281.25, 56.25 และ 28.125 ng/μl กับ Negative control (น้ำ PCR grade) (ภาพภาคผนวก ง-2)

ภาพภาคผนวก ง-1 การวิเคราะห์ปริมาณของ mRNA ด้วยเครื่อง Chromo4™ Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad, Laboratories Inc. USA.)

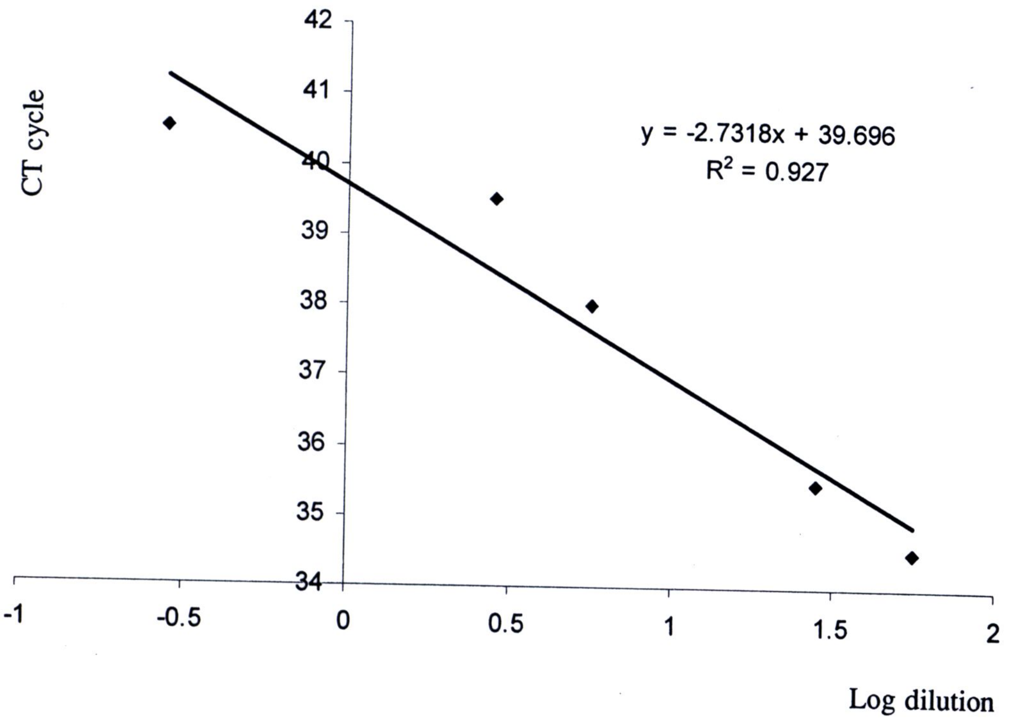


ภาพภาคผนวก ง-2 กราฟการทดสอบความเข้มข้น Stock Conc. cDNA เจือจาง (281.25, 56.25 และ 28.125 ng/μl กับ Negative control)

เมื่อได้ความเข้มข้นในการเจือจาง stock cDNA ที่ได้จากการทำ reverse transcription จึงนำมาทำการเจือจาง stock cDNA ที่ได้จากการทำ reverse transcription จากความเข้มข้น 2812.4 ng/μl ใน micro tube ขนาด 1.5 ml. เติมน้ำ PCR grade ตามอัตราส่วนการเจือจาง คือ ความเข้มข้น 56.25, 28.125, 5.625, 2.812 และ 0.281 ng/μl กับ Negative control ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ง-1)

ตารางภาคผนวก ง-1 การเตรียมสารละลายเจือจาง cDNA มาตรฐาน ของ IFN-τ

Standard	final conc. (ng/μl)	Stock Conc. cDNA (2812.4 ng/μl) เท่า	Log (quanlity)
1	56.250	50	1.75
2	28.125	100	1.45
3	5.625	500	0.75
4	2.812	1,000	0.45
5	0.281	10,000	-0.55



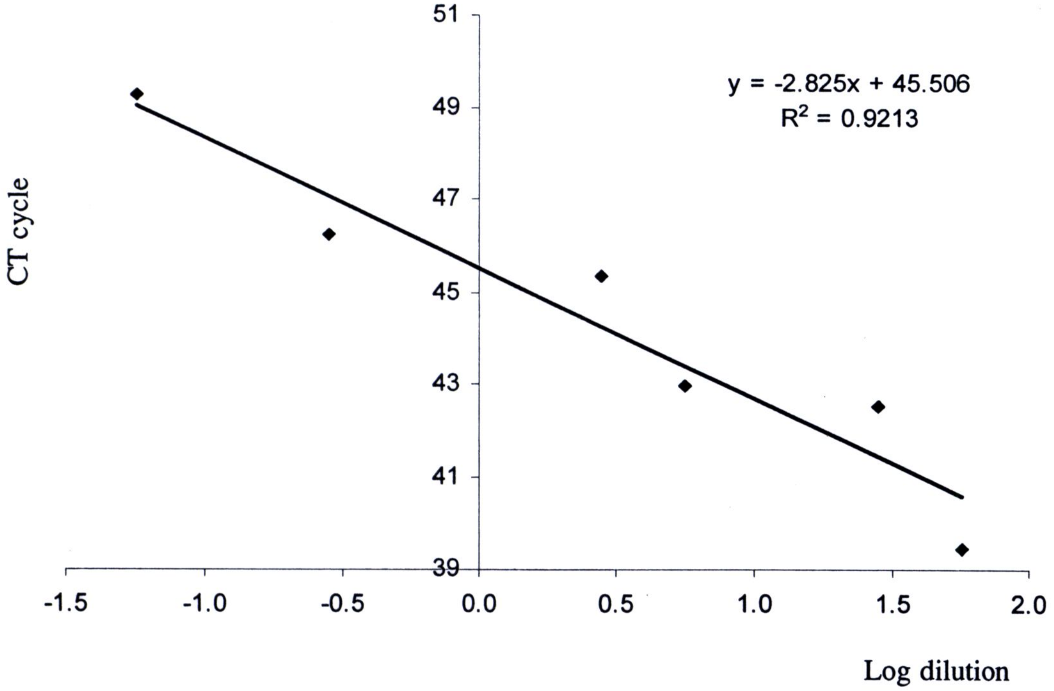
ภาพภาคผนวก ง-3 กราฟ cDNA มาตรฐานการแสดงออกของจีน IFN-τ ของ Stock Conc. cDNA (2812.4 ng/μl) (ความเข้มข้น 56.25, 28.125, 5.625, 2.812, และ 0.281 ng/μl กับ Negative control)

