การตรวจหาเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย ด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน

นางสาว สุนันทา ศักดิ์ทวีกุลกิจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-812-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEX DETERMINATION OF *IN VITRO* FERTILIZED BOVINE EMBRYOS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Miss Sununtha Sakthaweekulkit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Philosophy of Science
Programme of Biological Science
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-634-812-4

I17227185

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาเพศของเอมบริโอโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย ด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน
โดย	นางสาว สุนันทา ศักดิ์ทวีกุลกิจ
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด
อาจารย์ที่ร่วมปรึกษา	นสพ. ยันต์ สุขวงศ์
	รองศาสตราจารย์ ดร. ยรรยง อินทรรักษา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. พูนพิพงศ์ วรวุฒิ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นสพ. ยันต์ สุขวงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ยรรยง อินทรรักษา)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งได้ให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นต่าง ๆ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของการศึกษาวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ยรรยง อินทรรักษา และ นายสัตวแพทย์ ยันต์ สุขวงศ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการที่ปรึกษาในงานวิจัยนี้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณ Professer Barry D. Bavister ภาควิชา Animal Health and Biomedical Science, University of Wisconsin ที่ท่านได้ให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นต่าง ๆในงานวิจัยนี้เป็นอย่างดียิ่ง

การศึกษาครั้งนี้ ได้รับความช่วยเหลือเงินทุนวิจัยบางส่วนจากฝ่ายวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจากทุนอุดหนุนวิจัยของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จเป็นรูปเล่มอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือจากอาจารย์เพื่อนร่วมงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

พระคุณที่ลืมไม่ได้ คือ คุณบิดา-มารดา และพี่ ๆ ผู้ให้การสนับสนุนในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงกำลังใจในการศึกษาเสมอมา

สุนันทา ศักดิ์ทวีกุลกิจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

BSC	BOVINE CALF SERUM
BSA	BOVINE SERUM ALBUMIN
bp	BASE PAIR
COCs	CUMULUS OOCYTE COMPLEXS
DNA	DEOXY RIBONUCLEIC ACID
EA	ESSENTIAL AMINO ACID
EGF	EPIGROWTH FACTOR
FSH	FOLLICLE STIMULATING HORMONE
IVM	INVITRO MATURATION
IVF	INVITRO FERTILIZATION
IVC	INVITRO CULTURE
LH	LEUTINIZING HORMONE
mHECM-3	MODIFIED HAMSTER EMBRYO CULTURE MEDIUM- 3
mg	MILIGRAM
NEA	NON ESSENTIAL AMINO ACID
OSA	OVINE SERUM ALBUMIN
PCR	POLYMERASE CHAIN REACTION
PSA	PENICILIN STREPTOMYCIN AMPHICILIN
PVA	POLYVINYL ALCOHOL
PVS	PERIVITELLINE SPACE
TCM-199	TISSUE CULTURE MEDIUM
°C	องศาเซลเซียส
มล	มิลลิลิตร
มม	มิลลิเมตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุนันทา ศักดิ์ทวีกุลกิจ : การตรวจหาเพศของ เอ็มบริโอโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน (SEX DETERMINATION *IN VITRO* FERTILIZED BOVINE EMBRYOS BY POLYMERASE CHAIN REACTION) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด อ. ที่ปรึกษาร่วม: น.สพ.ยันต์ สุขวงศ์ และ รศ. ดร. ยรรยง อินทรรักษา,115 หน้า ISBN 974-634-812-4

ศึกษาความแม่นยำของเทคนิคพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันในการตรวจเพศเอ็มบริโอโค โดยเฉพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายในน้ำยาเพาะเลี้ยง Modified Hamster Embryo Culture medium-3 (mHECM-3) ที่ไม่มีกลูตามีน และศึกษาผลของกรดอะมิโนทั้งชนิดไม่จำเป็น (NEA) และชนิดจำเป็น (EA) กลูโคส และฟอสเฟต ต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคจนถึงระยะบลาสโตซิสในช่วง 72-192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ผลการสุ่มกระจายเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอตั้งแต่ระยะ 2-เซลล์ จนถึง ≥ 7-เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิและเพาะเลี้ยงนอกร่างกายมาแล้ว 72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่เติมสารต่าง ๆ ดังกล่าว พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนรวมสองชนิด (NEA+EA) สนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอโคได้ Total blastocysts 34(20.6±11.2) และ Expanded blastocysts 28 (17.2±10.2) สูงกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนชนิด NEA หรือ EA เพียงชนิดเดียว [24(14.3±12.0), 14(8.4±12.1) และ 14(8.3±11.2), 10(6.3±10.9)] อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) การเติมกลูโคสในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนรวมสองชนิด พบว่าทำให้จำนวน Total blastocysts และ Expanded blastocysts มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น และการเติมกลูโคส+ฟอสเฟต ก็ไม่ช่วยสนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอในระยะเดียวกันให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างไร

