ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium	17.7	กรัม
$NaHCO_3$	3.024	กรัม
Pennicilin G	100	unit/มล.
Gentamycin	100	มคล.

ละลาย IMDM 17.7 กรัมและ $NaHCO_3$ 3.024 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH = 7.4 ด้วย NaOH 1*N* เติม Pennicilin G และ Gentamyecin จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มม. ใช้กรวย filtration assembly ที่ประกอบเข้ากับ Side-arm flask ขนาด 1 ลิตร กรองโดยอาศัยเครื่อง Vacuum ภายในตู้ปลอดเชื้อ

10 % Fetal Bovine Serum (10 % FBS)

10 % FBS ใน IMDM ประกอบด้วย FBS 10 มล.เติม IMDM 90 มล.ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลาย HAT (hypoxanthine, aminopterin และ thymidine) (100X)

นำ HAT (100X) 1 มล. เติม 10 % FBS ใน IMDM 99 มล.ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลาย HT (hypoxanthineและ thymidine) (100X)

นำ HT (100X) 1 มล. เติม 10 % FBS ใน IMDM 99 มล.ภายในสภาพปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำมาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส

สารละลายที่ใช้ในการเชื่อมเซลล์ (Fusion solution)

สารละลาย 50 % Polyethylene glycol (PEG) ประกอบด้วย Polyethylene glycol 2 กรัม เติม IMDM 2 มล. แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน (autocave)

สารละลาย 7.5 % dimethyl sulfoxide (DMSO) ประกอบด้วย dimethyl sulfoxide 7.5 มล. เติม IMDM 100 มล.

Fusion solution ประกอบด้วย สัดส่วน 50 % PEG: 7.5 % DMSO = 1:2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2-Mercaptoethanol (2-ME)

สารละลาย 2-ME (1000X) 0.0035 มล.เติม IMDM ให้ปริมาตรครบ 10 มล. เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เวลาใช้นำสารละลาย 2-ME 1 มล.เติมใน IMDM 1ลิตร ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ

การเตรียมสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต

ละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร บน hot plate ละลายจนกระทั่งแอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถละลายต่อไปได้อีก แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปอีกเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนแล้วจึงนำมาใช้ได้

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS)

NaCl	8.0 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.8 กรัม
KCl	0.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.4

การเตรียมสารละลาย EDTA เข้มข้น 500 มิลลิโมล่าร์

EDTA.$2H_2O$ (Ethylenediaminetetraacetic acid) 186 กรัม

ลงในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 8.0 ด้วย 1*N* NaOH

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการเคลือบ (coating buffer)

Na_2CO_3	4.29 กรัม
$NaHCO_3$	2.93 กรัม
NaN_3	0.20 กรัม

เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 9.6 ด้วย 1*N* NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการล้าง (washing buffer)

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 80) 500 ไมโครลิตร และเติม PBS ให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลาย 1 % เจลาติน

ละลายเจลาติน 1 กรัม ในสารละลายสำหรับการเคลือบ 80 มิลลิลิตร คนบน hot plate ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายสารตั้งต้น (citrate-phosphate buffer)

citric acid (monohydrate)	10.30 กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	18.16 กรัม

เติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ 5.0 ด้วย 1*N* NaOH หรือ 1*N* HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (stopping solution)

การเตรียม 4*N* H_2SO_4 ประกอบด้วยเติม H_2SO_4 (98 %) 21.36 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตั้งต้นสำหรับการพัฒนาสีของ ELISA

O-phenylenediamine acetate (OPD)	0.048 กรัม

ละลายใน citrate-phosphate buffer ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ทำในหลอดทดลองที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์เพื่อกันแสง นำไปเขย่าโดยใช้ Vortex-mixer เมื่อ OPD ละลายหมดแล้วจึงเติม 0.03 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 10 ไมโครลิตร (การเตรียม OPD จะเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้นเนื่องจากสารละลายจะเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อถูกแสงสว่าง)

สารละลายสำหรับ thiophilic resin chromatography

สารละลาย ก.