2. **การทำกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ BCL-2**

การเจือจาง stock cDNA ที่ได้จากการทำ reverse transcription จึงนำมาทำการเจือจาง stock cDNA ที่ได้จากการทำ reverse transcription จากความเข้มข้น 2812.4 ng/μl ใน micro tube ขนาด 1.5 ml. เติมน้ำ PCR grade ตามอัตราส่วนการเจือจาง คือ ความเข้มข้น 56.25, 28.125, 5.625, 2.812, 0.281 และ 0.056 ng/μl กับ Negative control

ตารางภาคผนวก ง-2 การเตรียมสารละลายเจือจาง cDNA มาตรฐาน BCL-2

Standard	final conc. (ng/μl)	Stock Conc. cDNA (2812.4 ng/μl) เท่า	Log (quanlity)
1	56.250	50	1.75
2	28.125	100	1.45
3	5.625	500	0.75
4	2.812	1,000	0.45
5	0.281	10,000	-0.55
6	0.056	50,000	-1.25



ภาพภาคผนวก ง-4 กราฟมาตรฐานการแสดงออกของจีน BCL-2 (ความเข้มข้น 56.25, 28.125, 5.625, 2.812, 0.281 และ 0.056 ng/μl กับ Negative control)

ภาคผนวก จ

ใบรับรองจรรยาบรรณและมาตรฐานในการใช้สัตว์ทดลอง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

โครงการวิจัยเรื่อง : อิทธิพลของชนิด serum ต่อการแสดงออกของโปรตีนอินเทอร์เฟียรอนทาว (IFN-τ) และ Bcl-2 ในการผลิตเอ็มบริโอของโค(Effects of serum type supplementation on Interferon-Tau (IFN-τ) expression and Bcl-2 in Bovine Embryo Production)

ผู้วิจัย : นางสาวอภิรดี สวรรค์นคร/รศ.ดร.ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์

หน่วยงานที่สังกัด : ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

ได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการใช้สัตว์ในงานวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้ว โดยยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ให้ไว้ ณ วันที่ 22 ตุลาคม 2552

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัญญา เรืองสิทธิ์)
ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการใช้สัตว์ในงานวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

(รองศาสตราจารย์กิตติชัย ไตรรัตนศิริชัย)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและการถ่ายทอดเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลำดับที่ : จส.มข. 44/2552
เลขที่ : ศธ 0514.1.12.2/48

ฝ่ายวิจัยและการถ่ายทอดเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
123 ถนนมิตรภาพ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
โทร.0 4320 2011 โทรสาร 0 4320 2015

KHON KAEN UNIVERSITY

This is certify that

The Project Entitled :	Effects of serum type supplementation on Interferon-Tau (IFN-τ) expression and Bcl-2 in Bovine Embryo Production
Researcher :	Miss Apiradee Swannakorn/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 44/2552

Reference No. 0514.1.12.2/48

Research and Technology transfer Affairs, Khon Kaen University, THAILAND
Tel.-66-43-202011 Fax-66-43-202015

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอภิรดี สวรรค์นคร เกิดเมื่อวันที่ 3 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่บ้านหนองกู่ ต.หนองไผ่ อ.ธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด เป็นบุตรคนที่ 2 มีพี่น้องร่วมบิดามารดาทั้งหมด 2 คน ของคุณพ่อทองม้วน สวรรค์นคร และคุณแม่บุญร่วม สวรรค์นคร จบการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสตรีศึกษา อำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วิทยาศาตรบัณฑิต เกษตรศาสตร์) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น เมื่อ พ.ศ. 2551 เนื่องจากมีความสนใจในด้านสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงจึงศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ปริญญาโท สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อ พ.ศ. 2551 โดยมีรองศาสตราจารย์ ดร.ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

ในระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาโท ได้รับทุนการศึกษา 4 ทุน คือ

1. ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2551 (TRF-MAG WindowII 515S063)

3. ทุนผู้ช่วยวิจัย ระดับปริญญาโท ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน (TROFREC)

4. ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2553 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)