



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์
ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งครรภ์หลังการย้ายฝากตัวอ่อนสด
และตัวอ่อนแช่แข็ง

Cloning of bovine embryo by using ear fibroblasts as donor cell
: Comparison of pregnancy rate after transferring fresh and
frozen-thawed embryos.

โดย

นายรังสรรค์ พาลพ่าย

พฤษภาคม 2549



สัญญาเลขที่ RSA/14/2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์

ต้นแบบ: เปรียบเทียบอัตราการตั้งครรภ์หลังการย้ายฝากตัวอ่อนสด

และตัวอ่อนแช่แข็ง

Cloning of bovine embryo by using ear fibroblasts as donor cell

: Comparison of pregnancy rate after transferring fresh and

frozen-thawed embryos.

โดย

นายรังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
Executive Summary	5
การทดลองที่ 1 การโคลนนิ่งโคอเมริกันบราห์มันและการย้ายฝากตัวอ่อน	8
การทดลองที่ 2 อิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, FicolI ในน้ำยาแช่แข็ง และ hatching stage ต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็ง โดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop	18
การทดลองที่ 3 การแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop	29
เอกสารอ้างอิง	39
Output ที่ได้จากโครงการ	45
ภาคผนวก	47

การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ: เปรียบเทียบ อัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการโคลนนิ่งโคอเมริกันบราห์มันโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ และทดสอบอัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับ ได้อัตราการเชื่อมเซลล์สำเร็จ 84.7% และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจนถึงระยะ blastocyst 31.8% หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst จำนวน 62 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 39 ตัว พบว่าหลังจากสัปดาห์ที่ 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 พบว่าลูกโคโคลนนิ่งทั้ง 7 ตัวมีแถบ DNA เหมือนโคต้นแบบทุกประการ และแตกต่างจากโคตัวรับ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูโคอเมริกันบราห์มันเพศผู้สามารถโปรแกรมตัวเองใหม่ได้ดีหลังนำไปทำโคลนนิ่ง และมีลูกโคโคลนนิ่งเกิดมามีชีวิตในอัตราสูง

การทดลองที่ 2 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของระยะของ hatching ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์ต่อการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification และการเติม linoleic acid-albumin (LAA) ในน้ำยา IVC และ Ficoll ในน้ำยา vitrification จะเพิ่มการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งหรือไม่ ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ 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

ระยะบลาสโตซิสต์เพิ่มขึ้น (54-68%) ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst ที่ผลิตในน้ำยาที่ไม่มี LAA จะรอดต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่ม late-hatching blastocyst (56% vs 80%, $p < 0.05$) การตั้งท้องจนคลอดลูกโคโคลนนิ่งออกมาพบได้เฉพาะการฝากตัวอ่อนสดให้ตัวรับเท่านั้น การทดลองนี้สรุปได้ว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ บลาสโตซิสต์ไม่ว่าจะอยู่ในระยะ hatching โคก็ตาม หากเลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA จะมีอัตราการรอดหลังจากแช่แข็งเท่าเทียมกัน

การทดลองที่ 3 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในน้ำยา vitrification ต่ออัตราการอยู่รอดหลังแช่แข็งโดยวิธี micro-drop ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูโคนมเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ 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 ความอยู่รอดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์หลังจากแช่แข็งในน้ำยา 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 การทดลองนี้สรุปได้ว่าสามารถประสบความสำเร็จในการนำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์นำไปทำ vitrification ในน้ำยา VS33 และ VS35 โดยวิธี micro-drop

Abstract

This project was divided into 3 experiments. In Experiment 1, the objective was to examine 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 determine 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 embryonic 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%, respectively). 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.

Executive Summary

ทุนพัฒนานักวิจัย ปี 2545

(1 พฤศจิกายน 2545 – 31 ตุลาคม 2546)

ชื่อโครงการ การโคลนนิ่งตัวอ่อนโคโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ:
เปรียบเทียบอัตราการตั้งครรภ์หลังการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง
Cloning of bovine embryo by using ear fibroblasts as donor cell : Comparison
of pregnancy rate after transferring fresh and frozen-thawed embryos.

ผู้วิจัย นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

ผลงานวิจัยที่ทำได้

1. ทำการทดลองโคลนนิ่งโคพันธุ์อเมริกันบราห์มัน โดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ ได้ลูกโคเกิดมามีชีวิตและสุขภาพแข็งแรงรวม 7 ตัว และยืนยันการเป็นลูกโคโคลนนิ่งด้วยการตรวจหา DNA microsatellite แล้ว ผลการทดลองนี้นับเป็นความสำเร็จได้ลูกโคโคลนนิ่งสายพันธุ์โคเนื่องจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกันมากที่สุดเท่าที่มีรายงานมาแล้ว
2. ทำการทดลองศึกษาอิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, Ficoll ในน้ำยาแช่แข็ง และ hatching stage ต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มี LAA จะมีความทนทานต่อขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโดยจะขึ้นอยู่กับขนาดของ hatching stage และ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนไม่มีผลต่ออัตราการรอดหลังการแช่แข็งและละลาย อัตราการตั้งครรภ์หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่แตกต่างกัน โคตัวรับที่อุ้มท้องตัวอ่อนสดได้คลอดลูกออกมามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนโคตัวรับที่อุ้มท้องตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งลูกก่อนครบกำหนดคลอด
3. ทำการทดลองศึกษาการแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop จากการทดลองพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ในน้ำยา VS33 และ VS35 ตัวอ่อนมีอัตราการรอดหลังละลายสูง และการแช่แข็งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งครรภ์หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่ตัวรับ แต่มีเฉพาะตัวรับที่

ฝากตัวอ่อนสดเท่านั้นที่สามารถคลอดลูกออกมามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนตัวรับที่ฝากตัวอ่อนแช่แข็งได้ทั้งทั้งหมด

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor 1 เรื่อง

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, C., Hochi, C., and Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 64: 1185-1196.

2. manuscript กำลังเขียนเพื่อส่งไปตีพิมพ์

Suteevun-Phermthai, T., Curshoue, C., Muenthaisong, S., Tian, X.C and Parnpai, R. 2006.

Is IGF2R a course of abnormality in clones?

3. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ 3 เรื่อง

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and Parnpai, R. 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod.Fert.Dev.* 16: 174.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and Parnpai, R. 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference*. Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.

Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction*. Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.

4. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับชาติ 3 เรื่อง

ชุดิ เหล่าธรรมธร ทศสุมา เทราโอ จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย

เวชยันต์ ชินิชิ โอชิ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อน

โคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจากVitrification. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.

ธวัชชัย เวชยันต์ ชุดิ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ปิยะมาศ การสมดี

มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เฟลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ สิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจ

สำเร็จ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟ

โบรบลาสโตของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุดิ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย

เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เฟลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ สิริ

อุดมเศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. เรื่องเต็มการประชุม

วิชาการมหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.

5. รางวัลที่ได้รับซึ่งเป็นผลจากการทำวิจัยเรื่องนี้

1. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้
ปาฐกถาอาซิโนะโมะโตะ เรื่อง Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells
ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมท้อปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก

2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้
เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการดีเด่น ด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 1 การโคลนนิ่งโคอเมริกันบราห์มันและการย้ายฝากตัวอ่อน

บทนำ

ปัจจุบันมีสัตว์หลายชนิดที่เกิดมาจากการทำโคลนนิ่ง ได้แก่ แกะ (Wilmut และคณะ, 1997) โค (Cibelli และคณะ, 1998, Kato และคณะ, 1998) แพะ (Baguisi และคณะ, 1999) หนูถีบจักร (Wakayama และคณะ, 1998) สุนัข (Polejaeva และคณะ, 2000, Onishi และคณะ, 2000) แมว (Shin และคณะ, 2002, Yin และคณะ, 2005) กระต่าย (Chesne และคณะ, 2002) ม้า (Galli และคณะ, 2003) หนูขาว (Zhou และคณะ, 2003) สุนัข (Lee และคณะ, 2005) และเฟอร์เร็ต (Li และคณะ, 2006) เป็นต้น เนื่องจากความสำเร็จของการโคลนนิ่งในสัตว์หลายชนิดดังกล่าวทำให้นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจในการศึกษาเรื่องต่างๆ แยกแขนงออกไปมากขึ้น เช่นการดัดแปลงพันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบก่อนที่จะนำมาทำโคลนนิ่ง การนำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากการโคลนนิ่งมาผลิตเซลล์ต้นกำเนิด การทำโคลนนิ่งเพื่อใช้ในการรักษาโรคทางการแพทย์ การทำโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ เป็นต้น

มีรายงานการโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ชนิดต่างๆ ในร่างกายและสามารถผลิตลูกโคจากการโคลนนิ่งได้ อาทิเช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อนดัดแปลงพันธุกรรม (Cibelli และคณะ, 1998; Zakharchenko และคณะ, 2001) เซลล์คิโมลัส (Kato และคณะ, 1998) เซลล์บุท่อนำไข่ (Kato และคณะ, 1998) เซลล์เม็ดเลือดขาว (Galli และคณะ, 1999) เซลล์แกรนูโลซ่า (Wells และคณะ, 1999) เซลล์บุต่อน้ำนม (Zakharchenko และคณะ, 1999a) เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหู (Pampai และคณะ, 2000) สำหรับการโคลนนิ่งแกะดอลลี่นั้น Wilmut และคณะ (1997) เลี้ยงเซลล์เต้านมในน้ำยาที่มีปริมาณซีรัมน้อยเพื่อที่จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G0 แต่ในการโคลนนิ่งโคนั้น Cibelli และคณะ (1998) ได้ใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะ G1 เป็นเซลล์ต้นแบบซึ่งหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่แม่ตัวรับก็ประสบความสำเร็จได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา และหลังจากตรวจอายุของลูกโคโคลนนิ่งโดยใช้วิธีตรวจความยาวของ telomere พบว่าลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดมาจากการใช้เซลล์ร่างกายที่อยู่ในระยะ G1 เซลล์สามารถที่จะย้อนกลับมามีอายุเท่ากับลูกโคที่มีการเจริญเติบโตตามปกติ (Kato และคณะ, 2000)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มจำนวนโคเนื้อ สายพันธุ์อเมริกันบราห์มัน ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมโดยใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่ง และอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากเชื่อมเซลล์โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F-1 ที่ผลิตโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) การเลี้ยงเซลล์ต้นแบบจะเลี้ยงในน้ำยา Alpha minimal essential medium (α -MEM) ที่เติม 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) น้ำยา *in vitro* maturation medium (IVM) ที่ใช้ในการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วประกอบด้วย TCM199 ที่เติม 10% FBS, 50 IU/mL hCG (Chorulon[®]; Intervet, Boxmeer, Netherlands), 0.02 AU/mL FSH (Antrin[®]; Denka Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) และ 1 μ g/mL estradiol 17 β . การกำจัดนิวเคลียสออกและการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วย ethanol จะใช้น้ำยา Emcare holding medium (ICP Bio, Auckland, New Zealand) เป็นน้ำยาหลัก การเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าจะใช้น้ำยา Zimmermann fusion medium (ZFM) น้ำยาที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนจะใช้ modified synthetic oviduct fluid with amino acids (mSOFaa) ที่เติม 0.3% fatty acid-free BSA (Sigma, A6003)

2. การผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่ง

2.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นหนังใบหูโคเนื้อพันธุ์อเมริกันบราห์มันเพศผู้ชื่อตาม จำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 0.5 ซม. และเก็บไว้ในน้ำยา modified Dulbecco's phosphate buffer saline (mDPBS) ที่อุณหภูมิ 4°C ระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำมาและกระดูกอ่อนออกจากหนังใบหู และตัดหนังใบหูออกเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปวางเรียงไว้ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (Nunc, Roskilde, Denmark) และปิดทับด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยา α -MEM ที่มี 10% FBS ปริมาณ 5 mL ลงในจานเลี้ยงเซลล์เลี้ยงนาน 8-10 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C 5%CO₂ in air เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เจริญออกจากหนังใบหู จะถูกนำไปขยายการเลี้ยง (passages) โดยการเติม 0.25% Trypsin-EDTA แล้วเก็บเซลล์ที่ได้นำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (Nunc) ขนาด 25 ลบ.ซม. ในน้ำยา α -MEM ที่มี 10% FBS เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใบหูจะถูกนำไปแช่แข็งด้วยน้ำยาที่มี 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เมื่อขยายการเลี้ยงไปแล้ว 3 ครั้ง เซลล์ที่ถูกละลายออกมาจะนำไปเลี้ยงในน้ำยา α -MEM ที่มี 10% FBS และใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่ง โดยจะใช้เป็นเซลล์ต้นแบบจนกระทั่งถึง passages ที่ 8 เซลล์ต้นแบบจะถูกทำเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดย 0.25% Trypsin-EDTA แล้วนำไปใส่ในน้ำยา Emcare holding เพื่อใช้ในขั้นตอนการฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่ที่กำจัดนิวเคลียสออกไปแล้วต่อไป

2.2 การเตรียมไซโตพลาส

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์และเก็บไว้ใน 0.9% NaCl ที่อุณหภูมิห้อง และนำมาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 4 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มขนาด 18G ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 mL ฉีดเข้าไป

จากรังไข่โดยเลือกเฉพาะรังไข่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-6 มม. และนำไข่ที่ได้มาล้าง 4 ครั้งในน้ำยา mDPBS ที่เติม 0.1% polyvinyl pyrrolidone (PVP) และคัดเฉพาะ cumulus-oocyte complexes (COCs) เท่านั้นไปเลี้ยงในน้ำยา IVM โดยเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/ 100 μ L และปิดทับ หยคน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงภายใต้ 5% CO₂ in air ที่ 38.5°C นาน 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะนำไข่ออกมาข่อยเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่ออกไป โดยใช้ปิเปตแก้วที่ขีดให้ปลายมีขนาดเล็กดูดไข่เข้าออกในน้ำยาที่มี 0.2% hyaluronidase จากนั้นนำไข่ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสมาล้าง 5 ครั้งในน้ำยา Emcare holding และเลือกเฉพาะไข่ที่มี 1" polar body มาวางไว้ในน้ำยาที่มี 5 μ g/mL cytochalasin B และนำไปกำจัดนิวเคลียสออกภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (กำลังขยาย 200 เท่า) โดยใช้ micromanipulator โดยจัดให้ตำแหน่ง 1" polar body อยู่ที่ตำแหน่ง 12 นาฬิกา จากนั้นใช้เข็มแก้วตัด zona pellucida ที่อยู่เหนือ 1" polar body จากนั้นกดให้ 1" polar body และไซโตพลาสซึม (10%) หลุดออกมาจาก zona pellucida จากนั้นนำไข่ที่กำจัดนิวเคลียสแล้วมาล้าง 5 ครั้งในน้ำยา Emcare holding และรอจนกระทั่งฉีดเซลล์ต้นแบบ

2.3 การฉีด เชื่อมเซลล์ต้นแบบและการเลี้ยงตัวอ่อน

ใช้ micromanipulator ฉีดเซลล์ต้นแบบเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 14-16 μ m จะถูกปล่อยเข้าไปที่บริเวณ perivitelline space ของไข่ที่กำจัดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไปวางไว้ในน้ำยา ZFM การเชื่อมเซลล์ต้นแบบและไข่ที่กำจัดนิวเคลียสออกแล้วเข้าด้วยกันจะใช้ fusion electrode โดยปล่อยไฟฟ้ากระแสตรง 2 ครั้ง (2.4 kV/cm นาน 15 μ s; electrodes ทั้งสองห่างกัน 110 μ m) โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F-1 หลังจากทำการเชื่อมเซลล์แล้ว 1 ชั่วโมงจึงจะบันทึกว่ามีการเชื่อมสำเร็จเท่าไร จากนั้นนำเฉพาะไข่ที่เชื่อมเซลล์สำเร็จไปกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวในน้ำยา Emcare holding ที่มี 7% ethanol นาน 5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa + 10% FBS ที่มี 10 μ g/mL cycloheximide + 1.25 μ g/mL Cytochalasin D โดยเลี้ยงที่ 5% CO₂ in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa medium ที่มี 0.3% BSA โดยเลี้ยงที่ 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ อุณหภูมิ 38.5°C นาน 2 วัน (20 ตัวอ่อน/100 μ L) จากนั้นตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์จะถูกนำไปเลี้ยงร่วมกับท่อไข่โค (bovine oviductal epithelial cells) ที่ 5% CO₂ อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 วัน (10 ตัวอ่อน/100 μ L) จะเปลี่ยนน้ำยาเก่าออก 50 μ L และน้ำยาใหม่ในปริมาณเท่ากันทุกวัน

2.4 การย้ายฝากตัวอ่อน

จะนำตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7-8 วันไปย้ายฝากสู่ตัวรับโดยวิธีไม่ผ่าตัด โดยจะย้ายฝาก 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยจะนำตัวอ่อนไปปล่อยไว้ที่ปลายปีกมดลูกด้านที่มีการตกไข่ของโคสาวหรือแม่โคที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัตว์และเป็นสัตว์ตามธรรมชาติ การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัตว์ทำได้โดยการฉีด 500 μ g ของ PGF_{2 α} analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia) และจะตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ในวันที่ 40 ของการตั้งท้อง และจะสัวจตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 และ 120 ของการตั้งท้องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

2.5 การตรวจ DNA ลูกโคโคลนนิ่ง

การสกัด DNA จากเลือดของโคต้นแบบ ลูกโคโคลนนิ่ง และโคตัวรับจะใช้ชุดสกัด “Perfect gDNA blood mini, for human and animal blood” จากบริษัท Eppendorf การตรวจ DNA microsatellite จะใช้ Primer 2 ชุด คือ MGTG 4B (5' GAGCAGCTTCTTTCTTTCTCATCTT-3') มี PCR product ขนาด 134-164 bp ส่วนชุดที่สองคือ TGLA 126 (5' TTGGTCTCTATTCTCTG AATATTCC-3') มี PCR product ขนาด 106-137 bp และใช้ PCR cycle ดังนี้คือ initial denaturation ที่ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นจะเริ่มเข้า cycle ที่ 1 โดยเริ่มเข้าขบวนการ denaturation ที่ 95°C นาน 1 นาที ที่ annealing step 46°C นาน 1 นาที extension ที่ 72°C นาน 1.30 นาที จะทำทั้งหมด 40 cycles ในรอบสุดท้ายจะคงอุณหภูมิที่ 72°C ออกไปอีก 5 นาที จากนั้น PCR product ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาแยกหาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย 6% Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จากนั้นจึงนำ gel ที่ได้มาย้อม silver staining จากนั้นทำการเปรียบเทียบแถบ DNA ที่ปรากฏระหว่างโคต้นแบบ ลูกโคโคลนนิ่งและแม่โคตัวรับ

ผลการทดลอง

หลังการโคลนนิ่งโดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F-1 ได้อัตราการเชื่อมเซลล์สำเร็จ 84.7% และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคจนถึงระยะ blastocyst 31.8% (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

Fused (%)	Embryos cultured	Cleaved (%)	8-cell (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
464/548 (84.7)	451	393/451 (87.1)	292/451 (64.7)	173/393 (44.0)	125/393 (31.8)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst จำนวน 62 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 39 ตัว (ตารางที่ 2) พบว่าหลังจากสังเกตที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีแม่โคตั้งท้อง 14 ตัว (36%) มีโคตัวรับแท้งลูกเดี่ยวทั้งหมด 4 ตัว ระหว่าง 200-240 วันหลังเป็นสัด และมีแม่โคจำนวน 10 ตัว ที่ตั้งท้องจนกระทั่งคลอด (26%) พบว่ามีแม่โคที่ตั้งท้องลูกแฝด 1 ตัว (ตารางที่ 3) โคตัวรับคลอดลูกตัวแรกตามธรรมชาติออกมา 1 ตัวในวันที่ 25 ตุลาคม 2546 มีน้ำหนักแรกเกิด 32.5 กก. มีสุขภาพแข็งแรงดีได้รับการตั้งชื่อว่า ตามตาม 2 โคตัวรับหมายเลข CB 17 ครบกำหนดคลอดแต่ยังไม่มีการพร้อมคลอดจึงทำการผ่าตัดทำคลอดซึ่งได้ลูกโคออกมามีชีวิตอยู่ได้ 15 นาทีก็เสียชีวิต หลังจากแม่โคตัวรับคลอดลูกทั้งหมดมีการเจาะเลือดลูกโคที่มีชีวิตทั้งหมด 7 ตัว (ตามตาม

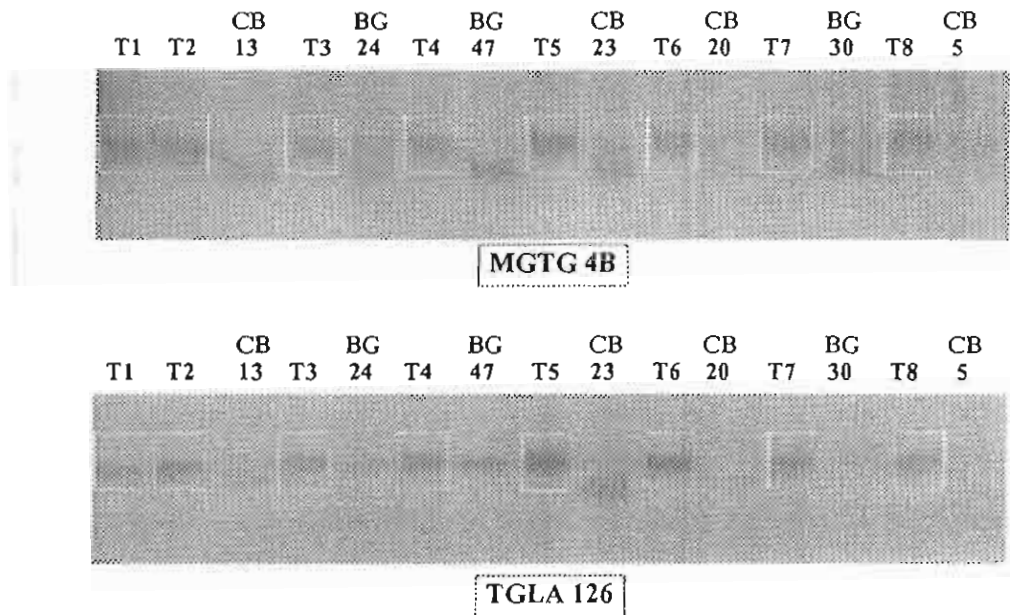
2-8) และแม่โคตัวรับมาตรวจวิเคราะห์ DNA microsatellite พบว่าคุมตามและลูกโคโคลนนิ่งคุมตามทั้ง 7 ตัวมี DNA เหมือนกันทุกประการและแตกต่างจาก DNA ของแม่โคตัวรับ (รูปที่ 1) ลูกโคโคลนนิ่งคุมตามทั้ง 7 ตัว (รูปที่ 2) มีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 41.21 กก. โดยลูกโคโคลนนิ่งคุมตามตัวแรก (คุมตาม 2) ที่คลอดออกมามีน้ำหนักแรกเกิดน้อยที่สุด (32.5 กก.) และลูกโคโคลนนิ่งคุมตามตัวที่ 4 (คุมตาม 5) มีน้ำหนักแรกเกิดสูงที่สุด (46 กก.) เมื่อเทียบกับลูกโคโคลนนิ่งคุมตามทั้ง 7 ตัว

ตารางที่ 2 ผลการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7-8 วันสู่แม่โคตัวรับ

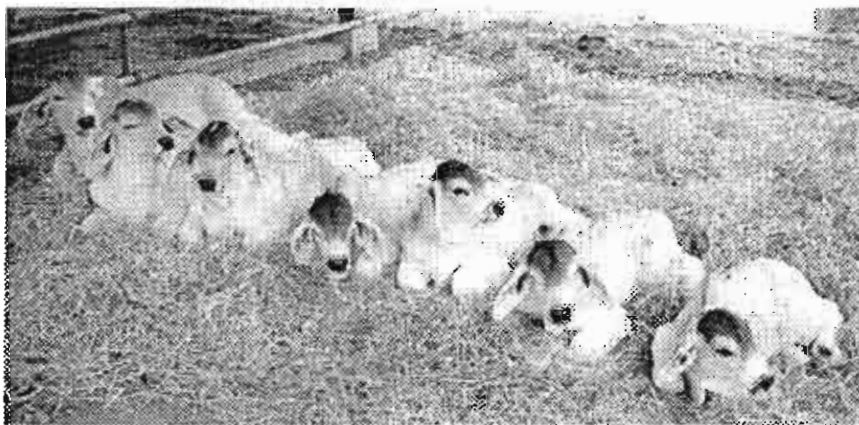
จำนวนตัวรับ	จำนวนตัวอ่อน/ตัวรับ	จำนวนตัวรับตั้งท้อง (%)						จำนวนตัวรับคลอดลูก (%)
		60 วัน	180 วัน	200 วัน	220 วัน	240 วัน	260 วัน	
39	62/39	14	14	13	12	11	10	10
	(1.6)	(36%)	(36%)	(33%)	(31%)	(28%)	(26%)	(26%)

ตารางที่ 3 รายละเอียดการคลอด น้ำหนักแรกเกิด ของลูกโคโคลนนิ่ง

หมายเลขตัว รับ	ว.ด.ป. คลอด	ระยะเวลา ตั้งท้อง (วัน)	ชนิดของ การคลอด	นน. แรกเกิด (กิโลกรัม)	สถานภาพ หลังคลอด	สถานภาพ ปัจจุบัน
CB 13	25 ต.ค. 2546	276	ธรรมชาติ	32.5	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด
CB 17	26 ต.ค. 2546	281	ผ่าตัด	45.5	ตาย 15 นาที หลังคลอด	-
BG 24	25 พ.ย. 2546	276	ธรรมชาติ	45.0	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด
BG 47	30 พ.ย. 2546	276	ธรรมชาติ	44.5	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด
CB 52	11 ธ.ค. 2546	281	ธรรมชาติ	44.0	ตาย 20 ชั่วโมง หลังคลอด	-
CB 69	12 ธ.ค. 2546	272	ธรรมชาติ	19.0	ตาย 5 นาที หลังคลอด	-
			ธรรมชาติ	25.0	ตาย 15 นาที หลังคลอด	-
CB 23	24 ธ.ค. 2546	283	ธรรมชาติ	46.0	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด
CB 20	28 ธ.ค. 2546	290	ธรรมชาติ	40.0	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด
BG 30	5 ม.ค. 2547	292	ธรรมชาติ	42.5	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด
CB 5	7 ม.ค. 2547	286	ธรรมชาติ	38.0	มีชีวิตรอด	มีชีวิตรอด



รูปที่ 1 ผลการตรวจ DNA microsatellite ลูกโคโคลนนิ่งตามทั้ง 7 ตัวเทียบกับตามโคต้นแบบ และแม่โคตัวรับ โดย T1 คือ DNA ที่ได้จากตามโคต้นแบบ; T2-T8 คือ DNA ของลูกโคโคลนนิ่งตามตัวแรกจนถึงตัวที่ 7 ที่มีชีวิต; CB และ BG ตามด้วยตัวเลขคือหมายเลขประจำตัวแม่โคตัวรับ



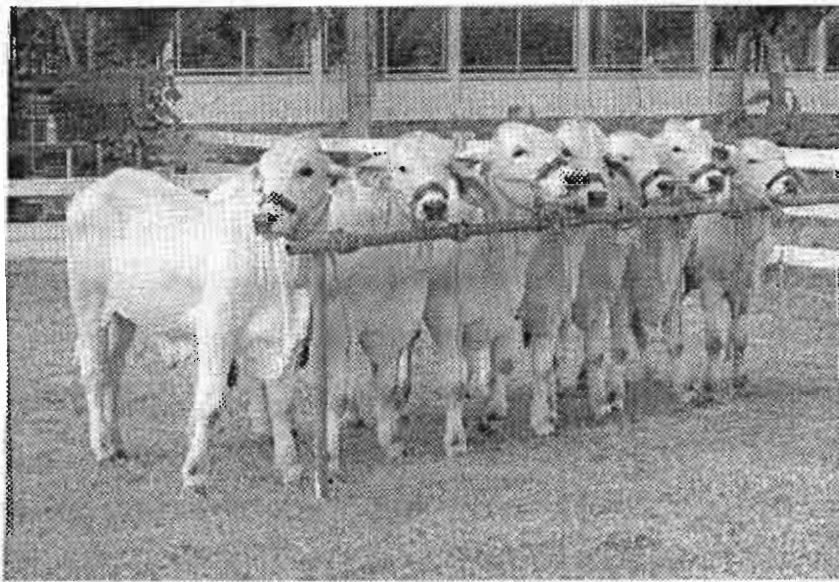
รูปที่ 2 ลูกโคโคลนนิ่งตามทั้ง 7 ตัว ถ่ายรูปขณะมีอายุได้ 1-2 เดือน

จากข้อมูลการเจริญเติบโตขณะยังไม่หย่านมของลูกโคโคลนนิ่งในระยะ 6 เดือน (ตารางที่ 4) พบว่าลูกโคโคลนนิ่งมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 920 กรัม/วัน ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยมาตรฐานของโคพันธุ์บราห์มันในประเทศไทย ที่รายงานโดยศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูนกลาง (730 กรัม/วัน) อัตราการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งในระยะก่อนหย่านมพบว่าขึ้นกับความสามารถในการผลิตน้ำนมของแม่ตัวรับ แม่ตัวรับของตาม 5 มีปริมาณน้ำมน้อยกว่าแม่ตัวรับตัวอื่นๆ ทำให้

อัตราการเจริญเติบโตของคุมตาม 5 น้อยกว่าคุมตามตัวอื่น เมื่อลูกโคอายุ 11-12 เดือน (รูปที่ 3) ลูกโคโคลนนึ่งมีสุขภาพแข็งแรงทุกตัว

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนึ่งตั้งแต่เกิดจนถึงอายุ 6 เดือน

โคโคลนนึ่ง	น้ำหนัก (กก.)							อัตราการเจริญเติบโต (กก./วัน)
	เกิด	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน	
คุมตาม 2	32.5	61.0	104.5	136.5	170.0	198.5	227.0	1.08
คุมตาม 3	45.0	78.5	109.5	147.0	176.5	210.0	229.0	1.02
คุมตาม 4	44.5	61.0	91.0	140.0	140.0	181.5	201.0	0.86
คุมตาม 5	46.0	59.5	81.5	115.0	115.0	129.0	146.0	0.55
คุมตาม 6	40.0	67.5	96.5	157.0	157.0	184.5	202.0	0.90
คุมตาม 7	42.5	78.5	107.5	159.0	159.0	183.0	206.0	0.90
คุมตาม 8	38.0	89.5	118.0	186.0	186.0	210.0	240.0	1.12
น.น. เฉลี่ย	41.2	70.7	101.2	148.6	157.6	185.2	207.2	0.92



รูปที่ 3 ลูกโคโคลนนึ่งคุมตามทั้ง 7 ตัว ถ่ายรูปขณะมีอายุได้ 11-12 เดือน

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องเชื่อมเซลล์ SUT F1 ที่ผลิตโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ผลการทดลองที่ไม่ต่างจากเครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ต้องตั้งซื้อจากต่างประเทศ (รังสรรค์ และคณะ, 2543) และสามารถผลิตลูกโคโคลนนิ่งคลอดออกมามีชีวิตรอดได้ถึง 7 ตัว จากผลการการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อพันธุ์ดีเยี่ยม มีโคตัวรับตั้งท้องจนถึง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่มีรายงานมาและมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill และคณะ, 2000)

ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ต้นแบบในระยะ G1 ซึ่งแตกต่างจากการโคลนนิ่งแกะดอลลี่ซึ่งใช้เซลล์ต้นแบบในระยะ G0 จากรายงานของ Wilmut และคณะ (1997) พบว่าเซลล์ต้นแบบควรอยู่ในระยะ G0 เพื่อให้เซลล์ต้นแบบเกิดการ reprogram ที่สมบูรณ์ แต่ในการทดลองของ Parnpai และคณะ (2000) พบว่าเซลล์ต้นแบบที่อยู่ในระยะ G0 หรือเซลล์ระยะ G1 (cycling stage) มีอัตราการเจริญสู่ระยะ blastocyst ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Hill และคณะ (1999) และ Zakhartchenko และคณะ (1999) พบว่าเซลล์ในระยะ cycling stage มีอัตราการเจริญสู่ระยะ blastocyst สูงกว่าเซลล์ระยะ G0

น้ำหนักแรกเกิดของลูกโคโคลนนิ่งตามพบว่ามีน้ำหนักค่อนข้างมาก โดยมีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 41.21 กก. วัวพันธุ์อเมริกันบราห์มันจะมีน้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย 30 กก. (http://www.vet.ku.ac.th/library-homepage/db_directory/ruminant/lg_rum/cattle/cattle_braman.htm) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในหลอดแก้วและตัวอ่อนโคลนนิ่ง จะมีแนวโน้มที่จะมีน้ำหนักแรกเกิดมากกว่าตัวอ่อนตามธรรมชาติ (Behboodi และคณะ, 1995; Garry และคณะ, 1996; Wilson และคณะ, 1995) ในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้องพบว่าแม่ตัวรับมีอัตราการแท้งที่สูง มีการศึกษาพบว่าสาเหตุที่เกิดการแท้งในระยะเวลาดังกล่าว สาเหตุเกิดจากความผิดปกติของการสร้างรกของลูกสัตว์โคลนนิ่ง เช่น Hydroallantois, Edema, มีปริมาณและขนาดของ Cotyledons ที่ผิดปกติ (Hill และคณะ, 1999, 2000, 2001; De Sousa และคณะ, 2000; Stice และคณะ, 1996; Wells และคณะ, 1999) ซึ่งในลูกโคปกติจะมีปริมาณ Cotyledons 70-120 อัน และมีขนาดตั้งแต่ 5-8 ซม (Kennedy and Miller, 1993) มีการศึกษาพบว่า 24% ของการตายของลูกสัตว์โคลนนิ่งหลังคลอดเกิดจากความผิดปกติของระบบกล้ามเนื้อโครงร่าง (musculoskeletal system) ซึ่งรวมทั้งความผิดปกติของเส้นเอ็นที่ยึดระหว่างข้อต่อ หลังจากการเจาะตรวจเลือดของโคโคลนนิ่งอายุ 2 ปี เปรียบเทียบกับโคปกติพบว่าไม่มีความผิดปกติใดๆ ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของโคโคลนนิ่ง (Wells และคณะ, 2004) มีรายงานตรวจพบว่าความผิดปกติที่พบได้ในโคโคลนนิ่งคือความผิดปกติของต่อมไทมัส (Renard และคณะ, 1999) การศึกษาในหนูถีบจักรโคลนนิ่งพบว่าระบบภูมิคุ้มกันจะต่ำกว่าหนูปกติ (Ogonuki และคณะ, 2002) แต่ในโคโคลนนิ่งไม่มีรายงานความผิดปกติลักษณะดังกล่าว (Lanza และคณะ, 2001) และมีการทดลองพบว่ามีความผิดปกติของขบวนการ reprogramming ส่งผลให้เกิด

ความผิดปกติต่อขบวนการ DNA methylation ซึ่งมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อน และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนส์, X-chromosome inactivation, genomic imprinting, chromatin modification ซึ่งมีผลต่อขบวนการสร้างรกและการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของตัวอ่อน และเป็นสาเหตุให้เกิดการแท้งและตายของโคโคลนนิ่ง (Li และคณะ, 1992; Okano และคณะ, 1999)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การโคลนนิ่งสามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนและคงไว้ซึ่งสัตว์ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้สามารถผลิตลูกโคโคลนนิ่งตามได้ 7 ตัว นอกจากนี้ยังมีโคตัวรับที่ตั้งท้อง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่เคยมีรายงานมา และมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill และคณะ, 2000) ดังนั้นเทคโนโลยีโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อพันธุ์ดีเยี่ยมโดยกำหนดพันธุกรรมได้ตามต้องการ

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, Ficoll ในน้ำยาแช่แข็ง และ hatching stage ต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคโลนนิ่งหลังจากแช่แข็ง โดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

บทนำ

การแช่แข็งโดยวิธี vitrification เป็นวิธีการที่ใช้ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิต เพื่อที่จะเก็บรักษาไว้ใช้ในอนาคตได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนาน ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำมากๆ (-196°C) ซึ่งวิธี vitrification นี้ Rall และ Fahy (1985) ได้คิดค้นขึ้นเพื่อที่จะแช่แข็งตัวอ่อนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นวิธีแช่แข็งที่ไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งโดยใช้สารที่มีความเข้มข้นดังนี้คือ 20.5% (w/v) DMSO, 15.5% (w/v) acetamide, 10% (w/v) 1,2 propanediol, 6% (w/v) polyethylene glycol โดย equilibrate ตัวอ่อนในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ cryoprotectant ในระดับ 25% ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นจึงย้ายมาไว้ในน้ำยาที่มีความเข้มข้น 50% ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แล้วจึงย้ายไปไว้ที่ความเข้มข้น 100% ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นจึงทำ vitrification โดยจุ่มลงในโครเจนเหลว ต่อมาในปี ค.ศ. 1986 Massip และคณะเป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการทำ vitrification ตัวอ่อนโคและเป็นทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนที่ทำ vitrification แล้วแม่โคตัวรับมีการตั้งท้อง วิธีการนี้จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นในระหว่างที่ลดอุณหภูมิ และจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของน้ำยาให้กลายเป็นของแข็งที่มีลักษณะใสคล้ายแก้ว แต่ยังคงรักษาคุณสมบัติของของเหลวไว้ได้แต่เปลี่ยนลักษณะทางกายภาพจากลักษณะของเหลวไปเป็นของแข็งเท่านั้น การไม่เกิดผลึกน้ำแข็งจะช่วยให้เซลล์ไม่ได้รับอันตรายที่มีสาเหตุมาจากผลึกน้ำแข็ง เคล็ดลับของการทำให้ vitrification solution ไม่เกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งอยู่ที่การลดอุณหภูมิของ vitrification solution ลงอย่างรวดเร็วและการใช้สารที่เป็น cryoprotectants ซึ่งจะช่วยให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็ง อัตราเร็วของการลดอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดน้ำแข็งที่ใสคล้ายแก้วได้ในน้ำบริสุทธิ์นั้นจะต้องลดอุณหภูมิลงด้วยอัตราเร็วอย่างน้อย $107^{\circ}\text{C}/\text{วินาที}$ จึงจะทำให้เกิดปรากฏการณ์นี้ได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ vitrification solution ปริมาณที่น้อยๆ เพื่อที่จะทำให้เกิดการส่งผ่านอุณหภูมิ (heat transfer) ได้รวดเร็วที่สุด

ปัจจุบันมีการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโดยวิธี vitrification กันอย่างต่อเนื่องจนปัจจุบันมีการคิดค้นภาชนะและอุปกรณ์เพื่อใช้ในการแช่แข็ง อาทิเช่น electron microscope grids (Martino และคณะ, 1996) open pulled straw (OPS, Vajta และคณะ, 1997) cryoloop (Lane และคณะ, 1999) hemi straw (Vanderzwalmen และคณะ, 2000) gel-loading tip (Tominaga and Hamada, 2001) และ flexipet-denuding pipette (Liebermann และคณะ, 2002) ซึ่งสามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนตั้งแต่ระยะ 1 เซลล์จนถึงระยะ blastocyst ได้

ตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีโคลนนิ่งจะมีรูปร่างเปลือกไข่ (zona pellucida) ซึ่งเกิดจาก ขบวนการกำจัดนิวเคลียสออกจากไข่ ทำให้ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst เร็วกว่าตัวอ่อนที่ปฏิสนธิตามธรรมชาติหรือผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว ซึ่งจะมี zona pellucida ที่สมบูรณ์ ในปี 2000 Nguyen และคณะ เป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่รายงานความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง โดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 250 μ l เป็นภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อน โดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย 40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose (EFS40) ซึ่งเป็นน้ำยาแช่แข็งที่มีรายงานมาแล้วโดย Kasai และคณะ (1990) ซึ่งใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้ว จากสูตรน้ำยานี้คิดเดียวกัน Gong และคณะ (2004) ประสบความสำเร็จในการผลิตลูกโคโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี vitrification

มีการศึกษาพบว่าการการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มีซีรัม จะทำให้ตัวอ่อนเกิดการสะสมไขมันภายในเซลล์สูง แต่หากเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่ไม่มีซีรัมจะช่วยให้ตัวอ่อนทนต่อการแช่แข็งได้ดีเนื่องจากมีปริมาณไขมันในเซลล์น้อย (Massip และคณะ, 1995; Yamashita และคณะ, 1999; Abe และคณะ, 2002) การใส่ unsaturated fatty acid-conjugated BSA (linoleic acid-albumin, LAA) ในน้ำยา IVM, IVF (Hochi และคณะ, 1999) และ IVC (Tominaga และคณะ, 2000; Hochi และคณะ, 1999; Imai และคณะ, 1997) จะช่วยให้ตัวอ่อนมีความทนทานต่อการแช่แข็งเพิ่มมากขึ้น

ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาอิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ผลของ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน และ hatching stage ต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีที่ใช้เหมือนในการทดลองที่ 1

2. การผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่ง

2.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นหนังใบหูโคนมขาวคำแพศเมียจำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 0.5 ซม. และดำเนินการต่อเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 การเตรียมไซโตพลาส

ดำเนินการเหมือนการทดลองที่ 1

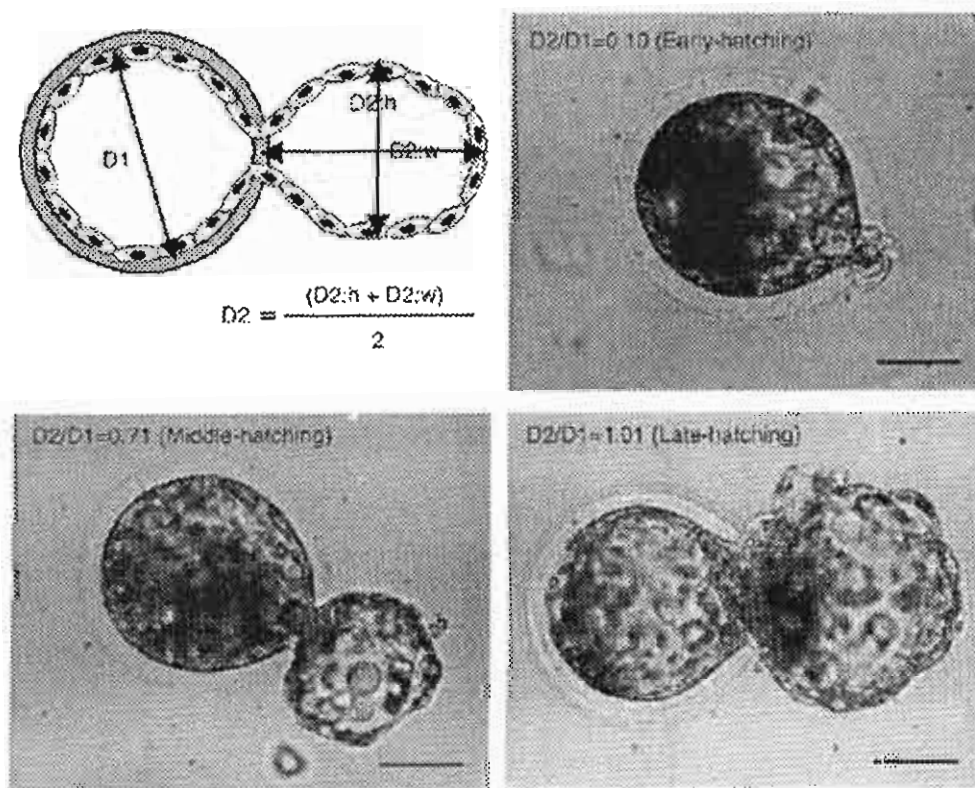
2.3 การฉีด เชื่อมเซลล์ต้นแบบและการเลี้ยงตัวอ่อน

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และหลังจากนำไข่ที่เชื่อมเซลล์สำเร็จแล้วจะนำไปกระตุ้น จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยา mSOFaa + 10% FBS ที่มี 10 μ g/mL cycloheximide + 1.25 μ g/mL cytochalasin D โดยเลี้ยงที่ 5% CO₂ in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อน

ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA โดยเลี้ยงที่ 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ อุณหภูมิ 38.5°C นาน 2 วัน (20 ตัวอ่อน/100 μ L) จากนั้นคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์นอ์นาไข่โคที่ 5% CO₂ in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 วัน (10 ตัวอ่อน/100 μ L) จะเปลี่ยนน้ำยาเก่าออก 50 μ L และเติมน้ำยาใหม่ในปริมาณเท่ากันทุกวัน

2.4 หลักการคัดเลือกตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst เพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification

ตัวอ่อนโคอายุ 7 วัน เกรด 1 และเกรด 2 ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst จะถูกนำมาถ่ายภาพ (รูปที่ 1) และแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแบ่งตามขนาดของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนซึ่งเคลื่อนออกจาก zona pellucida โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางตัวอ่อนที่เคลื่อนออกมาจาก zona pellucida (D2) ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนภายใน zona pellucida (D1) โดยหากผลของ D2/D1 = 0.01-0.70 จะจัดให้อยู่ในกลุ่ม early-hatching stage; หากผลของ D2/D1 = 0.71-1.00 จะจัดให้อยู่ในกลุ่ม middle-hatching stage และ หากผลของ D2/D1 = 1.01-1.70 จัดให้อยู่ในกลุ่ม late-hatching stage แต่หากผลของ D2/D1 มากกว่า 1.71 หรือมีคุณภาพต่ำจะไม่นำมาใช้ในการทดลอง



รูปที่ 1 A) ตัวอ่อนระยะ early-hatching stage: $D2/D1 = 0.01-0.70$; B) ตัวอ่อนระยะ middle-hatching stage: $D2/D1 = 0.71-1.00$; C) ตัวอ่อนระยะ late-hatching stage: $D2/D1 = 1.01-1.70$; Scale bar = 50 μ m.

2.5 การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี MVC และการละลายตัวอ่อน

การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี MVC

ตัวอ่อนจะถูกนำไปไว้ในน้ำยา equilibration ซึ่งประกอบด้วย TCM199/HEPES + 20% FBS (M199/FBS) ที่มี 10% (v/v) ethylene glycol (EG) + 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา vitrification ซึ่งประกอบด้วย M199/FBS ที่มี 20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose มีและไม่มี 10% (w/v) Ficoll จากนั้นนำตัวอ่อน 1-3 ใบไปวางบนปลายของ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) โดยให้น้ำยา vitrification เหลืออยู่บน Cryotop ให้น้อยที่สุด (<1 μ l) หลังจากตัวอ่อนอยู่ในน้ำยา vitrification ครบ 30 วินาทีให้นำ Cryotop แช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

การละลายตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อนหลังจากละลาย

ตัวอ่อนที่แช่แข็งแล้วจะถูกละลายโดยนำปลาย Cryotop มาแช่ในน้ำยา 0.5 M sucrose ที่ละลายใน M199/FBS ตัวอ่อนจะอยู่ในน้ำยานี้ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นจะย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 M sucrose ตามลำดับ น้ำยาละ 5 นาที จากนั้นจะนำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา mSOFaa ที่มี BSA หรือ LAA + BSA (เป็นน้ำยาชนิดเดียวกันที่เลี้ยงตัวอ่อน) และนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อไข่โคที่ 5% CO₂ in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 24 ชั่วโมง (1-5 ตัวอ่อนต่อ 100 μ l) หลังจากละลายตัวอ่อนแล้วจะดูทันทีว่ามีลักษณะที่ปกติหรือไม่ และหลังจากเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงต่อมา หากตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้แสดงว่าตัวอ่อนรอดจากการแช่แข็ง

2.6 การย้ายฝากตัวอ่อน

ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งและละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนจะถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วันโดยวิธีไม่ผ่าตัด โดยจะย้ายฝาก 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยจะนำตัวอ่อนไปปล่อยไว้ที่ปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ของโคสาวหรือแม่โค ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและที่เป็นสัดตามธรรมชาติ การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดทำได้โดยการฉีด 500 μ g ของ PGF_{2 α} analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia) ตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ไม่ได้แช่แข็งจะถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับเช่นเดียวกัน (กลุ่มควบคุม) และจะตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ในวันที่ 40 ของการตั้งท้องและจะถ่วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 และ 120 ของการตั้งท้องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองจะถูกทำซ้ำอย่างน้อยกลุ่มละ 3 ซ้ำ อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งจะวิเคราะห์โดยใช้ Chi-square test ส่วนอัตราการตั้งท้องของแม่ตัวรับจะใช้ Fisher's exact probability test ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้โปรแกรม StatView program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) ค่าความแตกต่างทางสถิติจะคิดที่ค่า P < 0.05

3. ผลการทดลอง

ไข่โคที่กำจัดนิวเคลียสออกสำเร็จคิดเป็น 86.4% (1614/1868) และเชื่อมเซลล์ไฟโบรบลาสกับไข่สำเร็จคิดเป็น 85.4% (1136/1330) หลังจากนำตัวอ่อนโคลนนิ่งไปเลี้ยงนาน 7 วัน (ตารางที่ 1) พบว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี LAA (40.7%, 246/604) พัฒนาเข้าสู่ระยะ blastocyst ได้สูงกว่า ($P < 0.005$) ในน้ำยาที่ไม่มี LAA (31.8%, 125/393)

อัตราการรอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งอายุ 7 วันที่ระยะ hatching blastocyst หลังจากแช่แข็งและละลายได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และรูปตัวอ่อนที่รอดหลังจากละลายแล้วเลี้ยงไปแล้ว 24 ชั่วโมงแสดงไว้ในรูปที่ 2 หลังจากแช่แข็งและละลายตัวอ่อนพบว่าไม่มีตัวอ่อนสูญหาย เมื่อนำตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี LAA และนำมาแช่แข็งในน้ำยา vitrification ที่ไม่มี Ficoll พบว่าอัตราการรอดหลังจากละลายตัวอ่อนในกลุ่ม early-hatching blastocyst (77%) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม middle-hatching blastocyst และ late-hatching blastocyst (74% และ 80% ตามลำดับ) จากผลการทดลองพบว่า Ficoll ที่เติมลงในน้ำยา vitrification ไม่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้ (54-68%) และพบว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ early-hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี LAA มีความทนทานต่อการแช่แข็งน้อยกว่าตัวอ่อนระยะ middle-hatching blastocyst และ late-hatching blastocyst

อัตราการตั้งท้องและคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน แสดงในตารางที่ 3 หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงจำนวน 25 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 14 ตัว พบว่าที่ 40 วันหลังจากเป็นสัดมีตัวรับตั้งท้อง 7 ตัว (50%) หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่ได้แช่แข็งจำนวน 37 ตัวอ่อนให้โคตัวรับจำนวน 27 ตัว พบว่าตั้งท้องที่ 40 วันจำนวน 11 ตัว (41%) เมื่อตรวจการตั้งท้องที่ 60 วัน พบว่าตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งยังคงตั้งท้องอยู่ 4 ตัว จาก 7 ตัว (29%) และในกลุ่มโคที่ตั้งท้องตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็งพบว่ามียังคงมีโคตั้งท้องอยู่ 7 ตัว จาก 11 ตัว (26%) และมีเพียงลูกโคโคลนนิ่ง 3 ตัว (11%) จากการย้ายฝากตัวอ่อนสดที่คลอดจากโคตัวรับ 3 ตัว ลูกโคสองตัวตายหลังจากคลอดไม่เกิน 12 ชั่วโมง และมี 1 ตัว (รูปที่ 3) ที่ยังคงมีชีวิตอยู่จนถึงขณะเขียนรายงาน

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคโคนึ่งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA

Culture Medium	Enu. (%)	Fused (%)	Cleaved (%)	8-cell (%)	Mor. at D-5	Blast. at D-7
(+) LAA	919/1068 (86.0)	671/782 (85.2)	604/671 (90.0)	485/671 (72.3)	297/604 (49.2)	246/604 (40.7)
(-) LAA	589/691 (85.2)	465/548 (84.7)	393/541 (87.1)	292/451 (64.8)	173/393 (44.0)	125/393 (31.8)

ตารางที่ 2 อัตราออกของตัวอ่อนโคโคโคนึ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย: ผลของ hatching stage ของตัวอ่อนที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มี LAA และแช่แข็งในน้ำยา vitrification (VS) ที่มี Ficoll

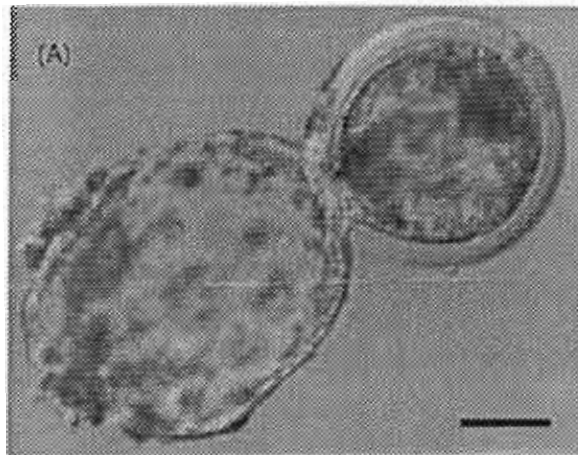
LAA during IVC	Ficoll in VS	No. survived/no. examined (%)			
		Hatching stage			
		Early	Middle	Late	รวม
+	-	23/30 (77)	20/27 (74)	24/30 (80)	67/87 (77) ^a
+	+	23/34 (68)	15/28 (54)	19/32 (59)	57/94 (61) ^b
-	-	15/27 (56) ^x	20/30 (67) ^{x,y}	28/35 (80) ^y	63/92 (68) ^{a,b}

^aภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

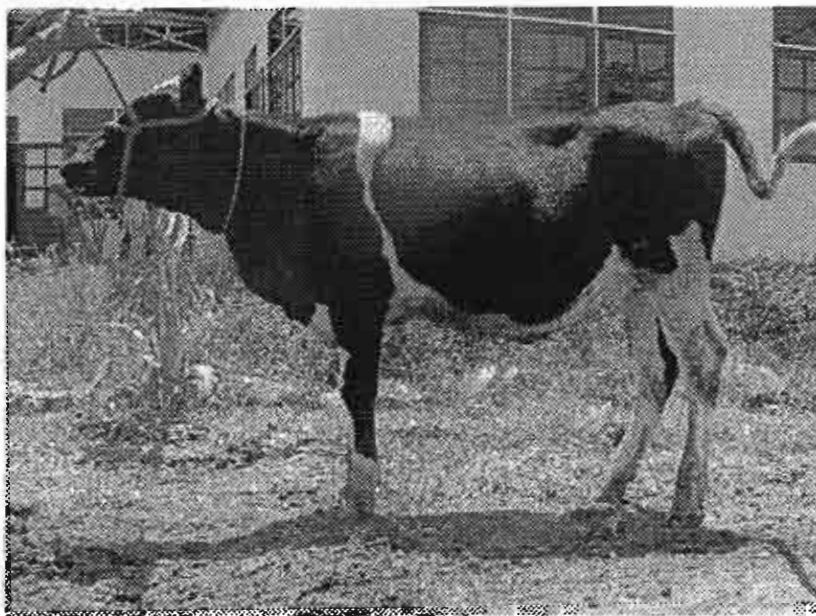
^bภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

^xภายใน Row เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

^yภายใน Row เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$



รูปที่ 2 รูปตัวอ่อนโคโคลนนึ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน หลังจากแช่แข็งและละลายออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง Scale bar = 50 μ m



รูปที่ 3 ลูกโคโคลนนึ่ง 346-2 ที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งครรภ์หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคตอนนิ่งที่แช่แข็งและตัวอ่อนสด

Groups	No. embryos transferred/recipient females	No. (%) pregnant ^a			
		Day 40	Day 60	Day 120	Full-term
Vitrified	25/14	7 (50)	4 (29)	0 (0) ^b	0 (0) ^b
Fresh control	37/27	11 (41)	7 (26)	5 (19) ^c	3 ^d (11) ^c

^a ตัวรับทุกตัวตั้งท้องลูกตัวเดียว

^b ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติ $P < 0.05$

^c ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติ $P < 0.05$

^d ลูกโค 2 ตัวตายหลังคลอดไม่เกิน 12 ชั่วโมง, ลูกโค 1 ตัวมีชีวิตรอดถึงปัจจุบัน

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนโคโคตอนนิ่งโดยใช้ Cryotop พบว่าให้อัตรารอดสูง ในปัจจุบันมีการคิดค้นอุปกรณ์ที่ใช้เป็นภาชนะสำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนและใช้สำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วยวิธี vitrification หลายชนิด อาทิเช่น electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) OPS (Vajta และคณะ, 1998) nylon loop (Lane และคณะ, 1999) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ซึ่งอุปกรณ์ทั้งหมดออกแบบมาเพื่อทำให้ปริมาณน้ำยา vitrification เหลือน้อยที่สุดก่อนที่จะถูกนำไปไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เกิดการถ่ายเทอุณหภูมิได้เร็วที่สุด มีการศึกษาทดลองเปรียบเทียบภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนในสัตว์หลายชนิด เช่น โคและแกะ ระยะ morulae และ blastocyst (Kelly และคณะ, 2004) ระหว่าง OPS และ Cryotop ตัวอ่อนระยะตัวระยะ pronuclear (Hochi และคณะ, 2004) และไข่ปลาวาฬระยะ germinal vesicle (Iwayama และคณะ, 2004) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการใช้ Cryotop ให้อัตรารอดที่ดีกว่า OPS และมีรายงานว่ามีการทดลองใช้ Cryotop ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรในระยะ pre-hatching (Ushijima และคณะ, 2004; Esaki และคณะ, 2004) ไข่และตัวอ่อนมนุษย์ (Hiraoka และคณะ, 2004; Katayama และคณะ, 2003) Kuwayama และ Kato (2000) เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่รายงานการใช้ Cryotop ในการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant (CPA) ในน้ำยา vitrification ที่น้อยลง (30%) แต่ส่วนประกอบของน้ำยา vitrification ที่ใช้ในการทดลองนี้มีส่วนประกอบเหมือนในการทดลองที่ใช้ OPS คือมี 40% CPA (Vajta และคณะ, 1998)

ขั้นตอนการผลิตตัวอ่อนโคตอนนิ่งจะต้องทำให้ zona pellucida เกิดรูเพื่อจะกำจัดนิวเคลียสออกไปทำให้ตัวอ่อนระยะ blastocyst เข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เร็วกว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากการปฏิสนธิตามธรรมชาติ ซึ่งการผลิตตัวอ่อนที่มีการฉีด DNA เข้าไปยัง pronuclear ทำให้ตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เร็วเช่นเดียวกัน และพบว่าหลังจากแช่แข็งตัวอ่อนที่ zona

pellucida ถูกทำให้เปิดอยู่อายุ 7 วัน โดยวิธี conventional freezing และวิธี vitrification พบว่ายังคงได้อัตราการรอดที่ดี (Ito และคณะ, 1998) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าตัวอ่อนระยะ blastocyst อายุ 6 วัน มีความทนทานต่อการแช่แข็งน้อยกว่าตัวอ่อนอายุ 7 วัน นอกจากนี้มีการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วอายุ 7-8 วัน ระยะ blastocyst ที่มีการเก็บเซลล์ตัวอ่อนออกไปพบว่าอัตราการรอด 78% (Ito และคณะ, 1999) และ 86% (Vajta และคณะ, 1997) มีการศึกษาแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้วและชะล้างตัวอ่อนจากมดลูกโค ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากที่สุด (Massip, 2001) Kelly และคณะ (2004) รายงานว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคและแกะที่ผลิตในหลอดแก้วโดยใช้ Cryotop และ OPS เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ตัวอ่อนหลังจากละลายจะสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เพิ่มขึ้นตามอายุของตัวอ่อนที่ถูกนำมาแช่แข็ง Amarnath และคณะ (2004) ได้รายงานว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst อายุ 8 วันที่ถูกนำมาแช่แข็งโดยวิธี conventional freezing จะสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้สูงกว่าตัวอ่อนระยะ early blastocyst (86% vs 14%) จากผลการทดลองนี้พบว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ early hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี LAA มีอัตราการรอดน้อยกว่าตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ middle และ late hatching blastocyst ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (56% vs 80%, ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเซลล์ของตัวอ่อนระยะ early hatching blastocyst มีจำนวนน้อยเกินไป