Tris-HCL	12 กรัม
K_2SO_4	87 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลาย ข

Tris-HCL 12 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH เป็น 7.6 ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

50X Tris-acetate buffer (TAE)

Tris base	242.0	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มล.
0.5 M EDTA	100.0	มล.

1X TAE

50X TAE	20.0	มล.
น้ำกลั่น	980.0	มล.

Gel-loading buffer 6X

0.25 % Bromophenol blue

0.25 % Xylene xyanol

40 % (W/V) sucrose in H_2O

Ethidium bromide (10มก./100มล.)

Ethidium bromide	10.0	มก.
ละลายในน้ำกลั่น	100.0	มล.

40% acrylamide : bis (19:1)

acrylamide	380.0	กรัม
bis acrylamide	20.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1X solution

10X PCR buffer	10	มคล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	90	มคล.

สารละลาย 1mM dNTPs

100 mM dATP	5.0	มคล.
100 mM dGTP	5.0	มคล.
100 mM dCTP	5.0	มคล.
100 mM dTTP	5.0	มคล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	480.0	มคล.

---

25 bp step ladder

stock 25 bp	5.0	มคล.
6X loading buffer	10.0	มคล.
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	45.0	มคล.

การเตรียมน้ำยาชะล้างตัวอ่อน (Flushing media)

NaCl	8.0 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.8 กรัม
KCl	0.2 กรัม
Pennicilin G	100 unit/มล.
Gentamycin	100 มคล.
Fetal Bovine Serum	10 มล.

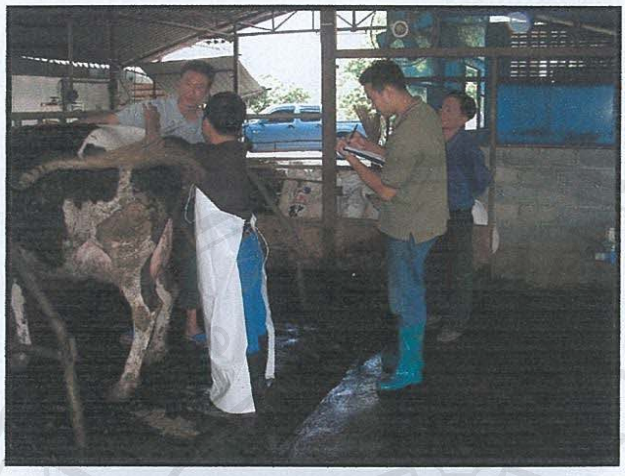
ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 7.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข.

ภาพแสดงขั้นตอนการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่และการเก็บตัวอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1. แสดงขั้นตอนการตรวจสภาพรังไข่ของแม่โคตัวให้ก่อนเข้าโปรแกรมการกระตุ้น.

ภาพที่ 2. การล้างทำความสะอาดบริเวณช่องคลอดก่อนใส่ CIDR.

ภาพที่ 3. ขั้นตอนการใส่ CIDR เข้าสู่กระบอกเพื่อนำใส่บริเวณช่องคลอด.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4. ขั้นตอนการใส่ CIDR เข้าสู่กระบอกเพื่อนำใส่บริเวณช่องคลอด.

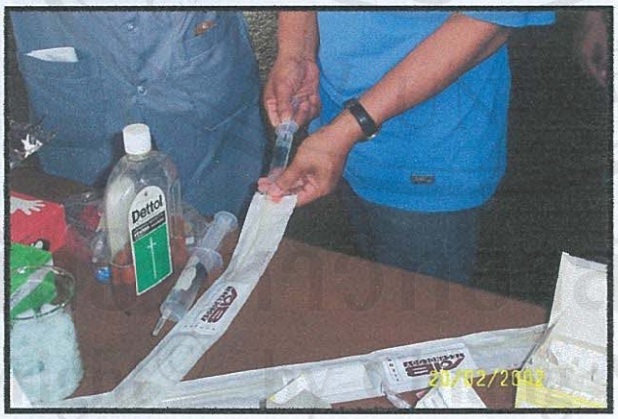
ภาพที่ 5. ลักษณะที่สมบูรณ์ของชุด CIDR ที่พร้อมสำหรับใส่ให้กับแม่โค.

