

พิเศษได้โดยไม่มีที่สิ้นสุดนอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคทาง genetic engineering เข้าร่วมเพื่อผลิตสุกรที่มียีนส์พิเศษที่ควบคุมการผลิตโปรตีนหายากและมีราคาแพงเพื่อใช้ในการแพทย์ (Stice et al., 1998; Ziomek, 1998) และจากการที่วงการแพทย์ได้ยอมรับให้มีการนำเอาอวัยวะของสุกรไปปลูกถ่ายให้มนุษย์ได้เมื่อใช้เทคนิค gene targeting เข้าร่วมกับการโคลนนิ่งเพื่อลบยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านอวัยวะหลังจากปลูกถ่ายให้ผู้รับ เพื่อผลิตสุกรโคลนนิ่งที่ไม่มียีนส์เหล่านี้ซึ่งจะทำให้สามารถใช้อวัยวะสุกรเหล่านี้ไปปลูกถ่ายให้ผู้ป่วยโดยไม่มีการต่อต้าน ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมหาศาลต่อมนุษย์ (Lawson and Platt, 1996)

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้สารเคมีของ Sigma Chemical Company (St.Louis, MO) ในการทดลองครั้งนี้ หากนอกเหนือจากบริษัทนี้จะเขียนกำกับไว้

การเตรียมเซลล์ไขหนู

เก็บตัวอย่างไขหนูไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่น้ำเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 มม. แล้วนำไปไว้ในสารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin (Gibco), 0.04% EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) แล้วนำไปกวนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 37° C นาน 30 นาที แล้วนำไปตั้งทิ้งให้เนื้อเยื่อขนาดใหญ่ตกตะกอน แล้วแยกส่วนใสไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 5 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM (Gibco, Grand Island, NY) + 10% FCS (Gibco) แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเชื้อ(culture flask) ขนาด 25 ตร.ซม. ที่อุณหภูมิ 37° C ภายใต้ 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเชื้อแล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้มีปริมาณมากๆแล้วแช่แข็งที่ passage 3 เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

การเตรียมเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

เก็บตัวอย่างหัวใจไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่น้ำเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ตัดส่วนที่เป็นผิวหนังออกมาจนถึงส่วนกล้ามเนื้อแล้วตัดกล้ามเนื้อให้มีขนาดประมาณ 1x1 มม. แล้วนำไปไว้ในสารละลาย Trypsin/EDTA แล้วนำไปกวนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 37° C นาน 30 นาที แล้วนำไปตั้งทิ้งให้เนื้อเยื่อขนาดใหญ่ตกตะกอน แล้วแยกส่วนใสไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 5 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM + 10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° C ภายใต้ 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเชื้อแล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้มีปริมาณมากๆแล้วแช่แข็งที่ passage 3 เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

การเลี้ยงไขอ่อนในหลอดแก้ว

เก็บรังไข่สุกรจากโรงฆ่าสัตว์ โดยเก็บไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิระหว่าง 35-37° C ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ จะะดูไข่อ่อนจากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-6 มม. ด้วยเข็มขนาด 21G ที่ต่อกับกระบอก

ฉีดยาขนาด 10 มล. เก็บส่วนที่ดูดได้ไว้ในหลอดขนาด 15 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วดูดส่วนกันหลอดไปส่องตรวจหาโอโอไซท์ด้วยกล้อง stereo microscope คัดเลือกโอโอไซท์ที่มีคุณภาพดีไปเลี้ยงในน้ำยาในงานเลี้ยงเชื้อซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วนโอโอไซท์ 60 ใบ/น้ำยา 500 μ l น้ำยาเลี้ยงโอโอไซท์ประกอบด้วย TCM199 (Gibco) ที่เติมด้วย 10% follicular fluid สุกร, 10 i.u./ml. PMSG (Folligon[®], Intervet), 10 i.u./ml. HCG (Chorulon[®], Intervet) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 39° C ภายใต้ 5% CO₂ in air นาน 36 ชั่วโมง