ยังคงมีรายงานเกี่ยวกับผลของการเติม LAA ลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดหลังการแช่แข็งโดยวิธี conventional freezing (Tominaga และคณะ, 2000; Hochi และคณะ, 1999; Imai และคณะ, 1997) ในการทดลองนี้พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในน้ำยาที่มี LAA จะช่วยทำให้ตัวอ่อนระยะ early-hatching blastocyst มีอัตราการรอดมากขึ้น (ตารางที่ 2) การเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้วจะไปเหนี่ยวนำให้เกิด intracellular lipid droplets (Yamashita และคณะ, 1999, Abe และคณะ, 2002) ซึ่งส่งผลให้ตัวอ่อนสุกร (Nagashima และคณะ, 1995) และโค (Ushijima และคณะ, 1999) มีความทนทานต่อการแช่แข็งลดน้อยลง นอกจากนี้คุณภาพของตัวอ่อนก็มีส่วนสำคัญที่เป็นสิ่งบ่งบอกถึงการพัฒนาและปริมาณเซลล์ตัวอ่อน ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มีและไม่มี LAA คุณภาพตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่ง LAA จะช่วยให้ตัวอ่อนทนต่อการแช่แข็งได้ดีขึ้นโดย LAA จะไปเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ lipid ในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์เกิดได้ดีขึ้น ทำให้การแช่แข็งมีประสิทธิภาพดีขึ้นเนื่องจากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อย สำหรับในตัวอ่อนสุกรจะมีปริมาณของ lipid droplet ที่สูงในระยะแรกของการพัฒนาของตัวอ่อนซึ่งเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนสุกรมีความทนทานต่อการแช่แข็งที่ค่อนข้างต่ำ (Nagashima และคณะ, 1995) จากการทดลองของ Hayashi และคณะ (1989) พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรระยะ expanded และ hatching blastocyst โดยวิธี conventional freezing หลังจากละลายตัวอ่อนสามารถพัฒนาต่อได้

สารเคมีที่เติมในน้ำยา vitrification ทั้งชนิดที่ซึมเข้าเซลล์ได้ และชนิดที่ไม่สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้ หรือ น้ำตาล เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อน ซึ่งน้ำยา vitrification ชื่อ EFS40 เป็นน้ำยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูถีบจักร, กระต่าย, ม้า, โค, จิงโจ้, สุนัข และมนุษย์ โดยเปลี่ยนจากน้ำตาล sucrose เป็น trehalose (Kasai, 1997) บทบาทของ cryoprotectant ชนิดที่ไม่สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้หรือสารโมเลกุลใหญ่ที่ใส่ลงในน้ำยา vitrification อาทิเช่น polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone, percoll, Ficoll, และ BSA ที่ใส่ลงในน้ำยา vitrification จะช่วยทำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะไปเป็นของแข็ง (น้ำแข็งที่ไม่มีผลึกน้ำแข็งอยู่ภายใน) ได้เร็วและดีขึ้น และช่วยลดความเป็นพิษของ cryoprotectant ที่ซึมเข้าสู่เซลล์ได้อีกด้วย โดยพบว่า Ficoll-70 มีความเป็นพิษน้อยกว่า polyethylene glycol เมื่อใส่ลงในน้ำยา vitrification ที่มี EG เข้มข้น 40% (Kasai, 1994) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การเติม Ficoll-70 ในน้ำยา vitrification ที่มี 20% EG, 20% DMSO และ 0.5M sucrose ไม่สามารถช่วยให้อัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ blastocyst เพิ่มขึ้นได้ ซึ่ง Ficoll อาจจะมีส่วนช่วยเล็กน้อยหรือไม่ผลทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการรอดได้มากขึ้นเลย ซึ่งรายงานการใช้ Ficoll พบว่าจะใช้ร่วมกับน้ำยา vitrification ที่มี 30%-40% EG หรือ 40%-50% glycerol (Kasai, 1997)

ในการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาจนกระทั่งตัวอ่อนพัฒนาจนออกจาก zona pellucida หลังจากละลาย เนื่องจากตัวอ่อนที่ได้จะนำไปย้ายฝากสู่ตัวรับทั้งที่เป็นโคสาวและแม่โค ซึ่งพบว่าหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งไม่มีโคตัวรับที่ตั้งท้องที่ 120 วัน ซึ่งสาเหตุการตั้งท้องไม่ครบจนกระทั่งคลอดอาจเกิดจากความผิดปกติของการสร้างรกของตัวอ่อนโคลนนิ่ง มีการศึกษาพบว่าในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้องพบว่าแม่ตัวรับมีอัตราการแท้งที่สูง ซึ่งความผิดปกติที่มีรายงานในลูกโคโคลนนิ่งได้แก่ ความผิดปกติของการพัฒนาของรก ลูกโคโคลนนิ่งมีขนาดและน้ำหนักที่มากกว่าปกติ (large calf syndrome) ทำให้คลอดยาก และตายหลังคลอด (Cibelli และคณะ, 1998; Hill และคณะ, 1999; Wakayama และ Yanagimachi, 1999; Wells และคณะ, 1999; Hill และคณะ, 1999, 2001) และพบว่ารกของลูกโคโคลนนิ่งจะมีปริมาณ Placentome น้อยกว่าปกติ และพบว่า Placentome จะมีขนาดใหญ่กว่าปกติ (Hill และคณะ, 1999) การพัฒนาที่ผิดปกติของรกอาจเกิดจากระบบเส้นเลือดที่ผิดปกติ หรืออิทธิพลของ epigenetic/imprinting gene ที่ผิดปกติ (Young และ Fairburn, 2000) imprinting gene มีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโต การพัฒนาของตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งรกด้วย ซึ่งมีหลายยีนส์ที่พบว่าเกิดการผ่าเหล่าหรือเกิดความผิดปกติทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนโคลนนิ่งและรกผิดปกติ (Lau และคณะ, 1994; Guillemot และคณะ, 1994; Leighton และคณะ, 1995, 1996) สาเหตุดังกล่าวส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงขนาดของอวัยวะภายในที่ผิดปกติไป และเป็นสาเหตุให้ตัวอ่อนในครรภ์ตายและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา (Farin และคณะ, 2001)

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งมีอัตราการตั้งท้องที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลูกโคโคลนนิ่งตัวแรกผ่านการแช่แข็งและถูกย้ายฝากสู่ตัวรับมีการตั้งท้องและคลอดในปี 2003 (Tecirlioglu และคณะ, 2003) Gong และคณะ (2004) รายงานว่าทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน 9 ตัวอ่อน สู่ตัวรับ 9 ตัว พบว่าที่ 60 วันหลังจากย้ายฝากมีตัวรับตั้งท้อง 3 ตัว และได้ลูกโคโคลนนิ่งคลอดออกมา 3 ตัว และทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง 8 ตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็งสู่แม่ตัวรับ 8 ตัว พบว่าที่ 60 วันมีตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว และมีลูกโคคลอด 2 ตัว Tecirlioglu และคณะ (2003) ย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ blastocyst ที่ถูกแช่แข็งจำนวน 53 ตัวอ่อนให้กับ 14 ตัวรับ ที่ 40 วันมีโคตัวรับท้อง 6 ตัว และทั้ง 6 ตัวก็ท้องจนคลอดได้ลูกโคโคลนนิ่ง 6 ตัว จากนั้นในการทดลองต่อมา Tecirlioglu และคณะ (2003) ทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่ถูกแช่แข็งจำนวน 7 ตัวอ่อนสู่โคตัวรับพบว่าไม่มีโคตัวรับตั้งท้องจนกระทั่งคลอดเลย ซึ่งอัตราการแท้งของตัวอ่อนโคลนนิ่งจะเกิดค่อนข้างสูงในช่วง 3-6 เดือนแรกของการตั้งท้อง ซึ่งคงเป็นปัญหาสำหรับการผลิตตัวอ่อนโคโคลนนิ่งในปัจจุบัน

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มี LAA จะมีความทนทานต่อขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโดยจะขึ้นอยู่กับขนาดของ hatching stage และ Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนไม่มีผลต่ออัตราการรอดหลังการแช่แข็งและละลาย

การทดลองที่ 3 การแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคโลนนิ่งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop

บทนำ

Rall และ Faby (1985) เป็นทีมนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกของโลกที่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูโดยวิธี vitrification แล้วย้ายฝากให้แม่ตัวรับและมีลูกหนูเกิดขึ้น จากนั้นปี 1987 ก็ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคโลนนิ่งโดยวิธี vitrification (Massip และคณะ, 1987) และมีการคิดค้นภาชนะบรรจุตัวอ่อนและวิธีการที่ใช้แช่แข็งขึ้นมากมาย เช่น electron microscope grids (Martinelli และคณะ, 1996) open pulled straw (OPS, Vajta และคณะ, 1997) cryoloop (Lane และคณะ, 1999) hemi straw (Vanderzwalmen และคณะ, 2000) gel-loading tip (Tominaga and Hamada, 2001) และ flexipet-denuding pipette (Liebermann และคณะ, 2002) การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification นี้ยังประสบความสำเร็จในคนอีกด้วยโดยมีเด็กที่เกิดจากตัวอ่อนแช่แข็งแล้ว (Mukaida และคณะ, 2001) การทดลองแช่แข็งตัวอ่อนจะแช่แข็งและละลาย เพื่อดูการพัฒนาว่าหลังจากแช่แข็งในน้ำยาแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งสูง จะมีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนหรือไม่ ในปี 1999 Park และคณะ แช่แข็งตัวอ่อนโคโรระยะ blastocyst โดยใช้ electron microscope grids หลังจากละลายพบว่าที่ 24 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อนรอดทั้งหมด ที่ 48 ชั่วโมง ตัวอ่อนรอด 73% และตัวอ่อนสามารถพัฒนาจนออกจาก zona pellucida ได้ 67.8% ในปี 2004 Kelly และคณะ แช่แข็งตัวอ่อนระยะ blastocyst โดยใช้ Cryotop หลังจากละลายพบว่ามีลักษณะภายนอกปกติ 97% และพัฒนาจนกระทั่งออกจาก zona pellucida 67% และนอกจากนี้ยังมีการทดลองนำตัวอ่อนที่แช่แข็งและละลายแล้ว ไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับเพื่อดูอัตราการตั้งครรภ์และการคลอด ในปี 1996 Saha และคณะ ทดลองแช่แข็งตัวอ่อนโคโคโลนนิ่ง 5 ตัวอ่อนในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ml แล้วย้ายฝากทันทีหลังจากละลายให้ตัวรับ 5 ตัว พบว่ามีตัวรับ 3 ตัวท้องจนคลอดและได้ลูกโคเกิดมา 3 ตัว ต่อมา Vajta และคณะ (1998) ทดลองแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคโคโลนนิ่งโดยใช้ OPS หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนระยะ blastocyst ให้แม่ตัวรับได้ลูกโคเกิด 3 ตัว และมีสุขภาพแข็งแรงดี ในปี 2000 Pugh และคณะ แช่แข็งตัวอ่อนโคโรระยะ morula และ blastocyst โดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 0.25 ml หลังละลายพบว่าตัวอ่อนระยะ morula มีอัตราการรอดที่ 24 ชั่วโมงหลังละลายน้อยกว่าตัวอ่อนระยะ blastocyst อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (24% และ 75% ตามลำดับ) และที่ 48 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อนระยะ blastocyst พัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้มากกว่าตัวอ่อนระยะ morula (15% และ 59% ตามลำดับ) หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนพบว่าอัตราการตั้งครรภ์หลังจากย้ายฝากที่ 90 วันของตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน (50% และ 55% ตามลำดับ)

การแช่แข็งแบบ vitrification โดยวิธี micro-drop รายงานครั้งแรกโดย Papis และคณะ (1999) โดยแช่แข็งไข่โคและนำมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วซึ่งพบว่าตัวอ่อนสามารถแบ่งตัวได้ถึง

76% และเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ blastocyst 30% อย่างไรก็ตามการแช่แข็งแบบ vitrification โดย micro-drop ยังไม่มีรายงานมาก่อนในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง

ปัจจุบันยังคงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยวิธี vitrification มาอย่างต่อเนื่อง (Nguyen และคณะ, 2000; French และคณะ, 2001; Tecirlioglu และคณะ, 2003; Gong และคณะ, 2004; Laowtammathron และคณะ, 2005) ในขั้นตอนการโคลนนิ่งจะต้องกำจัดนิวเคลียสออกซึ่งขั้นตอนดังกล่าวจะทำให้ zona pellucida เกิดรูขึ้น ดังนั้นตัวอ่อนโคลนนิ่งจะมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้เร็วกว่าตัวอ่อนตามธรรมชาติซึ่งมี zona pellucida ที่สมบูรณ์ มีการทดลองในปี 2005 โดย Laowtammathron และคณะ ทดลองผลกระทบของขนาดของตัวอ่อนที่ขึ้นออกนอก zona pellucida ในระยะ hatching blastocyst พบว่าขนาดของตัวอ่อนที่ขึ้นออกจาก zona pellucida ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่แช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop ในปี 2000 Nguyen และคณะ เป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่รายงานความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 250 μ l เป็นภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อน โดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่ประกอบด้วย 40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose (EFS40) ซึ่งเป็นน้ำยาแช่แข็งที่มีรายงานมาแล้วโดย Kasai และคณะ (1990) ซึ่งใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยการปฏิสนธิในหลอดแก้ว จากสูตรน้ำยาชนิดเดียวกัน Gong และคณะ (2004) ประสิทธิภาพสำเร็จในการผลิตลูกโคโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี vitrification อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยใช้วิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของ EG และ DMSO ในน้ำยา vitrification ต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst

วิธีการทดลอง

สารเคมี วิธีการโคลนนิ่ง การเลี้ยงตัวอ่อน เหมือนในการทดลองที่ 1 ส่วนเซลล์ต้นแบบเป็นตัวเดียวกับการทดลองที่ 2

1. การแช่แข็งตัวอ่อน

ตัวอ่อนอายุ 7 และ 8 วัน ที่ระยะ hatching blastocysts เกรด 1 และ 2 จำนวน 1-5 ตัวอ่อน จะถูกนำมาใส่ในน้ำยา equilibration solution (7.5% EG + 7.5% DMSO in TCM199 + 20% FBS) นาน 3 นาที และย้ายไปไว้ในน้ำยา VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20%FBS) หรือ VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20% FBS) นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดน้ำยาและตัวอ่อนมาและปล่อยน้ำยา 1-2 μ l ที่มีตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง จากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

2. การละลายตัวอ่อน

micro-drop จะถูกละลายโดยนำออกมาใส่ในน้ำยา 0.6M sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4M sucrose, 0.2M sucrose และ 0M sucrose ใน TCM199 + 20% FBS นานความเข้มข้นละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C หลังจากละลายแล้วจะสังเกตลักษณะภายนอกของตัวอ่อนว่าปกติหรือไม่ จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อไข่โคไอน้ำยา mSOFaa นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาบันทึกผลการทดลองว่ามีตัวอ่อนใบใดบ้างที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

3. การย้อมสีตัวอ่อน

หลังจากละลายตัวอ่อนแล้ว 24 ชั่วโมงจะนำตัวอ่อนที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้มาย่อย zona pellucida ออกโดยแช่ตัวอ่อนใน 0.5% protease และล้างตัวอ่อนที่ย่อย zona pellucida ออกแล้วในน้ำยา mSOFaa จากนั้นนำตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยาที่มี 10% rabbit anti bovine spleenocytes นาน 45 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement + 75 µg/ml propidium iodide + 100 µg/ml hoechst 33258 นาน 45 นาที แล้วนำตัวอ่อนมาวางบนกระจกสไลด์และปิดทับด้วย glycerol และกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) ภายใต้อุปกรณ์ fluorescence microscope

4. การย้ายฝากตัวอ่อน

เหมือนในการทดลองที่ 1 โดยตัวอ่อนโคไคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 และละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนจะถูกย้ายฝากสู่ตัวรับแบบไม่ผ่าตัด

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตราการรอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคไคลนนิ่งจะวิเคราะห์โดยการหาค่าความแตกต่างทางสถิติจะใช้วิธี ANOVA โดยใช้โปรแกรม SAS โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

ผลแช่แข็งตัวอ่อนโคไคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน โดยวิธี micro-drop แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยอัตราการรอดของตัวอ่อนโคไคลนนิ่งหลังจากแช่แข็งโดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35 พบว่าตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มรอดทั้งหมดหลังละลายที่ชั่วโมงที่ 0 ตัวอ่อนหลังจากละลายออกมาจะถูกนำมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งโดยใช้น้ำยา VS35 มีอัตราการรอดน้อยกว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา VS33 (86% vs 94% ตามลำดับ) แต่หลังจากนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่าง

ตารางที่ 1 อัตรารอดของตัวอ่อนโคโคตอนี่ระยะ hatching blastocyst หลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 หรือ VS35

Vitrification solution	Normal morphology and survival rate	
	0 h (%)	24 h (%)
VS33	99/99 (100)	93/99 (94)
VS35	98/98 (100)	84/98 (86)

หลังจากตัวอ่อนถูกละลายและเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ตัวอ่อนบางส่วนจากทั้งสองกลุ่มจะถูกนำมาข้อม TE และ ICM เพื่อดูจำนวนเซลล์ของตัวอ่อน หลังจากข้อมเซลล์แล้วพบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนจากน้ำยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราส่วนของจำนวน ICM:TE เซลล์ของตัวอ่อนที่แช่แข็งใน VS35 มีมากกว่า VS33 (1:3.9 และ 1:3.2 ตามลำดับ)

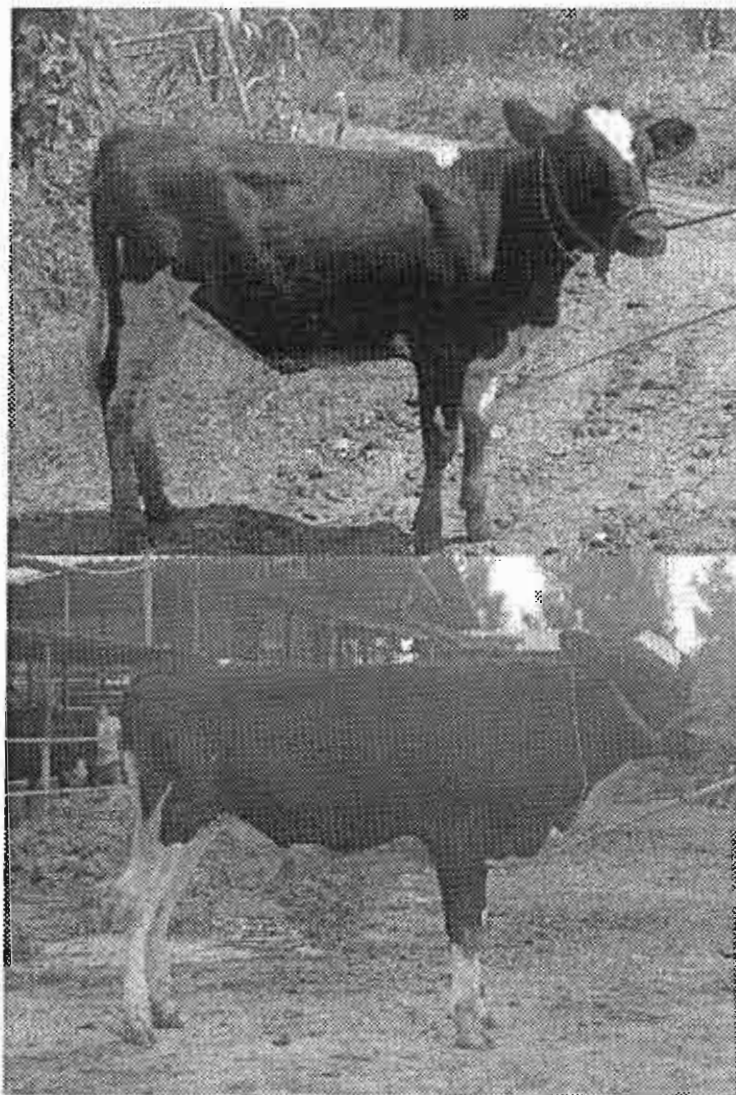
ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์เฉลี่ยของ TE และ ICM และอัตราส่วนของ TE และ ICM ของตัวอ่อนโคตอนี่ระยะ hatching blastocyst