การตรวจวิเคราะห์เพศของเอ็มบริโอโคโดยอาศัยเทคนิคพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันเพิ่มปริมาณดีเอนเอ สามารถบ่งชี้เพศได้แน่นอนจำนวน 49 ใน 50 ตัว (98%) ที่ทำการศึกษา โดยแบ่งได้เป็นเพศผู้ 21 ตัว (42%) และเพศเมีย 28 ตัว (58%) เอ็มบริโออีก 1 ตัว ไม่พบมีแถบดีเอนเอ ความสามารถในการตรวจระบุเพศของเอ็มบริโอได้ชัดเจนและรวดเร็วด้วยเทคนิคพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน ก่อนที่จะนำเอ็มบริโอนั้นไปถ่ายฝากให้แก่แม่ตัวรับที่เหมาะสม จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวางแผนกำหนดเพศของลูกให้ได้ตามที่ต้องการ เทคนิคนี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ และพัฒนาสายพันธุ์สัตว์เศรษฐกิจได้ในอนาคต

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C 427017: MAJOR BIOLOGICAL SCIENCE
KEY WORD: BOVINE EMBRYO/ SEX DETERMINATION/ IN VITRO / PCR

SUNUNTHA SAKTHAWEEKULKIT : SEX DETERMINATION OF IN VITRO FERTILIZED BOVINE EMBRYOS BY POLYMERASE CHAIN REACTION.
THESIS ADVISOR: ASSO.PROF. VITHAYA YODYINGYUAD,Ph.D. AND Mr. YANT SUKWONGS AND ASSOC.PROF. YONYONG INTRARUKSA, Ph.D. 115 pp.
ISBN 974-634-812-4

Accuracy of polymerase chain reaction technique in determining sex of bovine embryo was studied. Embryos obtained from in vitro fertilization were cultured in modified Hamster Culture Medium-3 (mHECM-3) without glutamine. Effect of both non-essential (NEA) and essential (EA) amino acids, glucose and phosphate on the development of embryos through blastocyst stage during 72-192 hour after fertilization was also investigated. In vitro fertilized and developed 2- to $\geq$ 7-cell embryos were randomly distributed to culture in mHECM-3 with the above mentioned substances added. Results indicated that medium with NEA+EA added supported the development of bovine embryos significantly higher ($p > 0.05$) than medium containing NEA or EA alone, with the number of total blastocysts 34(20.6 $\pm$ 11.2) and expanded blastocysts 28 (17.2 $\pm$ 10.2) against [24(14.3$\pm$12.0, 14(8.4$\pm$12.1)] and [14(8.3$\pm$11.2), 10(6.3$\pm$10.9)] respectively. Increasing of glucose concentration added to medium containing NEA+EA tend to decrease both the number of total blastocysts and expanded blastocysts. Adding of glucose+phosphate in the medium did not increase the support of embryonic development either.

Sex determination of bovine embryos by means of DNA amplification through polymerase chain reaction technique was able to identify 49 out of 50 embryos (98%) studied, of which, 21 embryos (42%) were male and 28 embryos(56%) were female. One of these embryos did not show DNA band. The ability to identify sex of embryos clearly and quickly by this technique before transfer of embryos to suitable recipients will be of great advantage in planning sex of claves one would like to obtain. This technique may be applied to breeding and development of economic species in the future.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