การโคลนนิ่ง

การดูดนิวเคลียสออก

นำโอโอไซท์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วเสร็จแล้วมาย่อยเซลล์ด้วย 0.1% hyaluronidase แล้วส่องตรวจดูด้วยกล้องกำลังขยาย 200 เท่า เพื่อคัดเลือกโอโอไซท์ที่เจริญถึงระยะ Metaphase II (M II) ซึ่งจะมี first polar body (Fig 1 A) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulators ภายใต้กล้อง inverted microscope (Zeiss, Axiovert 135) ในน้ำยาที่มี 5 μ g/ml. cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 μ g/ml. Hoechst 33342 แล้วส่องตรวจดูภายใต้ epifluorescence microscope (Zeiss, Axiovert 135)

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

นำเซลล์ไข่มุและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 39° C แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS ในขวดเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° C ภายใต้ 5% CO₂ in air แล้ว passage ทุกๆ 4-5 วัน จะใช้เซลล์ไข่มุและเซลล์กล้ามเนื้อจนถึง passage ที่ 8

การฉีดเซลล์ต้นแบบและ เชื่อมเซลล์

ใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitelline space ของโอโอไซท์ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว (Fig 1 B,C) จากนั้นนำไปเชื่อมด้วยการนำโอโอไซท์ที่ตรงละใบไปไว้ระหว่างปลายของ electrode (Fig 1 D) ในน้ำยาเชื่อมเซลล์ (0.3 M mannitol, 0.1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 0.5 mM HEPES) ด้วยกระแสไฟฟ้า DC pulse โดยใช้เครื่อง Electro Cell Fusion (BTX 200) แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199 + 10% FCS นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted microscope

การทดลองที่ 1

ทำการทดสอบผลของฟอสฟอรัสพาราเมเตอร์ต่ออัตราการเชื่อม จะตรวจสอบผลของการใช้ DC pulse voltage 20 V/โอโอไซท์ ในระยะเวลา 10, 20, 30, 40 และ 50 μ sec จำนวน 2 ครั้ง

เลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้วโดยนำเซลล์ที่เชื่อมกันมาเลี้ยงในน้ำยา NCSU 23 + 4 mg/ml fatty acid free BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/น้ำยา 100 μ l ที่อุณหภูมิ 39° C ภายใต้ 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา NCSU 23 + 4 mg/ml fatty acid free BSA ในสัดส่วน 5-10 ใบ/น้ำยา 100 μ l ที่อุณหภูมิ 39° C, 5% CO₂ ต่อไปอีก 6 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของตัวอ่อนภายใต้กล้อง inverted microscope ทุกๆวัน

การทดลองที่ 2

ทำการทดสอบผลของระยะเวลาหลังเลี้ยงไข่อ่อนต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนดังนี้

A) เลี้ยงโอโอไซท์ในหลอดแก้วนาน 36 ชั่วโมงแล้วนำมาเข้าสู่ขั้นตอนการโคลนนิ่ง โดยจะเชื่อมเซลล์ที่ 41-42 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงโอโอไซท์ในหลอดแก้ว

B) เลี้ยงโอโอไซท์ในหลอดแก้วนาน 41 ชั่วโมงแล้วนำมาเข้าสู่ขั้นตอนการโคลนนิ่ง โดยจะเชื่อมเซลล์ที่ 46-47 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงโอโอไซท์ในหลอดแก้ว

C) เลี้ยงโอโอไซท์ในหลอดแก้วนาน 46 ชั่วโมงแล้วนำมาเข้าสู่ขั้นตอนการโคลนนิ่ง โดยจะเชื่อมเซลล์ที่ 51-52 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงโอโอไซท์ในหลอดแก้ว

ใช้ฟิวส์ชั้นพารามิเตอร์ที่ได้ผลเหมาะสมที่สุดในการทดลองที่ 1 มาใช้เชื่อมเซลล์ในการทดลองนี้

ใช้การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้วเหมือนการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3

ใช้ฟิวส์ชั้นพารามิเตอร์ที่ได้ผลเหมาะสมที่สุดในการทดลองที่ 1 มาใช้เชื่อมเซลล์ในการทดลองนี้ และระยะเวลาหลังเลี้ยงโอโอไซท์ที่เหมาะสมที่สุดในการทดลองที่ 2 มาใช้ในการทดลองนี้

เลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้วโดยนำเซลล์ที่เชื่อมกันมาเลี้ยงในน้ำยา NCSU 23 + 4 mg/ml fatty acid free BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/น้ำยา 100 μ l ที่อุณหภูมิ 39° C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา NCSU 23 + 4 mg/ml fatty acid free BSA ที่มีเซลล์บุท่อนำไข่ของสุกร (co-culture) และไม่มีเซลล์บุท่อนำไข่ของสุกร (nonco-culture) ในน้ำยาในสัดส่วน 5-10 ใบ/น้ำยา 100 μ l ที่อุณหภูมิ 39° C, 5% CO₂ ต่อไปอีก 6 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของตัวอ่อนภายใต้กล้อง inverted microscope ทุกๆวัน

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

จากการนำโอโอไซท์เลี้ยงในหลอดแก้วนาน 36 ชั่วโมง ได้อัตราการเจริญเป็นระยะ MII 41% (378/923) ได้ประสิทธิภาพการดัดนิวเคลียส 94%(351/374) เมื่อยืนยันโดยนำส่วนที่ดัดได้ไปย้อมด้วย Hoecht 33342 ได้อัตราความสำเร็จการฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าในโอโอไซท์ที่ดัดนิวเคลียสออกแล้ว 97% (340/350) จากตารางที่ 1 เซลล์ใบหูและเซลล์กล้ามเนื้อหางมีอัตราการเชื่อมสูงสุดเมื่อใช้กระแสไฟฟ้า 20 V/โอโอไซท์ นาน 50 μ sec อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ใช้เวลานาน 30 และ 40 μ sec อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะ 8-เซลล์ (Fig 1 F) ทั้งสองกลุ่มเซลล์ต้นแบบสูงสุดเมื่อใช้กระแสไฟฟ้า นาน 50 μ sec อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ใช้เวลานาน 30 และ 40 μ sec เช่นเดียวกัน ในการทดลองนี้ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์

การทดลองที่ 2

จากการนำโอโอไซท์เลี้ยงในหลอดแก้วนาน 36(กลุ่ม A), 41(กลุ่ม B) และ 46(กลุ่ม C) ชั่วโมง ได้ อัตราการเจริญเป็นระยะ MII 41%(174/425), 46%(172/374) และ 52%(180/348) ตามลำดับ จากตารางที่ 2 อัตราการเชื่อมเมื่อใช้ DC pulse 20 V/โอโอไซท์ นาน 40 μ sec 2 ครั้ง ของกลุ่ม A, B และ C ทั้งสองกลุ่ม

เซลล์ต้นแบบ ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะ 8-เซลล์ทั้งสองกลุ่มเซลล์ต้นแบบในกลุ่ม A, B และ C ไม่มีความแตกต่างกัน ในการทดลองนี้ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์

Table 1. Effects of fusion parameters on fusion rate and *in vitro* development of cloned porcine embryos derived from adult ear and tail muscle cells.

Donor cells	Fusion parameters	Fusion	Fused (%)	Embryos cultured	2-Cell (%)*	4-Cell (%)*	8-cell (%)*
Ear cells	20 V 10 μ sec	33	3 (9)	3	1 (33)	0	0
	20 V 20 μ sec	33	7 (21)	7	3 (43)	2 (29)	1 (4)
	20 V 30 μ sec	34	12 (35)	12	5 (42)	3 (25)	2 (17)
	20 V 40 μ sec	34	22 (65)	22	11 (50)	6 (27)	4 (18)
	20 V 50 μ sec	34	24 (71)	24	13 (54)	7 (29)	5 (21)
Tail muscle cells	20 V 10 μ sec	34	3 (9)	3	1 (33)	0	0
	20 V 20 μ sec	33	6 (18)	6	3 (50)	1 (17)	0
	20 V 30 μ sec	35	14 (40)	14	6 (43)	3 (21)	2 (17)
	20 V 40 μ sec	34	18 (53)	18	9 (50)	4 (22)	3 (17)
	20 V 50 μ sec	36	22 (61)	22	13 (59)	6 (27)	4 (18)

*Percentage from embryos cultured.