Vitrification solution	No. embryos	ICM	TE	ICM : TE	Total cell
VS33	25	31±18	99±41	1:3.2	130±50
VS35	25	26±8	102±28	1:3.9	128±30

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วัน จำนวน 39 ตัวอ่อนสู่ตัวรับ 19 ตัว พบว่าที่ 60 วันหลังจากเป็นสัดมีตัวรับตั้งท้องจำนวน 3 ตัว (15.8%) ตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็งในน้ำยา VS33 จำนวน 30 ตัวอ่อนถูกย้ายฝากสู่ตัวรับ 17 ตัว พบว่ามีตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว (11.8%) (ตารางที่ 3) โดยอัตราการตั้งท้องระหว่างตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โคตัวรับตัวอ่อนสดคลอดลูก 2 ตัว มีสุขภาพแข็งแรง (รูปที่ 1) ส่วนโคตัวรับตัวอ่อนแช่แข็งได้ทั้งหมดทั้ง 2 ตัว

ตารางที่ 3 อัตราการตั้งท้องและการคลอดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนโคโคลนนิ่งสดและตัวอ่อน
แช่แข็งระยะ hatching blastocyst

Groups	No.embryos transfer/recipient	Pregnancy rate on days 60 (%)	Calving (%)
Fresh control	39/19 (2.0)	3/19 (15.8)	2/19 (10.5)
VS33	30/17 (1.8)	2/17 (11.8)	0/17 (0)



รูปที่ 1 ลูกโคโคลนนิ่ง 346-3 (บน) และ 346-4 (ล่าง) ที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันการแช่แข็งตัวอ่อนในโคโดยวิธี vitrification เพื่อการค้ายังไม่แพร่หลายเมื่อเทียบกับ การแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี conventional freezing (Hasler, 2003; Vajta, 2000) ตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา VS33 มีอัตราการรอดสูงกว่าในน้ำยา VS35 เนื่องจากน้ำยา VS35 มีความเป็นพิษสูงกว่าน้ำยา VS33 ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการรอดน้อยกว่าในกลุ่ม VS33 ซึ่งอัตราการรอดของตัวอ่อนในการทดลองนี้สูงกว่าการแช่แข็งโดยใช้ OPS (Kelly และคณะ, 2004) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการรอดของตัวอ่อน นอกจากชนิดและความเป็นพิษของ cryoprotectant แล้ว อุณหภูมิขณะทำการทดลอง ชนิดของน้ำคาลที่ใส่ในน้ำยาแช่แข็ง ระยะของตัวอ่อน รวมทั้งเทคนิคที่ใช้ทำล้วนมีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อน หลังการแช่แข็งทั้งสิ้น (Seidel, 2006) การ equilibrate ตัวอ่อนในน้ำยา equilibration solution ของน้ำยา VS33 และ VS35 นาน 3 นาที ตัวอ่อนที่อยู่ในน้ำยา equilibration solution ของน้ำยา VS35 จะได้รับผลกระทบจากความเป็นพิษของ cryoprotectant มากกว่า เนื่องจากในน้ำยา equilibration solution ของน้ำยา VS35 มีความเข้มข้นของ cryoprotectant สูงกว่า equilibration solution ของน้ำยา VS33 ทำให้ปริมาณของ cryoprotectant จะเข้าสู่ภายในเซลล์ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่อยู่ใน VS35 มากกว่า อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งแบบ micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35 จะให้อัตรารอดหลังละลายที่ค่อนข้างสูงที่ 24 ชั่วโมงหลังการละลายตัวอ่อน (94% และ 86% ตามลำดับ) แสดงว่าความเข้มข้นของ EG และ DMSO ใน VS33 และ VS35 ไม่มีผลต่อผลกระทบต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนหลังจากละลายและเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง รวมทั้งไม่มีผลกระทบต่อจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะ hatching blastocyst อีกด้วย

ในการทดลองนี้ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ไม่แช่แข็งและตัวอ่อนแช่แข็ง เพื่อศึกษาผลกระทบของการแช่แข็งต่ออัตราการตั้งท้อง จากการทดลองนี้พบว่าการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผ่านการแช่แข็งสู่ตัวรับไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องเมื่อเทียบกับตัวอ่อนสด ในปี 1997 มีการทดลองย้ายฝากตัวอ่อนที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี vitrification และ conventional freezing ให้ตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (van Wagendonk-de Leeuw และคณะ, 1997)

ในปี 2002 Lopatarova และคณะ ทดลองชะล้างตัวอ่อนจากโคตัวรับออกมาเพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ OPS และ conventional freezing จากผลการทดลองพบว่า อัตราการรอดของตัวอ่อนจากการแช่แข็งทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน (OPS: 92.9% และ conventional freezing: 91.1%) โดยมีอัตราการรอดใกล้เคียงกับการแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี micro-drop โดยใช้น้ำยา VS33 และ VS35

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่โคตัวรับพบว่าจะมีอัตราการแท้งที่ค่อนข้างสูงในช่วง 3 เดือนแรกซึ่งมักจะมีความผิดปกติที่เกิดจากการขบวนการ reprogramming ทำให้การแสดงออกของ gene ต่างๆ ผิดปกติซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการแท้งและตายหลังคลอดของลูกโคโคลนนิ่ง (Li และ

คณะ, 1992; Okano และคณะ, 1999; First และคณะ, 2002) การพัฒนาของรกของลูกอ่อนโคโคลนนิ่งจะช้ากว่ารกของลูกอ่อนตามธรรมชาติ และมีปริมาณเนื้อเยื่อ cuiboidal chorionic epithelium น้อยกว่าปกติเป็นสาเหตุให้การสร้างระบบหลอดเลือดและสายสะดือที่เชื่อมจากแม่ไปลูกพัฒนาได้ไม่ดี ทำให้การส่งผ่านสารอาหารและการแลกเปลี่ยนของเสียระหว่างแม่และลูกเกิดได้ไม่ดี ส่งผลให้ตัวอ่อนขาดอาหารและเกิดการแท้งในเวลาต่อมา นอกจากนี้หากขนาดของ placentome เล็กจะส่งผลให้มีพื้นที่สัมผัสการส่งผ่านของอาหารและของเสียเกิดได้น้อย หากปริมาณของ placentome มีน้อยจะทำให้การส่งผ่านของฮอร์โมนและ Growth factor ชนิดต่างๆ เช่น IGFs (insulin-like growth factors) ลดน้อยลง ซึ่งมีผลต่อขนาดของรก แต่ถ้ามียมีการแสดงออกในปริมาณมากจะทำให้รรมีขนาดและน้ำหนักมากผิดปกติ (Hill และคณะ, 2000) นอกจากนี้พบว่า 30-40% ของลูกโคโคลนนิ่งจะมีขนาดและน้ำหนักตัวที่โตผิดปกติที่เรียกว่า large offspring syndrome (LOS) หรือ large calf syndrome (LCS) (Bondioli และคณะ, 1990; Keefer และคณะ, 1994; Wilson และคณะ, 1995) ซึ่งโรคนี้ไม่เกิดขึ้นในสัตว์ทุกชนิดแต่จะพบบ่อยในโคโคลนนิ่ง สาเหตุการเกิดโรคนี้อาจเกิดจากความผิดปกติของ epigenetic ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของรกที่ผิดปกติทำให้ลูกอ่อนเกิดความผิดปกติ (Hill และคณะ, 2000; De Sousa และคณะ, 2001) ลูกโคที่เป็น LOS มักจะเกิดปัญหาการคลอดยาก (dystocia) จึงต้องช่วยคลอดหรือผ่าตัดทำคลอด (Cesarean section) ส่วนใหญ่ลูกโคที่เป็นโรคนี้มักจะตายระหว่างคลอดหรือหลังคลอด จึงจำเป็นต้องมีการดูแลอย่างใกล้ชิดหลังคลอด เนื่องจากลูกโคโคลนนิ่งที่เป็นโรคนี้จะมีอัตราการตายหลังคลอดสูงถึง 9-50% นอกจากนี้พบว่าจะมีการตอบสนองต่อการดูดนม (suckling reflex) ต่ำทำให้ลูกโคได้รับนมแม่เหลืองในปริมาณไม่เพียงพอ และมักจะมีปัญหาเกี่ยวกับ ขบวนการ metabolism และ respiratory acidosis มีระดับ insulin ในเลือดสูง มีลักษณะ hypothyroidism ขนาดของ thyroid gland มีขนาดโตผิดปกติ เกิดภาวะ hypoxemia, hypoglycemia, lung fibrosis, ตับแข็ง (First และคณะ, 2002)

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การแช่แข็งตัวอ่อนโคโคลนนิ่งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ micro-drop ในน้ำยา VS33 และ VS35 ตัวอ่อนมีอัตราการรอดหลังละลายสูง และการแช่แข็งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสู่ตัวรับ แต่มีเฉพาะตัวรับที่ฝากตัวอ่อนสดเท่านั้นที่สามารถคลอดลูกออกมา มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ส่วนตัวรับที่ฝากตัวอ่อนแช่แข็งได้แท้งทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบร บลาสจากไขนุเป็นเซลล์ต้นแบบ. เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38 สาขาสัตว. 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. pp. 79-85.
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol. Reprod. Dev.** 61:57-66.
- Amarnath, D., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2004. Cryopreservation of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts: effect of developmental stage. **J. Reprod. Dev.** 50:593-598.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W., Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.** 17:456-461.
- Behboodi, E., Anderson, G.B., Bondurant, R.H., Cargill, S.L., Kreuscher, B.R., Medrano, J.F., Murray, J.D. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology** 44:227-232.
- Bondioli, K.R., Westhusin, M.E., Looney, C.R. 1990. Production of identical bovine-offspring by nuclear transfer. **Theriogenology** 22: 165-174.
- Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nat. Biotechnol.** 4:366-369.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** 280:1256-1258.
- De Sousa, P.A., Walker, S.K., King, T.J., Young, L.E., Harkness, L., Ritchie, W.A., Travers, A., Ferrier, P., Wilmut, I. 2000. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep. **Theriogenology** 53:214.

- De Sousa, P.A., King, T., Harkness, L., Young, L.E., Walker, S.K., Wilmut, I. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placenta. **Biol. Reprod.** 65:23-30.
- Esaki, R., Ueda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R., Yoshioka, H., Ushijima, H., Kuwayama, M. Nagashima, H. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. **Biol. Reprod.** 71:432-437.
- Farin, P.W., Crosier, A.E., Farin, C.E. 2001. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology** 55:151-170.
- First, N.L., Beyhan, Z., Ambroggio, J.D. 2002. **Principles of cloning**; In "Chapter 19 Cloning of cattle" Cibelli, J., Lanza, R.P., Campbell, K.H.S., West, M.D. (eds) Academic Press, pp 375-390.
- French, A.J., Hall, V.J., Korfiatis, N.A., Ruddock, N.T., Vajta, G., Lewis, I.M., Trounson, A.O. 2001. Viability of cloned bovine embryos following OPS vitrification. **Theriogenology** 57:413.
- Galli, C., Duchi, R., Moor, R.M. 1999. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning** 1:161-170.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G. 2003. Pregnancy: A cloned fole born to its dam twin. **Nature** 424:635.
- Garry, F.B., Adams, R., McCann, J.P., Odde, K.G. 1996. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology** 45:141-152.
- Gong, G., Dai, Y., Fan, B., Zhu, H., Zhu, S., Wang, H., Wang, L., Tang, B., Li, R., Wan, R., Liu, Y., Huang, Y., Zhang, L., Sun, X., Li, N. 2004. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. **Mol. Reprod. Dev.** 69:278-288.
- Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J., Joyner, A.L. 1994. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. **Nature** 371:333-336.
- Hayashi, S., Kobayashi, K., Mizuno, J., Saitoh, K., Hirano, S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. **Vet. Rec.** 125:43-44.
- Hill, J.R., Roussel, A.J., Edwards, J.F., Thompson, J.A., Cibelli, J.B. 1999. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology** 51:1451-1465.

- Hill, J.H., Burghardt, R.C., Jones, K., Long, C.R., Looney, C.R., Shin, T., Spencer, T.E., Thompson, J.A., Winger, Q.A., Westhusin, M.E. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biol. Reprod.** 63:1787-1794.
- Hill, J.R., Edwards, J.F., Sawyer, N., Blackwell, C., Cibelli, J.B. 2001. Placental anomalies in a viable cloned calf. **Cloning** 3:83-88.
- Hiraoka, K., Hiraoka, K., Kinutani, M., Kinutani, K. 2004. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. **Hum. Reprod.** 19:2884-2888.
- Hochi, S., Kanamori, A., Sugisawa, K., Kimura, K., Hanada, A. 1999. Effect of linoleic acid-albumin in the IVM and IVF media on survival of frozen-thawed pronuclear bovine zygotes. **J. Mamm. Ova Res.** 16:19-22.
- Hochi, S., Kimura, K., Hanada, A. 1999. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology** 52:497-504.
- Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M., Hirao, M. 2004. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. **Theriogenology** 61:267-75.
- Imai, K., Kobayashi, S., Goto, Y., Dochi, O., Shimohira, I. 1997. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology** 47:347 (abstract).
- Ito, K., Otake, S., Hirabayashi, M., Hochi, S., Ueda, M. 1998. Cryopreservation of in vitro-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. **Theriogenology** 50:1093-1100.
- Ito, K., Sekimoto, A., Hirabayashi, M., Hochi, S., Kimura, K., Ueda, M., Nagao, Y. 1999. Effect of time interval between biopsy and vitrification on survival of in vitro-produced bovine blastocysts. **J. Reprod. Dev.** 45:351-355.
- Iwayama, H., Hochi, S., Kato, M., Hirabayashi, M., Kuwayama, M., Ishikawa, H., Ohsumi, S., Fukui, Y. 2004. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle-stage. **Zygote** 12:333-338.

- Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, H., Tsudera, T., Sakurai, T., Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **J. Reprod. Fertil.** 89:91-97.
- Kasai M. 1997. Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. **J. Mamm. Ova Res.** 14:17-28.
- Kasai, M. 1994. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. In: Mori T, Aono T, Tominaga T, Hiroi M, editors. **Perspectives on assisted reproduction frontiers in endocrinology**, 4. Roma, Italy: Ares-Serono Symposia Publications; p. 481-487.
- Katayama, K.P., Stehlik, J., Kuwayama, M., Osamu, K., Stehlik, E. 2003. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. **Fertil. Steril.** 80:223-224.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J.Y., Doquchi, H., Yasue H., Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science** 282:2095-2098.
- Kato, Y., Tani, T., Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J. Reprod. Fertil.** 120:231-237.
- Keefer, C.L., Slice, S.L., Matthews, D.L. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. **Biol. Reprod.** 50: 935-939.
- Kelly, J.M., Kleemann, D.O., Kuwayama, M., Walker, S.K. 2004. Vitrification of in vitro-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. **Reprod. Fertil. Dev.** 16:172-173 (abstract).
- Kennedy, P.C. and Miller, R.B. 1993. The female genital system. In **Pathology of Domestic Animals**. K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, and N. Palmer, eds. (Harcourt, Brace, Jovanovich, San Diego) pp. 390-391.
- Kuwayama, M. and Kato, O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J. Assist. Reprod. Genet.** 17:477 (abstract).
- Lanc, M., Schoolcraft, W.B., Gardner, D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloopcontainer-less technique. **Fertil. Steril.** 72:1073-1078.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Faber, D., Sweeney, R.W., Henderson, B., Nevala, W., West, M.D., Wettstein, P.J. (2001). Cloned cattle can be healthy and normal. **Science** 294:1893-1894.

- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, M., Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 64:1185-1196.
- Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., Stewart, C.L. 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes. Dev.* 8:2953–2963.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436: 641.
- Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., Tilghman, S.M. 1995. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 375:34–39.
- Leighton, P.A., Saam, J.R., Ingram, R.S., Tilghman, S.M. 1996. Genomic imprinting in mice: its function and mechanism. *Biol. Reprod.* 54:273–278.
- Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915–926.
- Liebermann, J., Tucker, M., Graham, J., Han, T., Davis, A., Levy, M. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronucleate zygotes using the flexipet denuding pipette (FDP). *Reprod. Bio Medicine Online* 4:146–150.
- Lopatarova, M., Cech, S., Havlicek, V., Holy, L. 2002. Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated Cows. *Acta Vet. Brno* 71:93–99.
- Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol. Reprod.* 54:1059–1069.
- Massip, A., Van Der Zwalm, P., Scheffen, B., Ectors, F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7:270-273.
- Massip, A., Van Der Zwalm, P., Ectors, F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27:69-79.
- Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10:3004–3011.

- Massip, A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod. Dom. Anim.** 36:49–55.
- Mukaïda, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., Takahashi, K. 2001. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. **Fertil. Steril.** 76:618–623.
- Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R.J., Grupen, C.G., Nottle, M. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature** 374:416.
- Nguyen, B.X., Sotomaru, Y., Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y. 2000. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. **Theriogenology** 53:1439–1448.
- Ogonuki, N., Inoue, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Tanemura, K., Suzuki, O., Nakayama, H., Doi, K., Ohtomo, Y., Satoh, M., Nishida, A., Ogura, A. 2002. Early death of mice cloned from somatic cells. **Nat. Genet.** 30:253–254.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** 99:247–257.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A.C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science** 18:1188–1190.
- Park, S.P., Kim, E.Y., Kim, D.I., Park, N.H., Won, Y.S., Yoon, S.H., Chung, K.S., Lim, J.H. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. **Hum. Reprod.** 14: 2838–2843.
- Papis, K., Shimizu, M., Izaïke, Y. 1999. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology** 51:173.
- Parnpai, R., Tasripoo, K., Kamonpatana, M. 2000. 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., Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. **Theriogenology** 57:443.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A., and Campbell, K.H. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature** 407:86–90.