สารบาญ

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) iv

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) v

กิตติกรรมประกาศ vi

สารบาญ vii

สารบาญตาราง x

สารบาญรูป xi

บทที่ 1 บทนำ 1

- การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย 6
- ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอโคภายนอกร่างกาย 10
  1. ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 10
  2. อายุของไข่และช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงไข่กับอสุจิ 17
- การตรวจหาเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน 18
- หลักการทำงานของพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน 23
- องค์ประกอบสำคัญต่อเทคนิคใน PCR 24
  1. Taq DNA polymerase 24
  2. เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR 24
  3. การออกแบบไพรเมอร์ 25
  4. ความเข้มข้นของเอนไซม์ 26
  5. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต 26
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย 28
- ความสำคัญและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 28

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 30

- สัตว์ทดลอง ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และ สารเคมี 30
  1. สัตว์ทดลอง 30
  2. ห้องปฏิบัติการ 30
  3. อุปกรณ์ 30
  4. สารเคมี 32

สารบาญ (ต่อ)

- วิธีการดำเนินงานวิจัย 35
  1. การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง 35
  2. การเพาะเลี้ยงไข่โคในจานทดลองให้ถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ 38
  3. การปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของโคในจานทดลอง 38
  4. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ PCR 42
     - 4.1 การเตรียม 2X Master Mix 42
     - 4.2 การเตรียม 1X Master Mix 43
     - 4.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis 44
       - 4.3.1 การเตรียม 10X Buffer : 44
       - 4.3.2 เตรียม 1X Buffer 44
       - 4.3.3 การเตรียม DNA markers 44
       - 4.3.4 การเตรียมสี Bromophenol Blue 44
       - 4.3.5 การเตรียมสีย้อม DNA 44
  5. การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ biopsy ของเอ็มบริโอโค 45
  6. วิธีการทำ biopsy ของเอ็มบริโอโค เพื่อการตรวจเพศ 45
  7. การตรวจวิเคราะห์หาเพศในเอ็มบริโอโค โดย PCR 49
     - 7.1 ตัวอย่างที่นำมาใช้วิเคราะห์เพศ 49
       - 7.1.1 Lymphocyte ของเลือดโค 49
       - 7.1.2 เลือดคน 49
       - 7.1.3 เอ็มบริโอโค 49
     - 7.2 การเตรียมและการสกัด DNA จากเลือดโคและเลือดคนในการตรวจวิเคราะห์เพศ 50
       - 7.2.1 วิธีแยก Peripheral blood mononuclear cells 50
       - 7.2.2 การสกัด DNA ดำเนินตามวิธีของ Strauss 50
     - 7.3 การใช้ PCR เพิ่มจำนวนยีนของส่วนจำเพาะ zfx และ zfy 51
     - 7.4 ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์หาเพศโดย PCR 55
     - 7.5 การตรวจขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR 56
       - 7.5.1 การเตรียม agarose gel electrophoresis 56
       - 7.5.2 การหยอดสารตัวอย่าง DNA ใน agarose gel 57
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 60

สารบาญ (ต่อ)

บทที่ 3 ผลการทดลอง 61

- การทดลองที่ 1 ผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72-192 ชั่วโมงหลังได้รับการผสม (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)..... 62
- การทดลองที่ 2 ผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72-192 ชั่วโมงหลังได้รับการผสม (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง) 63
- การทดลองที่ 3 การกำหนดเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันเทคนิค 69

บทที่ 4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 77

- ผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังได้รับการผสม (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)..... 77
- ผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังได้รับการผสม (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)..... 80
- การกำหนดเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันเทคนิค 82

รายการอ้างอิง 88

ภาคผนวก 104

- วิธีการเตรียมกรดอะมิโนในแต่ละจำพวกเพื่อทดสอบผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอในระยะ 72 - 192 ชั่วโมงหลังผสม 104
- การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอในระยะ 72 - 192 ชั่วโมงหลังผสม 106
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง 107
- ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ในหลอดทดลอง 108
- ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ในหลอดทดลอง 109
- สารเคมีที่ใช้เตรียมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ 111
- ข้อมูลการเพาะเลี้ยงไข่โคในจานทดลอง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังผสม 112