Table 2. Effects of time after *in vitro* maturation at the time of fusion on fusion rate and *in vitro* development of cloned porcine embryos derived from adult ear and tail muscle cells.

Donor cells	Treatments*	Fusion	Fused (%)	Embryos cultured	2-Cell (%)**	4-Cell (%)**	8-cell (%)**
Ear cells	A	80	54 (68)	54	29 (54)	14 (26)	10 (19)
	B	80	55 (69)	55	28 (51)	13 (24)	9 (16)
	C	80	53 (66)	53	26 (49)	12 (23)	9 (17)
Tail muscle cells	A	80	50 (63)	50	27 (54)	12 (24)	9 (18)
	B	80	49 (61)	49	27 (55)	11 (22)	10 (20)
	C	80	48 (60)	48	25 (52)	11 (23)	8 (17)

* A Maturation time 36 h; fusion at 41-42 h post-maturation

B Maturation time 41 h; fusion at 46-47 h post-maturation

C Maturation time 46 h; fusion at 51-52 h post-maturation

** Percentage from embryos cultured.

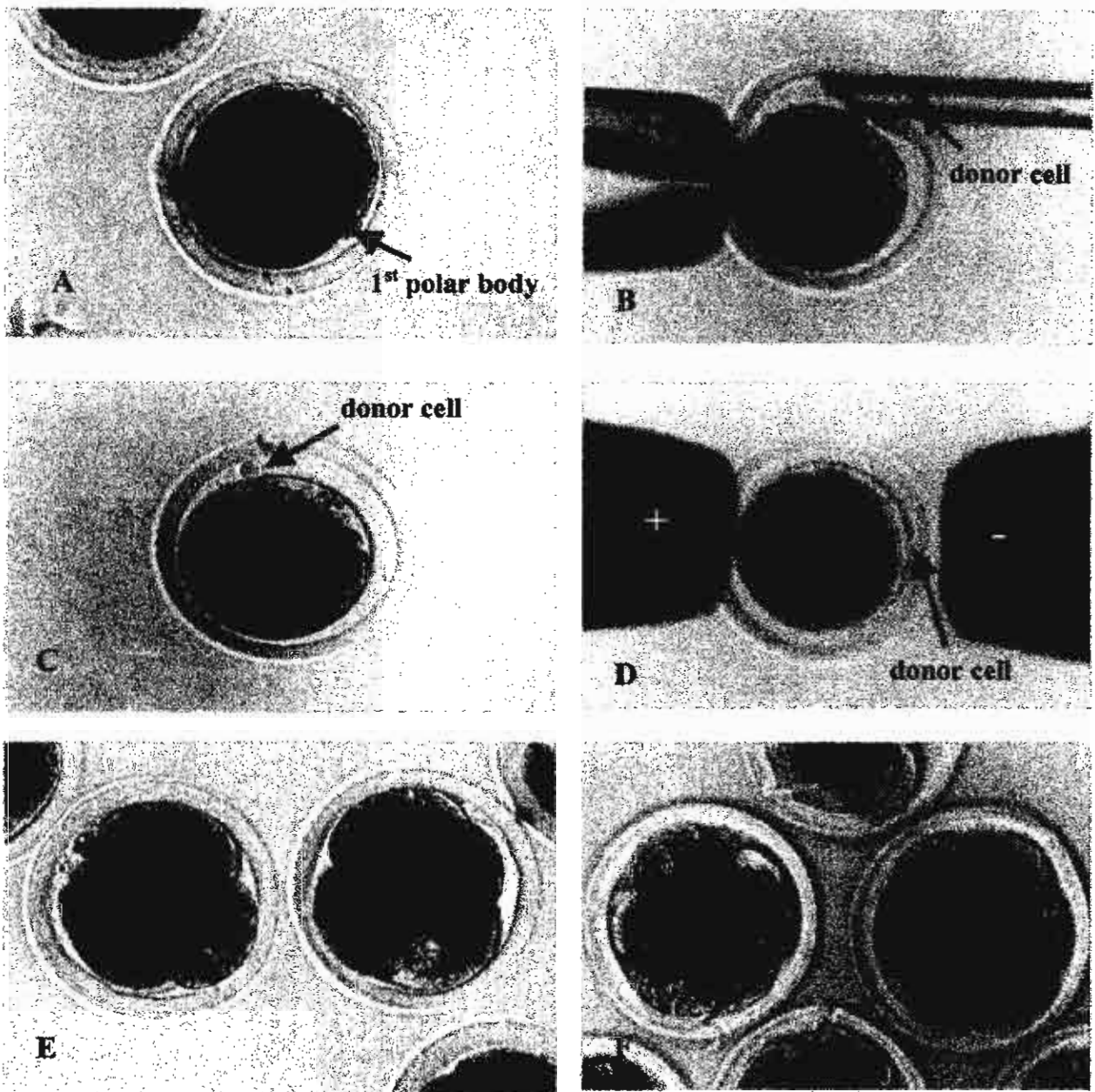


Fig 1 A) Oocyte at MII stage. **B)** Insertion of donor cell into perivitelline space of enucleated oocyte. **C)** After insertion donor cell. **D)** Couplet held between the pair of electrodes during fusion. **E)** Embryos at 4-cell stag. **F)** Embryos at 8-cell stage. **A-F** (200x)

การทดลองที่ 3

จากการใช้โอโอไซท์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วนาน 46 ชั่วโมงและเชื่อมโดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 V/โอโอไซท์ นาน 40 μ sec 2 ครั้ง เพื่อผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ 8-เซลล์ จากตารางที่ 3 เมื่อนำตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์มาเลี้ยงแบบ co-culture และ nonco-culture กับเซลล์บุท่อไข่สุกร. ปรากฏว่าทั้งสองกลุ่มไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์

Table 3. Effects of culture systems on *in vitro* development of 8-cell stage cloned porcine embryos derived from adult ear and tail muscle cells.

