รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยพัฒนาเพื่อผลิตปลาซีบร้าฟิช “น๊อกอิน”
Generation of knock-in zebrafish

โดย ผศ.สพ.ญ.ดร.กรรณิการ์ ศิริภัทรประวัติ

กันยายน 2561

สัญญาเลขที่ MRG5480228

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยพัฒนาเพื่อผลิตปลาซีบร้าฟิช “น๊อกอิน”
Generation of knock-in zebrafish

ผู้วิจัย	สังกัด
1. กรรณิการ์ ศิริภัทรประวัติ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. Jose B. Cibelli (Mentor)	Michigan State University
3. ธีระพล ศิรินฤมิตร (Mentor)	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480228

ชื่อโครงการ: การวิจัยพัฒนาเพื่อผลิตปลาซีบร้าฟิช "น๊อกอิน"

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน:

ผศ.สพ.ญ.ดร.กรรณิการ์ ศิริภัทรประวัติ

อีเมล์: fvetkks@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี และขอขยายระยะเวลาดำเนินการต่อ

บทคัดย่อ:

ปลาซีบร้าฟิชถูกนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์สำหรับการศึกษาโรคในมนุษย์และการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่มีระบบการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในการทดสอบวิจัยที่หลากหลายเทคโนโลยีการผลิตปลาซีบร้าฟิชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นมีจำกัด โดยเฉพาะเทคโนโลยีที่สามารถตัดหรือต่อยีนที่เฉพาะจุด (gene targeting) นั้นไม่สามารถทำได้ง่ายดายเท่ากับหนูทดลอง การทำโคลนนิ่งเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมได้ คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งปลา (Siripattarapravat et al., 2009) และผู้ร่วมวิจัยประความสำเร็จในการผลิตปลาซีบร้าฟิชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคการใช้ Zinc Finger Nuclease (Meng et al., 2008) ดังนั้นการผนวกเทคนิคทั้งสองเข้าด้วยกันอย่างเหมาะสม จะสามารถผลิตปลาซีบร้าฟิชน๊อกอินได้สำเร็จ ผู้วิจัยได้จัดเตรียมสัตว์ทดลอง ระบบการเลี้ยงเซลล์ ระบบการฉีดตัวอ่อน และระบบการทำโคลนนิ่งในห้องทดลองเรียบร้อย จากนั้นทำการทดลองถ่ายฝากยีนในตัวอ่อน และเซลล์ของปลาซีบร้าฟิช คัดเลือกเซลล์ที่ต้านยา G418 ในห้องทดลอง และตรวจสอบผลการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามียีนต้านยา G418 ในเซลล์ที่คัดเลือกได้ แต่ไม่พบว่าอยู่ในตำแหน่งของยีน Dlx3b ตามที่เสนอ จึงไม่ได้นำเซลล์นี้ไปใช้ทดลองทำโคลนนิ่งต่อไป

คำหลัก : ปลาซีบร้าฟิช โคลนนิ่ง น๊อกอิน

Abstract

Project Code: MRG5480228
Project Title: Generation of knock-in zebrafish
Investigator: Assistant Professor Kannika Siripattarapravat
E-mail Address: fvetkks@ku.ac.th
Project Period: 2 years with extension

Abstract:

Zebrafish has been a widely used vertebrate model for human diseases and studies of developmental biology. In comparison to mouse-model, however, homologous recombination has not been successfully implemented in zebrafish, in part, due to the lack of a robust system for derivation of embryonic stem cells - a practical approach for generating knock-in/ -out mice. To utilize zebrafish model systems into parity with rodent model systems, a reliable and simple method for reverse genetics is necessary. The zinc finger nucleases (ZFNs) technology has recently been utilized in germ-line gene targeting in zebrafish. However, the mutant zebrafish normally harbors mosaic lesions and as of yet, a combination of ZFNs and DNA repairing by homologous recombination has not been reported in fish. Somatic cell nuclear transfer – cloning has a potential to become a method of choice for germline genetic modification in zebrafish. We have developed cloning method that can be used efficiently to produce cloned zebrafish (Siripattarapravat et al., 2009). Our collaborator previously reported that ZFNs can increase the rate of DNA repair and introduce DNA lesion resulting in knockout zebrafish embryos (Meng et al., 2008). So, it is possible that, under appropriate selection systems, cultured cells with gene targeting homologous recombination can be propagated from a primary culture of ZFNs-mutant embryos. The cultured cells that are genetically knock-in can then be exploited in the cloning system. Here, we proposed to combine cloning technique and ZFNs technology, to achieve the goal of creating a knock-in zebrafish. We introduced ZFNs targeting dlx3b gene and dlx3b template cassette into embryos and cultured cells. The dlx3b template composes of diphtheria toxin A (DTA) and neomycin resistant (NeoR) genes for negative and positive selection, respectively. The knock-in cells had insertion of NeoR but not the targeted location that disrupts dlx3b gene, unfortunately, and the following somatic cell nuclear transfer experiment was not conducted.

Keywords : Zebrafish, cloning, knock-in

เนื้อหางานวิจัย

1. บทคัดย่อ (ตามเอกสารแนบหมายเลข 2/1 และ 2/2)

1.1 บทคัดย่อภาษาไทย

ปลาซีบร้าฟิชถูกนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์สำหรับการศึกษาโรคในมนุษย์และการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่มีระบบการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อใช้ในการทดสอบวิจัยที่หลากหลายเทคโนโลยีการผลิตปลาซีบร้าฟิชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นมีจำกัด โดยเฉพาะเทคโนโลยีที่สามารถตัดหรือต่อยีนที่เฉพาะจุด (gene targeting) นั้นไม่สามารถทำได้ง่ายดายเท่ากับหนูทดลอง การทำโคลนนิ่งเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมได้ คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งปลา (Siripattarapravat et al., 2009) และผู้ร่วมวิจัยประความสำเร็จในการผลิตปลาซีบร้าฟิชดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคการใช้ Zinc Finger Nuclease (Meng et al., 2008) ดังนั้นการผนวกเทคนิคทั้งสองเข้าด้วยกันอย่างเหมาะสม จะสามารถผลิตปลาซีบร้าฟิชน๊อกอินได้สำเร็จ ผู้วิจัยได้จัดเตรียมสัตว์ทดลอง ระบบการเลี้ยงเซลล์ ระบบการฉีดตัวอ่อน และระบบการทำโคลนนิ่งในห้องทดลองเรียบร้อย จากนั้นทำการทดลองถ่ายฝากยีนในตัวอ่อน และเซลล์ของปลาซีบร้าฟิชคัดเลือกเซลล์ที่ต้านยา G418 ในห้องทดลอง และตรวจสอบผลการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่ามียีนต้านยา G418 ในเซลล์ที่คัดเลือกได้ แต่ไม่พบว่าอยู่ในตำแหน่งของยีน Dlx3b ตามที่เสนอ จึงไม่ได้นำเซลล์นี้ไปใช้ทดลองทำโคลนนิ่งต่อไป

1.2 บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Zebrafish has been a widely used vertebrate model for human diseases and studies of developmental biology. In comparison to mouse-model, however, homologous recombination has not been successfully implemented in zebrafish, in part, due to the lack of a robust system for derivation of embryonic stem cells - a practical approach for generating knock-in/ -out mice. To utilize zebrafish model systems into parity with rodent model systems, a reliable and simple method for reverse genetics is necessary. The zinc finger nucleases (ZFNs) technology has recently been utilized in germ-line gene targeting in zebrafish. However, the mutant zebrafish normally harbors mosaic lesions and as of yet, a combination of ZFNs and DNA repairing by homologous recombination has not been reported in fish. Somatic cell nuclear transfer – cloning has a potential to become a method of choice for germline genetic modification in zebrafish. We have developed cloning method that can be used efficiently to produce cloned zebrafish (Siripattarapravat et al., 2009). Our collaborator previously reported that ZFNs can increase the rate of DNA repair and introduce DNA lesion resulting in knockout zebrafish embryos (Meng et al., 2008). So, it is possible that, under appropriate selection systems, cultured cells with gene targeting homologous recombination can be propagated from a primary culture of ZFNs-mutant embryos. The cultured cells that are genetically knock-in can then be exploited in the cloning system. Here, we proposed to combine cloning technique and ZFNs technology, to achieve the goal of creating a knock-in zebrafish. We introduced ZFNs targeting dlx3b gene and dlx3b template cassette into embryos and cultured cells. The dlx3b template composes of diphtheria toxin A (DTA) and neomycin resistant (NeoR) genes for negative and positive selection, respectively. The knock-in cells had insertion of NeoR but not the targeted location that disrupts dlx3b gene, unfortunately, and the following somatic cell nuclear transfer experiment was not conducted.

2. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

2.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

ปลาซีบร้าฟิชถูกพัฒนาเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบเพื่อใช้ศึกษาโรคของคนและศึกษาชีววิทยาของพัฒนาการของตัวอ่อนอย่างแพร่หลาย ปลาซีบร้าฟิชนั้นมีคุณลักษณะที่เติบโตและสืบพันธุ์เร็ว ตัวอ่อนใสและเจริญพัฒนาภายนอก เพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องทดลอง ค่าเลี้ยงดูถูกกว่าการเลี้ยงหนูทดลองมาก มีคุณสมบัติของการเป็นสัตว์ทดลองที่ดี และจีโนมทั้งหมดได้ถูกถอดรหัสแล้ว จึงเป็นต้นแบบการศึกษาทางพันธุศาสตร์อย่างมีประสิทธิภาพ แต่เดิมความก้าวหน้าของวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้นเกิดมีได้ส่วนใหญ่จากการศึกษาวิจัยในหนูทดลอง ทั้งนี้สืบเนื่องจากข้อได้เปรียบในดัดแปลงพันธุกรรมของหนูทดลองโดยวิธี “น๊อกเอ้าท์” หรือ “น๊อกอิน” (knock-out/ -in) ที่ทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ นักวิทยาศาสตร์สามารถพัฒนาหนูดัดแปลงพันธุกรรมโดยการใช้เซลล์ที่เรียกว่า embryonic stem cells (ESCs) เพื่อการผลิตหนูลูกผสม (chimeric mouse) โดยเริ่มต้นจากปรับเปลี่ยนส่วนของสารพันธุกรรมบางส่วนของ ESCs ด้วยวิธีการที่เรียกว่า gene targeting ในห้องทดลอง ทำการคัดเลือกให้ได้เซลล์ที่มีการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมจำเพาะแล้ว จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการผลิตหนูลูกผสม หนูชนิดดังกล่าวจะมีกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ที่เจริญพัฒนามากจาก gene targeted-ESCs ดังนั้นจะถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกได้ เทคโนโลยีการผลิตหนูดัดแปลงพันธุกรรมเป็นเอกสิทธิ์ของหนูทดลองชนิดเดียว ไม่สามารถทำได้ในสัตว์ชนิดอื่นๆ แม้แต่ความพยายามในการผลิตปลาซีบร้าฟิชลูกผสม (Chimeric zebrafish) ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จ (Fan et al., 2004, Ma et al., 2001) ทำให้ความรู้และเข้าใจกลไกทางชีววิทยาที่จะสามารถศึกษาได้ในปลาซีบร้าฟิชนี้ต้องล่าช้าลงไปอย่างมาก

ความสำเร็จของการโคลนนิ่ง Dolly จากเซลล์ที่ได้จากเต้านมของแกะสาว (Wilmut et al., 1997) ทำให้เปิดงานทางด้านการปรับปรุงพันธุกรรมในสัตว์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่มีระบบการเลี้ยง ESCs อย่างในหนูทดลอง เทคนิคโคลนนิ่งเป็นการนำเซลล์ที่เลี้ยงในห้องทดลอง (donor cells) ไปใส่ทดแทนนิวเคลียสหรือสารพันธุกรรมของเซลล์ไข่ (recipient egg) ผลที่ได้คือลูกสัตว์ที่มีพันธุกรรมเหมือนกับ donor cell ร้อยเปอร์เซ็นต์ เทคโนโลยีการโคลนนิ่งปลาซีบร้าฟิชนั้นถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในห้องปฏิบัติการของเรา (Siripattarapravat et al., 2009) และมีความเป็นไปได้สูงที่เราจะประยุกต์ใช้เทคนิคโคลนนิ่งในการผลิตปลาน๊อกเอ้าท์ หรือน๊อกอิน ในอนาคตอันใกล้

จากการศึกษารายงานการทดลองพบว่าอัตราการซ่อมแซม DNA ชนิด homologous recombination นั้นต่ำมากในเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ ESCs ทำให้ gene targeting ในเซลล์เพาะเลี้ยง และการคัดเลือกเซลล์เพื่อนำไปใช้เป็น donor cells สำหรับโคลนนิ่งนั้นมีโอกาสน้อยลงไปอีก นักวิจัยหลายกลุ่มได้พัฒนาเทคนิคที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการซ่อมแซม DNA ชนิด homologous recombination ได้โดยการใช้ Zinc finger nucleases (ZFNs) เป็นตัวช่วย (Perez et al., 2008, Santiago et al., 2008, Urnov et al., 2005) เอนไซม์ ZFNs มีส่วนประกอบของโปรตีน 2 ชนิด ส่วนหนึ่งคือโปรตีน zinc finger ที่สามารถจับกับตำแหน่งเบสจำเฉพาะบน genome ได้ อีกส่วนหนึ่งคือเอนไซม์ endonuclease ที่มีความสามารถในการตัด DNA ให้ขาดออกเป็นสองชิ้น ZFNs ทำงานเป็นคู่และจะสามารถตัด DNA ได้ต่อเมื่อโปรตีนของ ZFNs สองตัวจับอยู่บนตำแหน่งของ DNA ในระยะที่ใกล้กัน เอื้อให้เอ็นไซม์ endonuclease ที่อยู่ในแต่ละข้างมารวมเป็นคู่ และจับกันเป็น active form ของเอ็นไซม์ ซึ่งเอ็นไซม์จะตัด DNA ให้ขาดได้ในตำแหน่งจำเพาะที่ใกล้กับตำแหน่งที่โปรตีน zinc finger จับเท่านั้น ดังนั้น gene targeting โดยใช้เทคนิคนี้จึงมีความเป็นไปได้สูง

เทคโนโลยี ZFNs ถูกนำเสนอเข้าในวงการวิจัยปลาซีบร้าฟิชเมื่อปี 2008 เทคนิคนี้ทำโดยการฉีด mRNA ของ ZFNs เข้าไปในตัวอ่อนระยะหนึ่งเซลล์ ผลคือสามารถตัดต่อ DNA ในตำแหน่งยีนจำเพาะในเซลล์ของปลาได้ โดยท้ายสุดเป็นเทคนิคที่ใช้ในการผลิตปลาน๊อกเอ้าท์ได้ (Doyon et al., 2008, Meng et al., 2008) ถึงแม้ว่าการดัดแปลงพันธุกรรมนี้จะเรียกว่า gene targeting ก็ตาม เทคนิคนี้อิงการซ่อมแซม DNA แบบ non-homologous end joining ไม่ใช่การซ่อมแซมแบบ homologous recombination ดังนั้นจึงไม่สามารถจะควบคุมวิการที่เกิดบน DNA ได้ว่าเป็นแบบ deletion หรือ insertion และที่สำคัญการผลิต gene targeted zebrafish ด้วยเทคนิคนี้สามารถทำได้เฉพาะแต่ปลาน๊อกเอ้าท์ ไม่สามารถทำปลาน๊อกอิน และ conditional knock-out/-in ได้

โครงการวิจัยนี้เสนอการนำจุดเด่นของเทคโนโลยีโคลนนิ่ง และ ZFNs มาผนวกรวมกัน เพื่อใช้ในการผลิตปลาน๊อกอิน เนื่องจากเทคนิค ZFNs ถูกพัฒนาและทำสำเร็จในตัวอ่อนของปลาซีบร้าฟิช คณะผู้วิจัยจึงเสนอการผลิตเซลล์น๊อกอินโดยใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในตัวอ่อน จากนั้นจึงนำเซลล์จากตัวอ่อนมาเลี้ยงในห้องทดลอง คัดเลือก เพิ่มจำนวน และตรวจสอบ ก่อนจะนำเซลล์นั้นไปใช้เป็น donor cell สำหรับการทำโคลนนิ่งต่อไป เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการนำร่องเพื่อเป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการที่นำเสนอนี้ว่าสามารถประยุกต์ใช้ได้จริง ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษายีน *dlx3b* ซึ่งยีนนี้ถ้าถูกน๊อกเอ้าท์ไปจะส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อหู (otic vesicle) หากยีน *dlx3b* หายไปแค่ 1 allele จะไม่มีผลต่อพัฒนาการของตัวอ่อนปลา แผนการวิจัยออกแบบระบบการคัดเลือกเซลล์ในห้องทดลองให้จัดทำเป็นสองระบบคือ positive และ negative selection ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการคัดเลือกเซลล์หลังจากผ่านขบวนการ gene targeting การคัดเลือกเซลล์เบื้องต้นจะทำโดยวิธี negative selection ด้วย Diphtheria toxin A (DTA) กล่าวคือเซลล์ที่มี random integration ของ DNA template ที่ตำแหน่งอื่นๆ ใดบนจีโนมจะตายด้วย DTA นี้ทันที การคัดเลือกขั้นต่อไปคือ positive selection โดยการน๊อกอินส่วนของยีน Neomicin resistant (Neo^R) เข้าไปแทรกใน exon3 ของ *dlx3b* ดังนั้นเมื่อใส่ G418 เข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่จะอยู่รอดได้คือเซลล์น๊อกอินเท่านั้น เราสามารถตรวจสอบขั้นต่อไปในระดับโมเลกุล เพื่อยืนยันคุณลักษณะของเซลล์ ก่อนที่จะนำเซลล์นั้นมาใช้ในการโคลนนิ่ง เทคนิคการผลิตปลาน๊อกอินโดยใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งร่วมกับ ZFNs จะเป็นการเปิดให้ศักยภาพในการเป็นสัตว์ทดลองของปลาซีบร้าฟิชมีมากขึ้นทวีคูณ อีกทั้งองค์ความรู้ที่ได้นี้ยังสามารถขยายผลไปในการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมจำเพาะชนิดอื่นได้ในอนาคต

2.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิควิธีการผลิตปลาน๊อกอินให้สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพในเชิงปฏิบัติ
2. เพื่อนำเทคนิคที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการผลิตปลาน๊อกอิน และนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสัตว์ทดลอง เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ต่อไป
3. เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ได้วิจัย และพัฒนาจาก Cellular Reprogramming Lab ประเทศสหรัฐอเมริกา มาสู่ประเทศไทยโดยผ่านทางมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
4. เพื่อเตรียมความพร้อม และเพิ่มโอกาสในการทำงานวิจัยภายในประเทศในระดับที่สูงขึ้น
5. เพื่อสร้างเครือข่ายความร่วมมือทางงานวิจัยระหว่าง Michigan State University และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และพัฒนาคุณภาพของงานวิจัยในประเทศ

2.3 วิธีทดลอง

1. การทำการทำ Gene targeting ในเอ็มบริโอ

- mRNA ของ ZFNs จะถูกสังเคราะห์ในห้องทดลองด้วยวิธี in vitro transcription โดยใช้ชุดผลิต mRNA ชื่อว่า mMessage mMachine SP6 kit ของ Ambion
- DNA template จากพลาสมิดที่ได้จัดเตรียมไว้ (รูปที่ 2) จะนำมาเพิ่มจำนวนและทำให้เป็นเส้นตรง (linearization) ด้วย restriction enzyme จากนั้นนำมาสกัดให้บริสุทธิ์
- ตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณของ mRNA และ DNA ที่ได้
- เตรียมแบ่ง aliquot เอาไว้ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อนำไปฉีดเข้าเอ็มบริโอ
- เตรียมเอ็มบริโอระยะหนึ่งเซลล์จากพ่อแม่พันธุ์ปลาด้วยวิธีผสมตามธรรมชาติ
- ฉีด mRNA และ DNA template เข้าไปในเอ็มบริโอ
- เลี้ยงเอ็มบริโอจนถึงระยะ 5-15 somites และเตรียมเอ็มบริโอสำหรับเลี้ยง primary cell culture ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด D-NACs

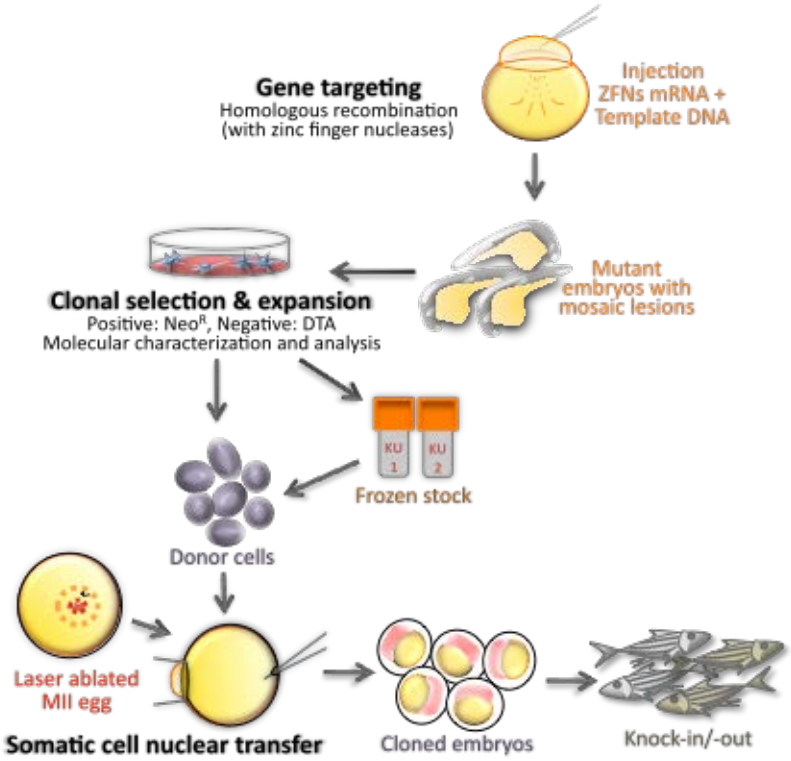
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์จากเอ็มบริโอ และคัดเลือกเซลล์น๊อกอิน ประชากรของเซลล์น๊อกอินนั้น สามารถถูกคัดเลือกออกจากเซลล์อื่นๆ ได้เนื่องจากมีระบบ positive และ negative selection

- เลี้ยง และเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ได้จากเอ็มบริโอ
- ในกรณีที่เซลล์ได้รับการแทรกตัวของ DNA template ในตำแหน่งอื่นๆ ของ genome เซลล์นั้นๆ จะตายเนื่องจาก Diphtheria toxin A (DTA) ของระบบ negative selection
- เซลล์ที่เหลือรอดอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์ จะถูกคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ G418 (Invitrogen) ในกรณีที่เซลล์ไม่มี DNA template แทรกเข้าใน genomeเซลล์จะตายเนื่องจากไม่มีสารต้านยาปฏิชีวนะ
- เพิ่มจำนวนเซลล์แบบชนิด Clonal selection เพื่อให้ได้ประชากรของเซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกันมากที่สุด

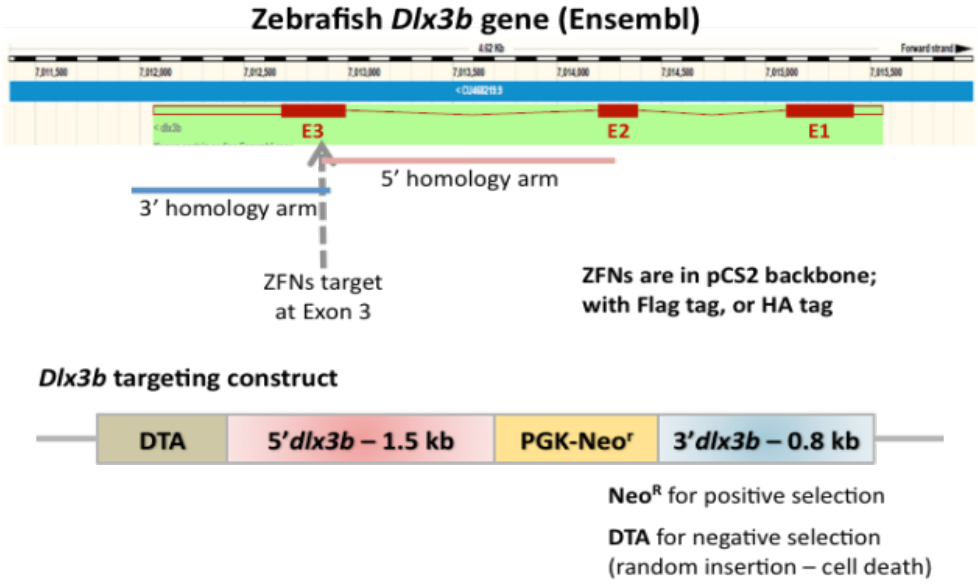
3. ตรวจสอบยืนยันเซลล์น๊อกอิน และนำมาใช้ในการทำโคลนนิ่งเพื่อผลิตปลาน๊อกอิน