- Pugh, P.A., Tervit, H.R., Niemann, H., 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Anim. Reprod. Sci.** 58:9–22.
- Rall, W. F. and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature** 313:573-575.
- Renard, J.P., Chastant, S., Chesne, P., Richard, C., Marchal, J., Cordonnier, N., Chavatte, P., Vignon, X. 1999. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. **Lancet** 353:1489–1491.
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C., Suzuki, T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone. **Cryobiology** 33:291-299.
- Seidel, G.E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology** 65:228-235.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature** 415:859.
- Stice, S.L., Strelchenko, N.S., Keefer, C.L., Matthews, L. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. **Biol. Reprod.** 54:100–110.
- Stice, S.L., Robl, J.M., Ponce de Leon, F.A., Jerry, J., Golueke, P.G., Cibelli, J.B., Kare, J.J. 1998. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology** 49:129–138.
- Tecirlioglu, R.T., French, A.J., Lewis, I.M., Vajta, G., Korfiatis, N.A., Hall, V.J., Ruddock, N.T., Cooney, M.A., Trounson, A.O. 2003. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. **Reprod. Fertil. Dev.** 15:361–366.
- Tominaga, K., Hamada, Y., Yabuue, T., Ariyoshi, T. 2000. Effect of linoleic acid–albumin on post-thaw survival of *in vitro*-produced bovine embryos at the 16-cell stage. **J. Vet. Med. Sci.** 62:465–467.
- Tominaga, K. and Hamada, Y. 2001. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. **J. Reprod. Dev.** 47:267-273

- Ushijima, H., Yoshioka, H., Esaki, R., Takahashi, K., Kuwayama, M., Nakane, T., Nagashima, H. 2004. Improved survival of vitrified *n vivo*-derived porcine embryos. **J. Reprod. Dev.** 50:481–486.
- Ushijima, H., Yamakawa, H., Nagashima, H. 1999. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biol. Reprod.** 60:535–539.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. 1997. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. **Theriogenology** 47: 501–509.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.** 51:53–58.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim Reprod Sci** 60–61:357–64.
- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C.H., Standaert, V., and Schoysman, R. 2000. *In vitro* survival of metaphase II oocytes and blastocysts after vitrification in an Hemi Straw (HS) system. **Fertil. Steril.** 74:215.
- van Wagtenonk-de Leeuw, A.M., den Dass, J.H.G., Rall, W.F. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology** 48:1071–1084.
- 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** 394:369–374.
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. **Nat Genet** 22:127–128.
- Wells, D.N., Miska, P.M., Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol. Reprod.** 60:996–1005.
- Wells, D.N. Forsyth, J.T., McMillan, V., Oback, B. 2004. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. **Cloning Stem Cells** 6:101–110.

- Wilson, J.M., Williams, J.D., Bondioli, K.R., Looney, C.R., Westhusin, M.E., McCalla, D.F. 1995. Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. **Anim. Reprod. Sci.** 38:73-83.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 385:810-813.
- Yamashita, S., Abe, H., Itoh, T., Satoh, T., Hoshi, H. 1999. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts and their improved viability after freezing and thawing. **Cytotechnology** 31:1-9.
- Yin, X. J., Lee, H. S., Lee, Y.H., Seo, Y.I., Jeon, S.J., Choi, E.G., Cho, S.G., Min, W., Kang, S.K., Hwang, W.S., and Kong, I.K. 2005. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. **Reproduction** 129: 245-249.
- Young, L.E. and Fairburn, H.R. 2000. Improving the safety of embryo technologies; possible role of genomic imprinting. **Theriogenology** 53:627-648.
- Zakartchenko, V., Alberio, R., Stojkovic, M. 1999. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. **Mol. Reprod. Dev.** 54:264-272.
- Zakartchenko, V., Mueller, S.S., Alberio, R. 2001. Nuclear transfer in cattle with non-transfected and transfected fetal or cloned transgenic fetal and adult fibroblasts. **Mol. Reprod. Dev.** 60:362-369.
- Zhou, Q., Jean-Paul Renard, Fric, G.L., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., Cozzi, J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. **Science** 302:1179.

http://www.vet.ku.ac.th/library-homepage/db_directory/ruminant/lg_rum/cattle/cattle_braman.htm

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor 1 เรื่อง

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, C., Hochi, C., and Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 64: 1185-1196.

2. ส่ง manuscript ไปตีพิมพ์ในวารสารที่มี impact factor 1 เรื่อง

Suteevun-Phermthai, T., Curshoue, C., Muenthaisong, S., Tian, X.C and Parnpai, R. 2006. Is IGF2R a course of abnormality in clones? Submitted to *Biology of Reproduction*

3. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ 3 เรื่อง

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and Parnpai, R. 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod.Fert.Dev.* 16: 174.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and Parnpai, R. 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference*. Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.

Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction*. Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.

4. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับชาติ 3 เรื่อง

ชุตติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมาเทราโอ จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย

เวชยันต์ ชินิชิ โซชิ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อน

โคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจากVitrification. *เรื่องเติมการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย*

เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.

ธวัชชัย เวชยันต์ ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ปิยะมาศ การสมดี

มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เฟลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจ

สำเร็จ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟ

โบรบลาสโตของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเติมการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย

เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เฟลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริ

อุดมเศรษฐ์. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเติมการประชุม*

วิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.

5. รางวัลที่ได้รับซึ่งเป็นผลจากการทำวิจัยเรื่องนี้

1. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้
ปาฐกถาอายุโนะโมะโตะ เรื่อง Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells
ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547 ณ โรงแรมทอปแลนด์ จังหวัดพิษณุโลก

2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้
เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

3. รางวัลบุคลากรสายวิชาการดีเด่น ด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก



Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution

Chuti Laowtammathron^a, Chanchao Lorthongpanich^a,
Mariena Ketudat-Cairns^a, Shinichi Hochi^{b,*}, Rangsun Parnpai^{a,*}

^a Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^b Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

Received 24 November 2004; accepted 6 February 2005

Abstract

The objective was to determine whether the hatching stage of cattle and swamp buffalo somatic cell nuclear-transferred (SCNT) 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. Fused couplets were activated with ethanol and cycloheximide-cytochalasin D (day 0), and were allowed to develop in the presence of 0.3% BSA or 0.1% LAA + 0.2% BSA. Hatching blastocysts were harvested at day 7.0 (cattle) or day 6.5 (buffalo), and classified into one of three categories, according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona to embryonic diameter inside the zona. The blastocysts were vitrified in 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 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. In cattle, 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%, respectively). Inclusion of Ficoll in the vitrification solution did

* Corresponding authors. Tel.: +66 44224244 (R. Parnpai)/+81 268215350 (S. Hochi);
fax: +66 44224150 (R. Parnpai)/81 268215830 (S. Hochi)

E-mail addresses: shochi@shinshu-u.ac.jp (S. Hochi), rangsun@ccs.sut.ac.th (R. Parnpai).

not improve the cryosurvival of SCNT blastocysts (54 to 68%). Early-hatching SCNT blastocysts produced in the absence of LAA were sensitive to the vitrification procedure (cryosurvival 56%; $P < 0.05$ versus 80% in the late-hatching blastocysts). The full-term developmental potential of SCNT blastocysts was proven only in the non-vitrified control group. In buffalo, the mean cryosurvival of hatching SCNT blastocysts produced with LAA (89%) was not different from that of those produced without LAA (87%). In conclusion, bovine SCNT 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. Furthermore, swamp buffalo SCNT blastocysts were more tolerant of vitrification than bovine SCNT blastocysts.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cryotop; Ficoll; Hatching; LAA; Nuclear transfer

1. Introduction

Recent advances in embryo cryopreservation in bovine species include high survival rates after vitrification by ultra-rapid cooling procedures. With IVF-derived bovine embryos, ultra-rapid cooling in cryodevices such as open-pulled straws (OPS) [1] and gel-loading tips [2] has made it possible to cryopreserve embryos at various developmental stages ranging from 1-cell zygotes to expanded blastocysts. Embryos produced by nuclear transplantation have mechanical slits in their zonae pellucidae, and therefore initiate hatching earlier than non-manipulated embryos. Nguyen et al. [3] were the first to achieve high in vitro survival of bovine somatic cell nuclear-transferred (SCNT) blastocysts cryopreserved by a combination of partial dehydration and vitrification. They used conventional 0.25-mL French straws as embryo containers and a vitrification solution consisting of 40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose (EFS40), originally reported by Kasai et al. [4]. Gong et al. [5] used the same EFS40 solution for vitrification of SCNT embryos and successfully produced a cloned calf following transfer of nine vitrified-warmed embryos. Another cloned calf has been delivered from a SCNT blastocyst vitrified in a solution consisting of 20% EG + 20% DMSO + 0.6 M sucrose, using the OPS system [6].

Removal of serum from the IVC medium for culturing presumptive zygotes improved the resistance of blastocysts to cryopreservation [7–9]. Abe et al. [9] reported that cytoplasmic lipid droplets were highly accumulated in the bovine morulae and blastocysts when the IVF zygotes were cultured in IVC medium that contained serum. Supplementation with the unsaturated fatty acid-conjugated BSA (linoleic acid–albumin, LAA), to the IVM and IVF media [10] and IVC medium [11–13] produced bovine zygotes and embryos resistant to the conventional two-step freezing procedure.

In contrast to the highly reproducible SCNT procedure in cattle, efficiency in producing SCNT buffalo embryos is not satisfactory [14,15], despite an increased demand for cloned buffaloes. We have previously reported that efficiency in producing SCNT blastocysts in swamp buffalo (19–22%) was approximately half of that in cattle (39–41%) [15]. On the other hand, both bovine- and buffalo-enucleated oocytes receiving buffalo fibroblasts equally developed into blastocysts (33 and 39%, respectively) [16]. There have been only a few reports on the cryopreservation of buffalo embryos [17–21], including the birth of calves after transfer of vitrified-warmed water buffalo IVF-derived embryos [21].

The present study was undertaken to determine whether the hatching stage of bovine SCNT blastocysts affects cryosurvival after vitrification by the minimum volume cooling (MVC) procedure, and whether addition of LAA to the IVC medium and of Ficoll to an EG + DMSO-based vitrification solution improves cryosurvival (experiment 1). An additional vitrification study was conducted for swamp buffalo SCNT hatching blastocysts produced by IVC, with or without LAA (experiment 2).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and media

All chemicals were purchased from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise. For culturing donor cells, alpha minimal essential medium (α -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), defined hereafter as α -MEM/FBS, was used. For cryopreserving the cultured donor cells, 10% DMSO was added to the tissue culture medium 199 (TCM199) supplemented with 25 mM HEPES and 20% FBS, defined hereafter as HEPES-buffered M199/FBS. The IVM medium for oocyte maturation was TCM199 supplemented with 10% FBS, 50 IU/mL hCG (Chorulon; Intervet, Boxmeer, Netherlands), 0.02 AU/mL FSH (Antrin; Denka Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) and 1 μ g/mL estradiol 17 β . The Emcare holding medium (ICP Bio, Auckland, New Zealand) was used as the basal medium throughout the process of enucleation to ethanol activation, except during electrofusion, when the Zimmermann medium [22] was used. The IVC medium for culturing SCNT embryos was modified synthetic oviduct fluid with amino acids (mSOFaa) [23] supplemented with 0.3% fatty acid-free BSA (Sigma, A6003) or 0.1% LAA (Sigma, L8384) + 0.2% fatty acid-free BSA.

2.2. Production of SCNT blastocysts

2.2.1. Preparation of donor cells

The ear skin of adult Holstein cow and swamp buffalo ($n = 1$ each) was biopsied and transported to the laboratory. Skin tissues were removed from cartilage and cut into small pieces before being placed in 60-mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and covered with a sterile glass slide. An amount of 5 mL of α -MEM/FBS was added into the dishes and the tissue was cultured for 8–10 days in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37 °C. The fibroblasts outgrowing from ear skin tissues were harvested using 0.25% Trypsin-EDTA and seeded in 5 mL of α -MEM/FBS in a 25-cm² culture flask (Nunc). At sub-confluence, fibroblasts were harvested by standard trypsinization and subjected to passages. The fibroblasts were frozen at the third cell culture passage and stored in liquid nitrogen (LN₂). The post-thaw fibroblasts were cultured in α -MEM/FBS and used for nuclear transfer between passages 3 and 8 of culture. A few minutes before donor cell injection, a single cell suspension of the fibroblasts was prepared in an Emcare holding medium.

2.2.2. Preparation of recipient cytoplasm

Abattoir-derived bovine (Holstein) and buffalo ovaries were transported to the laboratory within 4 h of slaughter. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by aspiration from follicles 3–6 mm in diameter using an 18-gauge needle attached to a 10 mL syringe, and washed four times with PBS supplemented with 0.1% polyvinyl pyrrolidone (PVP). Each of 20 COCs was cultured in 100 μ L droplets of IVM medium covered with mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 °C for 21 h.

At 21 h of IVM culture, the cumulus cells were mechanically removed by repeated pipetting using a fine-tip pipette in 0.2% hyaluronidase and washed five times in the Emcare holding medium. Oocytes with an extruding first polar body were placed in 5 μ g/mL cytochalasin B for 15 min, and enucleated by a micromanipulator under an inverted microscope (200 $\times$ magnification). Briefly, the zona pellucida close to the first polar body was dissected with a glass needle and a small volume (~10%) of cytoplasm lying beneath the first polar body was squeezed out of the opening of zona pellucida. The enucleated oocytes were washed five times in the Emcare holding medium and kept in the same medium until donor cell injection. The successful enucleation of each oocyte was confirmed by Hoechst 33342 fluorescent staining of the corresponding karyoplast that was squeezed out.

2.2.3. Reconstruction and IVC

An individual donor cell, 14 to 16 μ m in diameter [14], was inserted into the perivitelline space of the cytoplasm, using a slit in the zona pellucida dissected at enucleation. The donor cell-cytoplasm couplets were fused in the Zimmermann medium by two direct currents (2.4 kV/cm for 15 μ s in cattle, and 2.6 kV/cm for 17 μ s in buffalo; the distance between electrodes was about 110 μ m) generated by a hand-made fusion machine (SUT F-1, Suranaree University of Technology). The number of couplets successfully fused was recorded 1 h after electro-stimulation. The fused couplets (reconstructed embryos) were activated by a combined treatment of 7% ethanol in the Emcare holding medium for 5 min and 10 μ g/mL cycloheximide + 1.25 μ g/mL cytochalasin D in mSOFaa medium + 10% FBS in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 °C for 5 h.

The reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium supplemented with 0.3% BSA or 0.1% LAA + 0.2% BSA in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ at 38.5 °C for 2 days (20 embryos per 100 μ L droplet). Thereafter, SCNT embryos at the 8-cell stage were selected and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells (BOEC) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 °C for 5 days (10 embryos per 100 μ L droplet), as described previously [14]. Half of the volume of culture medium was replaced every day.

2.2.4. Classification of hatching blastocysts

The blastocysts at the hatching stage were harvested at day 7 (in the case of cattle) or day 6.5 (in the case of buffalo) and photographs were taken. As shown in Fig. 1, three hatching stages were identified according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona (D2) to embryonic diameter inside the zona (D1); early-hatching stage: D2/D1 = 0.01–0.70, middle-hatching stage: D2/D1 = 0.71–1.00 and late-hatching stage: D2/D1 = 1.01–1.70. Hatching blastocysts that developed beyond the D2/D1 ratio of 1.71 (mostly or

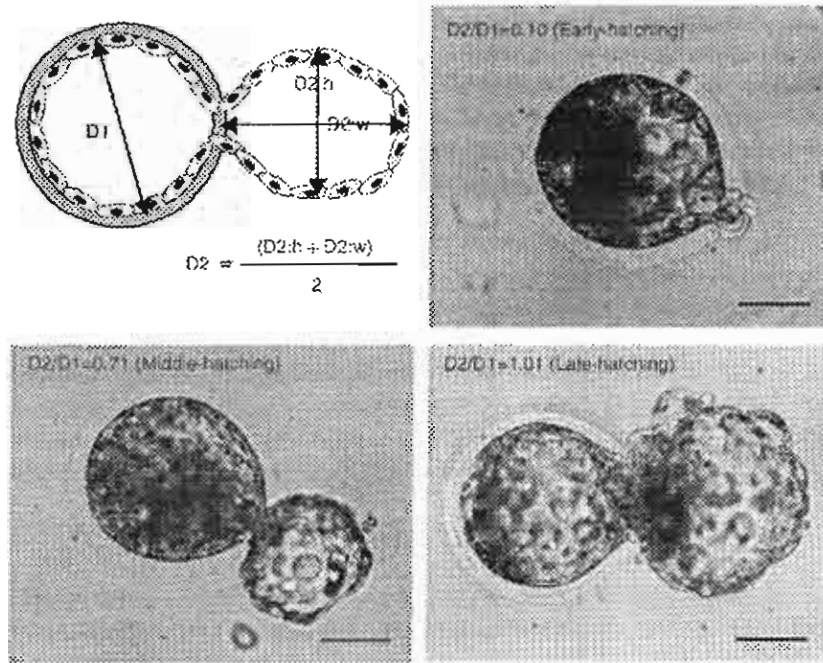


Fig. 1. Classification of hatching stage of bovine and swamp buffalo SCNT blastocysts. Hatching blastocysts were classified into one of three groups according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona (D2) to embryonic diameter inside the zona (D1); Early-hatching stage: $D2/D1 = 0.01-0.70$, Middle-hatching stage: $D2/D1 = 0.71-1.00$, late-hatching stage: $D2/D1 = 1.01-1.70$. Some representative photographs of hatching bovine SCNT blastocysts are shown. Scale bar = 50 μm .

completely hatched) or those with extremely low morphological quality were not used in the present study.

2.3. Vitricification and cryosurvival assay

2.3.1. Vitricification by MVC procedure

Embryos were exposed to 10% (v/v) EG + 10% (v/v) DMSO in HEPES-buffered M199/FBS for 2 min at 22 °C, and then transferred into a vitricification solution consisting of 20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose with and without 10% (w/v) Ficoll in HEPES-buffered M199/FBS. In the buffalo series, Ficoll was not added to the vitricification solution. One to three embryos were placed on a sheet of each Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) in a small volume of the vitricification solution (<1 μL). The Cryotop device was plunged into LN_2 after the embryos were exposed to the vitricification solution for 30 s at 22 °C.

2.3.2. Warming and culture for survival assay

After storage in LN_2 , the embryos were thawed by immersing the Cryotop into 0.5 M sucrose in HEPES-buffered M199/FBS for 5 min at 22 °C. Finally, the embryos were

placed into HEPES-buffered M199/FBS following a stepwise dilution with 0.4, 0.3, 0.2, and 0.1 M sucrose solutions at 5 min intervals. The post-warm embryos were washed three times with mSOFaa containing BSA or LAA + BSA (in which the tested embryos were produced), and co-cultured with BOEC in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5 °C for 24 h (1–5 embryos per 100 µL droplet). The embryos developing to a more advanced hatching stage, with a clearly visible inner cell mass, were considered to be surviving.

2.3.3. Embryo transfer to recipients

Some bovine SCNT blastocysts were transferred to recipients after vitrification, warming, and in vitro culture for 24 h. One or two embryos were transferred into the uterine horn (ipsilateral to ovulation) of a recipient Holstein cow or heifer that had been synchronized naturally or by treatment with 500 µg of a PGF_{2α} analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia). Fresh control day-7 SCNT blastocysts were transferred to synchronous recipients. Pregnancy was diagnosed on day 40 by ultrasonography and on days 60 and 120 by transrectal palpation.

2.4. Statistical analysis

Experiments were replicated at least three times in each treatment group. The post-warm survival rates of SCNT blastocysts were compared by chi-square test and pregnancy rates of recipients by Fisher's exact probability test, using the StatView program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A value of $P < 0.05$ was chosen as an indication of statistical significance.

3. Results

3.1. Cryosurvival of bovine SCNT blastocysts (experiment 1)

The overall successful enucleation rate of bovine IVM oocytes was 86.4% (1614/1868) and the fusion rate of donor fibroblasts with the recipient cytoplasts was 85.4% (1196/1401). Efficiency in producing SCNT blastocysts on day 7 in the LAA-containing IVC medium (40.7%, 246/604) was higher ($P = 0.005$) than that in the LAA-free medium (32.3%, 144/446).

The in vitro survival rates of day-7 SCNT bovine blastocysts after the MVC-cryotop vitrification are summarized in Table 1 and the photograph of a blastocyst surviving 24 h after warming is shown in Fig. 2A. All vitrified bovine blastocysts were recovered. 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%, respectively). Inclusion of Ficoll in the vitrification solution did not improve the cryosurvival of SCNT blastocysts (54 to 68%). The early-hatching SCNT blastocysts produced in the absence of LAA were sensitive to the vitrification procedure.