Donor cells	Culture systems	Embryos cultured	Morula (%)
Ear cells	Co-culture	30	0
	Nonco-culture	30	0
Tail muscle cells	Co-culture	30	0
	Nonco-culture	30	0

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเจริญของโอโอไซท์ถึงระยะ M II เมื่อเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 46 ชั่วโมง มีอัตราสูงกว่าเลี้ยงนาน 36 และ 41 ชั่วโมง แต่มีอัตราต่ำกว่าที่มีรายงานมาแล้วโดยได้ถึง 90.9% ซึ่งใช้วิธีการเลี้ยงคล้ายคลึงกัน (Tao et al., 1999) เป็นที่น่าสังเกตว่าวิธีการฆ่าสุกรในบ้านเราจะใช้วิธีนำซากสุกรไปจุ่มในน้ำร้อนก่อนขูดขนออกจากผิวหนัง จากการวัดอุณหภูมิช่องท้องหลังจากจุ่มในน้ำร้อนจะได้ระหว่าง 41-43°C ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิร่างกาย 2-4°C ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อุณหภูมิของรังไข่เพิ่มสูงขึ้นแล้วมีผลทำให้โอโอไซท์ที่นำไปเลี้ยงในหลอดแก้วเจริญถึงระยะ M II ต่ำกว่ารายงานการทดลองจากประเทศสหรัฐอเมริกา คานาดา หรือ ญี่ปุ่น ซึ่งใช้การแล่หนังสุกรออกโดยไม่ผ่านการจุ่มน้ำร้อน

ในระยะเริ่มต้นการทำโคลนนิ่งจะใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบซึ่งมีขนาดใหญ่ โดยในขั้นตอนการเชื่อมนิยมใช้ fusion chamber เป็นขั้วไฟฟ้าโดยไม่มีปัญหาเกี่ยวกับอัตราการเชื่อมต่ำในการทำโคลนนิ่งโค (Robl et al., 1987; Westhusin et al., 1991) สุกร (Prather et al., 1989) แกะ (Smith and Wilmut, 1989) แพะ (Yong and Yuglang, 1998) และ กระต่าย (Collas et al., 1992) จากการที่เซลล์ร่างกายมีขนาดเล็กมีผลทำให้เยื่อผิวของเซลล์ต้นแบบและโอโอไซท์สัมผัสกันน้อย ซึ่งเมื่อใช้ fusion chamber แล้วทำให้ได้อัตราการเชื่อมต่ำในโค (Kato et al., 1998; Edwards et al., 1999; Hill et al., 1999; Shin et al., 1999; Vignon et al., 1999; Wells et al., 1999; Zakhartchenko et al., 1999) สุกร (Du et al., 1999) และ กระต่าย (Dinnyes et al., 1999; Garat et al., 1999) Mitani และคณะ (1993) รายงานการนำโอโอ