- การตรวจเซลล์น๊อกอินนั้นสามารถทำได้โดยวิธีพีซีอาร์ ดังแสดงในรูปที่ 3
- ทำการเพิ่มจำนวนเซลล์น๊อกอินที่ตรวจสอบแล้ว ส่วนหนึ่งเพื่อนำไปเก็บไว้เป็นคลังเซลล์สำหรับการทดลองต่อไป และบางส่วนเลี้ยงเพิ่มจำนวนต่อ
- นำเซลล์น๊อกอินมาใช้ทำโคลนนิ่ง
- ตรวจสอบประสิทธิภาพ และคุณภาพของปลาที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง
- ตรวจสอบลูกหลานของปลาที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง ว่ามีการถ่ายทอดการตัดต่อพันธุกรรมของยีน Dlx3b ไปยังลูกหลานหรือไม่

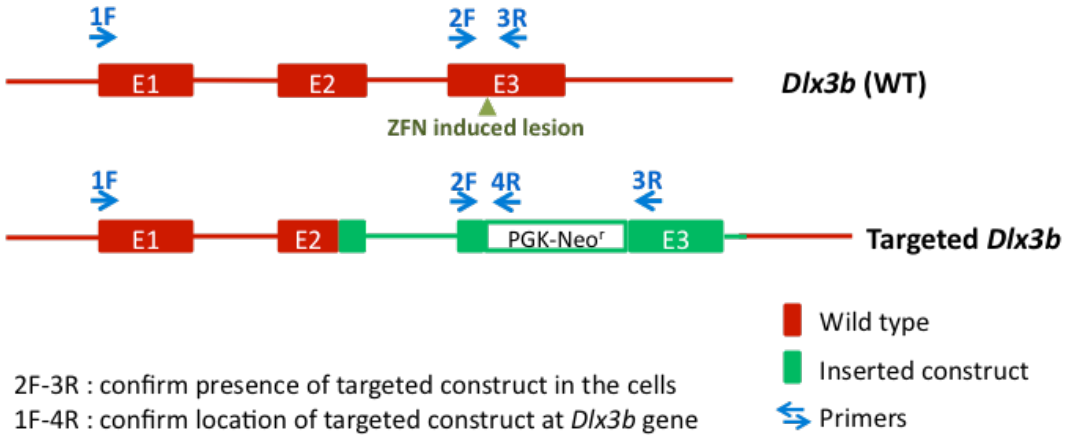
รูปที่ 1 สรุปแผนการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ



รูปที่ 2 ยีน dlx3b ที่ใช้เป็นยีนต้นแบบในการทำปลาน๊อกอิน



<u>รูปที่ 3</u> การตรวจสอบเซลล์น๊อกอิน



2.4 แผนการดำเนินงาน

<u>ปีที่ 1</u>

ช่วง 6 เดือนแรก: เตรียมความพร้อมของห้องทดลอง และสารเคมี

เตรียมห้องเลี้ยงปลาซีบร้าฟิช เตรียมห้องเลี้ยงเซลล์ของปลาซีบร้าฟิช เตรียมความพร้อมของเครื่องมือฉีดเอ็มบริโอ จัดเตรียม dlx3b ของ ยีน DNA template และ ZFNs ของ RNA และตรวจสอบทบทวนเอกสารทางวิชาการอย่างต่อเนื่อง

ช่วง 6 เดือนหลัง: เริ่มต้นทำการทดลองในตัวอ่อนปลา ฉีดเอ็มบริโอ และทำ primary culture cells

ฉีดเอ็มบริโอและคัดเลือกเอ็มบริโอ นำเซลล์ของเอ็มบริโอมาเลี้ยงในห้องทดลอง พร้อมทั้งคัดเลือกเซลล์น๊อกอินด้วยระบบ ตามลำดับ DTA โดยใช้ยาปฏิชีวนะ และ Negative selestion และ Positive เพิ่มจำนวนเซลล์และวางแผนการตรวจสอบระดับโมเลกุลของ DNA หากได้เซลล์มากพอดำเนินการตรวจสอบเซลล์ว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของ เบื้องต้นด้วยวิธีพีซีอาร์ DNA รวบรวมข้อมูล ประมวลผล เขียนรายงานสรุปผล และวางแผนงานขั้นต่อไป

<u>ปีที่ 2</u>

ช่วง 6 เดือนแรก: เพิ่มจำนวนเซลล์และตรวจสอบระดับโมเลกุลของ DNA

พยายามคัดแยกเซลล์แบบและเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มากขึ้น clonal selection ตรวจสอบระดับโมเลกุลของ Karyotyping และตรวจ DNA สรุปผลการทดลอง และตรวจสอบแก้ไขหรือปรับเปลี่ยน ในส่วนของการทดลอง(ถ้ามี) เขียนรายงานผลการทดลอง และเริ่มส่งร่างฉบับย่อไปยังวารสารนานาชาติ เพื่อตรวจสอบความเป็นไปได้ในการตีพิมพ์ เพิ่มจำนวนเซลล์ และเก็บเซลล์ที่ได้ตรวจสอบแล้ว แช่แข็งในสารไนโตรเจนเหลว เพื่อสามารถนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ติดต่อประสานงานกับทาง Professor Jose Cibelli และวางแผนที่จะใช้เซลล์นี้ ในการทำโคลนนิ่งต่อไป

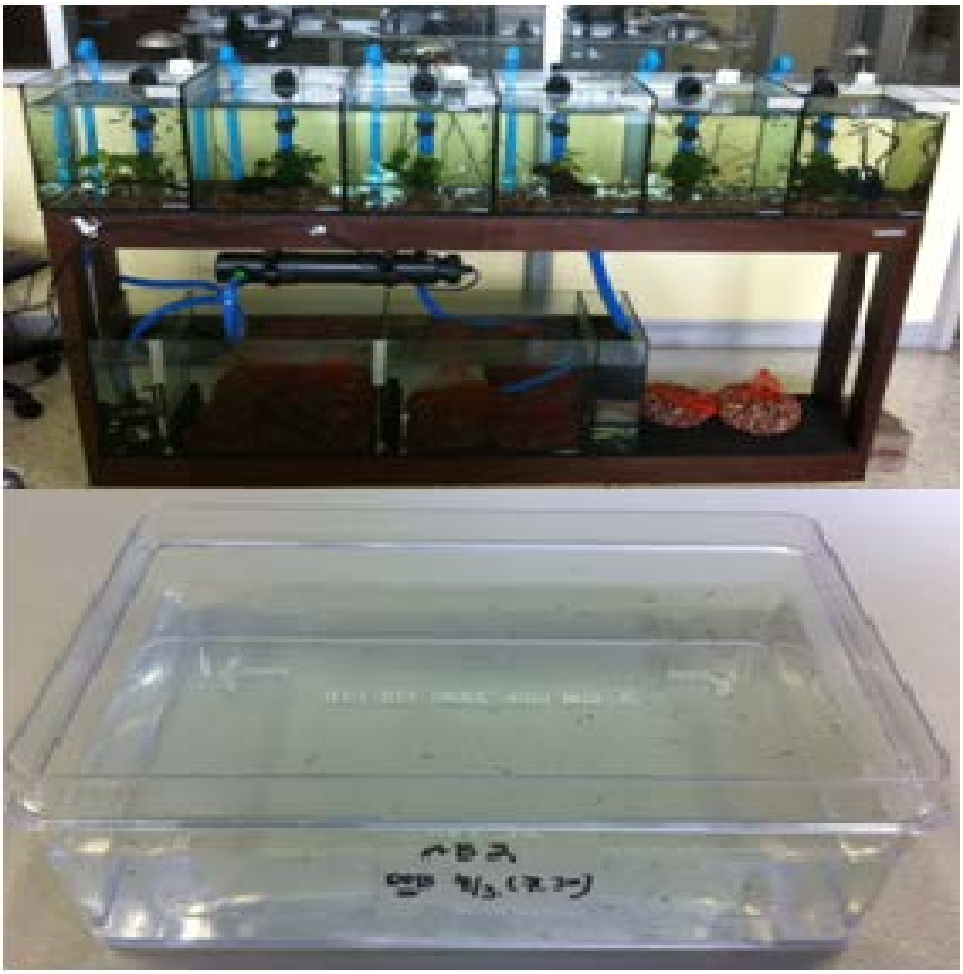
ช่วง 6 เดือนหลัง: ทำโคลนนิ่งจากเซลล์น๊อกอิน เพื่อผลิตปลาน๊อกอิน สรุปผลงาน และส่งผลเพื่อตีพิมพ์

นำเซลล์น๊อกอินที่ได้นี้ไปใช้ในการทำโคลนนิ่งจริง ตรวจสอบประสิทธิภาพของโคลนนิ่ง และลักษณะของปลาน๊อกอินที่ได้ ผลิต และเลี้ยงปลาน๊อกอินให้โตจนออกลูกหลานได้ ตรวจสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลูกหลานของปลาน๊อกอินที่ได้ เขียนรายงานสรุปผล และส่งผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

3. ผลการทดลอง

3.1 การสร้างระบบการเลี้ยงปลาซีบร้าฟิช

ผู้วิจัยได้ออกแบบตู้สำหรับเลี้ยงปลาซีบร้าฟิชโตเต็มวัย (รูปที่ 4) ขนาด 30 X 30 X 30 ซม. จำนวน 6 ตู้ เป็นระบบน้ำวนแบบปิด โดยแต่ละตู้มีระบบน้ำล้นเพื่อให้มีการหมุนเวียนน้ำตลอดเวลา ทางระบายน้ำออกจะผ่านทางใยกรองน้ำ และถ่ายเทไปสู่ถังบำบัดน้ำรวมด้านล่าง ซึ่งประกอบไปด้วยถังดักสิ่งสกปรกด้วยฟองน้ำสำหรับกรองสิ่งปฏิกูลโดยเฉพาะ ต่อมาเป็นถังบำบัดสารประกอบไนโตรเจนในน้ำด้วยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในหินคริก้าที่มีรูพรุน จำนวน 2 ถัง และถังสุดท้ายบรรจุปั้มน้ำ เพื่อสูบน้ำเข้าไปยังส่วนบำบัดน้ำสุดท้ายด้วยการฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลตเพื่อฆ่าเชื้อโรคในน้ำ แล้วน้ำเหล่านี้จึงถูกสูบขึ้นไปหมุนเวียนในตู้ปลาด้านบน



A

B

<u>รูปที่</u> <u>4</u> ระบบเลี้ยงปลาซีบร้าฟิชโตเต็มวัยแบบ recirculation (A) มีการบำบัดของเสียด้วยการกรองผ่านวัสดุที่มีรูพรุนและฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตร้าไวโอเล็ต, ลูกปลาที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยวิธีธรรมชาติถูกนำมาอนุบาลในกล่องขนาดเล็กจนกระทั่งอายุ 1 เดือน (B)

การควบคุมอุณหภูมิและแสงภายในห้องเลี้ยงปลา ปลาซีบร้าฟิชจะผสมพันธุ์ในช่วงเช้าก่อนพระอาทิตย์ขึ้น ดังนั้นการควบคุมแสงภายในห้องให้มีช่วงสว่างและมืดเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจึงสำคัญต่อกระตุ้นให้ระบบสืบพันธุ์ทำงานเป็นไปตามธรรมชาติ แต่เนื่องจากห้องเลี้ยงปลามีหน้าต่างที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศตะวันออก แสงจากดวงอาทิตย์ในช่วงเช้าจะรบกวนการตั้งเวลาเปิดปิดไฟภายในห้อง เพื่อให้ปลามีการผสมพันธุ์ในเวลาที่สะดวกต่อการทำงาน จึงติดอุปกรณ์กั้นแสงแดด และเปิดเครื่องปรับอากาศเพื่อให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 29$\pm$1 องศาเซลเซียส ทำให้อุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับปลาซีบร้าฟิชคือ 28 องศาเซลเซียส แต่เนื่องจากระบบการเลี้ยงปลาซีบร้าฟิชนี้ไม่ได้เลี้ยงในอาคารสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาพอากาศและอุณหภูมิตลอดทั้งปี สภาพอากาศที่ร้อนและแปรปรวนของประเทศไทยทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนการตั้งค่าเครื่องปรับอากาศตลอดเวลา ผู้วิจัยได้ทำการเก็บข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นของห้องเลี้ยงปลามามากกว่า 1 ปี และพบว่าการปรับการทำงานของเครื่องปรับอากาศให้เปิดปิดอัตโนมัติในช่วงกลางวัน และกลางคืนสามารถช่วยควบคุมสภาพอากาศในห้องเลี้ยงปลาได้ โดยเฉพาะช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม อากาศร้อนอบอ้าว บางวันอุณหภูมิขึ้นสูงมาก จนทำให้เครื่องปรับอากาศทำงานได้ไม่ดี ส่งผลให้อุณหภูมิของห้องเลี้ยงปลามีความคลาดเคลื่อนสูง และส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของปลา จึงต้องทำการติดฟิล์มลดแสงที่ส่องเข้าห้องปลา พร้อมทั้งบุห้องด้วยโฟม เพื่อลดความร้อนจากภายนอกห้อง พร้อมทั้งเปิดเครื่องปรับอากาศให้ตลอดเวลาในช่วงนี้

3.2 การเพาะเลี้ยงเอมบริโอปลาซีบร้าฟิช

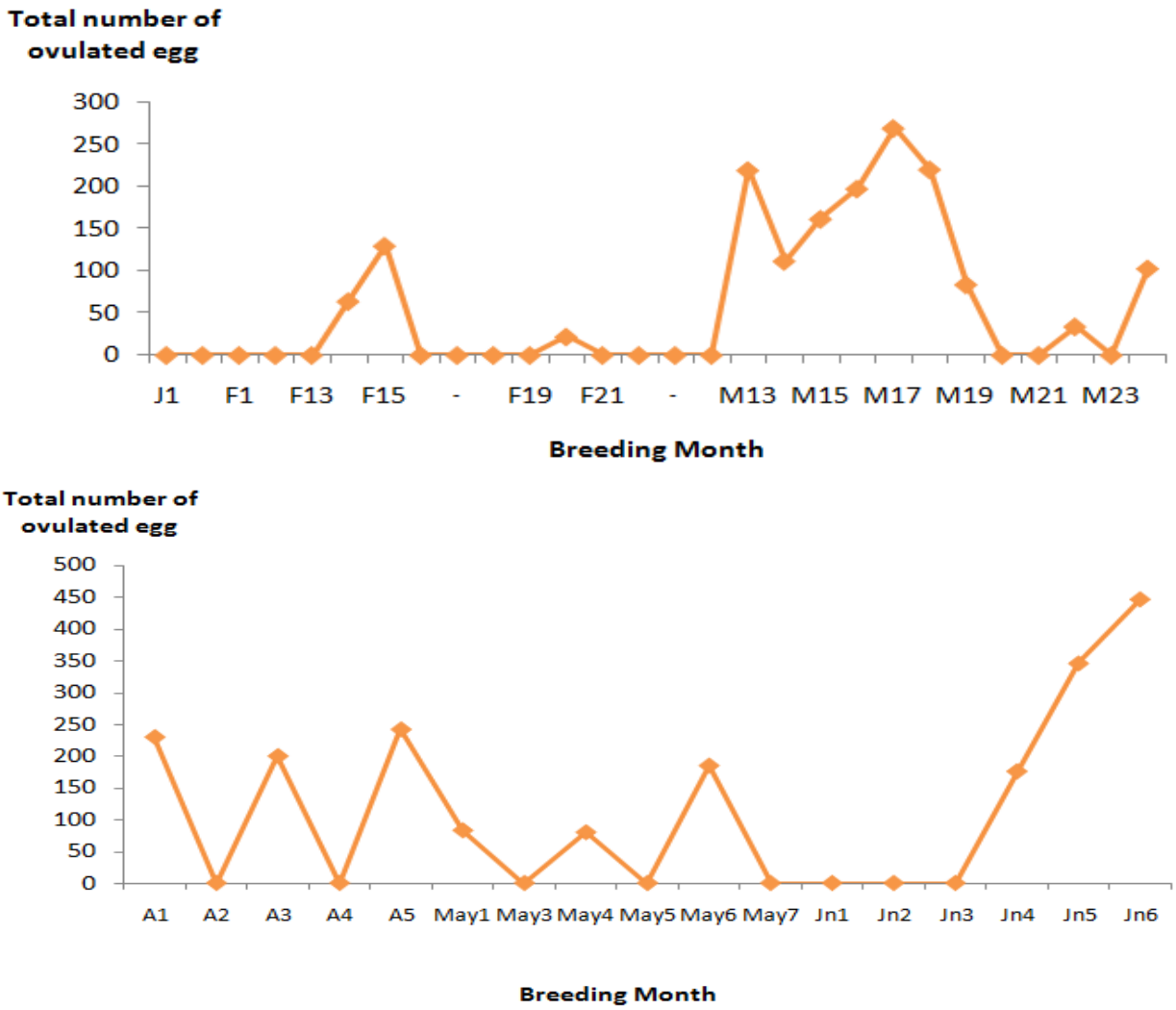
ผู้วิจัยได้สั่งซื้อตัวอ่อน (ไข่ปลายังไม่ฟัก) ของปลาสายซีบร้าฟิชสายพันธุ์ Tubingen 100 ตัวและ AB line 100 ตัว จาก Zebrafish international resource center ประเทศสหรัฐอเมริกา ลูกปลาถูกส่งเข้ามาในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 และนำมาเพาะเลี้ยงต่อในบ่ออนุบาล เริ่มให้อาหารที่อายุ 3 วัน โดยใช้สาหร่าย Spirulina ผงผสมกับอาหารสำหรับลูกปลาที่มีขนาดเม็ดเล็ก 50-100 ไมครอน และเริ่มเปลี่ยนขนาดอาหารเป็นอาหารลูกปลาขนาดเม็ด 150 – 200 ไมครอนเมื่ออายุ 7 วัน และขนาด 250 – 400 ไมครอน เมื่ออายุ 14 วัน และให้อาทริเมียร่วมด้วย เมื่อลูกปลาอายุได้ 30 วันจึงแยกมาเลี้ยงในตู้ระบบปิดโดยแบ่งเป็นตู้ Tubingen และตู้ AB line จำนวน 2 ตู้ และเริ่มให้อาหารเป็น อาทริเมียสด หรืออบแห้ง ร่วมกับ สาหร่าย Spirulina อบแห้ง วันละ 3 มื้อ

เนื่องจากเนื่องจากปัญหามหาอุทกภัยปี 2554 ทำให้ไม่สามารถเข้ามาทำงานได้เป็นระยะเวลาเกือบ 2 เดือน จึงได้ทำการอพยพปลาไปเลี้ยงที่บ้านเพื่อแก้ปัญหา แต่อย่างไรก็ตามตู้เลี้ยงปลาที่ปล่อยทิ้งไว้นาน และระบบที่เตรียมไว้รองรับปลาซีบร้าฟิชก็เสียหายไปบางส่วน ต้องซ่อมและต้องมีค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมเพิ่ม ปลาที่อพยพและย้ายที่อยู่นั้นมีภาวะเครียด เมื่อย้ายปลาเข้าในระบบที่เตรียมไว้ ลูกปลามีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น แต่โตช้ากว่าปลาซีบร้าฟิชที่เคยเลี้ยงที่สหรัฐอเมริกามาก ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของปลาซีบร้าฟิชต่ำในช่วงแรกของการทดลอง

3.3 การผสมพันธุ์ปลา

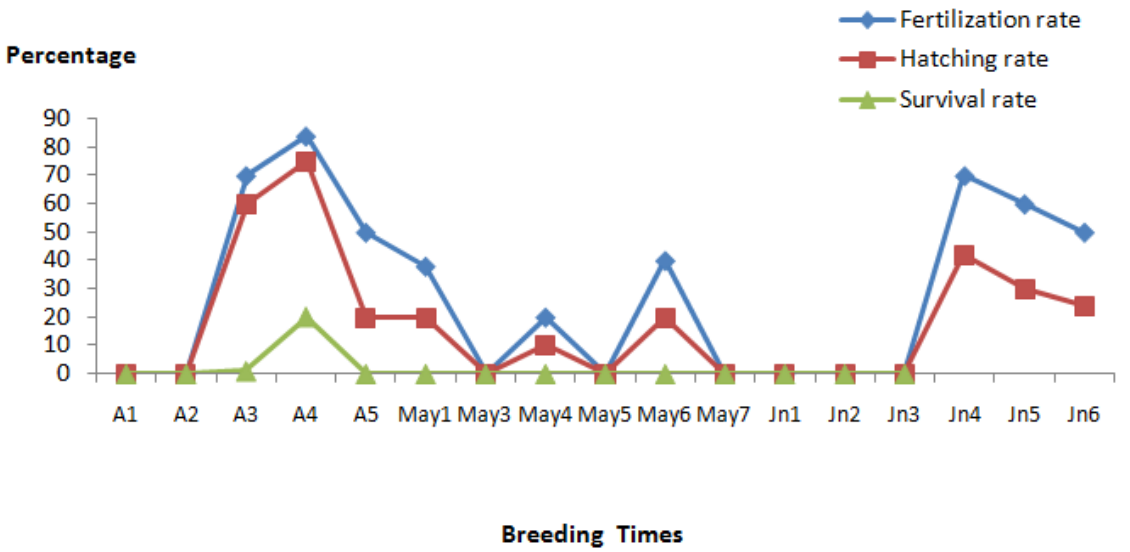
ในส่วนของการเตรียมพ่อแม่พันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตเอมบริโอ จากการทำการผสมในหลอดแก้ว หรือ *in vitro* fertilization (IVF) จึงต้องทำการจับแยกปลาเพื่อผสมในกล่องผสมพันธุ์ เป็นการสร้างความคุ้นเคยต่อการถูกจับและประเมินความพร้อมของระบบสืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ ในช่วงเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ สังเกตพบพฤติกรรมที่เพศผู้เริ่มสนใจและพยายามผสมพันธุ์กับเพศเมีย รวมทั้งพบลูกปลาเกิดใหม่ในตู้ แสดงว่ามีการผสม

พันธุ์ตามธรรมชาติเกิดขึ้น จึงเริ่มแยกปลาเพศผู้และเมียใส่ในกล่องสำหรับผสมพันธุ์ ที่มีตะแกรงอยู่ด้านล่าง สำหรับให้ไข่ (oocyte) และ สเปิร์ม (sperm) ตกลงไปปฏิสนธิด้านล่าง ป้องกันการถูกกินและสามารถนำเอมบริโอมาประเมินความพร้อมของพ่อแม่พันธุ์ โดยวัดอัตราการผสมติด อัตราการฟักเป็นตัว และอัตราการรอดชีวิตจนถึงอายุ 1 เดือน ซึ่งแสดงผลดังแผนภูมิในรูปที่ 5 และ 6



<u>รูปที่ 5</u> แผนภูมิแสดงจำนวนไข่จากตัวเมียที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ แสดงตามเดือนโดยใช้อักษรย่อของเดือน และตัวเลขข้างหลังแสดงลำดับครั้งที่ทำการผสมในกล่องผสมพันธุ์ในเดือนนั้น แผนภูมิ 5A แสดงข้อมูลในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม แผนภูมิ 5B แสดงข้อมูลในช่วงเดือนเมษายนถึงมิถุนายน โดยมีตัวย่อดังนี้; J = มกราคม, F = กุมภาพันธ์, M = มีนาคม, A = เมษายน, May = พฤษภาคม, Jn = มิถุนายน

2A



2B

<u>รูปที่ 6</u> แผนภูมิแสดงอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate-ข้าวหลามตัดสีฟ้า), อัตราการฟักตัว (Hatching rate-สี่เหลี่ยมสีเลือดหมู) และอัตราการรอดชีวิตจนถึงอายุ 1 เดือน (survival rate-สามเหลี่ยมสีเขียว) จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ แสดงตามเดือนโดยใช้อักษรย่อของเดือน และตัวเลขข้างหลังแสดงลำดับครั้งที่ทำการผสมในกล่องผสมพันธุ์ในเดือนนั้น แผนภูมิ 6A แสดงข้อมูลในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม แผนภูมิ 6B แสดงข้อมูลในช่วงเดือนเมษายนถึงมิถุนายน โดยมีตัวย่อดังนี้; J = มกราคม, F = กุมภาพันธ์, M = มีนาคม, A = เมษายน, May = พฤษภาคม, Jn = มิถุนายน.

ผลการประเมินประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ พบว่าในเดือนมกราคมซึ่งเป็นช่วงที่ปลามีอายุประมาณ 3 เดือน ปลาเริ่มแสดงพฤติกรรมการผสมพันธุ์ แต่ยังไม่มีความสมบูรณ์พันธุ์ ดังจะเห็นได้จากช่วงกลางเดือนกุมภาพันธ์ที่มีการผสมพันธุ์และตกไข่ แต่อัตราการเกิดปฏิสนธิต่ำ ในเดือนมีนาคมมีการผสมพันธุ์และเกิดการตกไข่จำนวนมากขึ้น รวมทั้งอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟักตัว และอัตราการรอดชีวิตจนถึงอายุ 1 เดือน เพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากปลามีอายุได้ 5 เดือน ซึ่งจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เต็มที่ แต่พบว่าในช่วงปลายเดือนมีนาคมอัตราการการผสมพันธุ์ลดน้อยลง เนื่องจากอุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 32-33 องศาเซลเซียสซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 29-30

องศาเซลเซียส เพราะสภาพอากาศที่ร้อนขึ้น จึงทำการแก้ไขโดยการติดฟิล์มกันความร้อนที่หน้าต่างห้อง พบว่าอัตราการผสมดีขึ้นในช่วงกลางเมษายน แต่อุณหภูมิห้องไม่คงที่และยังคงสูงเกินไป ดังจะเห็นได้จากอัตราการผสมในเดือนพฤษภาคมที่ลดลง จึงทำใช้แผ่นโฟมติดกระจกหน้าต่างจึงเป็นฉนวนกันความร้อนและติดตั้งระบบเปิดปิดไฟอัตโนมัติ ทำให้ควบคุมอุณหภูมิและปริมาณแสงได้ดียิ่งขึ้น ทำให้อัตราการผสมในเดือนมิถุนายนดีขึ้น

3.4 การสร้าง Plasmid vector และการทำ in vitro transcription

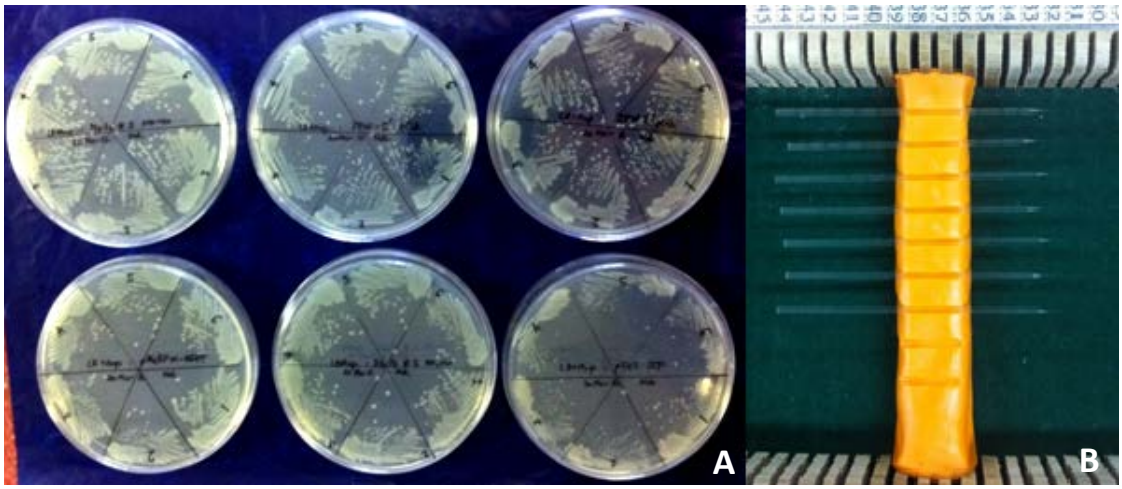
การเตรียมดีเอนเอ และอาร์เอนเอเพื่อทำ Gene targeting มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.1 ขั้นแรกนำ Plasmid vector ที่เตรียมไว้แล้ว Transformation ไปสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน และคัดเลือกด้วยวิธี antibiotic resistance (Ampicillin) หลังจากนั้นสกัด plasmid ความเข้มข้นสูงออกมาเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 7A)

3.4.2 ทำการสร้าง plasmid vector เพื่อเป็น DNA template พลาสมิดสำหรับเป็นต้นแบบในการทำ gene target ถูกเตรียมให้เป็น Linearized plasmid โดยการตัดด้วยเอนไซม์ NotI แยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ Agarose gel electrophoresis และตัดแยกชิ้นพลาสมิดจากเจล จากนั้นสกัดให้บริสุทธิ์ ทำละลายในน้ำ และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop

3.4.3 ส่วน RNA เตรียมจากพลาสมิด pCS2-5’ZFN และ pCS2-3’ZFN โดยทำ *in vitro* transcripted mRNAs ของโปรตีน zinc finger nucleases ที่จำเพาะต่อยีน *dlx3b* (ตามรูปที่ 2) โดยใช้ชุด In vitro transcription kit ของ Ambion ชื่อ mMessage mMachine SP6 kit ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ ส่วนของ RNA ถูกตกตะกอนด้วย Lithium Chloride ก่อนนำมาใช้

3.4.4 ส่วนผสมของ DNA template (linearized targeted construct) และ RNA สำหรับ 5’ และ 3’ Zinc Finger nucleases ถูกเตรียมพร้อมสำหรับการฉีดเข้าตัวอ่อนปลาที่เพิ่งผสมโดยใช้เข็มแก้วที่เตรียมไว้ (รูปที่ 7B)

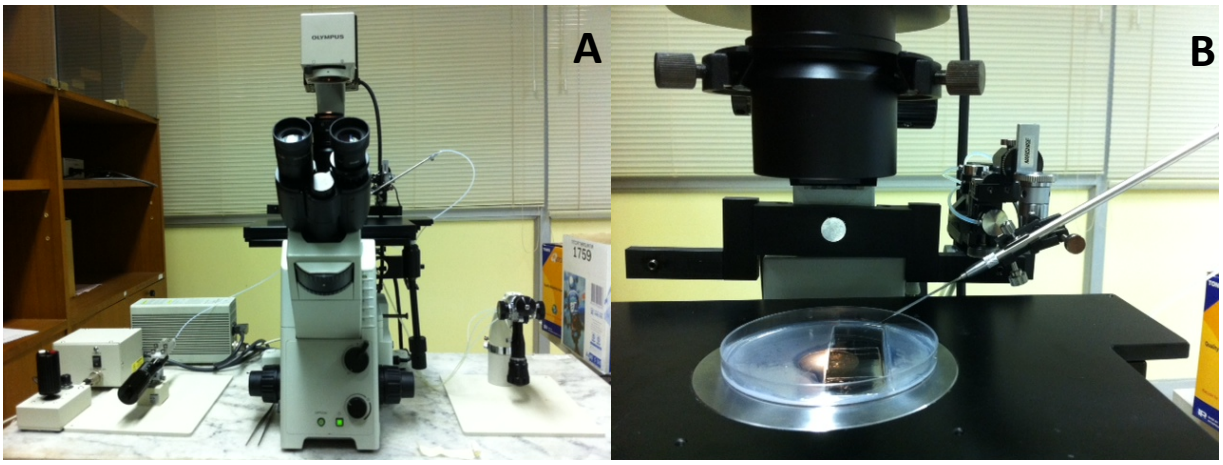


<u>รูปที่ 7</u> Plasmid vector ถูกทำ transformation ไว้ในแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* (Top10) และจะถูกนำมาทดสอบการ expression ของ plasmid vector เพื่อนำไปฉีดเข้าเอมบริโอต่อไป (A), เข็มปลายแหลมสำหรับฉีดเอมบริโอ (B)

3.5 การเตรียมเครื่องมือสำหรับฉีดเอมบริโอ และการทำ Embryo injection

อุปกรณ์ที่ใช้ในการฉีดเอมบริโอ ประกอบด้วยเข็มแก้วปลายแหลม ชุดเครื่องมือ Micromanipulator และกล้อง Stereomicroscope การเตรียมเข็มทำขึ้นเองจากแท่งแก้วขนาด 20 µl โดยนำมายืดให้ปลายแหลมและมีขนาด 10 µm ด้วยลวดที่ผ่านความร้อน และทำส่วนปลายเข็มให้เป็นมุมเอียงด้วยเครื่อง micro-grinder (รูปที่ 7B)

การฉีดเอมบริโอเป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ในการทำ Gene targeting ผู้วิจัยใช้ injection chamber ที่ทำขึ้นเอง โดยใช้ Petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100mm, Glass slide, Cover slip, และ Agarose gel ชุดอุปกรณ์ฉีดเอมบริโอใช้ Micromanipulator ในการบังคับทิศทางการเคลื่อนไหวของเข็ม และอุปกรณ์ควบคุมการปล่อยและดูดสารจากปลายเข็มโดยใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์และเข็มฉีดที่ทำเตรียมไว้ (รูปที่ 8A) หลังจากประกอบอุปกรณ์จนครบจึงผสมปลา และเก็บเอมบริโออายุไม่เกิน 1 ชั่วโมง นำมาวางเรียงในช่องที่ประกอบขึ้นจากการวาง cover slip ไว้ด้านหนึ่งและใช้ความหนาของ Agarose gel กั้นข้างอีกด้านหนึ่ง (รูปที่ 8B) ทดสอบโดยการฉีด 0.2M KCl ในสารละลายที่มี Phenol red พบอัตรารอดชีวิตของเอ็มบริโอไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม



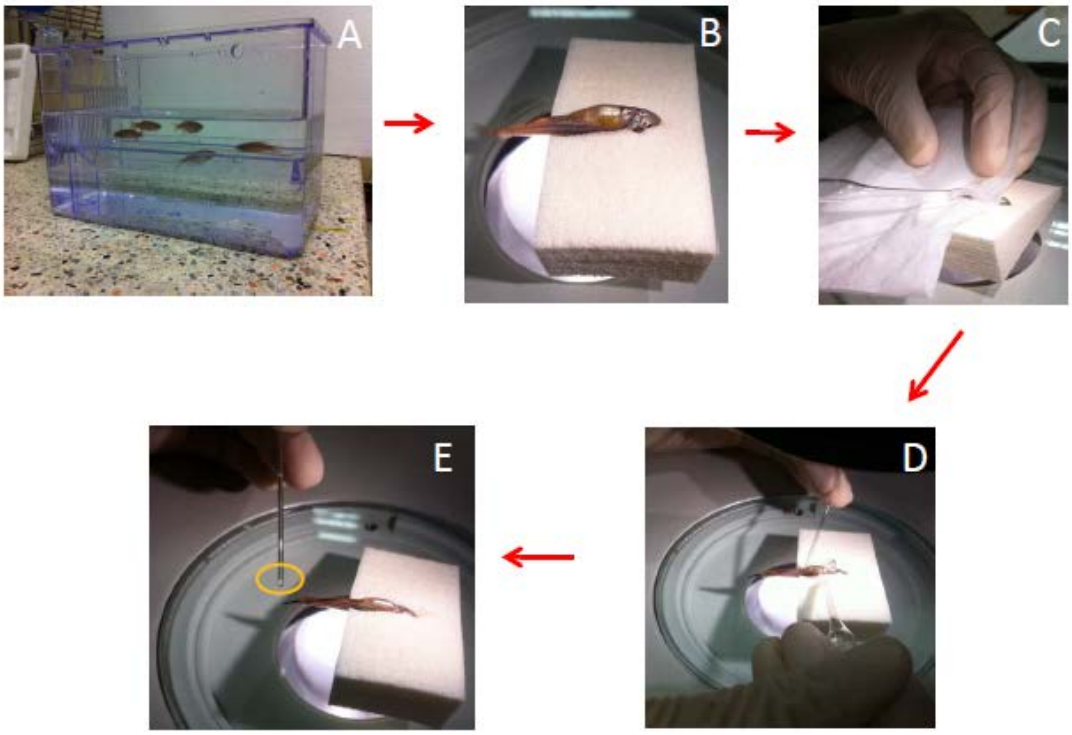
<u>รูปที่ 8</u> แสดงอุปกรณ์และวิธีการทำ embryonic injection ชุดอุปกรณ์ Micromanipulator ประกอบด้วยอุปกรณ์บังคับทิศทางการเคลื่อนไหวของเข็ม และอุปกรณ์ควบคุมการปล่อยและดูดสารจากปลายเข็ม โดยทำงานร่วมกับกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (A), Injection chamber ใช้การขึ้นรูป Agarose gel ให้มีช่องสำหรับวางเอมบริโอ (B)

3.6 การทำการปฏิสนธินอกตัว (*In vitro* fertilization)

การเตรียมเซลล์ตัวอ่อนเพื่อใช้ในการฉีดเอมบริโอ โดยใช้เอมบริโอที่ได้จากการปฏิสนธินอกตัว (IVF) เมื่อปลาเพศผู้และเมียมีความสมบูรณ์พันธุ์ดี คือมีการตกไข่ 100-200 ฟอง และมีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักเป็นตัวมากกว่า 80% จึงทำการรีดเก็บ oocyte และ sperm ประเมินคุณภาพของ oocyte ที่ได้ด้วยการดูลักษณะทางจุลกายวิภาคด้วย Stereomicroscope และตรวจคุณภาพของ sperm ที่ได้ โดยทดสอบการ activation ของ sperm หลังการเก็บแบบแช่เย็น แล้วจึงนำมาทำการปฏิสนธิภายนอกตัว และวัดอัตราการเกิดปฏิสนธิ ณ เวลาต่างๆ นับจากเวลาที่รีดเก็บ oocyte

การทำ *in vitro* fertilization ใช้เทคนิค Stripping technique (รูปที่ 9) ในการรีดเก็บ egg และ sperm จากปลาโตเต็มวัย ที่แสดงพฤติกรรมการผสมพันธุ์ ในกล่องผสมที่เตรียมไว้ และเป็นการฝึกความคุ้นเคยของปลากับกล่องผสมพันธุ์ เพื่อลดความเครียดในการถูกจับและเปลี่ยนสิ่งแวดล้อม หลังจากได้ egg และ sperm นำมาประเมินคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะของ egg ที่ดีจะต้องมีเยื่อหุ้มสมบูรณ์ ไม่ฉีกขาด, Yolk granule มีความละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) และเป็นสีเหลือง (yellowish) sperm จะต้องนำมาทดสอบระยะเวลาที่ sperm มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังจากถูกกระตุ้นด้วยน้ำ (hypotonic activation) sperm ควรจะเคลื่อนไหวทันทีที่เติมน้ำลงไป และเริ่มหยุดเคลื่อนไหวเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2-3 นาที

การปฏิสนธินอกตัวทำโดยการเตรียม semen 20 µl ไว้ในปิเปต และเตรียมน้ำประมาณ 500 µl (tank water) ไว้ในปิเปตอีกอันหนึ่ง ส่วน egg จะถูกบรรจุอยู่ใน Petri dish ใส่ sperm แล้วตามด้วยน้ำลงไปทันที ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จึงเติมน้ำลงไปเพิ่มอีก หลังจากนั้นบันทึกจำนวนตัวอ่อนที่มีการพัฒนาในแต่ละขั้นเปรียบเทียบกับผลการผสมพันธุ์ด้วยวิธีธรรมชาติ

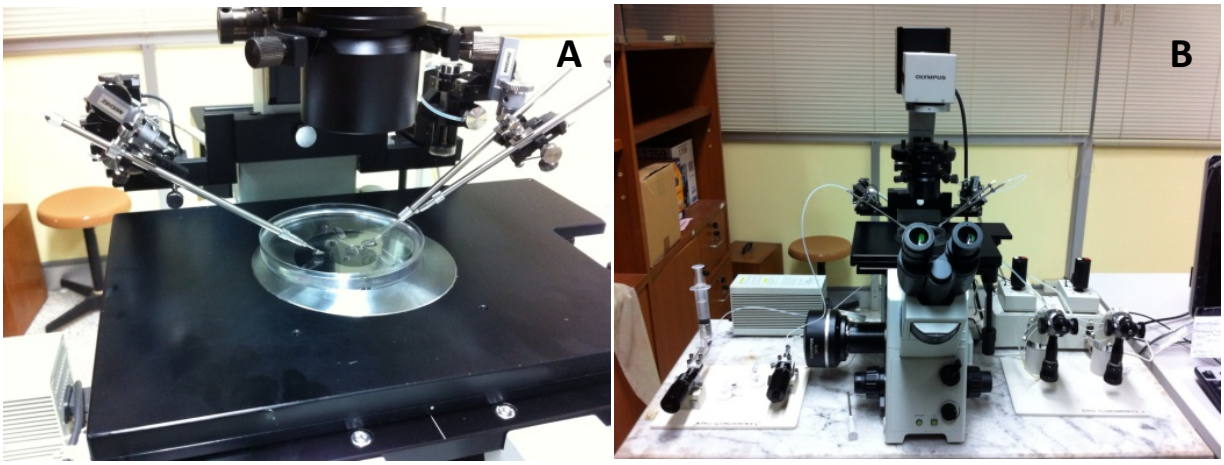


<u>รูปที่ 9</u> การรีดเก็บน้ำเชื้อจากปลาซีบร้าฟิชตัวผู้ ภาพ A = กล่องผสมพันธุ์ แบบที่มีพื้นเป็นตะแกรงเพื่อให้ตัวอ่อนหรือ oocyte หล่นลงไปยังพื้นกล่องด้านล่าง; ภาพ B = นำเพศผู้ที่มีพฤติกรรมการผสมพันธุ์ มาวางยาสลบโดยการแช่ใน Tricane (MS222) ผสมใน tank water อัตราส่วน 4% V/V แล้วนำมาวางในร่องที่ทำไว้ในฟองน้ำ; ภาพ C = ซับบริเวณท้องและด้านข้างของลำตัว รวมทั้งครีบท้อง ครีบหาง โดยใช้กระดาษ Kim wipes; ภาพ D = ใช้ Capillary tube ขนาด 5 µl เก็บน้ำเชื้อ โดยวางตรง genital opening แล้วใช้แท่งแก้วผิวเรียบโค้งมนกดเบาๆ ด้านข้างลำตัว พร้อมกับใช้นิ้วประคองด้านที่ตรงกันข้าม; ภาพ E = น้ำเชื้อที่ได้จะถูกนำไปเก็บใน Chilled Hank buffer saline แล้วแช่น้ำแข็ง

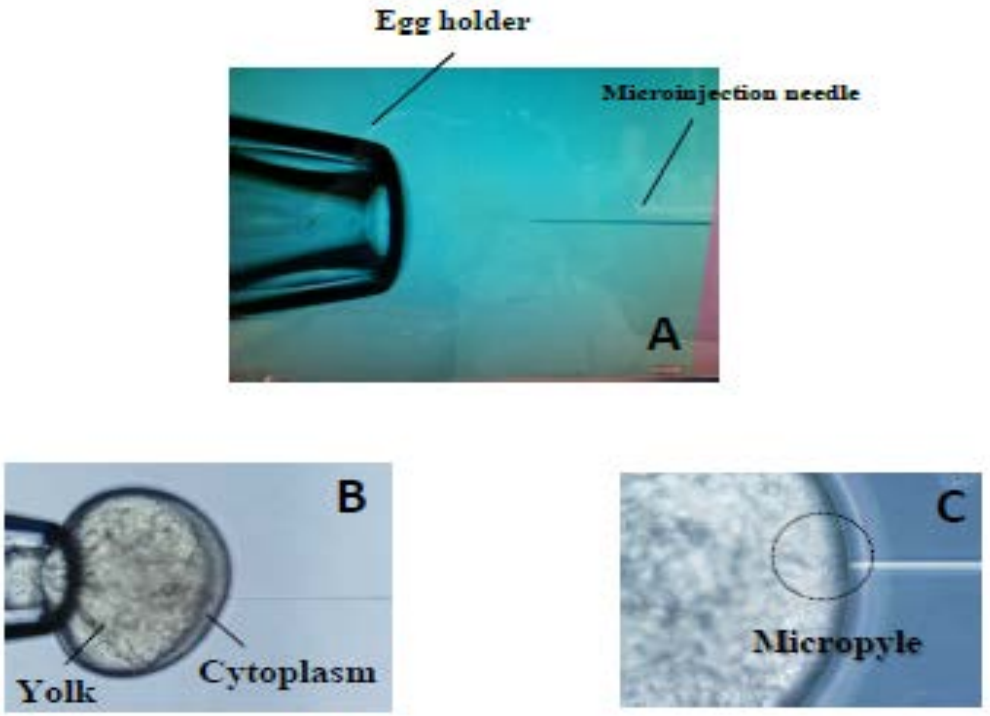
3.7 การเตรียมความพร้อมในการการถ่ายฝากนิวเคลียส (Microinjection)

การถ่ายฝากนิวเคลียสในขบวนการโคลนนิ่ง เข้าไปในส่วน cytoplasm ของ egg ในปลาซีบร้าฟิช ต้องฉีดผ่าน micropyle ซึ่งคือตำแหน่งที่เกิด sperm fusion วิธีการนี้ต้องใช้เครื่องมือในการฉีดที่จำเพาะ และใช้เข็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ปลายเข็มขนาด 6 μm องค์ประกอบอุปกรณ์ที่ต้องใช้ประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope, needle holder และอุปกรณ์บังคับการเคลื่อนไหวของเข็ม ทางห้องปฏิบัติการได้เตรียมความพร้อมในการทำโคลนนิ่งไว้เรียบร้อยแล้ว ดังแสดงในรูปที่ 10-12

<u>รูปที่ 10</u> ภาพการติดตั้ง Micromanipulation system เพื่อใช้ในการทำ Microinjection



<u>รูปที่ 11</u> ภาพการติดตั้ง Micromanipulation system เพื่อใช้ในการทำ Microinjection; ภาพ A แสดงการจัดวาง needle holder ทั้ง 3 ชิ้น โดยจัดให้ปลายเข็มวางกึ่งกลาง manipulation plate ซึ่งบรรจุ 5% PVP ใน CSOF สำหรับใส่ egg และ 1% PVP ใน LDF media สำหรับใส่ donor cell, ภาพ B แสดงการจัดวางชุดอุปกรณ์ทั้งหมด สำหรับทำ nuclear transfer



<u>รูปที่ 12</u> ภาพ Microscopic view ของการทำ Microinjection: ภาพ A = ติดตั้ง egg holder ทางซ้ายมือและ injection needle ทางขวามือให้อยู่ตรงข้ามกันและขนานกัน; ภาพ B = แสดงการฉีด egg ผ่านทาง micropyle; ภาพ C = ภาพขยายตำแหน่งของ micropyle

3.8 การทำ Non-enucleated nuclear transfer

เนื่องจากยังขาดเครื่องมือในการทำ Enucleation คือ Laser-equipped objective lens ที่ใช้ในการทำลายนิวเคลียสของไข่ปลา การทำ Non-enucleated nuclear transfer จึงเป็นสิ่งแรกที่จะทดสอบเทคนิค และวิธีการทำโคลนนิ่ง ว่าสามารถทำได้จริง ในห้องปฏิบัติการของประเทศไทย

3.8.1 การเตรียม Donor nucleus

Donor cell ที่ใช้คือ เซลล์หางของ embryo ในระยะ 12-16 somite ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งจะถูกเตรียมให้เจริญพัฒนาอยู่ในระยะที่เราต้องการในวันที่จะทำ nuclear transfer พอดี การเตรียม Donor cell โดยการตัดส่วนหางของ embryo และบดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปย่อยด้วย 0.025% trypsin นาน 5 นาที แล้วจึงเติม 5% fetal bovine serum (FBS) เพื่อยับยั้งปฏิกริยาของ trypsin จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วน supernatant ออก เติม 5% FBS และปั้นอีกครั้ง จากนั้นเมื่อได้ cell pellet จึงทำการ resuspend ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ LDF ที่ผสม Polyvinylpyrrolidone (PVP) ในอัตราส่วน 1% แล้วเก็บไว้ที่ 4°C ก่อนนำไปใช้

3.8.2 การเตรียม Recipient egg

ในวันก่อนวันทำ nuclear transfer เตรียมปลาเพศผู้และเมียไว้ในกล่องผสม ในเช้าของวันที่ทำ nuclear transfer หลังจากเตรียม donor cell แล้ว จึงปล่อยให้ปลาผสมพันธุ์กัน และนำ embryo ที่ได้มาตรวจนับอัตรา

การผสมติด เลือกคู่ปลาที่ได้อัตราการผสมติดสูงที่สุดมาใช้ โดยรีดเก็บไข่จากตัวเมีย เก็บไว้ใน Chinook salmon ovarian fluid (CSOF) (Siripattarapravat et al., 2009 – Gifted from Jose Cibelli, MSU) และวางไว้ใน moist chamber อุณหภูมิ 24-25°C

3.8.3 การเตรียม Manipulation setting

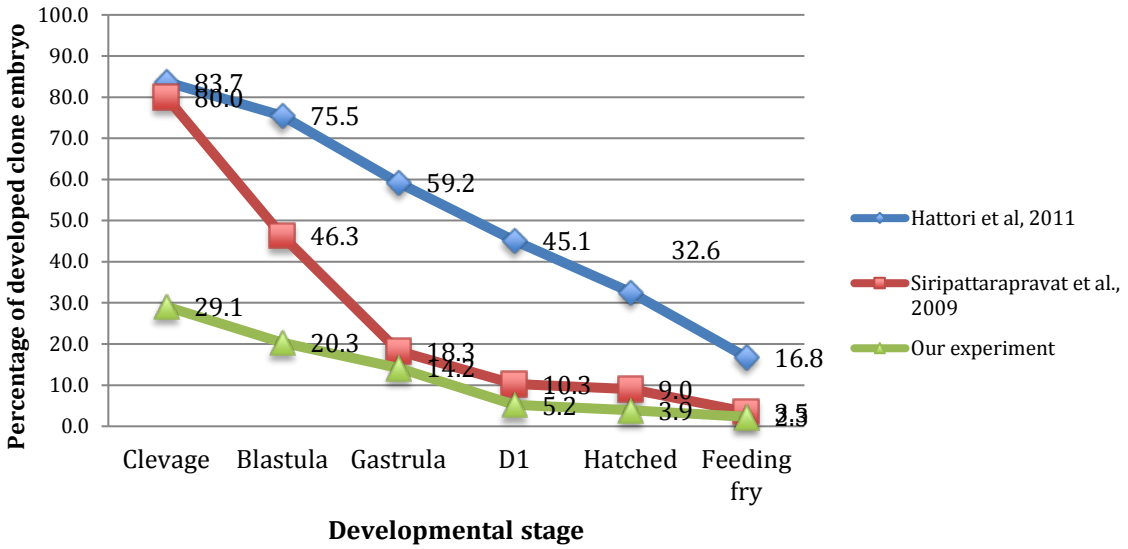
อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope, อุปกรณ์ยึดเข็มฉีด (needle holder) อุปกรณ์บังคับการเคลื่อนไหวของเข็ม (manipulator) และอุปกรณ์สำหรับควบคุมการฉีดสาร (injector) (รูปที่ 10-12) เข็มที่ใช้ฉีดมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ปลายเข็มขนาด 6 µm และเตรียม manipulation plate สำหรับบรรจุ egg และ cell ในขณะทำ nuclear transfer