The in vivo developmental potential of vitrified-warmed and 1-day-cultured SCNT blastocysts as well as fresh day 7 SCNT blastocysts is shown in Table 2. Seven of 14

Table 1

Cryosurvival of bovine SCNT blastocysts harvested on day 7: effects of hatching stage, LAA in IVC medium, and Ficoll in vitrification solution (VS)

LAA during IVC	Ficoll in VS	No. survived/no. examined (%)			
		Hatching stage			
		Early	Middle	Late	Overall
+	–	23/30 (77)	20/27 (74)	24/30 (80)	67/87 (77) ^a
+	+	23/34 (68)	15/28 (54)	19/32 (59)	57/94 (61) ^b
–	–	15/27 (56) ^a	20/30 (67) ^{a,y}	28/35 (80) ^y	63/92 (68) ^{a,b}

^a Within a column, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

^b Within a column, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

^a Within a row, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

^y Within a row, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

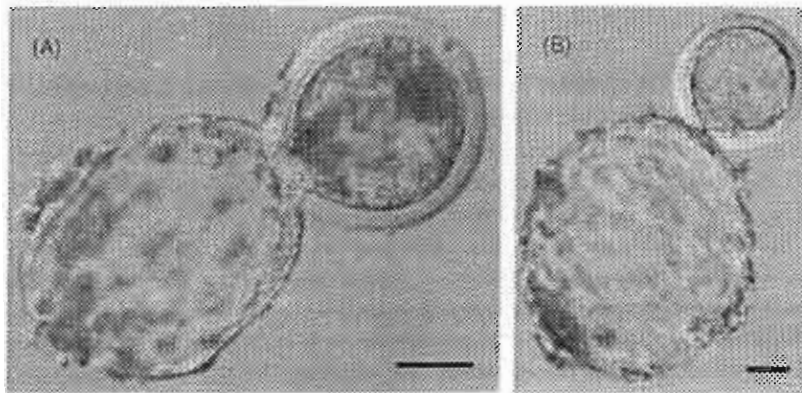


Fig. 2. Photographs of the SCNT blastocysts surviving 24 h after vitrification and warming: (A) bovine and (B) buffalo. During post-warm culture, buffalo embryos appeared to develop slightly faster than bovine embryos. Scale bar = 50 μ m.

recipients (50%) receiving a total of 25 post-warm surviving SCNT blastocysts were pregnant at day 40 while 11 of 27 recipients (41%) receiving a total of 37 fresh SCNT blastocysts were pregnant. Although four recipients that had received post-warm embryos

Table 2

In vivo survival of bovine SCNT blastocysts after vitrification and warming

Groups	No. embryos transferred/recipient females	No. (%) pregnant recipients ^a			
		Day 40	Day 60	Day 120	Full-term
Vitrified	25/14	7 (50)	4 (29)	0 (0) ^b	0 (0) ^b
Fresh control	37/27	11 (41)	7 (26)	5 (19) ^c	3 ^d (11) ^c

^a All pregnant recipients had a single conceptus.

^b Within a column, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

^c Within a column, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

^d Two calves died soon after birth, while one calf survived.

Table 3

Cryosurvival of swamp buffalo SCNT blastocysts harvested on day 6.5: effects of hatching stage and LAA in IVC medium

LAA during IVC	No. survived/no. examined (%)			
	Hatching stage			
	Early	Middle	Late	Overall
+	4/5 (80)	5/5 (100)	8/9 (89)	17/19 (89)
–	10/12 (83)	6/8 (75)	10/10 (100)	26/30 (87)

Ficoll was not added to the vitrification solution.

(29%) and seven that had received fresh embryos (26%) maintained their pregnancies until day 60, only three cloned calves (11%) were delivered from three recipients in the fresh embryo group. Two calves died soon after birth and one calf survived.

3.2. Cryosurvival of buffalo SCNT blastocysts (experiment 2)

The overall successful enucleation rate of buffalo IVM oocytes was 85.8% (1011/1179) and the fusion rate of donor fibroblasts with the recipient cytoplasts was 86.3% (676/783). Between the LAA-containing medium and the LAA-free medium, efficiency in producing SCNT blastocysts on day 6.5 (20.7%, 39/188 and 18.9%, 63/332, respectively) was similar.

All vitrified buffalo blastocysts were recovered. The mean cryosurvival of hatching SCNT blastocysts produced with LAA (89%) was not different from that of those produced without LAA (87%), as shown in Table 3. Although the number of blastocysts classified into each of three hatching stages was small, cryosurvival of buffalo SCNT blastocysts tended ($P = 0.06$) to be higher than that of bovine blastocysts without LAA. The photograph of a buffalo blastocyst surviving 24 h after warming is shown in Fig. 2B.

4. Discussion

In the present study, relatively high survival rates of bovine and buffalo SCNT blastocysts after vitrification and warming were obtained using the cryotop as a cryodevice. A variety of containers or devices, including an electron microscope grid [24], OPS [1], nylon loop [25] and cryotop [26], all of which can minimize the volume of vitrification solution for the ultra-rapid cooling rate, have been used for vitrification of mammalian embryos and oocytes. Comparative studies between OPS and cryotop in bovine and ovine morulae to blastocysts [27], pronuclear-stage rabbit zygotes [28] and germinal vesicle-stage whale oocytes [29] suggest that cryotop is a better alternative cryodevice than OPS. Recently, MVC-cryotop vitrification has been successfully applied to pre-hatching embryos in pigs [30,31], oocytes and blastocysts in humans [32,33], and IVM oocytes or enucleated cytoplasts in buffalo [34]. A possible advantage of the MVC-cryotop vitrification procedure originally reported by Kuwayama and Kato [26] may be due to the use of a lower concentration of permeating cryoprotective agents (CPA) in the vitrification solution (30%), but the composition of the vitrification solution employed in the present study was the same as that reported for the OPS system (CPA concentration 40%) [1].

Blastocysts produced by nuclear transplantation have mechanical slits in their zonae pellucidae, and therefore initiate hatching earlier than their non-manipulated counterparts. Bovine blastocysts microinjected with exogenous DNA at the pronuclear stage also initiated hatching earlier without thinning their zonae pellucidae, and survived cryopreservation by conventional freezing and vitrification as far as the blastocysts were harvested on day 7 [35]. However, day 6 blastocysts were sensitive to vitrification. Cryosurvival of IVF-derived bovine blastocysts biopsied on days 7 to 8 was relatively high (78% [36], 86% [37]). Among *in vivo* and IVF-derived bovine embryos, the expanded blastocyst seems to be the stage most tolerant to cryopreservation (see review by Massip [38]). Kelly et al. [27] reported that post-warm hatching rates of IVF-derived bovine and ovine embryos were improved by the progression of embryo development when days 5–7 embryos were vitrified using cryotop or OPS. Amarnath et al. [39] recently reported that bovine SCNT day 8 blastocysts at the advanced hatching stage survived conventional freezing better than the early stage blastocysts (86% versus 14%). In the present study, the cryosurvival of early hatching bovine SCNT blastocysts produced with LAA-free medium was significantly lower than that of advanced embryos (56% versus 80%, Table 1), probably due to their lower cell numbers.

There have been reports describing a positive effect of LAA in IVC medium for IVF-derived bovine zygotes on improvement in their survival rate after conventional freezing [11–13]. In the present study, the higher sensitivity of early-hatching bovine blastocysts to vitrification may be reduced by culturing SCNT embryos in the presence of LAA (Table 1). A suboptimal IVC condition for IVF-derived bovine embryos induces accumulation of intracellular lipid droplets [8,9]; these droplets are responsible for the high sensitivity of pig [40] and cattle [41] embryos to cryopreservation. The quality of blastocysts is often judged based on developmental kinetics and total cell numbers. Although these parameters were not examined in the present study, the morphological appearance (grade or cellular darkness; data not shown) seemed to be similar in blastocysts produced with LAA-containing medium and LAA-free medium. A possible contribution of LAA to improving cryotolerance may be modification of membrane lipid composition, facilitating water loss from the cell.

Composition of the vitrification solution (permeating CPAs and non-permeating macromolecules or saccharides) is among the factors influencing cryosurvival of embryos. A vitrification solution named EFS40 has been widely used for embryo cryopreservation in mice, rabbits, horses, cattle and marsupials, and in pigs and humans after replacing sucrose with trehalose (see review by Kasai [42]). Possible cryoprotective roles of macromolecules (e.g., polyethylene glycol, polyvinyl pyrrolidone, Percoll, Ficoll, and BSA) added to the vitrification solution are promoting solidification of the solution and reducing the chemical toxicity of the permeating agents. The Ficoll-70 was less toxic than polyethylene glycol when it was mixed with 40% EG [43]. In the present study, addition of 10% Ficoll-70 to a vitrification solution containing 20% EG, 20% DMSO and 0.5 M sucrose had no impact on cryosurvival of SCNT bovine blastocysts. When either two different permeating CPAs are used as a mixture, or when DMSO is included in the vitrification solution, further addition of Ficoll may have a negligible or even adverse effect on improving cryosurvival. To date, positive effects of Ficoll have been derived only in solutions containing 30 to 40% EG or 40 to 50% glycerol [42].

The full-term developmental potential of bovine SCNT blastocysts after vitrification and warming was not proven in the present study. Pregnancies of recipient cows or heifers

receiving vitrified-warmed SCNT blastocysts were maintained for no longer than 60 days. The reason for the pregnancy loss was unknown and requires further investigation. The statistical significance between fresh and vitrified embryos should not be over-emphasized due to the small number of embryos transferred. The first live calves derived from vitrified SCNT blastocysts have been reported in 2003–2004 from two independent laboratories [5,6]. Gong et al. [5] reported that transfer of nine vitrified SCNT blastocysts into nine recipients resulted in three pregnancies at day 60 and birth of a cloned calf, while transfer of eight fresh SCNT blastocysts into eight recipients resulted in two pregnancies at day 60 and two newborn calves. Tecirlioglu et al. [6] reported that transfer of 53 vitrified SCNT blastocysts into 14 recipients resulted in six pregnancies at day 40 and the birth of a cloned calf. In the latter study, none of the seven fresh SCNT blastocysts transferred into two recipients resulted in the birth of cloned calves (a larger scale experiment is on-going; personal communication, Dr. Tecirlioglu). The high frequency of embryonic loss during the first and the second trimesters of the gestation period, as well as perinatal deaths, is still an obstacle for somatic cell nuclear transfer in cattle.

Buffalo SCNT embryos appeared darker and developed a half-day earlier than bovine SCNT embryos [14]. However, buffalo SCNT blastocysts are more likely to survive vitrification than bovine SCNT blastocysts (Tables 1 and 3). The high content of intracellular lipid droplets in porcine embryos at early stages is still considered as the major cause of their high sensitivity to low temperature [40]. Nevertheless, Hayashi et al. [44] reported that expanded and hatched porcine blastocysts were capable of developing full-term after conventional freezing. Duran et al. [21] recently reported that approximately 90% of IVF-derived water buffalo embryos survived vitrification in EFS40 solution when the embryos were vitrified at the morula to expanded blastocyst stages, followed by birth of six calves after transfer of 71 post-warm embryos. In the present study (Table 3), the late-stage hatching blastocysts had a high cryotolerance (95%, 18/19), but their true survival *in vivo* remains to be clarified.

In conclusion, bovine SCNT blastocysts regardless of their hatching stage were relatively resistant to the MVC-cryotop vitrification procedure when the blastocysts were produced in the presence of LAA, and swamp buffalo SCNT blastocysts were more tolerant of vitrification than bovine SCNT blastocysts.

Acknowledgements

The authors thank T. Terao (Shinshu University, Japan), S. Muenthaisong, T. Vetchayun, P. Karnsomdee, C. Saengngam and S. Imsunthronruksa (Suranaree University of Technology, Thailand) for their technical assistance. This work was supported by Thailand Research Fund and R&D Fund of Suranaree University of Technology (to R.P.).

References

- [1] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53–8.

- [2] Tominaga K, Hamada Y. Gel-loading tip as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *J Reprod Dev* 2001;47:267–73.
- [3] Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology* 2000;53:1439–48.
- [4] Kasai M, Komi JH, Takakamo H, Tsudera T, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990;89:91–7.
- [5] Gong G, Dai Y, Fan B, Zhu H, Zhu S, Wang H, et al. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2004;69:278–88.
- [6] Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, et al. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev* 2003;15:361–6.
- [7] Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum Reprod* 1995;10:3004–11.
- [8] Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts and their improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 1999;31:1–9.
- [9] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57–66.
- [10] Hoshi S, Kanamori A, Sugisawa K, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid–albumin in the IVM and IVF media on survival of frozen-thawed pronuclear bovine zygotes. *J Mamm Ova Res* 1999;16:19–22.
- [11] Tominaga K, Hamada Y, Yabuue T, Ariyoshi T. Effect of linoleic acid–albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J Vet Med Sci* 2000;62:465–7.
- [12] Hoshi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid–albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology* 1999;52:497–504.
- [13] Imai K, Kobayashi S, Goto Y, Dochi O, Shimohira I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in-vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. *Theriogenology* 1997;47:347 (abstract).
- [14] Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M. 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* 1999;15:371–84.
- [15] Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts, ear fibroblasts, and granulosa cells. *Theriogenology* 2002;57:443 (abstract).
- [16] Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 2001;3:97–104.
- [17] Techakumphu C, Lohachit P, Chantaraprateep P, Prateep P, Kobayashi G. Preliminary report on cryopreservation of Thai swamp buffalo embryos: manual and automatic methods. *Buffalo Bull* 1989;8:29–36.
- [18] Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Wright Jr RW. Embryos quality of frozen-thawed water buffalo embryos by slow cooling and two step freezing procedures. *Buffalo J* 1992;8:131–8.
- [19] Kasiraj R, Misra AK, Mutha Rao M, Jaiswal RS, Rangareddi NS. Successful culmination of pregnancy and live birth following the transfer of frozen-thawed buffalo embryos. *Theriogenology* 1993;39:1187–92.
- [20] Apimeteetumrong M, Songsasen N, Yiengvisavakul V, Sukwongs Y, Techakumphu M. Cryopreservation of embryos collected from elite swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Thai J Vet Med* 1998;28:39–48.
- [21] Duran DH, Pedro PB, Venturina HV, Hufana RD, Salazar AL, Duran PG, et al. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 2004;61:1429–39.
- [22] Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membrane Biol* 1982;67:165–82.
- [23] Gardner DK, Lane M, Batt P. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 1994;50:390–400.

- [24] Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;54:1059–69.
- [25] Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999;17:1234–6.
- [26] Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:477 (abstract).
- [27] Kelly JM, Kleemann DO, Kuwayama M, Walker SK. Vitrification of in vitro-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:172–3 (abstract).
- [28] Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 2004;61:267–75.
- [29] Iwayama H, Hochi S, Kato M, Hirabayashi M, Kuwayama M, Ishikawa H, et al. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle-stage. *Zygote* 2004;12:333–8.
- [30] Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, et al. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *J Reprod Dev* 2004;50:481–6.
- [31] Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* 2004;71:432–7.
- [32] Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004;19:2884–8.
- [33] Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Osamu K, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223–4.
- [34] Pampai R, Laowattammathron C, Terao T, Lorthongpanich C, Muenthaisong S, Vetchayan T, et al. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:180–1 (abstract).
- [35] Ito K, Otake S, Hirabayashi M, Hochi S, Ueda M. Cryopreservation of in vitro-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. *Theriogenology* 1998;50:1093–100.
- [36] Ito K, Sekimoto A, Hirabayashi M, Hochi S, Kimura K, Ueda M, et al. Effect of time interval between biopsy and vitrification on survival of in vitro-produced bovine blastocysts. *J Reprod Dev* 1999;45:351–5.
- [37] Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 1997;47:501–9.
- [38] Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 2001;36:49–55.
- [39] Amarnath D, Kato Y, Tsunoda Y. Cryopreservation of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts: effect of developmental stage. *J Reprod Dev* 2004;50:593–8.
- [40] Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995;374:416.
- [41] Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* 1999;60:535–9.
- [42] Kasai M. Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. *J Mamm Ova Res* 1997;14:17–28.
- [43] Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. In: Mori T, Aono T, Tominaga T, Hiroi M, editors. *Perspectives on assisted reproduction frontiers in endocrinology*. 4. Roma, Italy: Ares-Serono Symposia Publications; 1994. p. 481–7.
- [44] Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet Rec* 1989;125:43–4.

Reproduction, Fertility and Development

Proceedings of the Annual Conference of
the International Embryotransfer Society
Portland, Oregon, 10-14 January 2004

Volume 16(1,2) 2004

www.publish.csiro.au/rfd



104 EFFECT OF HATCHING STATUS ON VITRIFICATION OF CLONED BOVINE BLASTOCYSTS

C. Laowattamathron^A, T. Teruo^B, C. Lorthongpanich^A, S. Muenthaisong^A, T. Vetchayan^A, S. Hochi^B, and R. Parnpai^A^AInstitute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand; ^BFaculty of Textile Science, Shinshu University, Nagano, Japan. email: rangsun@ccs.sut.ac.th

Bovine blastocysts produced by nuclear transplantation have mechanical slits in their zonae pellucidae, and therefore initiate hatching earlier than the non-manipulated embryos. The present study was undertaken to examine whether the hatching stage of cloned blastocysts is among the factors influencing their survival after vitrification and warming. Cloned bovine blastocysts were produced by using adult ear fibroblast cells as reported previously (Parnpai *et al.*, 2002, *Theriogenology* 57, 443), except that fused couplets were co-cultured with bovine oviductal epithelial cells in mSOFaa medium supplemented with 0.1% linoleic acid-albumin (LAA) + 0.2% BSA (Hochi *et al.*, 1999, *Theriogenology* 52, 497–504). Hatching blastocysts harvested on Day 7 were classified into one of three groups according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona (D2) to embryonic diameter inside the zona (D1); category-A: D2/D1 = 0.01–0.70; category-B: D2/D1 = 0.71–1.00; category-C: D2/D1 = 1.01–1.70. The blastocysts were first exposed to 10% DMSO + 10% ethylene glycol in TCM199 + 20% FCS for 2 min, and then equilibrated in 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 0.5 M sucrose with or without 10% Ficoll in TCM199 + 20% FCS for 30 s. One to three blastocysts were placed on a Cryotop sheet (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) and vitrified in liquid nitrogen. The samples were warmed in 0.5 M sucrose solution for 2 min and transferred into TCM199 + 20% FCS in five steps (5 min per step). The post-warm survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h. When Ficoll-free vitrification solution was used, post-warm survival rate of the category-A blastocysts (77%, 23/30) was not significantly different (ANOVA test) from those of category-B and category-C blastocysts (74%, 20/27; and 80%, 24/30; respectively). Inclusion of 10% Ficoll in the vitrification solution did not improve (ANOVA test) the post-warm survival rates of cloned blastocysts (category-A: 65%, 22/34; category-B: 54%, 15/28; category-C: 59%, 19/32). Groups of fresh nonsurgical embryos, vitrified with or without Ficoll, yielded 66.7% (4/6), 66.7% (2/3) and 40.0% (2/5), respectively, of recipients pregnant at 48 days of gestation. In conclusion, cloned bovine blastocysts, regardless of their hatching stages, were relatively resistant to cryopreservation by vitrification. (Supported by Thailand Research Fund and R&D Fund of Suranaree University of Technology.)