ไซท์ครึ่งละไปไปไว้ระหว่างปลายทั้งสองของ electrode เพื่อเชื่อมเซลล์จากตัวอ่อนและโอโอไซท์ที่ได้ อัตราการเชื่อม 75-98% มีรายงานของเราก่อนหน้านี้ในการใช้ electrode เชื่อมเซลล์ลูกอ่อนและเซลล์คุมูลัสกับโอโอไซท์ในการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักได้อัตราการเชื่อม 85-88% (Parnpai et al., 1999; Parnpai et al., 2000b) และการเชื่อมเซลล์ใบหูกับโอโอไซท์ในการโคลนนิ่งโคได้อัตราการเชื่อม 88-92% (Parnpai et al., 2000a) ซึ่งการทดลองเหล่านี้ใช้พัลส์ชั้นพารามิเตอร์ 30 V/โอโอไซท์ นาน 15 μ sec 2 ครั้ง สำหรับการโคลนนิ่งสุกรในการทดลองที่ 1 เมื่อใช้ electrode ได้อัตราการเชื่อมสูงสุดเมื่อใช้พัลส์ชั้นพารามิเตอร์ 20 V/โอโอไซท์ นาน 50 μ sec 2 ครั้ง แต่ยังคงต่ำกว่าที่มีรายงานในกระบือปลักและโคแม้ว่าจะใช้วิธีเดียวกัน

ตามปกติแล้วเมื่อตัวสูกิจจะเข้าไปในโอโอไซท์ขณะปฏิสนธิจะไปกระตุ้นทำให้ปริมาณ intracellular free Ca^{++} [Ca^{++}]i ภายในโอโอไซท์เพิ่มขึ้นชั่วขณะซึ่งเป็นการทำให้เริ่มต้นโปรแกรมการเจริญเติบโตของโอโอไซท์ สามารถเลียนแบบการกระตุ้นแบบนี้ได้โดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งนิยมใช้กันในการกระตุ้นโอโอไซท์ในขั้นตอนการทำโคลนนิ่ง (Prather et al., 1989) นอกจากนี้แล้วยังสามารถใช้สารเคมีกระตุ้นซึ่งได้แก่ calcium ionophore (Wang et al., 1998) และ ethanol (Didion et al., 1990) ในขณะที่มีการเชื่อมด้วยกระแสไฟฟ้าจะเป็นการกระตุ้นโอโอไซท์ไปในตัว ในการทดลองที่ 1 การใช้กระแสไฟฟ้า DC pulse 20V/โอโอไซท์ นาน 30, 40 และ 50 μ sec 2 ครั้ง มีความเหมาะสมในการเชื่อมเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิด และสามารถทำให้มีการแบ่งตัวหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว แต่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์ได้

ในการทดลองที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตถึงระยะ 8-เซลล์ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงในหลอดแก้วนาน 36, 41 และ 46 ชั่วโมง ของทั้งสองเซลล์ต้นแบบ แสดงว่าระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซท์อาจจะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน แต่การทดลองนี้ยังพิสูจน์ได้ไม่ชัดเจนเนื่องจากตัวอ่อนหยุดเจริญที่ระยะ 8-เซลล์ ในการโคลนนิ่งตัวอ่อนสุกรโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ Tao และคณะ (1999) ได้ตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิส 7% ส่วน Han และคณะ (2000) ได้ตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสระหว่าง 6-11%

จากการทดลองที่ 3 ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์แบบ co-culture และ nonco-culture กับเซลล์บุท่อไข่สุกร ชนิดไหนดีกว่ากันเนื่องจากตัวอ่อนไม่เจริญเติบโตต่อทั้งสองกลุ่ม จากการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มีข้อสงสัยเกิดว่าตัวอ่อนหยุดเจริญเติบโตที่ระยะ 8-เซลล์ ทั้งๆที่ใช้น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิดเดียวกันและมีอัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างจากที่รายงานโดย Tao และคณะ (1999) ซึ่งอาจจะมีผลมาจากการนำซากสุกรไปจุ่มในน้ำร้อนก็ได้ หรืออาจจะเกิดจากสาเหตุอื่นๆซึ่งควรศึกษาวิจัยต่อไป

จากการทดลองนี้อาจสรุปได้ดังนี้

1. พิวชั้นพารามิเตอร์ ด้วยการใช้กระแสไฟฟ้า DC pulse 20V/โอโอไซท์ นาน 30, 40 และ 50 μ sec 2 ครั้ง มีความเหมาะสมในการเชื่อมเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิดกับโอโอไซท์
2. การนำโอโอไซท์มาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 36, 41 และ 46 ชั่วโมง ได้อัตราการเชื่อมและเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะ 8-เซลล์ไม่แตกต่างกันในเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิด
3. ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าการนำตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ 8-เซลล์มาเลี้ยงแบบ co-culture และ nonco-culture กับเซลล์บุท่อไข่สุกร แบบไหนจะดีกว่ากันเนื่องจากว่าทั้งสองกลุ่มไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโรงฆ่าสัตว์ในบ้านเราทุกแห่งจะใช้วิธีนำซากสุกรไปจุ่มในน้ำร้อนก่อนขูดขนออกจากผิวหนัง ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าอุณหภูมิร่างกายที่เพิ่มขึ้น 2-4°C ภายหลังจุ่มน้ำร้อนจะมีผลต่ออัตราการเจริญของโอโอไซต์ถึงระยะ M II และการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งถึงระยะบลาสโตซิสต์ในหลอดแก้วหรือไม่ ในอนาคตควรจะมีการทดลองโดยเจาะดูโอโอไซต์จากสุกรมีชีวิตเพื่อนำเอามาใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Bondioli, K.R., Westhusin, M.E. and Looney, C.R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33: 165-174.
- Bondioli, K.R. 1993. Nuclear transfer in cattle. *Mol.Reprod.Dev.* 36: 274-275.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. 1998. Clones transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.
- Collas, P., Balise, J.J. and Robl, J.M. 1992. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol.Reprod.* 46: 492-500.
- Didion, B.A., Martin, M.J. and Markert, C.L. 1990. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 33: 1165-1175.
- Dinnyes, A., Liu, L., Dal, Y., Xu, J., Zhou, P., Van de Velde, A and Yang, X. 1999. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblast cells. *Theriogenology* 51: 199.
- Du, Z.T., Verma, P.J., Crocker, L.A., Faast, R., Lyons, I.G. and Nottle, M.B. 1999. Development of nuclear transfer embryos using porcine fetal fibroblasts. *Theriogenology* 51: 201.
- Edwards, J.L., Powell, A.M., Talbot, N.C., Garrett, W.M. and Pursel, V.G. 1999. Development of reconstructed embryos activated immediately or 4 hours after assessment of fusion with fetal fibroblasts. *Theriogenology* 51: 202.
- Garat, V.V., Lagutina, I.S., Mesina, M.N., Chernich, V.J. and Prokofiev, M.I. 1999. Developmental potential of rabbit nuclear transfer embryos derived from donor fetal fibroblast. *Theriogenology* 51: 203.
- Han, Y.M., Koo, D.B., Kang, Y.K., Choi, Y.H., Park, J.S., Han, S.K., Son, D.S. and Lee, K.K. 2000. Developmental potential of porcine embryos produced by nuclear transfer using fetal fibroblast. *Theriogenology* 53: 217.
- Hill, J.R., Winger, Q.A., Jones, K.L., Thompson, J.A., Burghardt, R.C. and Westhusin, M.E. 1999. Serum starvation of bovine fetal fibroblasts prior to nuclear transfer increases in vitro development rates. *Theriogenology* 51: 204.
- Illmensee, K. and Hoppe, P.C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23: 9-18.

- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Dogushi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of single adult. *Science* 281: 2095-2098.
- Lawson, J.H. and Platte, J.L. 1996. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* 62: 303-331.
- Mitani, T., Utsumi, K. and Iritani, A. 1993. Developmental ability of enucleated bovine oocytes matured in vitro after fusion with single blastomeres of eight-cell embryos matured and fertilized in vitro. *Mol.Reprod.Dev.* 34: 314-322.
- Nagashima, H., Yamakawa, H. and Saito, S. 1992. Transplantation of porcine blastomere nuclei into oocytes collected from prepubertal gilts. *J. Reprod. Dev.* 38: 73-78.
- Nagashima, H., Ashman, R.J. and Nottle, M.B. 1997. Nuclear transfer of porcine embryos using cryopreserved delipated blastomeres as donor nuclei. *Mol.Reprod.Dev.* 48: 339-343.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. *Buffalo J.* 15: 371-384.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000a. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Theriogenology* 53: 239.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000b. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction* Stockholm, July 2-6, 2000, Abstracts Vol.2: 241.
- Prather, R.S., Barnes, F.L., Sim, M.M., Robl, J.M. Eystone, W.H. and First, N.L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol.Reprod.* 37: 859-866.
- Prather, R.S., Sims, M.M. and First, N.L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol.Reprod.* 41: 414-418.
- Robl, J.M., Prather, R., Barnes, F., Eystone, W., Northey, D., Gilligan, B. and First, N. 1987. Nuclear transplantation in cattle embryos. *J.Anim.Science.* 64: 642-647.
- Saito, S., Yamakawa, H. and Nagashima, H. 1992. Ability of porcine blastomere nuclei derived from 8- to 16-cell stage embryos to support development following transfer to enucleated oocytes in vitro. *Assis. Reprod. Tech./Andro.* 259: 257-266.
- Seidel, G.E. 1995. Sexing, bisection and cloning embryo: perspectives and applications to animal breeding. In: *Proc. of Symposium on Reproduction and Animal Breeding*, Milan, pp. 147-154.

- Shin, T.Y., Roh, S., Kim, S.K., Lee, B.C. and Hwang, W.S. 1999. Successful nuclear transplantation of fetal fibroblast cells as donor nuclei in Korean native cattle. *Theriogenology* 51: 214.
- Smith, L.C. and Wilmut, I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod.* 40: 1027-1035.
- Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1993. Multiple generation bovine embryo cloning. *Biol.Reprod.* 48: 715-719.
- Stice, S.L., Robl, J.M., Ponce de Leon, F.A., Jerry, J., Golueka, P.G., Cibelli, J.B. and Kane, J.J. 1998. Cloning: New breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology* 49: 129-138.
- Tao, T., Boquest, A.C., Machaty, Z., Petersen, A.L., Day, B. and Prather, R.S. 1999. Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fibroblast cells. *Cloning* 1: 55-62.
- Terlouw, S.L., Prather, R.S. and Day, B.N. 1992. In vitro development of nuclear transplant pig embryos. *Theriogenology* 37: 309.
- Vignon, X., LeBourhis, D., Chesne, P., Marshal, J., Heyman, Y. and Renard, J.P. 1999. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. *Theriogenology* 51: 216.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M. Jonhson, K.R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374.
- Wang, W.H., Machaty, Z., Abeydeera, L.R. Prather, R.S. and Day, B.N. 1998. Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the establishment of the zona block to sperm penetration after activation. *Biol.Reprod.* 58: 1357-1366.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.S.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wells, D.N., Misica, P.M. and Tervit, H.R. 1998. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol.Reprod.* 60: 996-1005.
- Westhusin, M.E., Pryor, J.H. and Bondioli, K.R. 1991. Nuclear transfer in cattle embryos: A comparison of 5-day, 6-day, frozen-thawed, and nuclear transfer donor embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 28: 119-123.
- Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63-65.
- Yong, Z. and Yuqiang, L. 1998. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: Production of goats by serially cloning embryos. *Biol.Reprod.* 58: 266-269.

- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, M., Prella, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J.Reprod.Fert.* 115: 325-331.
- Ziomek, C.A. Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology* 49: 139-144.