3.8.4 การถ่ายฝากนิวเคลียสและการจัดการ Reconstructed eggs

การทำ nuclear transfer โดยการฉีด donor cell เข้าไปยัง cytoplasm ของ egg ผ่านทางรู micropyle หลังจากฉีด นำ reconstructed egg ไป incubate ใน COSF อีกเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปล้างใน 5% bovine serum albumin ใน HBSS แล้ว นำ reconstructed egg ไปทำการ activation ด้วย egg water และบันทึกจำนวน embryo ที่มีการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ

3.8.5 ผลการทำ Non-enucleated nuclear transfer

ผลการทำ Non-enucleated nuclear transfer ทั้งหมด 13 ครั้ง (ตารางที่ 1) รวมทั้งสิ้น 310 reconstructed eggs พบว่าอัตราการเจริญเติบโตโดยรวมของ embryo (รูปที่ 13) ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่เคยมีการรายงาน (Siripattarapravat et al., 2009, Hattori et al., 2011) มาก่อนหน้านี้ แต่เมื่อพิจารณาในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองพบว่าผลที่ได้มีความผันแปรสูง เช่น อัตราการพบ embryo ในระยะ blastula พบอยู่ในช่วง 8-40% และในระยะ Gastrula อยู่ในช่วง 0-28% ดังนั้นควรแก้ไข โดยควบคุมปัจจัยต่างๆ ในการทดลองแต่ละครั้งให้มีความสม่ำเสมอ ลูกปลาที่รอดชีวิตทั้งหมดเมื่อมีอายุได้ประมาณ 3-5 เดือน จะทำการแยกเลี้ยงเซลล์จากส่วนหาง เพื่อเช็ค DNA ploidy พร้อมทั้งทดสอบให้ผสมพันธุ์ เพื่อดูความสมบูรณ์พันธุ์



<u>รูปที่ 13</u> อัตราการพบ embryo ในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต คิดเป็นร้อยละเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้า (Siripattarapravat et al., 2009, Hattori et al., 2011)

ตารางที่ 1 ผลของ Non-enucleated nuclear transfer ทั้งหมด 13 ครั้ง, ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงจำนวน embryo ที่ได้ เมื่อคิดเป็นร้อยละจากจำนวน reconstructed eggs ทั้งหมด, hpa = hour post activation

Manipulation	Reconstructed eggs	Cleavage (2.5hpa)	Blastula (2.5-4.5hpa)	Gastrula (5.5-10hpa)	Segmentation (10.5-24hpa)	Hatching	Feeding fry
1	9	3	1	0	0	0	0
2	25	11	8	7	1	1	0
3	18	3	0	0	0	0	0
4	31	8	3	3	1	1	1
5	20	8	6	3	1	1	1
6	43	9	8	7	1	0	0
7	27	10	9	7	3	2	1
8	20	8	6	4	3	3	1
9	25	7	6	3	1	1	1
10	41	5	5	5	1	1	0
11	12	1	1	1	1	0	0
12	23	13	8	3	2	1	1
13	16	4	2	1	1	1	1
Total	**310**	**90(29)**	**63(20.3)**	**44(14.2)**	**16(5.2)**	**12(3.9)**	**7(2.3)**

3.9 การเลี้ยง Primary cells จากตัวอ่อนปลาซีบร้าฟิช และการทดสอบความไวต่อยา G418

3.9.1 ระบบการเลี้ยงเซลล์ปลาซีบร้าฟิชแบบไม่ใช้ CO2

เนื่องจากผู้วิจัยไม่สามารถหาตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ปลาชนิดตู้บ่มที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) ที่มีระบบควบคุมระดับคาร์บอนไดออกไซด์ได้ จึงทดลองเลี้ยงเซลล์ในอาหารชนิดที่ใส่ chemical buffer ชื่อ Hepes แทน โดยสูตรอาหารที่ทดลองใช้ชื่อ LDF media ประกอบด้วย L15, Ham's F12, และ DMEM ในอัตราส่วน 100:70:30 และเสริมด้วย 2mM N-acetyl-L-cysteine, 1mM L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate, 2% Trout serum, 10%Fetal bovine serum, และ Antibiotics ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่แยกได้จากตัวอ่อนปลาระยะ 15 somites สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้ และสามารถใช้เป็นวิธีการเลี้ยงในขั้นตอนต่อไปได้ วิธีการเตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์ทำโดยนำลูกปลาระยะ 15 somites มาฉีกถุงหุ้มตัวอ่อนออกด้วย Forceps ล้างตัวอ่อนด้วย PBS ที่มี 1x antibiotics จำนวน 5 รอบ และ dissociate ด้วยการปิเปตขึ้นลงเป็นจำนวน 30 ครั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด LDF เมื่อเลี้ยงได้ระยะเวลา 1 เดือน จะมีจำนวนเซลล์มากพอ (ประมาณ 2 ขวด T25) ที่จะใช้ในการทดลองต่อไป

3.9.2 การทดสอบความไวของเซลล์ปลาซีบร้าฟิชต่อยาต้านจุลชีพ G418 (G418 killing curve)

การทดสอบความไวของเซลล์ปลาซีบร้าฟิชต่อยาต้านจุลชีพ G418 มีความสำคัญในการกำหนดขนาดและระยะเวลาที่เซลล์จะได้รับยา ขนาดที่ให้นี้ไม่ควรทำให้เซลล์ตายเร็วเกินไป จนทำให้ปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิตไม่สามารถเติบโตต่อไปได้ จากการทดสอบเลี้ยงเซลล์ปลาที่ความเข้มข้นของ G418 ที่ต่างกัน และพบว่า เซลล์ที่แยกได้จากตัวอ่อนของปลาซีบร้าฟิชจะตายทั้งหมดในเวลาแตกต่างกันไปตามความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ G418 (ตารางที่ 2) ผู้วิจัยจึงใช้ความเข้มข้นของ G418 ในระดับ 1mg/ml ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 ความไวของเซลล์ตัวอ่อนปลาซีบร้าฟิช ต่อยาต้านจุลชีพ G418

ขนาดที่ทดสอบ (µg/ml)	จำนวนวันที่เซลล์ตาย (วัน)
800, 900, 1000	7-10 (all died)
550, 600, 700	10-12 (all died)
450, 500	14-15 (all died)
350, 400	18-20 (all died)
200, 250, 300	Still 30-50% confluency at d22
50, 150	Still 100% confluency at d22

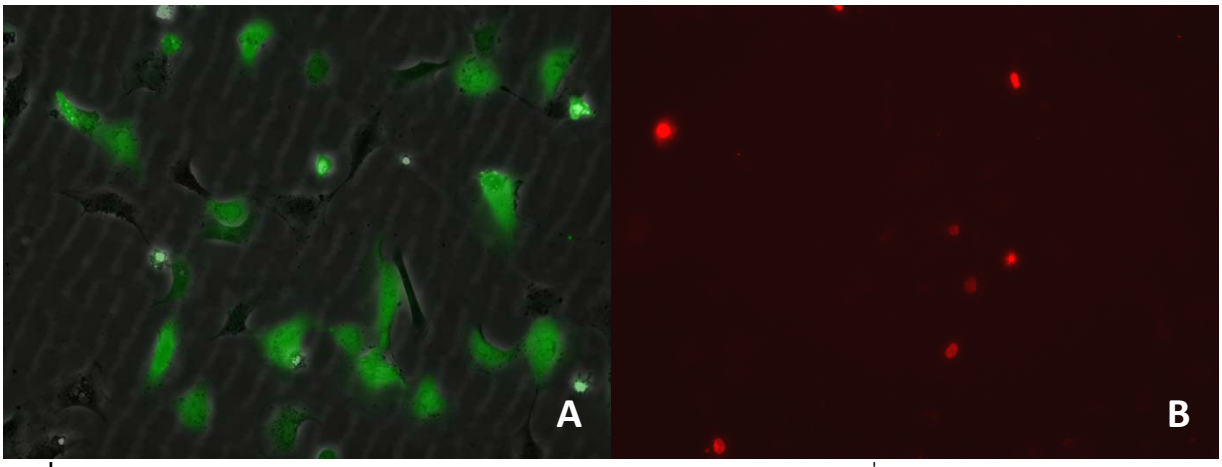
3.10. การผลิตเซลล์น๊อกอิน

3.10.1 การฉีดดีเอนเอ และ RNA ในตัวอ่อนปลาซีบร้าฟิชระยะ 1 เซลล์

นำ linearized plasmid และ in vitro transcribed ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 มาทดลองฉีดในไข่ของลูกปลาที่ได้จากการผสมพันธุ์แบบ IVF จากการทดลองฉีดพบว่า ลูกปลามีอัตรารอดเป็น 0% (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) จึงเปลี่ยนแผนการทดลองโดยการทำ transfection ใน culture cells แทน

3.10.2 การทำ Gene targeting ใน culture cells

ผู้วิจัยใช้วิธีการถ่ายยีนเข้าเซลล์โดย Amaxa nucleofactor kit V ด้วยโปรแกรม T-020 ซึ่งทดสอบแล้วให้ผลดีในการนำพลาสมิดที่มียีนเรืองแสงสีเขียว (pCS2-Green fluorescence protein) เข้าในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้จากตัวอ่อนปลา (รูปที่ 14)

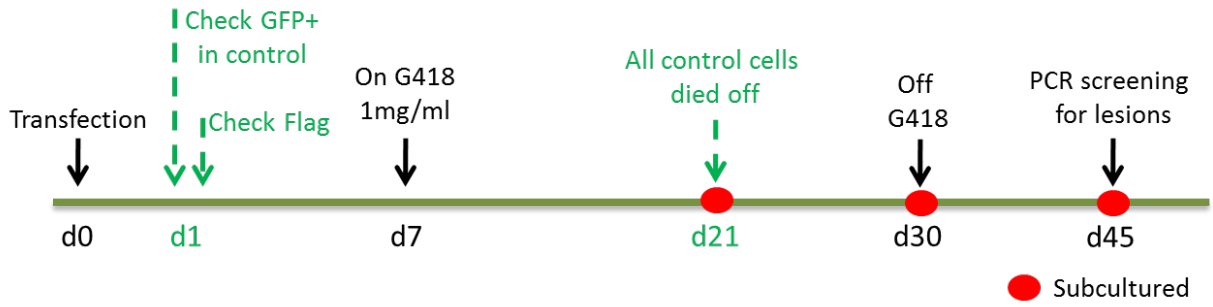


รูปที่ 14 ประสิทธิภาพของการทำ Transfection โดยใช้พลาสมิด pCS2-GFP ที่มี promoter ชนิดเดียวกันกับ Zinc finger nucleases ที่จะใช้ โดยความเข้มข้นของพลาสมิด7.5 µg ภาพถ่ายเมื่อ 1 วันหลังจาก transfection (A) และเมื่อตรวจสอบด้วย Flag antibody พบการแสดงออกของ Zinc finger nucleases (B)

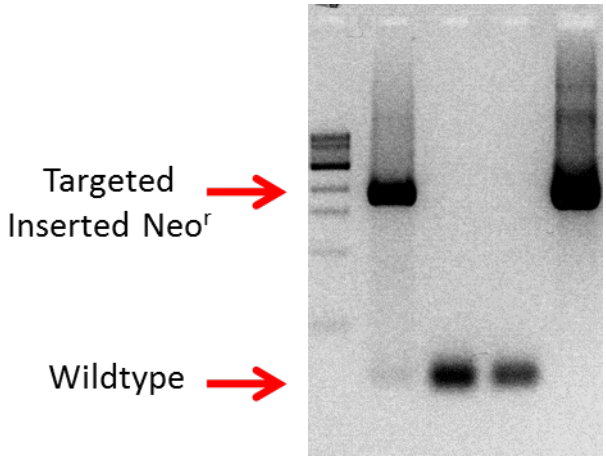
การทดลอง transfection โดยใช้ RNA นั้น ในวันรุ่งขึ้นไม่สามารถสังเกตเห็นสารเรืองแสง GFP ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นจึงใช้วิธีการ transfection เดียวกันนี้เพื่อถ่ายทอด Targeted DNA template และ พลาสมิดสำหรับ Zinc finger nucleases เข้าสู่เซลล์ ใช้ 7.5 µg ของพลาสมิด pCS2-5’ZFN และ pCS2-3’ZFN และ 5 µg ของlinearized/targeted DNA template dlx3b

หลังจาก transfection เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครึ่งหนึ่งในวันที่ 3 และ 5 จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาต้านจุลชีพ G418 ความเข้มข้น 1mg/ml ในวันที่ 7 และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาต้านจุลชีพทุก 3 วัน เลี้ยงต่อไปอีก 20 วัน จึงหยุดให้ยา เลี้ยงต่อไปจนครบ 45 วัน จึงนำเซลล์มาสกัดดีเอนเอ และทดสอบ lesion ในดีเอนเอด้วยวิธี PCR

เนื่องจากมีปริมาณเซลล์มาก (95% confluency) ในกลุ่มทดลอง จึงทำการ subculture และเก็บเซลล์แช่แข็งในวันที่ 21, 30, และ 45 วันหลังจากการทำ Transfection



<u>รูปที่ 15</u> Timeline ของการทดสอบเซลล์หลังจาก Transfection



<u>รูปที่ 16</u> การตรวจสอบเซลล์ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primers 2F – 3R; DNA ladder 1kb, Ln1 = Cells after G418 selection, Ln2-3 = Control cells (negative), Ln4 = Positive control (plasmid) พบว่าเซลล์มีทั้ง Targeted insert และ wildtype ในประชากรเซลล์ที่แยกเลี้ยงหลังผ่านการคัดเลือกด้วย G418

ทดสอบ lesion ในดีเอนเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ Primer 2F และ 3R (รูปที่ 3) พบว่า มีเซลล์ที่เกิดการซ่อมแซมดีเอนเอโดยใช้ Targeted DNA template ที่ให้ไป โดยจะพบ PCR products ขนาดใหญ่ขึ้น 2kb (insertion) ซึ่งแตกต่างจากขนาดของ wildtype gene ที่ amplified ได้จาก primers คู่นี้ แต่เมื่อทดสอบด้วย Primer 1F และ 4R ให้ผลเป็นลบ

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ผู้วิจัยสามารถสรุปผลการทดลองได้เป็นข้อย่อยได้ดังต่อไปนี้

4.1 ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการเตรียมความพร้อมสำหรับงานวิจัยทางด้านต่างๆ ดังนี้

- การเลี้ยงปลาซีบร้าฟิช ที่สามารถสืบพันธุ์ให้ลูกได้ โดยมีโคโลนีของปลาสายพันธุ์ Tuebingen, AB และลูกผสม Tu-AB ชื่อ TAB ที่มี reproductive soundness ที่ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็น inbred line
- เก็บไข่และสเปิร์ม เพื่อใช้ในการผสมแบบ In vitro fertilization ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- เซตระบบการฉีดสารเข้าตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- เซตระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด primary cell culture จากตัวอ่อนของปลา โดยปรับปรุงอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่ใช้ Hepes buffer ทดแทนการใช้ bicarbonate buffer ที่ต้องเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ และทำ G418 kill curve แล้วเสร็จ
- เซตระบบการทำ transfection ในเซลล์
- ทำการฉีดเซลล์เข้าไข่ปลาแบบ non-enucleation nuclear transfer (เนื่องจากขาด laser system ที่จะนำมาใช้ในการทำ laser-assisted ablation of egg genome

4.2 ผู้วิจัยไม่ประสบความสำเร็จในดำเนินการวิจัยต่อตามที่เสนอไว้ในข้อเสนอโครงการวิจัยดังนี้

- ไม่สามารถผลิตเซลล์น๊อกอินจากวิธีการที่เสนอ (การฉีดตัวอ่อนและคัดแยกเลี้ยงเซลล์จากตัวอ่อน) เนื่องจากพบความผิดปกติของตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดดีเอนเอ และอาร์เอนเอ คาดว่าเป็นผลมาจาก DTA gene ที่ใส่ไปเพื่อเป็น negative selection นั้นทำงานในเซลล์ของตัวอ่อน ทำให้เกิดพัฒนาการที่ผิดปกติ
- ไม่สามารถผลิตเซลล์น๊อกอินได้ด้วยวิธีการทำ transfection ทั้งนี้คาดว่าเนื่องจากอัตราการเกิด DNA repair ด้วยวิธี homologous recombination นั้นมีน้อย และวิธีการที่ใช้อาจจะไม่สมบูรณ์ที่สุด ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงรายละเอียดในแต่ละขบวนการให้เหมาะสมต่อไป
- ไม่ได้ดำเนินการทำ somatic cell nuclear transfer

4.3 ข้อเสนอแนะ

- ขณะนี้มีวิธีการทำให้เกิด lesion ในส่วน DNA ได้แก่ TALENs และ CRISPR/Cas9 ที่รายงานว่ามีความจำเพาะกว่า Zinc finger nucleases และมีการทดสอบแล้วว่าใช้ได้ผลในปลาซีบร้าฟิช ดังนั้นงานทดลองที่ผู้วิจัยทำโดยใช้ Zinc finger nucleases ที่มีประสิทธิภาพและความจำเพาะน้อยกว่า endonucleases ระบบใหม่ข้างต้น การทดลองขั้นต่อไปควรพิจารณาเปลี่ยนชนิดของ endonucleases ที่ใช้ทำให้เกิด lesion ในส่วนดีเอนเอ
- ปัญหาที่ผู้วิจัยประสบหลังจากได้รับทุนมากที่สุดคือ ความพร้อมของห้องปฏิบัติการ เนื่องจากผู้วิจัยมี mentor ที่เป็นคนต่างชาติ จึงมีความยากในการเซตห้องปฏิบัติการใหม่ขึ้นมาในประเทศไทย สิ่งที่ยากที่สุดคือกำหนดเวลาของบริษัทต่างๆนั้นยาวนานมาก ทำให้ต้องรอคอยทั้งช่าง และสารเคมี บางครั้งกินเวลาหลายเดือน
- ผู้วิจัยมีปัญหาสุขภาพเรื้อรัง ทำให้ไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้ต่อเนื่อง เป็นสาเหตุให้เกิดการสิ้นเปลืองทั้งสารเคมี และใช้ระยะเวลายาวนานกว่าจะดำเนินงานวิจัยแล้วเสร็จในแต่ละขั้นตอน

5. ภาคผนวก

5.1 เอกสารอ้างอิง

DOYON, Y., MCCAMMON, J.M., MILLER, J.C., FARAJI, F., NGO, C., KATIBAH, G.E., AMORA, R., HOCKING, T.D., ZHANG, L., REBAR, E.J. *et al.* (2008). Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26:702-8.

FAN, L., CRODIAN, J., XIANGYU, L., ALESTROM, A., ALESTROM, P. and COLLODI, P. (2004). Zebrafish Embryo Cells Remain Pluripotent and Germ-Line Competent for Multiple Passages in Culture. *Zebrafish* 1: 21-26.

MA, C., FAN, L., GANASSIN, R., BOLS, N. and COLLODI, P. (2001). Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2461-6.

MENG, X., NOYES, M.B., ZHU, L.J., LAWSON, N.D. and WOLFE, S.A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26: 695-701.

PEREZ, E.E., WANG, J., MILLER, J.C., JOUVENOT, Y., KIM, K.A., LIU, O., WANG, N., LEE, G., BARTSEVICH, V.V., LEE, Y.L. *et al.* (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26: 808-16.

SANTIAGO, Y., CHAN, E., LIU, P.Q., ORLANDO, S., ZHANG, L., URNOV, F.D., HOLMES, M.C., GUSCHIN, D., WAITE, A., MILLER, J.C. *et al.* (2008). Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5809-14.

SIRIPATTARAPRAVAT, K., PINMEE, B., VENTA, P.J., CHANG, C.C. and CIBELLI, J.B. (2009). Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. *Nat Methods* 6: 733-5.

URNOV, F.D., MILLER, J.C., LEE, Y.L., BEAUSEJOUR, C.M., ROCK, J.M., AUGUSTUS, S., JAMIESON, A.C., PORTEUS, M.H., GREGORY, P.D. and HOLMES, M.C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435:646-51.

WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J. and CAMPBELL, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-3.

HATTORI, M., HASHIMOTO, H., BUBENSHCHIKOVA, E., and WAKAMATSU, Y. (2011). Nuclear Transfer of Embryonic Cell Nuclei to Non-enucleated Eggs in Zebrafish, Danio rerio. The international Journal of Biochemistry & Cell Biology. 4: 460–468.

5.2 Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Siripattarapravat K, Prukudom S, Cibelli J. Method for somatic cell nuclear transfer in zebrafish. Methods Cell Biol. 2016;135:245-57. doi:10.1016/bs.mcb.2016.04.022. Epub 2016 May 24.

(เอกสารแนบท้ายรายงาน 1)

- การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

ได้นำเสนอผลงานในที่ประชุมนานาชาติ The 11th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society วันที่ 2-8 พฤศจิกายน 2557

(เอกสารแนบท้ายรายงาน 2)

- ผลงานตีพิมพ์ในหนังสือ Principles of Cloning, second edition

Chapter 16: Somatic Cell Nuclear Transfer in Zebrafish โดย Kannika Siripattarapravat, Boonya Pinmee, and Jose Cibelli ตีพิมพ์ในหนังสือ Principles of Cloning, 2nd Edition (Print book ISBN 9780123865410), Release Date: 28 Oct 2013, Pages 197-208.

(เอกสารแนบท้ายรายงาน 3)

- การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ – เชิงวิชาการ

ได้มีการนำส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยนี้ ไปใช้ในการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษา และสร้างนักวิจัย (นิสิตระดับปริญญาเอก) ให้สามารถทำงานโคลนนิ่งปลาได้เพิ่มอีก 1 คน ขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนรอตีพิมพ์ผลงานวิทยานิพนธ์เพื่อจบการศึกษา

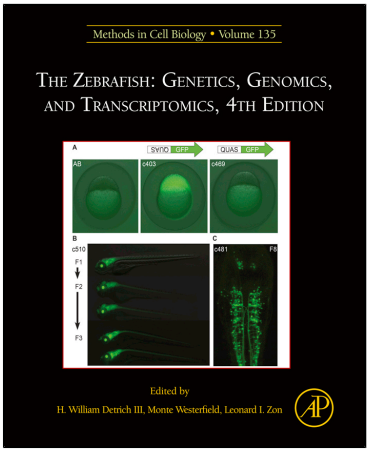
เอกสารแนบท้ายรายงาน 1

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Author's personal copy

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

This chapter was originally published in the book *The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Transcriptomics, Volume 135*. The copy attached is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research, and educational use. This includes without limitation use in instruction at your institution, distribution to specific colleagues, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:
http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial

From Siripattarapravat, K., Prukudom, S., & Cibelli, J. (2016). Method for somatic cell nuclear transfer in zebrafish. In H. W. Detrich, III, M. Westerfield, & L. I. Zon (Eds.),*The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Transcriptomics* (pp. 245–257).
ISBN: 9780128034743
Copyright © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.
Academic Press

Author's personal copy

CHAPTER

Method for somatic cell nuclear transfer in zebrafish

12

K. Siripattarapravat[*,¶], **S. Prukudom**[*,¶], **J. Cibelli**[||,#,1]

*Kasetsart University, Bangkok, Thailand

¶Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand

||Michigan State University, East Lansing, MI, United States

#BIONAND, Andalucía, Spain

[1]Corresponding author: E-mail: cibelli@anr.msu.edu

CHAPTER OUTLINE

Introduction **246**
1. Materials **246**
2. Method **251**
2.1 Fish Breeding 251
2.2 Preparation of Reagents 252
2.3 Set up the Micromanipulator 252
2.4 Egg Collection 253
2.5 Donor Cell Preparation 254
2.6 Micromanipulation 254
2.7 Activation of Reconstructed Eggs 255
2.8 In Vitro Fertilization at the End of the Somatic Cell Nuclear Transfer Procedure 256
2.9 Confirmation That a "Clone" Is a Real Clone 256
Acknowledgments **256**
References **257**

Abstract

This chapter presents a detailed methodology for somatic cell nuclear transfer—cloning of zebrafish. We aim to place the reader in a virtual lab experience to assist acquisition of the technical skills required for reproducing the published protocol. All materials, including catalog numbers for reagents and techniques for their preparation, are provided. Our protocols describe laser inactivation of egg chromosomes, the transfer of a cell through the oocyte micropyle, and spontaneous activation of the reconstructed embryo. High-quality eggs are the key to cloning success, and Chinook salmon ovarian fluid is

Methods in Cell Biology, Volume 135, ISSN 0091-679X, http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.04.022
© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Transcriptomics, Fourth Edition, 2016, 245–257

Author's personal copy

indispensable for keeping eggs arrested at the metaphase of meiosis II. This protocol continues to be refined by our laboratory. However, naive investigators should be able to apply it in its present form to generate cloned zebrafish.

INTRODUCTION

Since our first publication on somatic cell nuclear transfer (SCNT) in zebrafish (*Danio rerio*) in 2009, we have been able to refine the technique as reported in 2010 (Siripattarapravat et al., 2010; Siripattarapravat, Pinmee, Venta, Chang, & Cibelli, 2009) and later in two book chapters that followed (Siripattarapravat & Cibelli, 2011; Siripattarapravat, Pinmee, & Cibelli, 2013). In this article, we attempt to describe SCNT as if the reader is not familiar with the methodological steps, and we are adding the latest refinements as of December 2014. However, the major steps of zebrafish SCNT (also called cloning throughout this chapter) remain unchanged and we recommend the reader to review our 2009 publication.

The technique of cloning itself is an acquired skill that requires as much practice as patience. We usually remind students that one of the most important features of a successful "cloner" is the capacity to rebound quickly from failure, since there is not a single cloning session in which even the most skilled technician will not experience it. The work must be performed in a semi-dark room, and all the motor skills required (both hands and both feet) must be practiced to the point that muscle memory will free the technician's mind to make determinations as to which somatic cell is the best to use, which is the best oocyte to enucleate, when is it necessary to change needles, and even when is the time to take a break. Sessions last from 2 to 4 h depending on the number of reconstructed embryos. We recommend having two people working in tandem, with one person enucleating the oocytes and the other transferring the cell. It is fair to say that we are still far from knowing the best approaches to obtaining the largest number of viable clones. Nonetheless, if applied as here described, clones can be successfully generated, thereby enabling the experimenter to begin to answer some of the most fascinating questions regarding embryonic development, cellular differentiation, nuclear reprogramming, and aging.

1. MATERIALS

1. Hank's balance salt solution (HBSS).

1.1 HBSS

HBSS is prepared from Hank's balanced salt, with Ca^{2+} and Mg^{2+} (Cat no. B2261, Sigma), according to the manufacturer's instructions and kept at 4°C.

1.2 HBSS with 0.5% (w/v) bovine serum albumin (H-BSA, Cat no. A8806, Sigma).

H-BSA is prepared, filtered, aliquoted into 5-mL tubes, and kept at −80°C until use.

Author's personal copy

2. Chinook salmon ovarian fluid (CSOF).
We have described extensively the process of CSOF collection in our previous publication (Siripattarapravat & Cibelli, 2011). We have access to Chinook salmon through the Michigan Department of Natural Resources at the Little Manistee River weir. Ovarian fluid surrounds matured oocytes in oviducts of gravid salmonids. Any technique for collection of CSOF free of contaminants (ie, water or fecal material) should work. We generally squeeze healthy females to obtain eggs and the fluid simultaneously. CSOF is separated from eggs using a strainer and kept on ice until processing. We recommend using the same batch of CSOF for all CSOF-based solutions to be used in one cloning session.
   2.1 Filtered CSOF.
   The largest bottle top-filter unit with a 0.22 μm filter (Cat no. 431098, Corning) is generally used. Only small volumes of CSOF are filtered at a time. Filtered CSOF must be kept on ice throughout this step. Aliquots of filtered CSOF, 10 mL, are stored at −80°C until use.
   2.2 CSOF with 5% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP, Cat no. P0930, Sigma).
   PVP is difficult to dissolve in CSOF. We recommend adding the PVP on top of CSOF and placing it overnight at 4°C. By the next morning the PVP should be dissolved. Homogenize the solution using a vortex at low speed, make 1-mL aliquots, and store them at −20°C until use.
   2.3 CSOF with 50 μg/mL bis-benzimide Hoechst 33342 trihydrochloride (H33342, Cat no. B2261, Sigma).
   H33342 is prepared as a 1000X stock solution (50 mg/mL of H33342 in HBSS). When needed for staining, add 1 μL of stock solution to 1 mL of CSOF, and vortex. Be aware that there might be a precipitate in the final solution that could affect the final concentration of H33342.
3. Reagents for preparation of donor cells.
   3.1 Laboratory of Human Carcinogenesis (LHC) basal media (Cat no. 12677, Gibco), kept at 4°C.
   3.2 TrypLE express (Cat no. 12604, Gibco), kept at 4°C.
   3.3 1%(w/v) PVP in serum-free growth medium, kept at 4°C.
   Growth medium is prepared using a base solution of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (Cat no. 11995-065, Gibco), supplemented with 2 mM N-acetyl-L-cysteine (Cat no. A9165, Sigma), 1 μM L-ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (Cat no. A8960, Sigma), 10 ng/mL bovine insulin (Cat no. 128-100, Cell Applications), 5% fetal bovine serum, and 1% Trout serum (SeaGrow, Cat no. JJ80, EastCoast Bio).
4. Embryo medium.
Embryo medium is prepared as described by the Zebrafish book (Westerfield, 2000) using full-strength Hank's balanced salt solution (Cat no. H1387, Sigma) as a 10X stock. Filter the stock with bottle top-filter unit 0.22 μm (Cat no. 431098, Corning) and keep at 4°C. When needed, dilute 10X stock solution with distilled water and keep it at room temperature. Adjust the pH to 7.2 with a few drops of 1 M NaOH.

Author's personal copy

5. Setup for micromanipulation.

5.1 Inverted microscope.

We use an ultraviolet (UV) phase contrast inverted microscope equipped with 4× and 20× objective lenses, and a 40× objective lens equipped with a laser-drilling system. Our experience is limited to the Xyclone system (RED-i class 1 laser product, Hamilton Thorne), but other systems that have been used to drill the zona pellucida for in vitro fertilization (IVF) should work. For practical purposes, we recommend footswitches to operate both the UV shutter and the laser-drilling system. The diaphragm of the UV light source must be set to the smallest diameter to limit exposure of the egg to UV light.

5.2 Micromanipulators.

Any micromanipulator set that allows fine control of the glass pipettes at 40× magnification, such as those used for cloning in other species or for human intracytoplasmic sperm injection (ICSI) can be used. In this case, Narishige hydraulic (Cat no. 202ND) or Eppendorf electronic manipulators work well for zebrafish SCNT.

5.3 Microinjectors.

Our preference is to use CellTram Air (Cat no. 5176000017, Eppendorf) for the egg holder and CellTram vario (Cat no. 5176000033, Eppendorf) using oil for the cell transfer needle. The "supporting needle" does not require a connection to a microinjector.

6. Holder, supporting, and injection needles.

We custom-make our holder and supporting needles in our laboratory. For "home made" needles we use borosilicate glass pipettes with an outside diameter of 1 mm and an inside diameter at approximately 0.58 mm (Cat no. B100-58-10, Sutter Instrument Company). For the sake of consistency, we purchase injection needles from Sutter Instrument Company.

6.1 Preparation of holder needle (Fig. 1).

Use a glass pipette puller (Cat no. P-2000, Sutter Instrument Company) to pull the glass microtube and then cut the tip to a diameter of approximately 300 μm with a diamond cutter. Dip the cut edge in distilled water and sand it with fine (No. 600) and extrafine (No. 2000) silicon carbide sandpaper. Observe the polished edge under a microscope and continue sanding until a straight and smooth cut with approximately 500 μm outside diameter is obtained. Wash the needle tip thoroughly with distilled water and absolute ethanol to remove any debris. Dry the needle and fire-polish its tip to smooth sharp edges. Bend the needle approximately 8 mm from the tip using a flame. The desired angle is 25–30 degrees.

6.2 Supporting needle preparation (Fig. 2).

Pull a glass pipette as described earlier and use a Microforge (Cat no. MF-900, Narishige) to cut the tip at an outside diameter of 20 μm. Fuse the tip of the needle by heating.

6.3 Injection–cell transfer–needle.

Author's personal copy

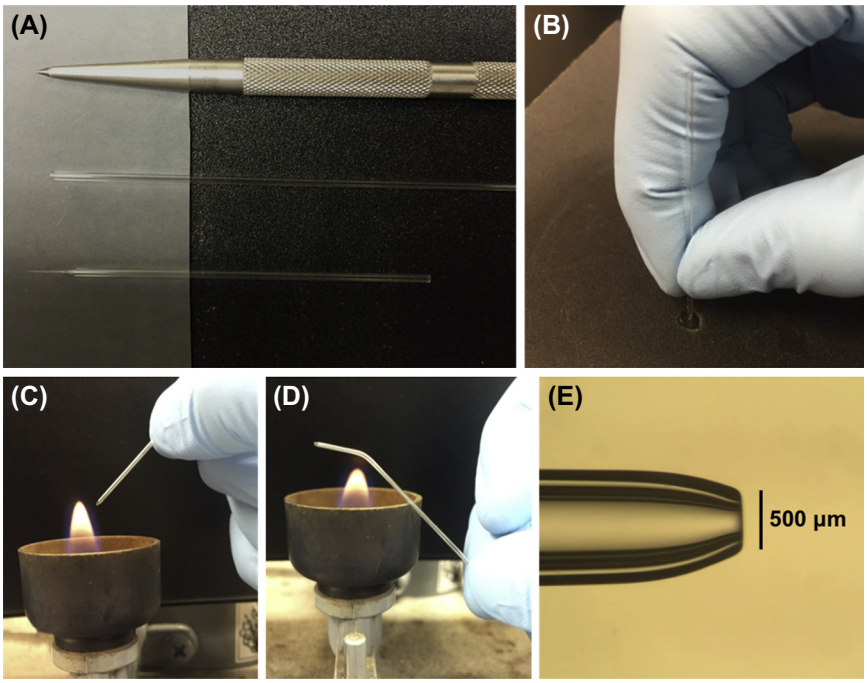


FIGURE 1

Glass holder preparation steps. (A) Fine sandpaper (black), extrafine sandpaper (gray), diamond cutter, glass microtube, and pulled glass needle; (B) polishing edges of the glass needle with sandpapers; (C) fire-polishing edges; (D) bending to get 25–30 degrees angle; and (E) close-up of the 500 μm outside diameter holder needle tip.

We recommend purchasing ICSI needles used with human sperm injections. Depending on the size range of the donor cells, ICSI needles with an inner diameter of 6–10 μm and bent at 20 degrees are most useful. We have successfully used needles from European (Cat no. BM100T-15, Biomedical instrument), Australian (Ref no. LISR, The pipette company), and US companies (Cat no. MIC-50-20, MIC-8-20, and MIC-9-20, Origio).

7. Glass pipettes.

7.1 Microdispenser.

We use the microdispenser to transfer MII eggs (arrested in the metaphase of meiosis II) in and out of a manipulation drop, ie, the place where eggs are enucleated and cells are transferred. The Drummond microdispenser of 20 μL fixed volume (Cat no. 3-000-320) works perfectly for zebrafish MII eggs. The glass capillary of the microdispenser must be fire-polished to smooth any sharp edges prior to use.

7.2 Glass Pasteur pipettes with rubber bulbs.

Author's personal copy

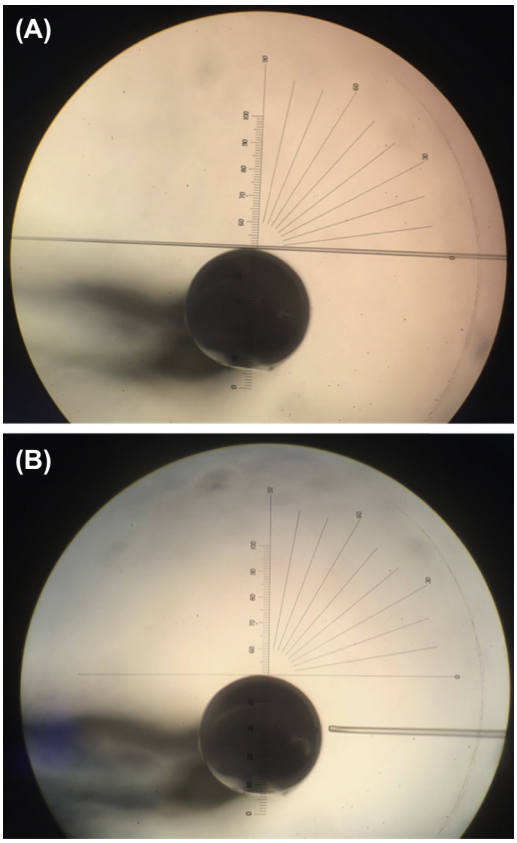


FIGURE 2

Supporting needle preparation steps. (A) Cutting pulled glass needle with heat at the point of 20 μm outside diameter and (B) heating the tip until smoothly closed.

Nine-inch glass Pasteur pipettes (Cat no. 14672-380, VWR) are cut and fire-polished to reduce their internal tip diameters to approximately 2 mm. These pipettes are used for transferring eggs and embryos between different solutions at low power under a stereomicroscope.

8. Miscellaneous items.

- **8.1** Stereomicroscope.
- **8.2** Warm plate and incubator, set at 28.5°C.
- **8.3** Mineral oil (Cat no. M8410, Sigma).
- **8.4** Fluorinert (Cat no. F9755, Sigma).
- **8.5** Glass rod for squeezing female and male fish.
- **8.6** Kimwipes (Cat no. 06-666A).
- **8.7** Dark-moist chamber.

Author's personal copy

8.8 Falcon plastic dishes, noncoated, 35 × 10 mm (Cat no. 351,008), 60 × 15 mm (Cat no. 351007), and 100 × 15 mm (Falcon, Cat no. 351,029).
8.9 Cosmetic sponge with slit and glass microcapillary for milt collection.
8.10 MS222 (Cat no. A5040, Sigma) (Westerfield, 2000).
8.11 Fish breeding box. Any breeding apparatus that allows a single mating pair setting can be used.

Remarks: Unless otherwise indicated, all procedures are carried out at room temperature (23°C).

2. METHOD

We summarize the process below in chronological order.

2.1 FISH BREEDING

We have found that the single most important factor determining the success of zebrafish SCNT is egg quality. Assuming that you are working with the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC)-approved animal facility and are working under the animal husbandry conditions described by the zebrafish book (Westerfield, 2000), we also recommend the following animal care steps. Breeder fish should be fed three times daily, at least twice with live hatched brine shrimp (atremia) and once with supplements such as cyclops, worms, and spirulina. Use eggs from 6- to 15-month-old females of an outbred line such as TAB (F1 cross between Tübingen and AB). Select male/female pairs that breed well in a breeding apparatus and monitor the quality of eggs (as measured by percentage of fertilized embryos). Other characteristics of good breeders include bright skin coloration—golden/black stripes for males and silver/black stripes for females. Females should be allowed to breed regularly every 5–7 days and should ideally yield fertilization rates >90%.

Late afternoon on the day before cloning, prepare approximately 10 breeding pairs, which should be sufficient to obtain, at minimum, 60 to 70 high-quality but unfertilized, eggs for each individual who will perform SCNT the following day. The male and female must be kept in a breeding tank but separated by a screen to avoid premature mating.

On the morning of the cloning procedure, immediately after the room light comes on, remove the screen separating the male and female in each breeding tank, working with two or three tanks at a time. Continuously observe the mating behavior of each pair. Typically, the male will chase a gravid female and, if the courting is successful, she will lay eggs multiple times. After the female releases eggs a couple of times, remove the male from the tank. Prepare the inverted microscope and the micromanipulation tools. Then proceed with the collection of eggs not yet released by each female (squeezing).

Author's personal copy

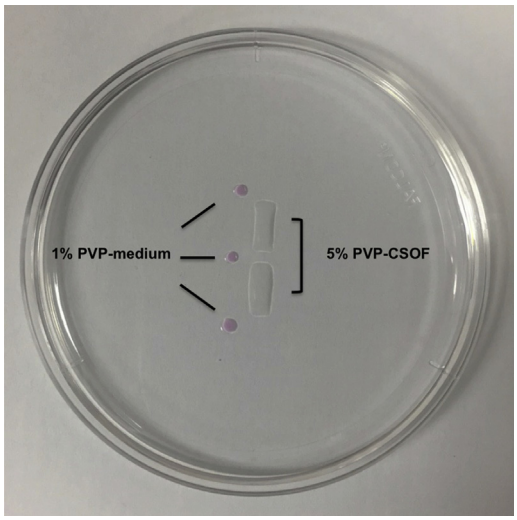


FIGURE 3

Typical setting of the manipulation drops under mineral oil.

2.2 PREPARATION OF REAGENTS

Once you know that you have at least one female able to provide matured eggs, thaw your stock solutions and CSOF. Most of reagents can be thawed in a water-bath at room temperature including filtered CSOF, 5% PVP in CSOF, H-BSA, and MS222. The egg staining solution is freshly prepared at this point by adding 1 μL of stock H33342 to 1 mL of CSOF, vortexing, and storing in the dark until use. Keep the remaining CSOF for egg collection and washing solution. Prepare the manipulation drops—two middle drops of 5% PVP-CSOF, and three left-side drops of 1% PVP media—then overlay these drops with mineral oil (Fig. 3).

2.3 SET UP THE MICROMANIPULATOR

Test the laser beam and adjust its target alignment prior to setting the glass needles. To test the laser, mark a glass coverslip with a black, erasable-ink marker and place it on a 100 × 15 mm petri dish, thereby emulating the distance between the laser and an egg's chromosomes. When the laser is properly adjusted, the laser pulse will produce a small hole in the black ink.

Connect the egg-holder needle to the CellTram pneumatic microinjector and position the needle within the field of view of the microscope using the 4× objective. The holder needle should be positioned on the left side at 9 o'clock. Fill the injection-cell transfer needle with fluorinert (Cat no. F9755, Sigma) and connect it to the oil-filled CellTram vario. The injection needle should be on the right side of the field of view, at 3 o'clock. The supporting needle must be set almost parallel with the injection needle, somewhere between 2 and 3 o'clock within the field of view (Fig. 4).

Author's personal copy

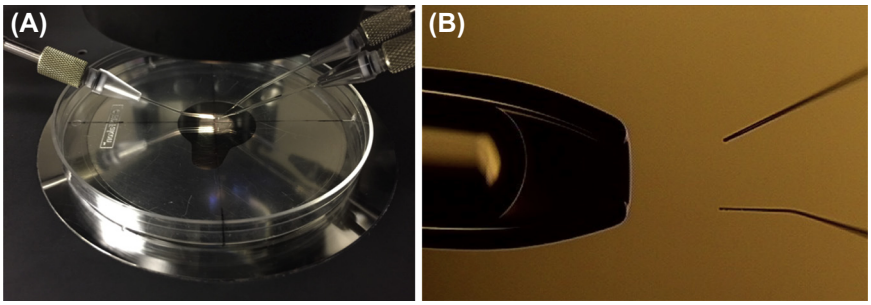


FIGURE 4

Setting of glass needles used for micromanipulation. (A) Stage view showing holder needle on the left and injection and supporting needles on the right and (B) microscopic view of the needles described in (A) at 4×.

2.4 EGG COLLECTION

Return to the breeding tanks to determine whether the eggs that were released by each female are fertilized and developing. At this point in time, they should be at the two-cell stage. The best quality eggs should have a fertilization rate close to 100%. These observations determine the female(s) that you are going to squeeze.

Prepare MS222 according to the Zebrafish book (Westerfield, 2000). Place 1 mL of CSOF in a 35 × 10 mm petri dish and set it aside for egg collection. Place female fish in the MS222 bath until fully anesthetized. As soon as slow movement of gills and fins is observed, rinse each female briefly in fish water and place her on a Kimwipe towelette. Hold the fish gently and belly-up in the folded Kimwipe with the mid-body between your thumb and middle finger. Dry the posterior part of the body (including pelvic fin, anal fin, dorsal fin, and caudal fin) with another Kimwipe to remove residual water that will prematurely activate the eggs. Position the female over the edge of the 35 mm petri dish in such a way that the genital opening is almost touching the CSOF and squeeze the female's abdomen gently with a glass rod to release eggs into the CSOF. Make a small caudal fin biopsy while the female is under anesthesia and then place her in fish water until she fully recovers. The section of fin that was removed should be kept frozen at −20°C for DNA analysis. Place breeders that have shed milt or eggs together in an isolation tank and leave them undisturbed for at least four weeks. After this period they can again be used as donors.

The unfertilized eggs that were collected by squeezing females should be at the MII stage of meiosis. High-quality eggs will appear yellowish and uniformly agranular, and their chorions will be intact and in direct contact with the cell membrane of the egg. If you observe eggs that have granular cytoplasm and/or have detached chorions, we recommended that you discard the batch, even if good quality eggs are present. Assuming that you obtain good eggs, carefully move them to the H33342 staining solution using a glass Pasteur pipette and rubber bulb. Avoid carryover of excess CSOF when moving the eggs since it will dilute the staining solution. Let

Author's personal copy

the eggs settle in the H33342 solution by gravity. Place the 35-mm dish with the eggs in a dark-moist chamber at room temperature for 20 min. Finally, transfer eggs to 2.5 mL of CSOF in a 35-mm petri dish and place them in the humidified, dark chamber until use.

Note: It is important to use the H33342 product described in the Section 1 (Cat no. B2261, Sigma). If you have difficulty obtaining a strong DNA signal, consider remaking the stock solution according to the solubility reported in the H33342 specification sheet.

2.5 DONOR CELL PREPARATION

Prepare the donor somatic cells while eggs are in the H33342 solution (20 min). Donor cells can be obtained both from embryonic tissue and from cultured cells. Mechanical dissociation is best suited for embryos at early stages (<24 h postfertilization; hpf). Use TrypLE express to dissociate cultured cells or to release cells from embryos beyond 24 hpf. Use LHC medium to inactivate the enzymes. Wash cells prior to centrifugation at 3500 rpm for 3 min using growth medium (DMEM) and resuspend the cells in a solution of 1% PVP in serum-depleted growth medium.

2.6 MICROMANIPULATION

The zebrafish egg is approximately 800 μm in diameter, much bigger than a human or bovine egg (~120 μm), and manipulating it under an inverted microscope requires some modifications from the conventional setup for mammalian species. In addition to a larger egg holder needle in the left manipulator, two parallel needles—the supporting needle and the injection-cell transfer needle—are needed in the right manipulator. The two needles in the left manipulator resemble a pair of chopsticks at a fixed angle. The holder needle, injection-transfer needle, and supporting needle enable you to control the rotation of the egg in all directions.

Transfer stained eggs to the manipulation drop containing 5% PVP in CSOF using the microdispenser. The goal is to maneuver the egg with the "chopsticks" to position the micropyle (sperm entry site) at the bottom of the petri dish. The micropyle also indicates the region where the egg's chromosomes are located, usually within 10–20 μm in any direction. Once the desired position is achieved, the egg is secured in place using suction from the holder needle on the left. The PVP in the manipulation drop slows movement of the egg.

To perform the laser-assisted enucleation, the operator first positions the micropyle at the bottom of the petri dish using the 4× objective and UV illumination. In this position, the stained metaphase plate is obvious, and the laser beam is more effective. After aligning the micropyle, switch to the 40× objective equipped with the laser. Identify the metaphase plate (ie, the oocytes chromosomes) using only a few seconds of UV exposure, then trigger the laser. This step requires some practice because the left joystick, which controls the egg holder and thus the movements of the micropyle, must be moved very slowly to re-align the metaphase plate under the

Author's personal copy

laser's target zone without losing grip on the egg and without exposing the egg to excessive UV light. At maximum power, the laser beam will raise the temperature at the center of the target to 400°C. With the Hamilton Thorne laser system, we recommend using 100% power and delivering two consecutive pulses of 500 μs each aimed directly at the metaphase plate. Depending upon the dexterity of the operator, one can perform 5 to 10 enucleations at a time (1 min per egg) before moving to the next step, cell injection.

To inject the somatic cell, the micropyle must be positioned in the equatorial region at 3 o'clock in the field of view in direct alignment with the transfer needle. The donor cell is delivered through the micropyle to minimize an injury to the recipient egg and to limit the injection volume. At the sperm entry site, the micropyle coincides with the region where the animal pole will develop. The micropyle is shaped as a funnel with the larger opening facing the outside of the egg. At its smallest, the micropylar pit accommodates only a single sperm. Since the pit is small, one should break the donor cell membrane using the injection-cell transfer needle. Chose a single donor cell, break its plasma membrane, and transfer the broken cell to the enucleated oocyte. Using a broken cell rather than a naked nucleus helps prevent clogging the transfer needle.

The alignment of the egg for cell injection is important. The micropyle should be positioned using the 4× objective in the equatorial region at 3 o'clock facing the injection needle. Secure the egg using gentle suction on the holder needle. Switching to the 20× objective, confirm that you can see the whole shape of the micropyle as if you are looking at a longitudinal cut of the funnel, from the largest opening to the smallest. Lock your focus point and bring into the same focal plane the injection needle, with the broken cell already loaded. Use the *z*-axis joystick control to move the needle into position near the micropyle. Then, and only then, attempt to go through the micropyle. Do not use excessive force; too much resistance indicates that you have not aligned the injection needle with the longitudinal axis of the funnel. If you encounter this problem, release the suction on the egg holder needle, return to the 4× objective, and reposition the micropyle to establish better longitudinal alignment of the micropyle with respect to the injection needle. Returning to the 20× objective, re-attempt to insert the injection needle into the micropyle. Successful insertion is recognized by the absence of resistance as the needle penetrates the egg cytosol. Inject the smallest amount of medium that guarantees delivery of the cell into the egg. Due to the lack of transparency of zebrafish eggs, the release of the somatic cell into the cytosol cannot be seen. You must rely upon visual observation of the distance traveled within the injection needle by the meniscus formed at the fluorinert/manipulation medium interface. Once you have determined that the donor cell has been transferred, gently remove the injection needle.

2.7 ACTIVATION OF RECONSTRUCTED EGGS

Rinse the reconstructed eggs twice using CSOF and incubate them for 15 min at room temperature in a dark-moist chamber. Immediately prior to activation of the

Author's personal copy

egg, rinse the reconstructed eggs twice with H-BSA, then transfer them into embryo medium, and place them in a 28°C incubator. Monitoring and recording of the development is done daily throughout the development phase until they are moved to the conventional fish tanks. It is important to remove all embryos that show signs of abnormal or no development. Alternatively, one may move healthy embryos to fresh embryo medium each time development is monitored.

2.8 IN VITRO FERTILIZATION AT THE END OF THE SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER PROCEDURE

We described previously the method for determination of egg quality via natural fertilization while eggs were squeezed from the donor female for SCNT. An equally important control is to perform IVF on unused eggs from the same SCNT batch. This should be done at the end of the SCNT procedure to ascertain whether the squeezed eggs decayed in any fashion during the SCNT session. Depending on the level of expertise of the operator, SCNT can last between 2 and 4 h, during which the eggs can lose potency. A fertilization rate of >70% after completion of SCNT indicates that the eggs retained their developmental potential while they were kept in CSOF awaiting use.

2.9 CONFIRMATION THAT A "CLONE" IS A REAL CLONE

Cloned fish and the somatic cell donor must have identical phenotypes and genotypes. Phenotypic screening can provide evidence that the clone originated from the somatic cell donor. However, it is restricted to instances in which the phenotypes of the egg donor and the somatic cell donor are quite obvious; for example, when the egg donor is wild-type TAB and the cell donor is either a *golden* or *casper* mutant.

To evaluate the stability of the cloned genome, one should obtain a karyotype. Replication banding, which has been recommended for its accuracy in identifying zebrafish chromosomes (Amores & Postlethwait, 1999), can be applied to cultured fibroblasts obtained from a fin clip of the cloned fish. The most stringent confirmation that a clone has been generated from a somatic cell is obtained by Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. We have described polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis of 11 genomic SNP markers for genotyping in our 2009 publication (Siripattarapravat et al., 2009). SNPs from the donor cells and the cloned animals should match 100% and be different than those from the egg donor.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Thailand research fund (MRG5480228 – KS); by the Center for Advanced Studies for Agriculture and Food—Kasetsart University Institute for Advanced Studies, by the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and

Author's personal copy

Technology—Postgraduate Education and Research Development Office, by the Commission on Higher Education, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE), by the Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Institute for Advanced Studies, Kasetsart University Under the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand (KS and SP); and by Michigan AgBio Research (JC).

REFERENCES

Amores, A., & Postlethwait, J. H. (1999). Banded chromosomes and the zebrafish karyotype. *Methods in Cell Biology, 60*, 323–338.

Siripattarapravat, K., & Cibelli, J. B. (2011). *Methods in Cell Biology, 104*, 209–217. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374814-0.00012-4. Elsevier.

Siripattarapravat, K., Pinmee, B., Chang, E.-A., Munoz, J. D., Kawakami, K., & Cibelli, J. B. (2010). The influence of donor nucleus source on the outcome of zebrafish somatic cell nuclear transfer. *International Journal of Developmental Biology, 54*(11–12), 1679–1683. http://dx.doi.org/10.1387/ijdb.103189ks.

Siripattarapravat, K., Pinmee, B., & Cibelli, J. (2013). *Chapter 16. Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. Principles of cloning* (pp. 1–15). Elsevier Inc. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386541-0.00016-3.

Siripattarapravat, K., Pinmee, B., Venta, P. J., Chang, C.-C., & Cibelli, J. B. (2009). Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. *Nature Publishing Group, 6*(10), 733–735. http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1369.

Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book* (4th ed.). Eugene: University of Oregon Press.

The 11th Annual Conference
ARBS 2014 Thailand
Asian Reproductive Biotechnology Society
November 3-8, 2014
Sukosol Hotel, Bangkok

ACCEPTANCE LETTER

September 28th, 2014

To: **Dr. Kannika Siripattarapravat**
Department of Pathology
Faculty of Veterinary Medicine
Kasetsart University, Bangkok
Thailand

Dear Dr. Kannika Siripattarapravat,

The 11th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society (ARBS) will be held during November 3rd-8th, 2014 at the Sukosol Hotel, Bangkok, Thailand. This year ARBS conference is hosted by Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology and co-hosted by The Thai Society for Animal Reproduction. The theme of this year's conference is ***"Innovation in ART and Stem Cells: Knowledge from Animals to Clinical Applications"***.

This letter confirmed that your abstract entitle:

SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER IN ZEBRAFISH
Kannika Siripattarapravat
Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

has been accepted after review process by the technical reviewers for an Oral Presentation at the 2014 ARBS conference. In addition, the abstract will be published in the conference proceedings of ARBS 2014. On behalf of the 11th ARBS Local Organizing Committee, I cordially invite you to attend this conference and present your most updated information to exchange exciting ideas and new developments during this event.

We look forward to meeting you and your colleagues at the Sukosol Hotel, Bangkok, Thailand. If you need any assistance from Local Organizing Committee for your visa, please do not hesitate to contact us at arbs2014conference@gmail.com or Prof. Dr. Rangsun Parnpai at rangsun@g.sut.ac.th.

Sincerely yours,

Rangsun Parnpai, Ph.D. Professor
Chair, Organizing Committee
Director, Embryo Technology and Stem Cell Research Center,
School of Biotechnology,
Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
Tel: +66-44-223 163; Fax: +66-44-223 164
Email: rangsun@g.sut.ac.th

SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER IN ZEBRAFISH

Kannika Siripattarapravat

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
E-mail: fvetkks@ku.ac.th

Zebrafish has been widely utilized as a model organism. The cloning of zebrafish has been successfully reported by several groups of researchers, and is a potential tool for making genetic modified fish. Any cloning system, so far, generates cloned fish at the percentage of efficiency in a single digit. Major parameters that limit a number of cloned-fish produced are a stage of recipient eggs, donor cells, and an egg activation protocol.

Of all parameters, the quality of recipient eggs is the most significant. Either unfertilized-activated eggs or eggs arrested at metaphase II of meiosis (MII) have been shown to produce cloned fish. The latter has a better control over fluctuation of maturation promoting factors, so that recipient eggs are more stable over the course of micromanipulation. Maintenance of MII eggs in arrested stage depends upon quality of a holding medium – Chinook salmon ovarian fluid. These MII eggs are with intact chorion – an eggshell, making enucleation by a regular technique impossible. Laser targeted-ablation of egg genome is implemented to overcome such challenge.

Zebrafish can be cloned from a variety of tissues, with subtle differences in a success rate. Epigenetic memory of each cell type might be a reason for the minimal variation observed. Characterization of the cell-cycle stage of donor cell, in accordance with one of recipient eggs, could be advantageous.

Zebrafish eggs undergo spontaneous-parthenogenetic activation in seconds of contact with spawning medium – fresh water, independent of sperm initiation. Parthenogenetic embryos go through abortive cleavages and die, while fertilized eggs go on embryogenesis. Although the pattern of calcium oscillations between parthenogenetic activation and fertilization is not different, the compartmentalization of calcium in each activated egg is distinct. Following nuclear transfer, the reconstructed eggs are subjected to spontaneous activation. The detail differences in signaling cascades following egg activation might help answer why fewer cloned fish survived.

Regarding cloning efficiency in zebrafish, more could be achieved. The comparative studies in cloning of other species can warrant gradual improvement of fish cloning and later that would bypass steps toward making knock-in/-out zebrafish.

The Thailand Research Funds (TRF), Center for Advanced Studies for Agriculture and Food (CASAF), and Center for Agricultural Biotechnology (CAB) have supported this work.

PROCEEDING OF THE 11th ANNUAL CONFERENCE OF THE ASIAN REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY SOCIETY

"Innovation of ART and Stem Cells: Knowledge from Animals to Clinical Application"

The Sukosol Hotel, Bangkok, Thailand
November 2-8, 2014

Edited on behalf of the conference committee by
Rangsun Parnpai, Ph.D.
Suranaree University of Technology, Thailand

2014 ARBS CONFERENCE STEERING COMMITTEE

SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE

Dr. Atsuo Ogura (Japan)
Dr. A.W.S. Chan (China)
Dr. Eimei Sato (Japan)
Dr. Hong-Thuy Bui (Vietnam)
Dr. Changxin Wu (China)
Dr. Chong Li (China)
Dr. Graham Jenkin (Australia)
Dr. Hoon Taek Lee (South Korea)
Dr. Hung-Chih Kuo (Taiwan)
Dr. Il-Keun Kong (South Korea)
Dr. Kazuhiro Kikuchi (Japan)
Dr. Ke-Huan Lu (China)
Dr. Libertado C. Cruz (Philippines)
Dr. Mark Nottle (Australia)
Dr. Mongkol Techakumphu (Thailand)
Dr. Mukesh Kumar Gupta (India)
Dr. Nam-Hyung Kim (South Korea)
Dr. Naojiro Minami (Japan)
Dr. Nguyen Van Thuan (Vietnam)
Dr. Nisar A. Wani (UAE)
Dr. Noboru Manabe (Japan)
Dr. Qing-Yuan Sun (China)
Dr. Ramli Abdullah (Malaysia)
Dr. Rangsun Parnpai (Thailand)
Dr. Satoshi Kishigami (Japan)
Dr. Sandeep Goel (India)
Dr. Sc Ng (Singapore)
Dr. Shaorong Gao (China)
Dr. Shien Zhu (China)
Dr. Takashi Miyano (Japan)
Dr. Takashi Nagai (Japan)
Dr. Teruhiko Wakayama (Japan)
Dr. Xiuchun Cindy Tian (China)
Dr. William C. Medrano (Philippines)
Dr. Xuan Bui Nguyen (Vietnam)

LOCAL ORGANIZING COMMITTEE

Hosted

Embryo Technology and Stem Cell Research Center,
School of Biotechnology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, Thailand

Co-Hosted

The Thai Society for Animal Reproduction (TSAR)

Advisory Committee

Chair: **Prof. Dr. Prasart Suebka**
Rector, Suranaree University of Technology

Vice-Chair: **Prof. Emeritus Dr. Annop Kunavongkrit**
School of Agriculture Resources, Chulalongkorn University

Members: **Prof. Yindee Kittiyanant**
Faculty of Science and Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University

Prof. Dr. Mongkol Techakumphu
Vice President in Research, Chulalongkorn University

Assoc. Prof. Dr. Kaitkanoke Sirinarumitr
Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University

Organizing Committee

Chair: Assoc. Prof. Dr. Rangsun Parnpai

Members: Dr. Tatsanee Phermthai
Dr. Yuanyuan Liang
Dr. Kittiphong Putkhao
Mr. Tanut Kunkanjanawan

Academic Committee

Chair: Dr. Chuti Laowtammathron

Members: Ms. Kanchana Punyawai
Ms. Nucharin Sripunya

Fund Raising Committee

Chair: Assoc. Prof. Dr. Mariena Ketudat-Caines

Members: Mr. Theesit Juanpanich
Mr. Prapot Thanthaisong
Mr. Wachira Panta

Protocol Committee

Chair: Dr. Chanchao Lorthongpanich

Members: Mr. Athip Limcharoen
Mr. Ashit Kumar Paul

Financial Committee

Chair: Mrs. Napaporn Thripatana

Members: Ms. Sujittra Khampang
Ms. Tayita Suttirojpattana

Conference Program

November 2, 2014	
16.00-19.00	Registration at Kamolthip 1 Room, Second floor
November 3, 2014	
7.00-8.30	Registration at Kamolthip 1 Room, Second floor
8.30-9.30	Greeting and Opening Remarks
SESSION 1	**PLENARY** Session Chair: Dr. Annop Kunavongkrit
9.30-10.00	**Improvement of *In Vitro* Bovine Embryo Production by Selecting System using Kinetics of Embryo Development** Dr. Kei Imai *Rakuno Gakuen University, Hokkaido, Japan*
10.00-10.30	**Coffee/Tea Break**
SESSION 2	**CRYOPRESERVATION OF GAMETES AND EMBRYOS** Session Chairs: Dr. Hoon Taek Lee ; Dr. Kehuan Lu
10.30-11.00	**Recent Progress in the Vitrification of Porcine Oocytes** Dr. Tamas Somfai *National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, Japan*
11.00-11.30	**Ovarian Tissue Cryopreservation and Culture in the Domestic Cat as a Model for Post-Mortem Gamete Rescue in Wildlife Species** Dr. Paweena Thuwanut *Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand and Center for Species Survival, Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, VA and National Zoological Park, Washington D.C, USA*
11.30-12.00	**Effect of Amino Acid Supplementation of Extender on Post-Thaw Quality of Sahiwal Bull Spermatozoa** Dr. S. Akhter *Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture University, Rawalpindi, Pakistan*
12.00-13.00	**Lunch**
SESSION 3	**OOCYTES BIOLOGY AND FUNCTION** Session Chairs: Dr. Naojiro Minami ; Dr. Qing-Yuan Sun
13.00-13.30	**Zinc Regulates Meiotic Resumption in Porcine Oocytes via a Protein Kinase C-Related Pathway** Dr. Ming-Hui Zhao *Chungbuk National University, Chungbuk, South South Korea*
13.30-14.00	***In Vitro* Matured Oocytes are More Susceptible Than *In Vivo* Matured Oocytes to Mock ICSI Induced Functional and Genetic Changes** Dr. Satish Adiga *Kasturba Medical College, Manipal, India*
14.00-14.30	**Increased Follicular Response and Oocyte Yield Following Superstimulation and Ovum Pick-Up and Its Prospect in Enhancing *In Vitro* Embryo Production in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*)** Dr. Eufrocina Atabay *Philippine Carabao Center, Nueva Ecija, Philippines*
14.30-15.00	**Coffee/Tea Break**

SESSION 4	**SPERM BIOLOGY AND FUNCTION** Session Chairs: Dr. Takashi Nagai ; Dr. Il-Keun Kong
15.00-15.30	**Motility Characteristics of Ejaculated Bovine Spermatozoa in L-Carnitine Supplemented Tris Egg Yolk Extender** Dr. Danilda Hufana-Duran *Philippine Carabao Center, Nueva Ecija, Philippines*
15.30-16.00	**Effect of Vitamin E and Selenium on Capacitation of Buffalo Spermatozoa *In Vitro*** Dr. Abdel-Hasseb *Alexandria University, Alexandria, Egypt*
SESSION 5	**GERM CELLS AND UTERINE BIOLOGY AND FUNCTION** Session Chairs: Dr. Kaitkanoke Sirinarumitr ; Dr. Tanut Kunkanjanawan
16.00-16.30	**Comparison between Three Types of Antibiotic for Treatment of Endometritis in Sheep** Dr. Ayman Swelum *King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia*
16.30-17.00	**MiRNA-199b-5p：A New Candidate to Assess the Maintenance of Pregnancy** Dr. Yu Wang *Inner Mongolia University, Hohhot, China*
18.30-22.00	**Welcome Dinner**
November 4, 2014	
SESSION 6	**ADVANCES IN SOMATIC CELL CULTURE** Session Chairs: Dr. Tamas Somfai ; Dr. Kei Imai
8.30-8.50	**Isolation, Characterization and Apoptosis Induced by Palmitate of Goat Mammary Epithelial Cells** Dr. Lizhong Wang *Nanjing Agricultural University, Nanjing, China*
8.50-9.10	**Optimizing Protocol for *In Vitro* Culture and Cryopreservation of Buffalo Ear Skin Cells for Their Utilization in Somatic Cell Nuclear Transfer in Water Buffaloes** Dr. Edwin C. Atabay *Philippine Carabao Center, Nueva Ecija, Philippines*
SESSION 7	**NUCLEAR TRANSFER AND NUCLEAR REPROGRAMMING** Session Chairs: Dr. Yidee Kittiyanant ; Dr. Nguyen Van Thuan
9.10-9.40	**Characteristics of Prion Gene KO Cow Against Spontaneous Bovine Spongiform Encephalopathy** Dr.Noboru Manabe *The University of Tokyo, Kasama, Japan*
9.40-10.00	**Production of Homoplasmic Cloned Cattle** Ms. Kanokwan Srirattana *Monash University, Clayton, Australia*
10.00-10.30	**Coffee/Tea Break**

SESSION 8	**NUCLEAR TRANSFER AND NUCLEAR REPROGRAMMING** Session Chairs: Dr. Noboru Manabe ; Dr. Nam-Hyung Kim
10.30-11.00	**Somatic Cell Nuclear Transfer in Zebrafish** Dr. Kannika Siripattarapravat *Kasetsart University, Bangkok, Thailand*
11.00-11.30	**Effects of Histone Acetylation Status on the Early Development of *In Vitro* Porcine Transgenic Cloned Embryos** Dr. Biping Luo *Nanjing Agricultural University, Nanjing, China*
11.30-12.00	**Effects of Obesity and Diabetes on DNA Methylation in Germ Cells and Offspring** Dr. Qing-Yuan Sun *Chinese Academy of Sciences, Beijing, China*
12.00-13.00	**Lunch**
SESSION 9	**ADVANCES IN ENDOCRINOLOGY AND AI** Session Chairs: Dr. Eufrocina Atabay ; Dr. Teoan Kim
13.00-13.30	**Kisspeptin and the Hypothalamic Pituitary Gonadal Axis in Buffalo** Dr. Thuchadaporn Chaikhun-Marcou *Mahanakorn University of Technology, Bangkok, Thailand*
13.30-13.50	**Factors Affecting the Success Rate of Artificial Insemination in Dairy Cows** Dr. Muhammad Usman *PMAS-UAAR Rawalpindi, Pakistan*
13.50-14.10	**Assessment of Reproductive Activity in Captive Arabian Tahr** Dr.M-K Idris Anas *Department of the President's Affairs, UAE*
14.10-14.40	**Coffee/Tea Break**
SESSION 10 14.40-16.30	**POSTER PRESENTATION at Kamolrudi Room** Session Chairs: Dr. Chanchao Lorthongpanich; Dr. Chuti Laowtammathron
16.30-17.30	**ARBS Executive Meeting**
November 5, 2014	
SESSION 11	**EMBRYONIC STEM CELLS/PLURIPOTENT STEM CELLS** Session Chairs: Dr. Rong Rui ; Dr. Tatsanee Phermthai
8.30-9.00	**Nonhuman Primate Model of Huntington's Disease: *In Vitro* vs *In Vivo*** Dr. Anthony W.S. Chan *Emory University, Atlanta, USA*
9.00-9.30	**Stem Cells in Animal Science: A New Hope for the Conservation of Endangered Wild Felids** Dr. Rajneesh Verma *Mahidol University, Bangkok, Thailand*
9.30-10.00	**Development of the Pig as a Large Animal Model for Human Embryonic Stem Cell Based Therapies for Type 1 Diabetes** Dr. Mark B. Nottle *University of Adelaide, Adelaide, Australia*

10.00-10.30	**Coffee/Tea Break**
SESSION 12	**EMBRYONIC STEM CELLS AND PLURIPOTENT STEM CELLS** Session Chairs: Dr. Anthony W.S. Chan ; Dr. Rangsun Parnpai
10.30-11.00	**Role of the Hippo Signaling Pathway in Lineage Specification of Mammalian Pre-Implantation Embryos and their Pluripotency** Dr. Chanchao Lorthongpanich *Mahidol University, Bangkok, Thailand*
11.00-11.30	**Induced Pluripotency in Avian Embryonic Fibroblast** Dr. Yangqing Lu *Guangxi University, Guangxi, China*
11.30-12.00	**The Roles of MicroRNAs in the Adipogenesis Derived from Pocine Pluripotent Stem Cells** Dr. Ziyi Li *Jilin University, Jilin, China*
12.00-13.00	**Lunch**
SESSION 13	**STEM CELLS BANKING AND DIFFERENTIATION** Session Chairs: Dr. Feng Wang ; Dr. Chuti Laowtammathron
13.00-13.30	**Microenvironment of Stem Cell Culture** Dr. Kwanchanit Tantivejkul *Becthai Bangkok Equipment & Chemical Co.,Ltd., Bangkok, Thailand*
13.30-14.00	**Replacement of Traditional Animal Serum with hUCS in Culture of Xeno-Free MSC Lines for Clinical Applications** Dr. Tatsanee Phermthai *Mahidol University, Bangkok, Thailand*
14.00-14.30	**Isolation and Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells** Dr. Dai Lam Vi *Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam*
14.30-15.00	**Modeling Human CFC Syndrome using Induced Pluripotent Stem Cells** Dr. Yong-Mahn Han *KAIST Institute, Daejeon, South Korea*
15.00-15.30	**Coffee/Tea Break**
15.30-16.00	**Awarding Ceremony of Poster Presentation**
16.00-16.15	**Announce the Next Host of The 12th ARBS Conference**
16.15-16.30	**Closing Ceremony**
18.30-22.00	**Farewell Dinner**
November 6-8, 2014	
8.30-17.00	**Post-Conference Scientific Trip**

Chapter 16

Somatic Cell Nuclear Transfer in Zebrafish

Kannika Siripattarapravat[1], Boonya Pinmee[2] and José B. Cibelli[2]

[1]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, [2]Departments of Animal Science and Physiology, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA, LARCel, Consejeria de Salud, Sevilla, Andalucia, Spain

Chapter Outline

Introduction	197
The Recipient Egg	198
The Donor Cells	202
Egg Activation Following Nuclear Transfer	203
Cloning Efficiency in Zebrafish	203
Conclusion and Closing Remarks	205
References	205

INTRODUCTION

In trying to understand why cloning zebrafish is important, we must first analyze its evolution as a model organism. A decade ago, only limited groups of researchers were familiar with zebrafish; today, it is recognized as one of the best model organisms to study embryonic development, and human disease and treatment. Zebrafish, *Danio rerio*, belong to the Cyprinidae family, the same family as carps and minnows. They were extensively promoted as a model organism by George Streisinger at the University of Oregon, and quickly embraced by the world's community of developmental biologists. The Zebrafish Information Network (ZFIN) gathers most essential information to outreach utilization of this model organism (Bradford *et al*., 2011).

Zebrafish are native to the tropical climate of Asian countries, and were first identified in India (Engeszer *et al*., 2007). Many fish strains are utilized for research, the more popular ones being Tübingen, AB, and wild type. Adult zebrafish are relatively small freshwater fish, approximately 3–4 cm in length, allowing them to be kept in a simple aquarium system in almost any laboratory. The desirable characteristics are fecundity, external fertilization, rapid embryonic development, and a short generation interval (Nusslein-Volhard and Dahm, 2002; Zon, 1999). Zebrafish eggs are large and transparent, facilitating DNA injection, cell labeling, and transplantation experiments. The embryos, being transparent and developing *ex vivo*, allow for the study of embryonic development from fertilization to hatching. This characteristic has now been extended to adulthood with the creation of Casper, a new, completely translucent, mutant strain (White *et al*., 2008).

The zebrafish represents a relatively inexpensive model for the study of normal and pathological animal development, genetics, physiology, aging, cell death, and diseases (Beis and Stainier, 2006; Berghmans *et al*., 2005; Kishi, 2002; Pyati *et al*., 2007). It is also a great complement to *D. melanogaster* and *C. elegans* for developmental biology studies (Amsterdam *et al*., 2004; Driever *et al*., 1996; Haffter *et al*., 1996). The number of genetically modified zebrafish has grown exponentially in recent decades. According to ZFIN, to date, there are thousands of transgenic zebrafish expressing fluorescent proteins (Sprague *et al*., 2008).

Completion of the human genome project has accelerated the study of functional genomics in humans, as well as other vertebrate systems. The sequencing of the zebrafish genome was initiated in 2001; at present, the latest version, Zv9, covers 87% of the euchromatic genome. Many zebrafish orthologues of human genes have been identified, increasing the demand for studies of functional genomics in this vertebrate model system. Most of the mutant fish lines utilized to date were created from random mutagenesis followed by large-scale and laborious screening (Wienholds *et al*., 2003). Target gene knockdown is possible using antisense technology – morpholinos (Nasevicius and Ekker, 2000). However, it is transient, and if the inactivation of gene expression is not complete, non-specific phenotypes can be observed. Targeted

Principles of Cloning. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386541-0.00018-7
© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

gene inactivation technology is being used to create new zebrafish mutants. Zinc finger nucleases (Doyon *et al*., 2008; Meng *et al*., 2008) and transcription activators, like effector nucleases (Miller *et al*., 2010), have been shown to produce germ-line competent mutants at reasonable mutagenesis rates, but they are still not fully amenable to knockin experiments (Bedell *et al*., 2012).

Embryonic stem cells (ESCs), used extensively to generate knockin/-out mice, have shown limited progress in zebrafish (Ma *et al*., 2001; Fan *et al*., 2006; Wong *et al*., 2011). As with other species in which ESCs are not a feasible approach to make knockin/-out animals, somatic cell nuclear transfer (SCNT) has become a method of choice for germline genetic modifications (Kuroiwa *et al*., 2002; Lai *et al*., 2002; McCreath *et al*., 2000; Richt *et al*., 2007). This approach calls for gene targeting by homologous recombination in cultured cells and, subsequently, for transferring the mutant nuclei into recipient eggs and later producing mutant clones. Only a few research groups have reported successful SCNT in fish species (Tanaka *et al*., 2010; Wakamatsu *et al*., 2001; Lee *et al*., 2002). Two major methods for SCNT in zebrafish have been investigated, the main difference being the cell cycle stage of the recipient egg: activated one-cell eggs (Lee *et al*., 2002; Luo *et al*., 2009) versus metaphase II arrested eggs (Siripattarapravat *et al*., 2009). At the moment, though, the low rate of homologous recombination in cultured cells and problems associated with poor developmental rates in SCNT embryos are drawbacks for successfully implementing gene targeting.

The efficiency of cloned animal production – measured as the number of healthy adult clones over the number of reconstructed embryos – depends upon technical aspects as well as the success of the nuclear reprogramming the donor cell has undergone following SCNT. It is fair to say that, at the moment, success is a rare event. Efficiency of cloned animal production has remained relatively low across all species cloned; very subtle improvement has been observed, probably as a result of streamlining the process and not so much due to proper understanding of the molecular mechanism underlying nuclear remodeling. The recipient egg is arguably one of the most sophisticated genome reprogramming units known in biology. However, the somatic nucleus must be amenable to such influence. It must shed its somatic cell identity by erasing its epigenetic memory, and assume an embryonic path. The *in vitro* manipulation calls for protocols that can best resemble that of natural fertilization. When all conditions are met, cloned animals can develop into seemingly healthy adults. This chapter focuses on how to optimize the parameters for zebrafish SCNT. It is aimed to help those that want to implement the technique for the first time, as well as those that would like to transition from a mammalian system into the zebrafish.

The recipient egg is arguably one of the most sophisticated genome reprogramming units known in biology.

THE RECIPIENT EGG

The arrested egg or oocyte at metaphase II of meiosis (MII) is generally used as a recipient cell for cloning, although it has been demonstrated that zygotes can be used as recipient cells as long as they are metaphase-arrested at the time of enucleation and nuclear transfer (Egli *et al*., 2007). The MII eggs can be obtained by either *in vitro* or *in vivo* maturation. In frogs, eggs are collected from hormonally stimulated females. Prior to fusing with the somatic cell, their genetic materials are removed by mechanical suction with a glass needle (Briggs and King, 1952) or UV irradiation (Gurdon and Uehlinger, 1966). In mammals, oocytes are obtained from either super-ovulation or *in vitro* maturation, according to species-specific preferences, and are subjected to manual enucleation. In medaka fish, MII eggs can be isolated and X-ray irradiated prior to being used as recipient cells (Wakamatsu *et al*., 2001). Zebrafish MII eggs can be easily obtained by gentle stripping from breeding sound females, as well as by *in vitro* maturation in well-established media (Seki *et al*., 2008). The first report of successful zebrafish cloning utilized activated unfertilized eggs (Lee *et al*., 2002). In a subsequent report, we described a method that uses eggs arrested at MII for a more efficient zebrafish cloning (Siripattarapravat *et al*., 2009).

To better characterize a suitable recipient cell for zebrafish cloning, understanding of the biology of zebrafish eggs from the arrested mature stage until fertilization is fundamental. Oogenesis of zebrafish is regulated by gonadotrophic hormone (GTH). After stimulation by gonadotrophic hormone (GTH), the oogonium enters meiosis and starts its development. Oocyte growth is mediated by GTH-I or follicle stimulating hormone. GTH-II or luteinizing hormone is responsible for maturation of the fully grown oocyte, including germinal vesicle breakdown, synthesis of maturation inducing hormone, and inducing ovulation. MIH stimulates synthesis of the maturation promoting factor (MPF), and maintains it at a high level in the mature MII-arrested oocytes. Ovulation is completed after the female is exposed to a male fish at dawn. It is not clear what really induces ovulation in zebrafish upon mating, but it is thought to be pheromones. In medaka, hydrolytic enzymes are responsible for follicular rupture prior to ovulation (Ogiwara *et al*., 2005). The mature eggs detach from the ovaries as denuded eggs, and are held in the ovarian cavity until the female is ready for mating. The eggs are released upon the natural mating behavior, at the same time that the milt is released from the male fish.

The gametes are then fertilized externally within a few minutes. Over the course of a single mating, zebrafish release eggs and milt many times.

The female fish usually holds hundreds of mature arrested eggs in its ovarian cavity. These eggs can be released following the natural courtship behavior of the mating pair, or gently stripping from anesthetized females (Westerfield, 1993). A zebrafish egg undergoes spontaneous parthenogenetic activation as soon as it comes into contact with spawning media. A synthetic holding media, Hank's balance salt solution supplemented with 0.5% bovine serum albumin (H-BSA), and an ovarian fluid of salmonids, such as Chinook salmon ovarian fluid (CSOF), have been reported to maintain MII arrested eggs for up to 1 hour (Sakai *et al.* 1997) and up to 6 hours (Corley-Smith *et al.*, 1999), respectively.

Maintenance of zebrafish eggs in holding media is essential for keeping them at the MII stage, and these eggs can be used for *in vitro* fertilization with a high success rate. The MPF level in zebrafish eggs declines within a few minutes following contact with water, and subsequently the eggs exit the metaphase stage of the cell cycle (Siripattarapravat *et al.*, 2009). When eggs are held in H-BSA or CSOF, however, MPF levels remain constant, keeping the eggs at a "fertilizable" state. Fluctuation of MPF levels as the cell cycle progresses were observed following egg activation, either by parthenogenesis or fertilization; chemical modulation of activated eggs could not maintain MPF at constant levels as it does in MII eggs (Siripattarapravat *et al.*, 2009). The irregular level of MPF in activated eggs argues in favor of using mature arrested eggs for efficient cloning. Keeping a mature MII egg in CSOF can maintain constant high level of MPF for extended periods (Siripattarapravat *et al.*, 2009), facilitating its use instead of activated eggs as a recipient cell for SCNT.

It is generally understood that MII eggs are transcriptionally silent, so that all reprogramming factors are already presented in the ooplasm and upon activation they are summoned to support development of fertilized or cloned embryos. Exposure of a somatic cell to a mitotic oocyte will trigger chromatin condensation, an essential step in almost all mammalian SCNT protocols (Wakayama *et al.*, 1998). It is hypothesized that condensation of somatic chromatin may mechanically facilitate an exchange of chromatin-associated factors, which could promote embryonic gene transcription. The mitotic environment of the recipient cell primes the chromatin of the somatic cell to be converted into an embryonic one. In *Xenopus*, following treatment with egg mitotic extracts, the inter-origin of replication spacing in red blood cells was decreased to as little as one embryonic cell as a consequence of an increase in the recruitment of replication initiation factors (Lemaitre *et al.*, 2005). This finding explains how mitotic conditions might promote somatic cell replication in cloned frogs, and why, in some instances, serial transplantation enhances cloning efficiency (Gurdon *et al.*, 1975; Hoffner and DiBerardino, 1980). This evidence points to MII eggs becoming a safe choice of recipient cells in most species.

The anatomical structure of zebrafish MII egg is different from the activated counterpart (Figure 16.1). The mature arrested egg has a thick shell, called the chorion (comparable with mammalian zona pellucida), which is closely associated with egg cytoplasmic membrane. On the chorion, there is a micropyle (Figure 16.1A, inset). Scanning electron microscopy studies revealed that the sperm of zebrafish must enter the egg through a micropyle, a single cone-shaped entrance on the chorion (Wolenski and Hart, 1987). The micropyle is a landmark of egg chromosomes (metaphase plate) and the first polar body (Figure 16.1B). At the time of exposure to water, the fish egg undergoes egg activation independent of contact with sperm. The sperm must find the micropyle within seconds of ovulation, otherwise fertilization will fail. The process is facilitated by the abundance of sperm surrounding the egg, the micropylar grooves surrounding the micropylar pit (Amanze and Iyengar, 1990), and the chorionic glycoproteins that can promote binding affinity of the sperm to the micropyle area (Iwamatsu *et al.*, 1997). Only one sperm per egg can go through the micropyle (Wolenski and Hart, 1987), and when one does, a filamentous actin network in the egg helps the fusion of the sperm to the egg at the fertilization cone (Hart *et al.*, 1992; Wolenski and Hart, 1988). The activated egg generally increases intracellular calcium concentration in waves that vary in frequency and magnitude; these are known as calcium oscillations (Ducibella and Fissore, 2008). In zebrafish, a single calcium wave was recorded as soon as an egg came into contact with water (Lee *et al.*, 1999). A new line of evidence suggests that fertilization, not parthenogenesis, activates a Src-family protein kinase, the Fyn kinase (Sharma and Kinsey, 2006; Wu and Kinsey, 2000); calcium oscillations are separated into two types, one that occurs at the center of the cytoplasm and another which starts from the micropyle and diffuses cortically throughout the cortex of the egg (Sharma and Kinsey, 2008). The latter is shown to be a sperm-specific calcium wave, and is different from the one triggered by pathenogenetic activation. In both cases, an activated egg shows indistinguishable structural changes, including exocytosis of cortical granules, metaphase exit to complete meiosis, extrusion of the second polar body, formation of a female pronucleus, expansion of the chorion, and the formation of the blastodisc after ooplasmic segregation toward the animal pole of the egg.

The chorion of mature arrested eggs is very thick, making it impossible for mechanical removal of chromosomes from intact eggs and to transfer nuclei. Dechorination

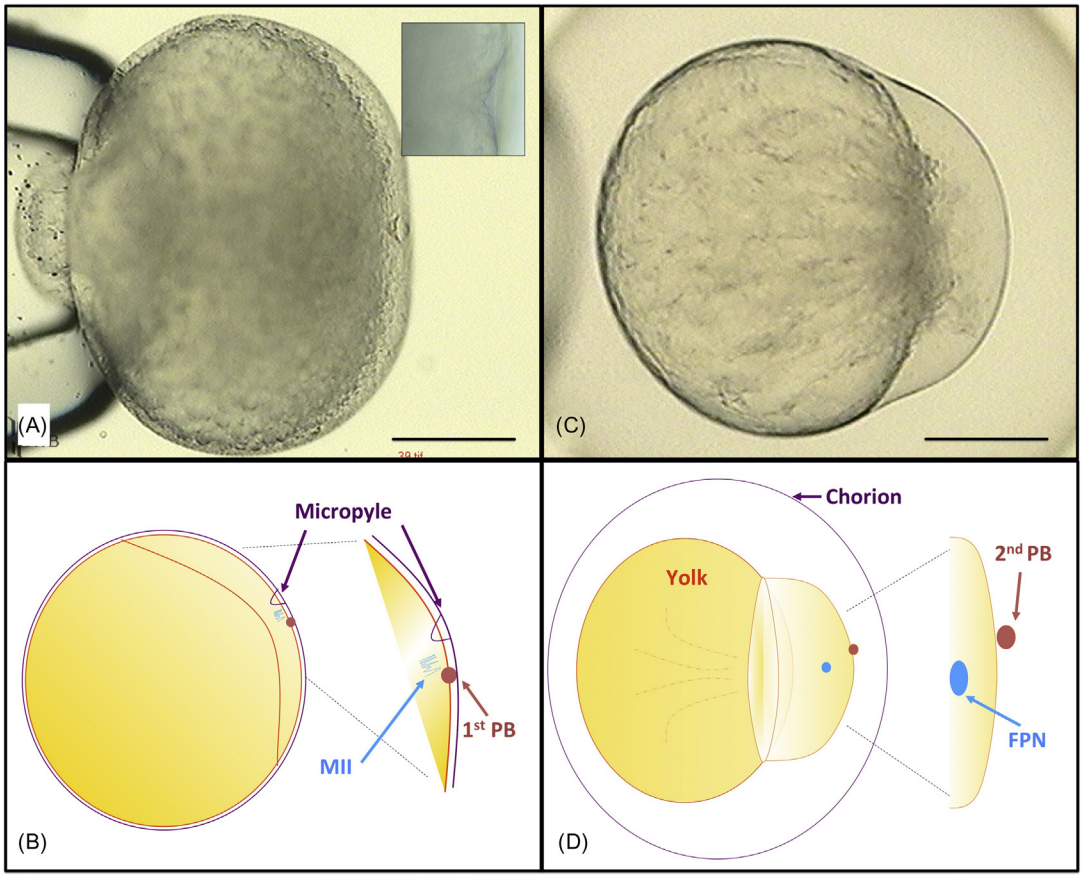


FIGURE 16.1 Anatomical structure of zebrafish egg at mature arrested stage (A–B) and after parthenogenetically activated (C–D). The mature arrested egg has intact chorion (A) and a micropyle (A – inset) that is closely associated with the metaphase plate (MII) and the first polar body (B). The parthenogenetically activated egg has a detached chorion and cytoplasmic stream toward its animal pole (C); it completes meiosis by extrusion of a second polar body and subsequent formation of female pronuclei (D). Scale bar = 200 μm.

with pronase is possible, but in almost all cases will trigger egg activation (Siripattarapravat *et al*., 2009). Nonetheless, if the egg is activated, the female pronuclei can be removed from dechorinated eggs – although timing is of the essence (Lee *et al*., 2002), and at the time of nuclear transfer, the egg should have passed metaphase of the second meiosis division (Siripattarapravat *et al*., 2009). When using mature arrested eggs as recipient cells, we have described a technique that uses laser-assisted inactivation of the egg genome and cell transfer through a micropyle (Siripattarapravat *et al*., 2009). We found that the MII eggs can be held in CSOF for up to 6 hours, and that the Hoechst 33342-stained metaphase plate can be target-ablated with laser firing pulses (Figure 16.2A, B). The cytoplasmic membrane of the somatic cell can be gently broken in a glass needle and transferred through a micropyle to the animal pole of the egg – the region that is closely associated with a place where female and male pronuclei usually fuse (Figure 16.2C, D). Egg activation can be triggered 15 minutes later in water. Since the chorion is an innate shield of zebrafish embryos, it helps cloned embryos to tolerate *in vitro* micromanipulations, and subsequent embryonic development.

The term "inactivation" is used to describe the outcome of target ablation of the egg genome using laser-firing pulses. Removal of the metaphase plate is conventionally performed by micropipetting or irradiation, and is referred to as enucleation. We have extensively characterized and validated laser ablation as an efficient approach to inactivate the egg's genome. The main concern is a complete absence of the egg's maternal genome in resulting cloned embryos (Siripattarapravat *et al*., 2009). The laser system applies high heat transiently, with manageable time and frequency, to the target, allowing for powerful ablation of the target with minimal effects on the surrounding areas. For inactivation of the zebrafish genome, isotherm rings are set for the highest laser beam of 400°C at the center of the Hoechst-stained metaphase plate, and for 100°C at the outer periphery to cover all genomic areas (Figure 16.2B). Full power is applied twice, each time for 500 μs. Since zebrafish eggs are approximately 800 μm in diameter, the metaphase target must be aligned closest to the

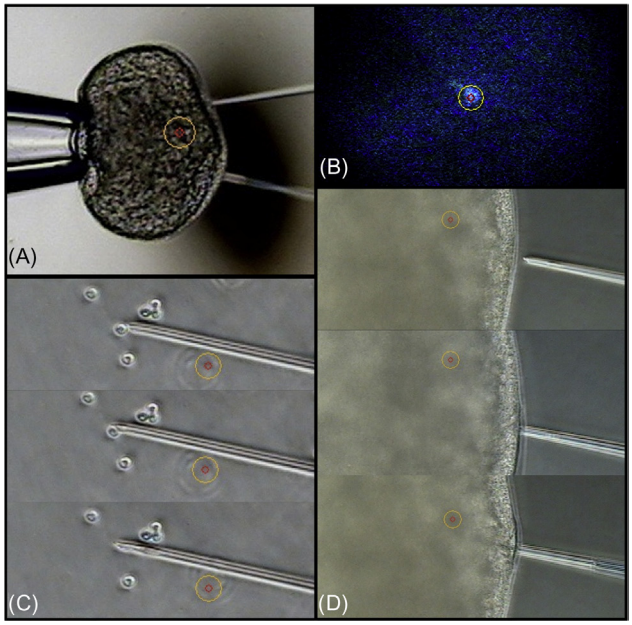


FIGURE 16.2 Method for somatic cell nuclear transfer in zebrafish. The egg micropyle is positioned facing the bottom of a Petri dish to visualize the metaphase plate (A). The Hoechst 33342-stained metaphase plate of the egg is ablated using the laser XY clone module (B). The areas under red and yellow circles, when the laser-pulse is introduced by a 40× laser-equipped objective lens, would be at 400°C and 100°C, respectively. An individual donor cell is picked up using a beveled-tip needle (C) and is then transferred through a micropyle to an animal pole of the egg (D).

laser objective lens to minimize power absorption into a liquid phase (Figure 16.2A). The micropyle is an important landmark of the egg genome, and when it is aligned facing down towards the bottom of the Petri dish it allows for both a minimal UV exposure time of the recipient eggs as well as quick focus of the metaphase plate with a 40× laser-equipped objective lens. Conveniently, the laser ablation technique does not activate zebrafish eggs.

It has been shown that ultraviolet light and Hoechst 33342 have an indistinct adverse effect on the development of cloned embryos (Siripattarapravat *et al*., 2009). It is speculated that zebrafish eggs, similar to the membrane transporter of bone marrow stem cells' side population (Kobayashi *et al*., 2007), can effectively pump out Hoechst 33342 dye, and, as such, visualization of stained DNA continues to fade over the SCNT manipulation time. A concentration of 50 μg/ml of Hoechst 33342 in CSOF and 20 minutes incubation is used to visualize the metaphase plate of the egg under UV light with a 40× laser-equipped objective lens. We found that a few seconds of UV exposure time does no harm to the eggs because UV-treated eggs give normal embryos following *in vitro* fertilization (Siripattarapravat *et al*., 2010).

We performed extensive validation when developing this new technique. We had to confirm that laser ablation was indeed efficient in inactivating the egg genome. Following spontaneous activation, DNA-stained laser-treated eggs revealed only the clump of chromatin remaining in the egg cytoplasm, without extrusion of the second polar body. We did not track the fate of burnt/denatured DNA over the course of hours after attempting parthenogenic activation due to the degradation of the egg itself, but in the case of SCNT, the denatured DNA is likely to be subject to degradation later on.

Zebrafish with the golden phenotype have melanocytes with less melanophores in each cell, so their skin has a lighter color ("golden") which is caused by homozygous mutation of the SLC24A5 gene – an orthologous gene partly responsible for human skin tones as well (Lamason *et al*., 2005). SLC24A5 is a recessive gene, so the heterozygous mutant will display a dark stripe, as does the wild type. The combination of recipient eggs from wild-type lines coupled with donor cells of golden fish can facilitate the screening of cloned embryos with golden phenotypes, and confirm efficient inactivation of the egg genome by targeted laser ablation (Siripattarapravat *et al*., 2009).

During the development phase of this new protocol we used homozygous golden strain (Lamason *et al*., 2005) somatic cell donors transferred into laser-ablated eggs of wild-type or transgenic histone H2A tagged with green fluorescence protein zebrafish (Pauls *et al*., 2001). All cloned embryos had the golden phenotypes. We also genotyped all cloned zebrafish, using 11 SNP markers. SNPs of the cloned zebrafish matched those of the cell donor but not those of the female from which recipient eggs were obtained. Adult cloned zebrafish produced by this technique had normal karyotypes, and, when backcrossed with golden individuals, gave rise to fertile offspring, all of which possessed golden phenotypes (Siripattarapravat *et al*., 2009).

Cloned animals are expected to have the genomic DNA identity of the cell donor and the mitochondrial DNA identity of the egg donor. In some instances there can be remnants of mitochondrial DNA from the donor cell, but at very low levels. The mitochondrial DNA contains hypervariable regions that are used for tracing a maternal linage. Zebrafish lines used for cloning experiments, however, show uniform DNA sequences of the D-loop region, a well-known hypervariable region of mitochondrial DNA (Siripattarapravat, unpublished data), making it impractical to track an egg donor. The nuclear DNA of cloned animals however, can be evaluated using microsatellite markers (Spence *et al*., 2006) or SNP markers (Siripattarapravat *et al*., 2009). Genetic analysis using microsatellite markers requires more sophisticated instruments than those used during SNP analysis. The single nucleotide polymorphisms can be easily identified and tested using polymerase chain reaction with restriction fragment length

polymorphism (PCR-RFLP), requiring much simpler tools. A SNP database of zebrafish is readily available online at the National Center for Biotechnology Information (Sayers *et al*., 2010). Using PCR-RFLP for 11 SNP markers, we found that our cloned zebrafish had the genetic identity of cell donors but not of egg donors (Siripattarapravat *et al*., 2009). SNP analysis also provided more evidence that no genetic trace of the egg donor remained in developing cloned zebrafish when laser ablation was used. Further investigation revealed that cloned zebrafish had normal karyotypes, were fertile, and could produce fertile offspring that carry their genetic trait, and this substantiates such a technique (Siripattarapravat *et al*., 2009).

We have shown that it is possible to use MII eggs as recipient cells for zebrafish cloning provided that all manipulations are performed in a "holding medium" that can maintain high levels of MPF activity for at least 2 hours after isolation of the eggs from the ovary.

We have shown that it is possible to use MII eggs as recipient cells for zebrafish cloning provided that all manipulations are performed in a "holding medium" that can maintain high levels of MPF activity for at least 2 hours after isolation of the eggs from the ovary. The synthetic holding medium described previously by others (Sakai *et al*., 1997) is not as good as the natural ovarian fluid of salmonids. We have observed that when using synthetic medium, the quality of the eggs declines within an hour after collection (Sakai *et al*. 1997); CSOF, when used as holding medium, can extend the quality of the eggs for up to 4–6 hours (Corley-Smith *et al*., 1999; Siripattarapravat *et al*., 2009). Unfortunately, CSOF is not commercially available and must be obtained from a direct source, if possible. We have found that the quality of the fluid can fluctuate depending on the collection technique and the health of the Chinook salmon females. While the ionic composition of CSOF has been reported (Rosengrave *et al*., 2009), to date there is a lack of proper understanding regarding how the fluid works to maintain the zebrafish egg at the MII stage. More work needs to be done to develop a synthetic ovarian fluid of stable quality for the purpose of egg manipulation in zebrafish.

THE DONOR CELLS

The cells used for cloning experiments are either freshly isolated or primary cultured from variety of adult and embryonic tissues. The recurring success of cloning experiments has proved that genomic DNA of differentiated cells remains constant from the embryonic stage throughout to adulthood (Cibelli, 2007). In mammals, almost any cell tested has been demonstrated to be capable of producing cloned animals. The success rate is noticeably different from one cell type to another (Rideout *et al*., 2000; Oback, 2009; Oback and Wells, 2007), and the main characteristic is that the percentage of live births over the number of cloned embryos made is always in single digits, regardless of the cell type. Differences in epigenetic status among cell types used are most likely responsible for such variations, and epigenetic memory in somatic cells (Ng and Gurdon, 2005, 2008) as well as technical factors are ultimately responsible for the outcome. In addition, full synchronization between the donor cell cycle and the recipient cell is an important parameter that was clearly demonstrated by Campbell and colleagues in their paper describing the generation of the first cloned transgenic sheep produced from a cultured cell line (Campbell *et al*., 1996) and, later, on cloning an adult individual (Dolly) (Wilmut *et al*., 1997), and should be taken into account in zebrafish cloning as well.

Cloned zebrafish originated from cultured of embryo-derived cells (Lee *et al*., 2002), freshly isolated cells from embryos, and cultured adult fin cells (Siripattarapravat *et al*., 2009). Even though it has been demonstrated that cells isolated from specific tissues can give rise to cloned zebrafish at different developmental rates (Siripattarapravat *et al*., 2010), to date, the reason underlying such variation of cloning efficiency in zebrafish is not understood.

The different plasticity of the epigenetic state among donor cells is likely to facilitate cellular reprogramming at different levels. There is evidence of epigenetic modification enzymes in zebrafish, which suggests their role as gene expression regulators in early embryogenesis (Lan *et al*., 2007; Mhanni and McGowan, 2004; Yokomine *et al*., 2006; Andersen *et al*., 2012; Lindeman *et al*., 2010). The first zygotic transcripts appear as early as the first cell division (approximately 20 hours) in mice and at the sixth cell division (approximately 2–4 hours) in frogs and fish (Tadros and Lipshitz, 2009). The midblastula transition, an initial switching point of maternal to zygotic gene expression, starts, in zebrafish, at 2.5–3 hours post-fertilization (Kane and Kimmel, 1993). Many genes are shown to be newly transcribed at this point (Mathavan *et al*., 2005; O'Boyle *et al*., 2007). Donor cells of any somatic origin, in zebrafish cloning, must be reprogrammed and start embryonic gene expression within a few hours following egg activation. Successful cloned fish development would require turning off genes of differentiated cells, switching on the embryonic genes, and bypassing to a rapid cell division of early embryonic cells. Cloned zebrafish, at the dome stage, were reported to have differential expressed genes from those of fertilized counterparts (Luo *et al*., 2009). The limited time to complete such tasks might lead to dysregulation of early embryonic gene transcription in most cloned embryos (Luo *et al*., 2009), and only a few

are capable of developing into seemingly healthy adult fish (Lee *et al*., 2002; Siripattarapravat *et al*., 2009, 2010). Chemical modulation of global epigenetic status has proven successful in increasing the efficiency of cloned mice (Kishigami *et al*., 2006, 2007; Thuan *et al*., 2010). Its effectiveness in zebrafish remains to be investigated.

Zebrafish cloning efficiency is higher when donor cells are freshly isolated cells from embryos, rather than cultured of adult cells.

We found that zebrafish cloning efficiency was higher when donor cells were derived from freshly isolated cells of embryos rather than cultured adult cells (Siripattarapravat *et al*., 2009). Zebrafish embryos develop very rapidly during the first hours after fertilization. The cells used for SCNT are selected from a pool of cells, making it difficult to determine the exact origin and cell cycle stage of such cells. Although, at G1/G0, the size of cells might be slightly smaller than cells at other stages of cell cycle, and most of selected donor cells were small cells (Siripattarapravat *et al*., 2009), the size of cells is not an actual indicator. Whether the cell cycle stage of the donor cell plays an important role in zebrafish cloning is still undetermined. The utilization of readily available transgenic zebrafish Fucci, which can express dual fluorescence proteins, degradable (red and green), upon entering each cell cycle stage (Sugiyama *et al*., 2009), may help in narrowing down the choices of SCNT donor cells.

The *in vitro* system for culturing of cells isolated from zebrafish has been described for both embryonic stem cells (Fan *et al*., 2004) and primary cells derived from embryos and adult tissues (Siripattarapravat *et al*., 2009; Collodi *et al*., 1992; Driever and Rangini, 1993; Ghosh and Collodi, 1994). Transgenesis of cultured cells can be performed by liposome-mediated transfection and electroporation; however, the latter is recommended as giving high transfection efficiency (Siripattarapravat, unpublished data). Homologous recombination events have been investigated and can efficiently introduce targeted gene inactivation in embryos (Wu *et al*., 2006) and cultured cells of zebrafish (Fan *et al*., 2006). Positive and negative selection systems for cultured zebrafish cells have been described (Fan *et al*., 2006). Zinc finger nucleases have been shown to increase the rate of the DNA repair mechanism by homologous recombination in cultured human cells (Porteus and Baltimore, 2003; Urnov *et al*., 2005). The successful implementation of both zinc finger nucleases (Doyon *et al*., 2008; Meng *et al*., 2008) and transcription activator-like effector nucleases (Miller *et al*., 2010; Huang *et al*., 2011) in zebrafish, in combination with the high rate of DNA transfection, could enhance the success rate of gene targeting events in cultured cells. All the above evidence suggests that genetic modified zebrafish, especially conditional knockin/-out cloned zebrafish, might be generated from *in vitro* cultured and selected donor cells.

EGG ACTIVATION FOLLOWING NUCLEAR TRANSFER

The pattern of calcium oscillation following fertilization is important for nuclear reprogramming (Ross *et al*., 2009) and subsequent embryonic development (Ducibella and Fissore, 2008). In zebrafish, egg activation using a hypotonic shock triggers parthenogenesis or spontaneous activation. Normally, zebrafish eggs undergo parthenogenetic activation as soon as they are released from a female breeder, and that happens independently from a sperm. The sperm of zebrafish must find a micropyle within seconds after the eggs and milt have been released from the breeders, or fertilization would fail. Activated unfertilized eggs would undergo several abortive cleavages and never make it to developing embryos. Although a single wave of transient calcium has been recorded in both parthenogenesis and fertilization (Lee *et al*., 1999), detailed mechanisms underlying egg activation are different. Parthenogenetically activated eggs lack calcium oscillation at the cortical compartment (Sharma and Kinsey, 2008) and lack of active Fyn kinase, a Src family tyrosine kinase, that is upstream of Phospholipase C and Inositol-3-phosphate (Sharma and Kinsey, 2006; Wu and Kinsey, 2000). The unfertilized eggs supplemented with zebrafish sperm extracts, following parthenogenetic activation, sustain a pattern of calcium oscillation at the cortex, similar to that of fertilization (Sharma and Kinsey, 2008).

The protocol for egg activation following nuclear transfer in zebrafish calls for exposure to a hypotonic medium, which is plain fresh water. It is possible that a recent egg activation protocol following nuclear transfer – i.e., exposure to egg water – is not sufficient to trigger downstream pathways mimicking fertilization. This is an area that deserves further investigation. Modulation of the calcium oscillation pattern of activated reconstructed embryos, to mimic that of fertilized embryos, might improve nuclear reprogramming and increase cloning efficiency in zebrafish.

CLONING EFFICIENCY IN ZEBRAFISH

Cloning efficiency in zebrafish is shown in Table 16.1 (Siripattarapravat *et al*., 2009, 2010). The developmental rates of cloned embryos were recorded every 3 hours, and, as shown here, include the blastula stage, germ ring (entering gastrulation), 90% epiboly (complete gastrulation), day 1 (complete segmentation), day 4 (hatched fry), eating fry, and adult. Each stage of embryonic development has been previously characterized and described in

TABLE 16.1 Zebrafish Cloning Efficiency*

Strain of egg donor	Strain of cell donor	Number of SCNT operation	Number of eggs in all SCNT operations	Total number of embryos reaching indicated stage (mean percentage of embryos ± s.e.m.; n = number of SCNT operations)						
				Blastula	Germ Ring	90%Epiboly	1 day	4 days	Live (Eat)	Live (Adult)
WT	Golden-ET	3	109	44 (38.7 ± 4.8)	11 (10.0 ± 2.5)	7 (6.7 ± 1.0)	7 (6.7 ± 1.0)	7 (6.7 ± 1.0)	3 (3.6 ± 2.5)	2 (2.2 ± 1.2)
WT	Golden-AF	3	125	49 (39.7 ± 6.5)	17 (13.4 ± 2.2)	9 (7.3 ± 2.6)	2 (1.7 ± 0.9)	1 (1.0 ± 1.0)	0 (0)	0 (0)
H2A	Golden-ET	5	149	78 (51.8 ± 6.0)	33 (21.4 ± 3.9)	28 (18.1 ± 4.0)	23 (15.0 ± 4.2)	20 (13.0 ± 3.4)	2 (1.0 ± 0.6)	0 (0)
H2A	Golden-AF	7	193	66 (33.7 ± 2.7)	19 (9.8 ± 2.2)	13 (6.7 ± 1.4)	10 (5.3 ± 1.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TAB	TuLF-ET	3	143	73 (50.1 ± 10.5)	36 (24.4 ± 7.9)	22 (14.7 ± 6.0)	16 (10.7 ± 4.2)	12 (7.9 ± 3.7)	9 (6.0 ± 2.1)	5 (3.3 ± 1.7)
TAB	TuLF-AF	4	207	86 (37.9 ± 8.9)	25 (10.9 ± 3.6)	15 (7.2 ± 3.2)	7 (3.3 ± 0.7)	1 (1.8 ± 0.4)	0 (0)	0 (0)
TAB	HGn62A	4	290	180 (61.85 ± 3.00)	26 (9.36 ± 3.86)	15 (5.30 ± 1.93)	12 (4.27 ± 1.94)	2 (0.74 ± 0.43)	1 (0.38 ± 0.38)	0 (0)
TAB	HGn30A	3	225	146 (58.88 ± 18.79)	39 (15.22 ± 7.01)	18 (6.84 ± 3.46)	8 (3.05 ± 1.53)	2 (0.78 ± 0.78)	0 (0)	0 (0)
TAB	HGn28A	3	225	116 (52.21 ± 6.43)	35 (15.15 ± 3.65)	17 (7.51 ± 3.32)	9 (3.95 ± 2.10)	4 (1.74 ± 0.88)	2 (0.95 ± 0.95)	1 (0.48 ± 0.48)
TAB	HG21c	4	256	147 (54.62 ± 9.11)	75 (27.56 ± 8.20)	59 (20.22 ± 6.76)	39 (13.93 ± 4.50)	12 (4.55 ± 2.03)	1 (0.29 ± 0.29)	0 (0)
TAB	HGn8E	4	185	62 (33.24 ± 3.95)	16 (8.82 ± 1.02)	12 (6.32 ± 0.66)	8 (4.25 ± 1.26)	8 (4.25 ± 1.26)	3 (1.71 ± 0.61)	1 (0.71 ± 0.71)

Modified from Siripattarapravat et al. (2009, 2010).
**SCNT operations were performed using wild-type eggs (WT), transgenic H2AzGFP eggs (H2A) or TAB outcrossed eggs (TAB). Donor cells were isolated from either freshly dissociated tailbuds of embryos at the 15- to 20-somite stage embryonic tailbud (ET), or cultured adult fin fibroblasts (AF), from homozygous golden with AB background or Tübingen–long fin (TuLF) fish (Siripattarapravat et al., 2009). Donor cells of HGn62A-skin, HGn30A-hatch gland, HGn28A-skin, HG21C-fin and notochord, and HGn8E-heart, were freshly isolated from green fluorescence protein-tagged specific cells of indicated tissue (Siripattarapravat et al., 2010). Each SCNT operation was performed with egg and donor cells from separate individuals.*

detail (Kimmel *et al.*, 1995). At the blastula stage, cell division is a major event until approximately the tenth cell division, when the embryo enters mid-blastula transition – the stage where the cell cycle is no longer homogeneous and lengthens; at this point, zygotic genes start transcription. At the gastrulation stage, the cells begin differentiation and migration, which is completed at 90% epiboly; three germ layers are formed. At the segmentation stage, cells progress in differentiation, form somites, and start organogenesis. By day 3, the embryos have finished organogenesis, hatch from the chorion, and develop a swim bladder.

Approximately half of reconstructed embryos can undergo rapid cell division like normally fertilized embryos, and reach the blastula stage. Less than half of such embryos are able to upregulate zygotic transcripts, possibly shut down tissue specific gene expression, and continue to differentiation and migration. Only a handful of reconstructed embryos are finally capable of completing normal embryonic development and hatch. A thorough characterization of embryos that fail to develop at each step of development may provide clues indicating the major barriers to be overcome during SCNT.

Many strains of zebrafish have been used as laboratory animals. The most popular include wild type, Tübingen, AB line, and Tübingen–long fin. These fish lines have been examined for their potential as donor cells in cloning experiments (Siripattarapravat *et al.*, 2009, 2010), and all of them are capable of giving rise to cloned fish (Table 16.1).

Of all the parameters we have tested so far and that are known to have an impact on the overall efficiency of SCNT, the quality of recipient eggs seems to be the most significant. Although we have yet to find a reliable marker for "good" and "bad" eggs, the eggs obtained from outcrosses of the Tübingen and AB line, namely TAB, seem to give the best quality eggs so far.

Wild-type, Tübingen, AB line, and Tübingen–long fin fish lines have been examined for their potential as donor cells in cloning experiments, and all of them were capable of giving rise to cloned fish.

CONCLUSION AND CLOSING REMARKS

The first cloned zebrafish was generated in 2002 (Lee *et al.*, 2002), a half century after the very first cloned frogs. We have been able to replicate such an experiment, albeit with major modifications in the protocol (Siripattarapravat *et al.*, 2009). At this point, SCNT in zebrafish is again being discussed as a real possibility for introducing multiple genetic modifications in the fish genome, including knockin experiments. There is still much room for improvement in increasing the efficiency of zebrafish cloning. We speculate that comparative studies between species will shed light on common problems during SCNT, including that of mammalian models.

REFERENCES

Amanze, D., Iyengar, A., 1990. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. Development 109 (2), 495–500.

Amsterdam, A., Nissen, R.M., Sun, Z., Swindell, E.C., Farrington, S., Hopkins, N., 2004. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (35), 12792–12797.

Andersen, I.S., Østrup, O., Lindeman, L.C., Aanes, H., Reiner, A.H., Mathavan, S., et al., 2012. Epigenetic complexity during the zebrafish mid-blastula transition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 417 (4), 1139–1144.

Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., et al., 2012. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature 491 (7422), 114–118.

Beis, D., Stainier, D.Y., 2006. *In vivo* cell biology: following the zebrafish trend. Trends Cell Biol. 16 (2), 105–112.

Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., et al., 2005. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. Biotechniques 39 (2), 227–237.

Bradford, Y., Conlin, T., Dunn, N., Fashena, D., Frazer, K., Howe, D.G., et al., 2011. ZFIN: enhancements and updates to the zebrafish model organism database. Nucleic Acids Res. 39 (Database issue), D822–D829.

Briggs, R., King, T.J., 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38 (5), 455–463.

Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I., 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380 (6569), 64–66.

Cibelli, J., 2007. Developmental biology: a decade of cloning mystique. Science 316 (5827), 990–992.

Collodi, P., Kamei, Y., Ernst, T., Miranda, C., Buhler, D.R., Barnes, D.W., 1992. Culture of cells from zebrafish (Brachydanio rerio) embryo and adult tissues. Cell Biol. Toxicol. 8 (1), 43–61.

Corley-Smith, G.E., Brandhorst, B.P., Walker, C., Postlethwait, J.H., 1999. Production of haploid and diploid androgenetic zebrafish (including methodology for delayed *in vitro* fertilization). Methods Cell Biol. 59, 45–60.

Doyon, Y., McCammon, J.M., Miller, J.C., Faraji, F., Ngo, C., Katibah, G.E., et al., 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. Nat. Biotechnol. 26 (6), 702–708.

Driever, W., Rangini, Z., 1993. Characterization of a cell line derived from zebrafish (Brachydanio rerio) embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol. 29A (9), 749–754.

Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., et al., 1996. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. Development 123, 37–46.

Ducibella, T., Fissore, R., 2008. The roles of Ca^{2+}, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. Dev. Biol. 315 (2), 257–279.

Egli, D., Rosains, J., Birkhoff, G., Eggan, K., 2007. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. Nature 447 (7145), 679–685.

Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafish 4 (1), 21–40.

Fan, L., Crodian, J., Collodi, P., 2004. Culture of embryonic stem cell lines from zebrafish. Methods Cell Biol. 76, 151–160.

Fan, L., Moon, J., Crodian, J., Collodi, P., 2006. Homologous recombination in zebrafish ES cells. Transgenic Res. 15 (1), 21–30.

Ghosh, C., Collodi, P., 1994. Culture of cells from zebrafish (Brachydanio rerio) blastula-stage embryos. Cytotechnology 14 (1), 21–26.

Gurdon, J.B., Uehlinger, V., 1966. "Fertile" intestine nuclei. Nature 210 (5042), 1240–1241.

Gurdon, J.B., Laskey, R.A., Reeves, O.R., 1975. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. J. Embryol. Exp. Morphol. 34 (1), 93–112.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., et al., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development 123, 1–36.

Hart, N.H., Becker, K.A., Wolenski, J.S., 1992. The sperm entry site during fertilization of the zebrafish egg: localization of actin. Mol. Reprod. Dev. 32 (3), 217–228.

Hoffner, N.J., DiBerardino, M.A., 1980. Developmental potential of somatic nuclei transplanted into meiotic oocytes of *Rana pipiens*. Science 209 (4455), 517–519.

Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., Zhang, B., 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. Nature 29 (8), 699–700.

Iwamatsu, T., Yoshizaki, N., Shibata, Y., 1997. Changes in the chorion and sperm entry into the micropyle during fertilization in the teleostean fish, *Oryzias latipes*. Dev. Growth Differ. 39 (1), 33–41.

Kane, D.A., Kimmel, C.B., 1993. The zebrafish midblastula transition. Development 119 (2), 447–456.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203 (3), 253–310.

Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A.M., Goto, T., Lin, M.C., Tsai, S.B., 2002. The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. Exp. Gerontol. 38 (7), 777–786.

Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N.V., Wakayama, S., et al., 2006. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340 (1), 183–189.

Kishigami, S., Bui, H.T., Wakayama, S., Tokunaga, K., Van Thuan, N., Hikichi, T., et al., 2007. Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. J. Reprod. Dev. 53 (1), 165–170.

Kobayashi, I., Saito, K., Moritomo, T., Araki, K., Takizawa, F., Nakanishi, T., 2007. Characterization and localization of side population (SP) cells in zebrafish kidney hematopoietic tissue. Blood 111 (3), 1131–1137.

Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Choi, Y.J., Naeem, R., Tomizuka, K., Sullivan, E.J., et al., 2002. Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. Nat. Biotechnol. 20 (9), 889–894.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., et al., 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science 295 (5557), 1089–1092.

Lamason, R.L., Mohideen, M.A., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., et al., 2005. SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. Science 310 (5755), 1782–1786.

Lan, F., Bayliss, P.E., Rinn, J.L., Whetstine, J.R., Wang, J.K., Chen, S., et al., 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. Nature 449 (7163), 689–694.

Lee, K.W., Webb, S.E., Miller, A.L., 1999. A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. Dev. Biol. 214 (1), 168–180.

Lee, K.Y., Huang, H., Ju, B., Yang, Z., Lin, S., 2002. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. Nat. Biotechnol. 20 (8), 795–799.

Lemaitre, J.-M., Danis, E., Pasero, P., Vassetzky, Y., Méchali, M., 2005. Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. Cell 123 (5), 787–801.

Lindeman, L.C., Winata, C.L., Aanes, H., Mathavan, S., Alestrm, P., Collas, P., 2010. Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. Intl. J. Dev. Biol. 54 (5), 803–813.

Luo, D., Hu, W., Chen, S., Xiao, Y., Sun, Y., Zhu, Z., 2009. Identification of differentially expressed genes between cloned and zygote-developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos at the dome stage using suppression subtractive hybridization. Biol. Reprod. 80 (4), 674–684.

Ma, C., Fan, L., Ganassin, R., Bols, N., Collodi, P., 2001. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. 98 (5), 2461–2466.

Mathavan, S., Lee, S.G.P., Mak, A., Miller, L.D., Murthy, K.R.K., Govindarajan, K.R., et al., 2005. Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. PLoS Genet. 1 (2), 260–276.

McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H., Colman, A., Schnieke, A.E., Kind, A.J., 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature 405 (6790), 1066–1069.

Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D., Wolfe, S.A., 2008. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. Nat. Biotechnol. 26 (6), 695–701.

Mhanni, A.A., McGowan, R.A., 2004. Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. Dev. Genes Evol. 214 (8), 412–417.

Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., et al., 2010. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nature 29 (2), 143–148.

Nasevicius, A., Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. Nat. Genet. 26 (2), 216–220.

Ng, R.K., Gurdon, J.B., 2005. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. Proc. Natl Acad. Sci. USA 102 (6), 1957–1962.

Ng, R.K., Gurdon, J.B., 2008. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3. 3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. Nat. Cell Biol. 10 (1), 102–109.

Nusslein-Volhard, C., Dahm, R., 2002. Zebrafish: A Practical Approach. Oxford University Press, New York, NY.

Oback, B., 2009. Cloning from stem cells: different lineages, different species, same story. Reprod. Fertil. Dev. 21 (1), 83–94.

Oback, B., Wells, D.N., 2007. Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? Mol. Reprod. Dev. 74 (5), 646–654.

Ogiwara, K., Takano, N., Shinohara, M., Murakami, M., Takahashi, T., 2005. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (24), 8442–8447.

O'Boyle, S., Bree, R.T., McLoughlin, S., Grealy, M., Byrnes, L., 2007. Identification of zygotic genes expressed at the midblastula transition in zebrafish. Biochem. Biophys. Res. Commun. 358 (2), 462–468.

Pauls, S., Geldmacher-Voss, B., Campos-Ortega, J.A., 2001. A zebrafish histone variant H2A. F/Z and a transgenic H2A. F/Z:GFP fusion protein for *in vivo* studies of embryonic development. Dev. Genes Evol. 211 (12), 603–610.

Porteus, M.H., Baltimore, D., 2003. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. Science 300 (5620), 763.

Pyati, U.J., Look, A.T., Hammerschmidt, M., 2007. Zebrafish as a powerful vertebrate model system for *in vivo* studies of cell death. Semin. Cancer Biol. 17 (2), 154–165.

Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., et al., 2007. Production of cattle lacking prion protein. Nat. Biotechnol. 25 (1), 132–138.

Rideout III, W.M., Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., et al., 2000. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. Nat. Genet. 24 (2), 109–110.

Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K., Gemmell, N.J., 2009. Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 152 (1), 123–129.

Ross, P.J., Rodriguez, R.M., Iager, A.E., Beyhan, Z., Wang, K., Ragina, N.P., et al., 2009. Activation of bovine somatic cell nuclear transfer embryos by PLCZ cRNA injection. Reproduction 137 (3), 427–437.

Sakai, N., Burgess, S., Hopkins, N., 1997. Delayed *in vitro* fertilization of zebrafish eggs in Hank's saline containing bovine serum albumin. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 6 (2), 84–87.

Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S.H., Canese, K., et al., 2010. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 39 (Database), D38–D51.

Seki, S., Kouya, T., Tsuchiya, R., Valdez, D.M.J., Jin, B., Hara, T., et al., 2008. Development of a reliable *in vitro* maturation system for zebrafish oocytes. Reproduction 135 (3), 285–292.

Sharma, D., Kinsey, W.H., 2006. Fertilization triggers localized activation of Src-family protein kinases in the zebrafish egg. Dev. Biol. 295 (2), 604–614.

Sharma, D., Kinsey, W.H., 2008. Regionalized calcium signaling in zebrafish fertilization. Intl. J. Dev. Biol. 52 (5–6), 561–570.

Siripattarapravat, K., Pinmee, B., Venta, P.J., Chang, C.-C., Cibelli, J.B., 2009. Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. Nature 6 (10), 733–735.

Siripattarapravat, K., Busta, A., Steibel, J.P., Cibelli, J., 2009. Characterization and *in vitro* control of MPF activity in zebrafish eggs. Zebrafish 6 (1), 97–105.

Siripattarapravat, K., Pinmee, B., Chang, E.-A., Munoz, J.D., Kawakami, K., Cibelli, J.B., 2010. The influence of donor nucleus source on the outcome of zebrafish somatic cell nuclear transfer. Intl. J. Dev. Biol. 54 (11–12), 1679–1683.

Spence, R., Jordan, W.C., Smith, C., 2006. Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. Front. Zool. 3, 5.

Sprague, J., Bayraktaroglu, L., Bradford, Y., Conlin, T., Dunn, N., Fashena, D., et al., 2008. The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database provides expanded support for genotypes and phenotypes. Nucleic Acids Res. 36 (Database issue), D768–D772.

Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., Iimura, T., Fukami, K., Kitaguchi, T., Kawakami, K., et al., 2009. Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (49), 20812–20817.

Tadros, W., Lipshitz, H.D., 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. Development 136 (18), 3033–3042.

Tanaka, D., Takahashi, A., Takai, A., Ohta, H., Ueno, K., 2010. Attempt at cloning high-quality goldfish breed "Ranchu" by fin-cultured cell nuclear transplantation. Zygote 20 (01), 79–85.

Thuan, N.V., Kishigami, S., Wakayama, T., 2010. How to improve the success rate of mouse cloning technology. J. Reprod. Dev. 56 (1), 20–30.

Urnov, F.D., Miller, J.C., Lee, Y.-L., Beausejour, C.M., Rock, J.M., Augustus, S., et al., 2005. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature 435 (7042), 646–651.

Wakamatsu, Y., Ju, B., Pristyaznhyuk, I., Niwa, K., Ladygina, T., Kinoshita, M., et al., 2001. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). Proc. Natl. Acad. Sci. 98 (3), 1071–1076.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R., 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature 394 (6691), 369–374.

Westerfield, M., 1993. The Zebrafish Book : A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). University of Oregon Press, Eugene. OR.

White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., et al., 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis. Cell Stem Cell 2 (2), 183–189.

Wienholds, E., van Eeden, F., Kosters, M., Mudde, J., Plasterk, R.H., Cuppen, E., 2003. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. Genome Res. 13 (12), 2700–2707.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385 (6619), 810–813.

Wolenski, J.S., Hart, N.H., 1987. Scanning electron microscope studies of sperm incorporation into the zebrafish (*Brachydanio*) egg. J. Exp. Zool. 243 (2), 259–273.

Wolenski, J.S., Hart, N.H., 1988. Effects of cytochalasins B and D on the fertilization of zebrafish (*Brachydanio*) eggs. J. Exp. Zool. 246 (2), 202–215.

Wong, T.T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P., 2011. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae. Biol. Reprod. 84 (6), 1190–1197.

Wu, W., Kinsey, W.H., 2000. Fertilization triggers activation of Fyn kinase in the zebrafish egg. Intl J. Dev. Biol. 44 (8), 837–841.

Wu, Y., Zhang, G., Xiong, Q., Luo, F., Cui, C., Hu, W., et al., 2006. Integration of double-fluorescence expression vectors into zebrafish genome for the selection of site-directed knockout/knockin. Mar. Biotechnol. 8 (3), 304–311.

Yokomine, T., Hata, K., Tsudzuki, M., Sasaki, H., 2006. Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family: a possible link between existence of DNMT3L and genomic imprinting. Cytogenet. Genome Res. 113 (1–4), 75–80.

Zon, L.I., 1999. Zebrafish: a new model for human disease. Genome Res. 9 (2), 99–100.