ประวัติผู้เขียน 115

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของโค	36
2.2	mHECM-3 Non-essential Amino Acids (NEA)	37
2.3	mHECM-3 Essential Amino Acids (EA)	37
2.4	ส่วนประกอบของสารเคมีใน 2X Master Mix	43
2.5	ส่วนประกอบของสารเคมีใน 1X Master Mix	43
2.6	ลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพศ	52
3.1	แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เป็นเอ็มบริโอระยะต่างๆ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรด อะมิโนชนิดไม่จำเป็นเวลา 54 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ	65
3.2	แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากอายุ 72 ชั่วโมง (2-เซลล์-≥ 7-เซลล์) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระยะที่ I เป็นเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสอายุ 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ	65
3.3	แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เป็นเอ็มบริโอระยะต่างๆ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรด อะมิโนชนิดไม่จำเป็นเวลา 54 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ	66
3.4	แสดงผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากอายุ 72 ชั่วโมง (2-เซลล์ - ≥ 7-เซลล์) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระยะที่ 1 เป็นเอ็มบริโอระยะมอรูลาและบลาสโตซีสอายุ 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ในน้ำยา mHECM-3 ที่เติมกรดอะมิโน 21 ชนิด และกลูโคส ฟอตเฟส หรือกลูโคส+ฟอสเฟตอย่างใดอย่างหนึ่ง	66
3.5	สรุปผลการวิเคราะห์เพศด้วยผลิตภัณฑ์ PCR จากรูปที่ 3.7, 3.8 และ 3.9	76

สารบาญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญที่เกิดขึ้นก่อนและระหว่างการปฏิสนธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม	7
1.2	แสดงกระบวนการปฏิสนธิระหว่างตัวอสุจิกับไข่	8
1.3	แผนภาพแสดงกระบวนการไกลโคไลซีส กระบวนการเพนโตสฟอสเฟต และกระบวนความสัมพันธ์ของเครบไซเคิล	12
1.4	แสดงวิถีของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ก่อนเข้ากระบวนการเครบไซเคิล	13
2.1	แสดงขั้นตอนการปฏิสนธิระหว่างไข่โคและอสุจิในจานทดลอง	40
2.2	แสดงขั้นตอนการเก็บเอ็มบริโอและบลาสโตเมียร์หลังทำ micromanipulation	47
2.3	แสดงขั้นตอน 1- 6 ในการทำ biopsy ของเอ็มบริโอโคในระยะ compact murula โดยวิธี micromanipulation	48
2.4	ลำดับยีน zfx และ zfy และตำแหน่งของ allele-specific primers	52
2.5	ภาพแสดง (ก) ส่วนประกอบต่าง ๆของเจลแชมเบอร์ (ข) การประกอบแถบพลาสติก (ค) การประกอบราวและหวี	58
2.6	ภาพแสดงการเท agarose gel ลงในเจลแชมเบอร์	58
3.1	แสดงการเจริญของไข่สู่ระยะการเจริญอย่างสมบูรณ์ในจานทดลอง เรียกว่า *In vitro* maturation	67
3.2	แสดงเอ็มบริโอโคที่ระยะ 8-เซลล์ จากการเพาะเลี้ยงที่ 1	67
3.3	แสดงระยะการเจริญของเอ็มบริโอสู่ระยะการเจริญต่าง ๆ	68
3.4	แสดงระยะการเจริญของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซีส	68
3.5(ก)	ผลการทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ทาง PCR โดยโคเพศเมีย 12 ตัว	71
3.5(ข)	ผลการทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์ทาง PCR โดยโคเพศผู้ 12 ตัว	71
3.6(ก)	ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเอ็มบริโอโค ใช้ DNA คนเพศเมีย และ DNA ของโคเพศเมียที่ทราบเพศแน่นอน	72
3.6(ข)	ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเอ็มบริโอโค ใช้ DNA คนเพศผู้ และ DNA ของโคเพศผู้ที่ทราบเพศแน่นอน	72
3.7	แสดงผลการวิเคราะห์เพศโคจากบลาสโตเมียร์ ของ embryo biopsies โดยวิธีทาง PCR และตรวจผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	73
3.8	แสดงผลการวิเคราะห์เพศโคจากบลาสโตเมียร์ของ embryo biopsies โดยวิธีทาง PCR และตรวจผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	74
3.9	แสดงผลการวิเคราะห์เพศโคจากบลาสโตเมียร์ของ embryo biopsies โดยวิธีทาง PCR และตรวจผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis	75