ภาพที่ 6. การใส่ CIDR ให้แม่โคบริเวณช่องคลอด.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 7. แสดงสาย CIDR ที่พ้นออกมาจากช่องคลอดหลังการใส่ ซึ่งจะทอดเมื่อวันที่ 11 ของโปรแกรมการกระตุ้น.

ภาพที่ 8. วันในที่ชะล้างตัวอ่อนจะทำการล้วงตรวจนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียมที่รังไข่ทั้งสองข้างก่อนการชะล้าง.



ภาพที่ 9. การเตรียมทางยางโฟเลย์สำหรับการชะล้างตัวอ่อน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 10. การล้างท่อยางโฟเลย์ด้วยน้ำยาชะล้างตัวอ่อนเพื่อลดความเป็นพิษของแอลกอฮอลลง.

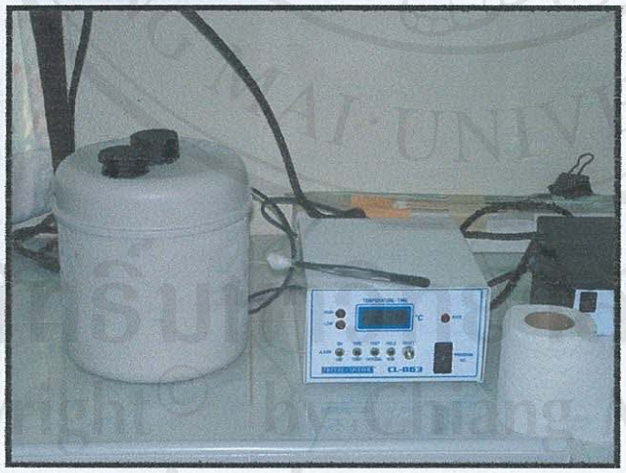
ภาพที่ 11. การใส่ท่อยางโฟเลย์เข้าสู่ปีกมดลูกที่ละข้างโดยจะใส่ข้างที่มีการตกไข่สูงสุดก่อนและวางบอลลูนบริเวณส่วนต้นของปีกมดลูก.

ภาพที่ 12. การต่อท่อยางโฟเลย์เข้าท่อยางเดินน้ำยาชะล้างตัวอ่อน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 13. การควบคุมท่อยางเดินน้ำยาชะล้างตัวอ่อนด้วยที่เปิด-ปิดสีแดงและขาวโดยที่สีขาวจะปล่อยน้ำยาเข้าส่วนสีแดงปล่อยน้ำยาออกสู่ที่กรองตัวอ่อน.

ภาพที่ 14. กล้องสเตอร์ริโอที่ใช้ในการหาตัวอ่อน.



ภาพที่ 15. เครื่องแช่แข็งตัวอ่อน.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายวิวัฒน์ พัฒนาวงศ์
วันเดือนปีเกิด	17 มกราคม พ.ศ. 2522
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย จ.นครราชสีมา ปีการศึกษา 2539
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขา เทคโนโลยีการเกษตร(การผลิตสัตว์) ปีการศึกษา 2543 จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม
การนำเสนอผลงาน	1.)ได้รับรางวัลผู้นำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ดีเด่นในการประชุม บัณฑิตศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ครั้งที่ 1 วันที่ 18-19 มีนาคม พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมรามาการ์เดน กรุงเทพมหานครฯ 2.) ได้รับรางวัลผู้นำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ดีเด่นสาขาเกษตรศาสตร์ใน การประชุมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4 วันที่ 10-11 สิงหาคม พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ 3.) เข้าร่วมแสดงผลงานภาคโปรสเตอร์ในการประชุม The 5th Princess Chulabhorn International Science Congress EVOLVING GENETICS and ITS GLOBAL IMPACT วันที่ 16 – 20 สิงหาคม พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมแชยงกีล่า กรุงเทพมหานครฯ
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนการศึกษาจากโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขา เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved