# การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

## บทคัดย่อ


โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 มีวัตุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการโคลนนิ่งโคอเมริกันบราห์มันโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ และทดสอบอัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับ ได้อัตราการเชื่อมเซลล์สำเร็จ 84.7% และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจนถึงระยะ blastocyst 31.8% หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst จำนวน 62 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 39 ตัว พบว่าหลังจากล้วงตรวจที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีแม่โคตั้งท้อง 14 ตัว (36%) มีโคตัวรับแท้งลูกเดี่ยวทั้งหมด 4 ตัว ระหว่าง 200-240 วันหลังเป็นสัด และมีแม่โคจำนวน 10 ตัว ที่ตั้งท้องจนกระทั่งคลอด (26%) ในจำนวนนี้มีลูกโคคลอดออกมาทั้งหมด 11 ตัว เป็นการตั้งท้องลูกแฝด 1 ตัว ลูกโคโคลนนิ่ง 4 ตัวเสียชีวิตหลังคลอด มีลูกโคโคลนนิ่งมีชีวิตหลังคลอด 7 ตัวซึ่งมีการเจริญเติบโตปกติหลังคลอด จากการตรวจ DNA microsatellite พบว่าลูกโคโคลนทั้ง 7 ตัวมีแถบ DNA เหมือนโคต้นแบบทุกประการและแตกต่างจากโคตัวรับ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคอเมริกันบราห์มันเพศผู้สามารถโปรแกรมตัวเองใหม่ได้ดีหลังนำไปทำโคลนนิ่ง และมีลูกโคโคลนนิ่งเกิดมามีชีวิตในอัตราสูง

การทดลองที่ 2 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของระยะของ hatching ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสต่อการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification และการเติม linoleic acid-albumin (LAA) ในน้ำยา IVC และ Ficoll ในน้ำยา vitrification จะเพิ่มการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งหรือไม่ ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ นำไข่ที่เชื่อมกับเซลล์ต้นแบบแล้วไปกระตุ้นด้วย ethanol และ cycloheximide-cytochalasin D (วัน 0) จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA นำตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงไว้ 7 วัน มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสัดส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตัวอ่อนที่ออกมาจากชั้น zona และเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์ตัวอ่อนที่อยู่ภายในชั้น zona นำตัวอ่อนไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification ในน้ำยา TCM199 + 20% FBS ที่มี 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 0.5 M sucrose ที่เติมหรือไม่เติม 10% Ficoll โดยใช้ Cryotop เป็นภาชนะสำหรับแช่แข็ง ตรวจสอบการอยู่รอดหลังจากทำละลายด้วยการเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง การเติม LAA ลงในน้ำยา IVC และน้ำยาสำหรับทำ vitrification ที่ไม่เติม Ficoll จะได้อัตราอยู่รอดของกลุ่ม early-hatching blastocyst (77%) ไม่แตกต่างจากกลุ่ม middle- และ late-hatching blastocyst (74 และ 80%, ตามลำดับ) การเติม Ficoll ในน้ำยา vitrification ไม่ช่วยให้มีอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อนโคลนนิ่ง

ระยะบลาสโตซีสเพิ่มขึ้น (54-68%) ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst ที่ผลิตในน้ำยาที่ไม่มี LAA จะรอดต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่ม late-hatching blastocyst (56% vs 80%, $p < 0.05$) การตั้งท้องจนคลอดลูกโคโคลนนิ่งออกมาพบได้เฉพาะการฝากตัวอ่อนสดให้ตัวรับเท่านั้น การทดลองนี้สรุปได้ว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ บลาสโตซีสไม่ว่าจะอยู่ในระยะ hatching ใดก็ตาม หากเลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA จะมีอัตรารอดหลังจากแช่แข็งเท่าเทียมกัน

การทดลองที่ 3 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในน้ำยา vitrification ต่ออัตราการอยู่รอดหลังแช่แข็งโดยวิธี micro-drop ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa medium + 0.3% BSA นาน 7 วัน นำตัวอ่อนระยะ middle- และ late-hatching blastocyst ไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO) หรือ VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO) โดยวิธี micro-drop ทำละลายตัวอ่อนโดยนำ micro-drop ไปไว้ใน 0.6 M sucrose ที่ 38° C นาน 5 นาที และล้างใน 0.4 0.2 และ 0 M sucrose ที่ 38° C นาน 5 นาทีในแต่ละครั้ง ตรวจสอบการอยู่รอดหลังจากทำละลายด้วยการเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง และนำตัวอ่อนไปย้อมแบบ differential ด้วย 75 µg/mL propidium iodide + 100 µg/mL Hoechst 33258 ความอยู่รอดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็งในน้ำยา VS33 (86%) ต่ำกว่าในน้ำยา VS35 (94%) เล็กน้อย จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนที่แช่แข็งใน VS33 และ VS35 มี 130±50 และ 128±30 ตามลำดับ โคตัวรับมีการตั้งท้องที่ 60 วันหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง 15.8 และ 11.8 % ตามลำดับ มีเพียงโคตัวรับที่ตั้งท้องจากตัวอ่อนสดได้คลอดลูกออกมา การทดลองนี้สรุปได้ว่าสามารถประสบความสำเร็จในการนำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสนำไปทำ vitrification ในน้ำยา VS33 และ VS35 โดยวิธี micro-drop

## Abstract

This project was divided into 3 experiments. In Experiment 1, the objective was to examined the efficiency of cloning American Brahman bull using ear fibroblast as donor cell and tested the pregnancy and calving rates after transferred cloned embryos to recipients. The fusion and blastocyst rates were 84.7 and 31.8 %, respectively. Sixty two cloned hatching blastocysts were transferred to 39 recipients resulting 14 (36%) recipients pregnant at 60 days. Four recipients aborted 4 fetuses during 200-240 days of pregnant. Ten recipients (26%) gave birth to 11 calves (1 twin calves), 4 calves died soon after birth whereas another 7 calves survived and had normal development after birth. The DNA microsatellite analysis showed that cloned calves and donor cells were the same pattern and obviously different from recipients. In conclusion, ear

fibroblasts of American Brahman bull can be reprogrammed after cloning and produced high rate of live calves born.

Experiment 2, the objective of this study was to determined whether the hatching stage of cattle cloned blastocysts affected cryosurvival after vitrification, and whether addition of linoleic acid-albumin (LAA) to the IVC medium and Ficoll to the vitrification solution improves cryosurvival. Ear fibroblasts of female Holstein Friesian (HF) were used as donor cell. Fused couplets were activated with ethanol and cycloheximide-cytochalasin D (day 0), and were allowed to develop in mSOFaa medium presence of 0.3% BSA or 0.1% LAA + 0.2% BSA. Hatching blastocysts were harvested at day 7.0, and classified into one of three categories, according to the ratio of extruding embryonics diameter from zona to embryonic diameter inside the zona. The blastocysts were vitrified in 20% dimethylsulfoxide (DMSO) + 20% ethylene glycol (EG) + 0.5 M sucrose, with or without 10% Ficoll in TCM199 + 20% FBS, using Cryotop as a cryodevice. The post-thaw survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h. When the LAA-supplemented IVC medium and the Ficoll-free vitrification solution were used, cryosurvival of the early-hatching blastocysts (77%) was not different from those of middle- and late-hatching blastocysts (74 and 80%, respective). Inclusion of Ficoll in the vitrification solution did not improve the cryosurvival of cloned blastocysts (54 to 68%). Early hatching SCNT blastocysts produced in the absence of LAA were sensitive to vitrification procedure (cryosurvival 56%; $p < 0.05$ versus 80% in the late-hatching blastocysts). The full-term developmental potential of cloned blastocysts was proven only in the non-vitrified control group. In conclusion, bovine cloned blastocysts, regardless of their hatching stage, were relatively resistant to vitrification by the ultra-rapid cooling procedure when the blastocysts were produced in the presence of LAA.

Experiment 3, The objective of this study was to compare the effects of concentration of EG and DMSO in the vitrification solution on the survival rate of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. Ear fibroblasts of female HF were used as donor cell. The embryos were cultured in mSOFaa medium + 0.3% BSA for 7 days. Cloned blastocysts at middle- and late-hatching were vitrified in VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO) or VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO) using micro-drop technique. Embryos were warmed by directly placed micro-drop into 0.6 M sucrose at 38° C for 5 min and washed in 0.4 , 0.2 and 0 M sucrose for 5 min in each step at at 38° C. The post-thaw survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h and differential stained with 75 μg/mL propidium iodide + 100 μg/mL Hoechst

33258. The cryosurvival of blastocysts after cultured of VS33 (86%) were slightly lower than VS35 (94%). Cell numbers of vitrified blastocysts were 130±50 and 128±30 in VS33 and VS35, respectively. The pregnancy rate at days 60 of fresh and vitrified embryos were 15.8 and 11.8 %, respectively. Only pregnant recipients from fresh embryos gave birth to live calves. In conclusion, bovine cloned blastocysts were successfully vitrified by using micro-drop technique in VS33 and VS35.