105 VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS USING THE CLV METHOD

W. Lindemans^A, L. Sangalli^A, A. Kick^A, C.R. Earl^B, and R.C. Fry^B^ACryoLogic Pty Ltd, 54 Geddes St., Mulgrave, Victoria 3170; ^BAnimal Reproduction Company, Sneydes Rd., Werribee, Victoria 3030, Australia. email: bill@cryologic.com

Vitrification has become the preferred method for cryopreserving *in vitro*-produced bovine embryos (IVP). Here we introduce a technique for vitrification developed at CryoLogic (the CLV Method), in conjunction with a study comparing the post-thaw viability of IVP embryos frozen by the widely used open pulled straw method (OPS—Vajta *et al.*, 1997 *Cryo-Letters* 18, 191) and the new CLV Method. Vitrification on thin metal surfaces has been explored and demonstrated previously (Le Gal & Massip 1999, *Cryobiology* 38, 290), and Dinnyes presented a Solid Surface Vitrification (SSV) (Dinnyes *et al.*, 2000, *Biol. Reprod.* 63, 513). The CLV Method utilizes vitrification on the surface of a solid metal block. This surface has been custom shaped and treated to enhance vitreous formation. The method also includes handling, storage and thawing protocols designed to avoid damage from crystallization of the unstable glass. Briefly, the block is precooled in LN₂ to –196°C. Up to 10 embryos are collected into a droplet of medium (3 µL), on the end of a fibre carrier attached to a handle. The droplet is presented to the vitrification surface, where it is converted into a glass bead by cooling rates comparable to that of plunging into solid/liquid phase nitrogen (–210°C) (Arav *et al.*, 2001 *Theriogenology* 55, 313). The glass bead, fibre and handle are transferred quickly into a half-sealed, precooled straw, and the handle seals the open end. A bead is thawed very rapidly by removing the handle, fibre and bead from the straw and transferring the bead into washing medium. COCs collected from bovine ovaries obtained from abattoirs were matured, fertilized and cultured for 6 days (Fry *et al.*, 2003 *Theriogenology* 59, 446). Embryos reaching the blastocyst or expanding blastocyst stage of development were graded (Grades 1, 2, and 3), equilibrated for 5 min in HEPES-199 medium with 20% FCS (HFm), placed in HFm with 10% EG, and 10% DMSO (VS1) for 2 min, and then transferred to HFm with 20% EG, 20% DMSO (VS2) for 30 s (Vajta). Between 5 and 10 IVP embryos were processed and collected for vitrification, either in an OPS plunged into LN₂, or in a 3 µL droplet vitrified by the CLV Method. The two sets of specimens were stored in LN₂, and later thawed. Both OPS tips and beads were thawed in 0.5 mL of HFm with 0.2 M sucrose at 39°C. Embryos were maintained at 39°C, examined after 5 min for contraction, and again after 6 h for re-expansion. They were then transferred to culture medium, incubated and examined at 24 and 48 h to assess hatching. As shown in Table 1, the CLV method appears to be satisfactory for maintaining membrane integrity (expansion) and developmental potential (hatching) for even poorer grade embryos, that might be more sensitive to the stresses of cryopreservation.

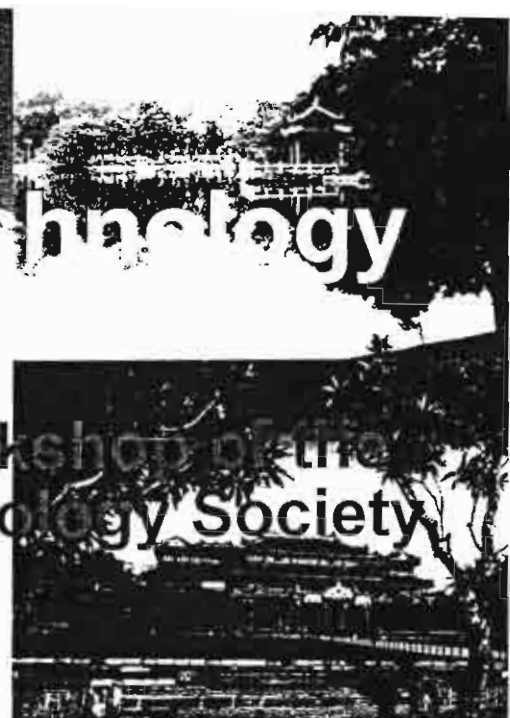
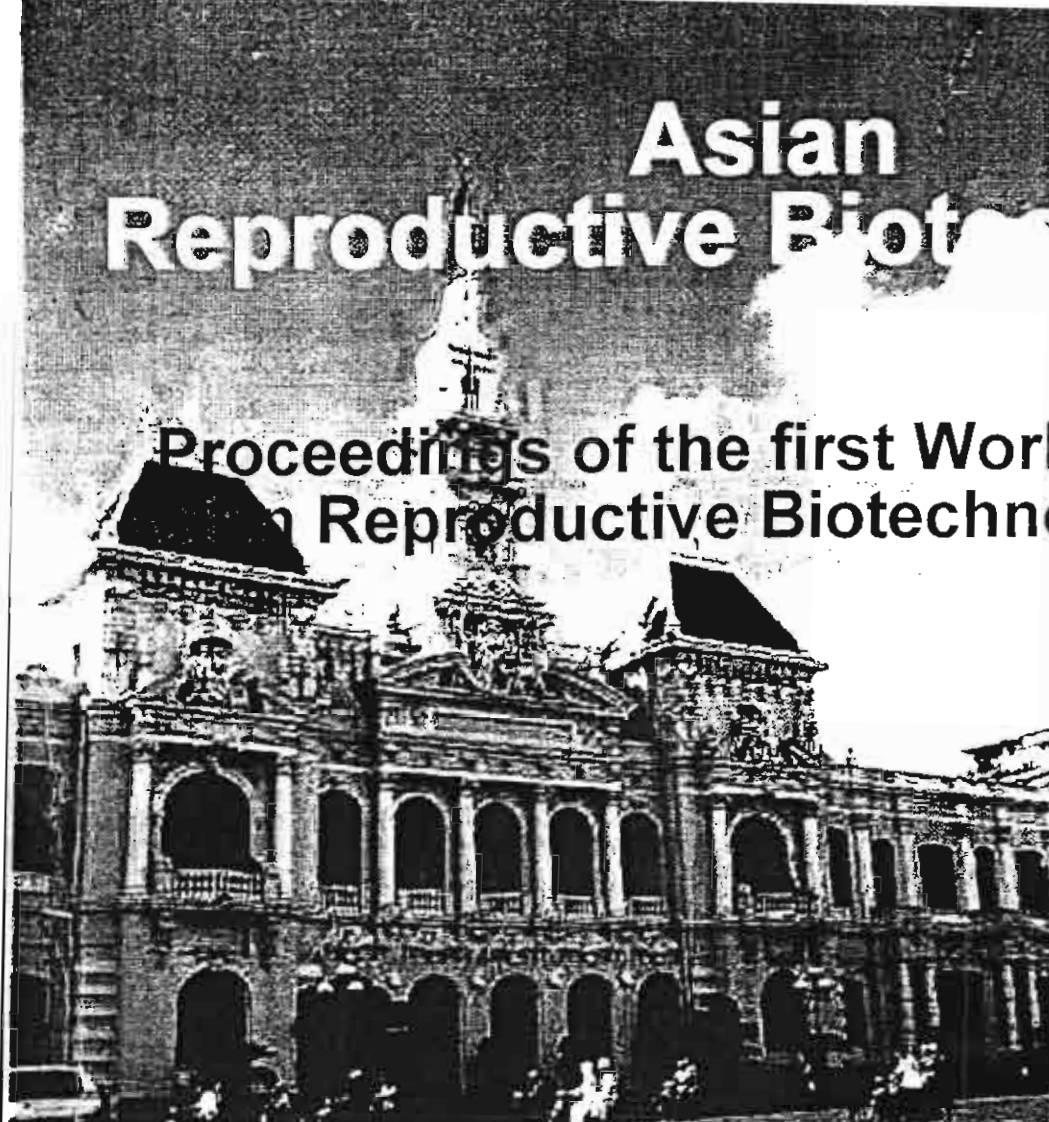
Table 1. Re-expansion and hatching rates of graded thawed bovine embryos vitrified by OPS or CLV methods

Embryo Grade	Method	# Frozen/thawed	# Re-expanded (%)	# Hatched (%)
Grade 1	OPS	92	81 (88)	75 (82)
	CLV	78	72 (92)	69 (88)
Grade 2/3	OPS	53	35 (66)	24 (45)
	CLV	35	31 (91)	26 (76)

No difference in re-expansion or hatching of Grade 1 embryos by either method. More ($P < 0.05$) Grade 2 and 3 embryos re-expanded and hatched after freeze thawing using CLV than OPS.

Asian Reproductive Biotechnology

Proceedings of the first Workshop of the
Asian Reproductive Biotechnology Society

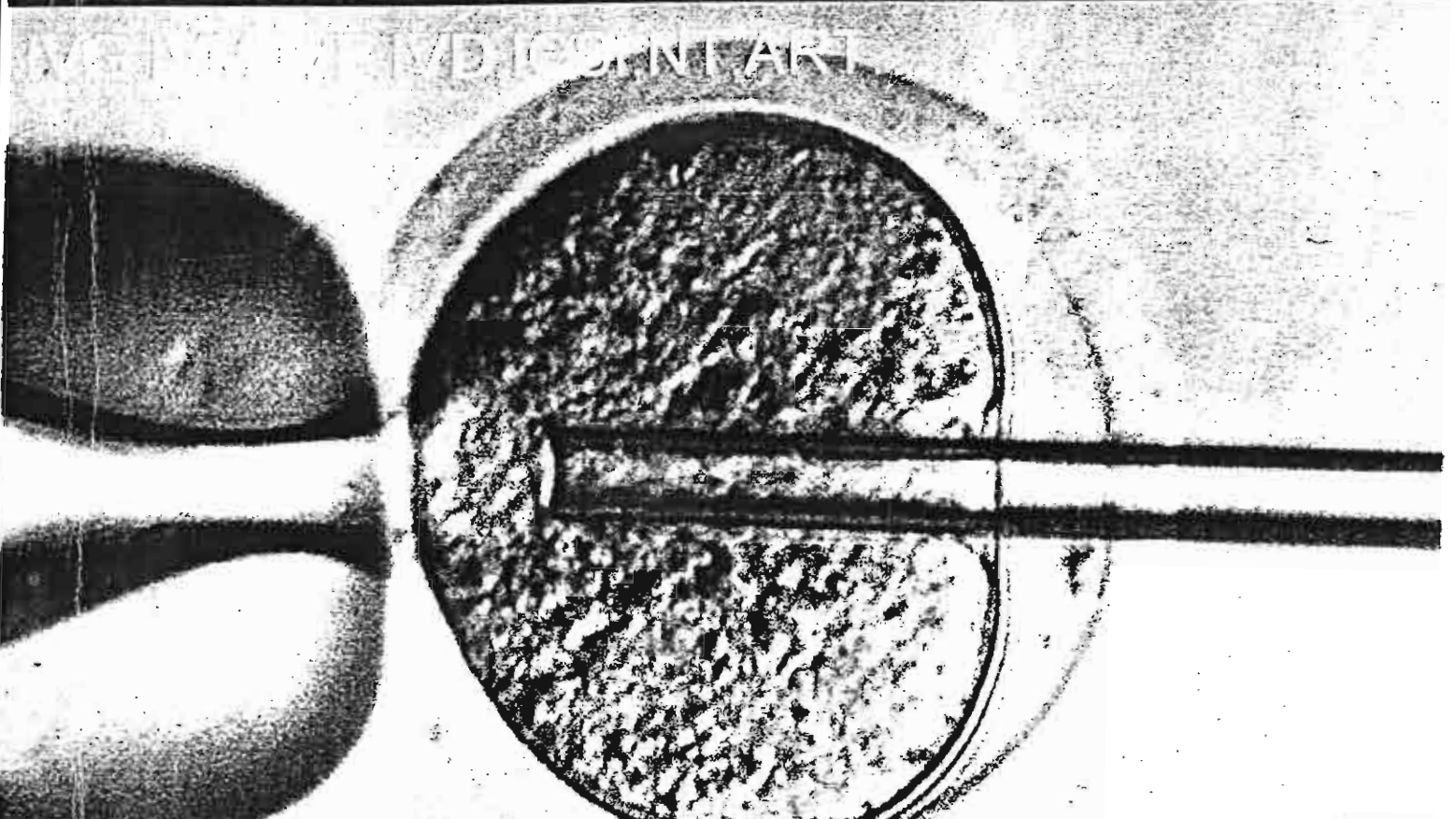


* Hanoi

* Hue

* Ho Chi Minh

HO CHI MINH City VIETNAM April 12-14, 2004



ARB

Hosted by the Center for Developmental Biology, RIKEN, JAPAN
and Nong Lam University, HO CHI MINH City, VIETNAM

THE EFFECT OF FICOLL IN VITRIFICATION SOLUTION AND HATCHING STATUS OF CLONED BOVINE BLASTOCYSTS ON THE SURVIVAL RATE AFTER VITRIFICATION BY USING CRYOTOP

Chuti LAOWTAMMATHRON¹, Tasuma TERAOKA², Chanchao LORTHONGPANICH¹, Suchitra MUENTHAISON¹, Tawatchai VETCHAYAN¹, Shinichi HOCHI² and Rangsun PARNPAI¹

¹ Animal Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

² Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Nagano, Japan.

E-mail: rangsun@ccs.sut.ac.th

Abstract

Bovine blastocyst produced by nuclear transplantation have mechanical slits in their zona pellucida, and therefore initiate hatching earlier than non-manipulated embryos. This study was examined the effect of vitrification solution with or without 10%Ficoll and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification and warming. Bovine cloned blastocysts were produced by using adult ear fibroblasts as previously reported (Parnpai et al., Theriogenology 2002; 57: 443). Reconstructed embryos were co-cultured with bovine oviductal epithelium cells in mSOFaa medium supplemented with 0.1% linoleic acid-albumin (LAA) + 0.2%BSA (Hochi et al., Theriogenology 1999; 52: 497-504). On day 7, hatching blastocysts were classified into three groups according to extruding embryonic diameter from zona pellucida (D2) to embryonic diameter inside zona pellucida (D1), group A: D2/D1 = 0.01-0.70, group B: D2/D1 = 0.71-1.00, group C: D2/D1 = 1.01-1.70. Embryos were exposed to 10%EG + 10%DMSO in TCM199-Hepes + 20%FCS for 2 minutes and placed into 20%EG + 20%DMSO + 0.5M sucrose in TCM199-Hepes + 20%FCS with or without 10%Ficoll for 30 seconds. One to three embryos were placed on the cryotop device (Kitazato Supply Co., Tokyo) and immediately submerged in liquid nitrogen. Embryos were warmed by serial dilution from 0.5M sucrose in 199Hepes + 20%FCS to 0M sucrose (5 minutes each). The survival rate was assessed at 0h and 24h after warming. In the Ficoll free vitrification solution group, the survival rate of embryos in group A (77%, 23/30) was not different from group B and C (74%, 20/27 and 80%, 24/30, respectively). Embryo survival did not improved after vitrification in solution supplemented with 10%Ficoll (Group A; 65%, 22/34; Group B; 54%, 15/28; Group C; 59%, 19/32). In conclusion, Ficoll and hatching status of bovine cloned blastocysts did not effect to the survival rate after vitrification and warming.

Keywords: *Vitrification, Ficoll, Cloning, Bovine, Hatching blastocyst*

(This study was supported by Thailand Research Fund and R&D Fund of Suranaree University of Technology)

ICBAR 2005

The 12th International Congress
on Biotechnology in Animal Reproduction



In Vitro Fertilization and Production of Embryos
Germ cells and Embryos Cryopreservation
Cloning of Mammalian embryos
Reproduction System
Genetics

August 4 to 6, 2005

Faculty of Veterinary Medicine
Chiang Mai University, Thailand.



SHORT COMMUNICATION/ PRESENTATION

Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique

C. Laowtammathron, S. Imsoonthornruksa, S. Mueanthaisong, C. Lorthongpanich, T. Vetchayun, C. Sang-ngam, C. Tangthai, M. Ketudat-Cairns and R. Parnpai*

Embryo Technology and Stem cell Research Center, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

** Corresponding authors. Tel. (66) 44 224 244 Fax. (66) 44 224 150*

E-mail address: rangsun@ccs.sut.ac.th

Introduction

There have been several studies to improve the efficiency of vitrified cloned bovine embryos (Nguyen et al., *Theriogenology* 2000; 53: 1439-1448; French et al., *Theriogenology* 2001; 57: 413; Tecirlioglu et al., *Reprod. Fertil. Dev.* 2003; 15: 361-366; Gong et al., *Mol. Reprod. Dev.* 2004; 69: 278-288; Laowtammathron et al., *Theriogenology* 2005; article in press). However, none of the previous studies have demonstrate the effects of the cryoprotectant using microdrop. The aim of this study is to compare the effects of concentration of ethylene glycol (EG) and dimethylsulfoxide (DMSO) in vitrification solution on the survival rate of vitrified cloned bovine blastocysts by using micro-drop technique.



Materials and Methods

Donor cell preparation

The ear skin was biopsied and kept in modified Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (mDPBS) for transportation to laboratory. Skin tissues were culture in α -MEM + 10%FBS under humidified atmosphere of 5%CO₂ in air at 37°C. Ear fibroblasts were frozen with 10%DMSO in α -MEM + 20%FBS at the third cell culture passages and stored in liquid nitrogen.

Recipient cytoplasm preparation

Bovine ovaries were collected from the slaughterhouse and kept in saline and transported to laboratory at room temperature. The oocytes were collected by aspiration technique using 10 ml syringe connected with 21G needle. Only cumulus oocytes complexes with three or more layers of cumulus cells were selected and cultured in TCM199 supplemented with 10%FBS, 0.02AU/ml FSH (Antrin[®], Denka Phamaceutical), 50 IU/ml HCG (Chorulon[®], Intervet) and 1 μ g/ml E₂ under humidified atmosphere of 5%CO₂ in air at 38.5°C for 20 h.

Somatic cells nuclear transfer

At 20 h of culture, the cumulus cells were removed in 0.2%hyarulonidase and washed 5 times in Emcare holding medium (ICP bio). Metaphase II oocytes were enucleated by micromanipulator. After that each individual donor cell was inserted into perivitelline space of the enucleated oocyte. The resulting somatic cell-cytoplasm complexes (SCCCs) were transferred to Zimmermann fusion medium. An individual SCCC was placed between both tips of electrode to electrostimulate with double DC pulses of 24V/SCCC for 15 μ sec each time. The DC pulses were generated by fusion machine (SUT F-1, Suranaree University of Technology). After 1 h the fusion rate was checked under inverted microscope. The reconstructed embryos were activated by placing in 7%Ethanol for 5 min and 10 μ g/ml cycloheximide + 1.25 μ g/ml cytochalasin D for 5 h under humidified atmosphere of 5%CO₂ in air at 38.5°C.



***In vitro* embryos culture**

The reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium supplemented with 0.3%BSA (mSOFaa). Reconstructed embryos was cultured under humidified of 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂ at 38.5°C for 2 d. After that, 8-cell stage embryos were selected and co-cultured with bovine oviductal epithelium cells (BOEC) in mSOFaa under humidified atmosphere of 5%CO₂ in air for 5-6 d. The development of embryos were observed and half of the medium were changed daily.

Vitrification

Grade 1 and 2 hatching blastocysts at day 7 and 8 of cultured were first exposed in equilibration solution (7.5%EG + 7.5%DMSO in TCM199 + 20%FBS) for 3 min and then exposed in VS33 (16.5%EG + 16.5%DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20%FBS) or VS35 (17.5%EG + 17.5%DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20%FBS) for 30 sec at 22°C. Then five embryos in 1-2 µl of vitrification solution were directly drop into liquid nitrogen by using pulled pasteur pipette.

Warming

Embryos were warmed by directly placed micro-drop into 0.6M sucrose at 38°C for 5 min and washed in 0.4M sucrose, 0.2M sucrose and 0M sucrose in TCM199 + 20%FBS for 5 min in each step at 38°C. Then the embryos were co-cultured with BOEC in mSOFaa for 24 h. At 0 h post-warmed, the embryos morphologies were examined and co-cultured with BOEC in mSOFaa for 24 h.

Differentiation staining

The zona-pellucida post-warmed survival blastocyst at 24 h of cultured were removed by 0.5% protease and washed in mSOFaa. The zona-free embryos were incubated in 10% rabbit anti bovine spleenocytes for 45 min and incubated in 10% guinea pig complement + 75 µg/ml propidium iodide + 100 µg/ml Hoechst 33258 for 45 min. The embryos were mounted on glass slide and cover with glycerol. Number of trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) were counted under fluorescence microscope.

Embryos transfer

Some fresh cloned bovine blastocysts (days 7 and 8) and frozen-thawed from VS33 (24 h after cultured) were non-surgical transferred



into the uterine horn (ipsilateral to ovulation) of a recipient (1-2 embryos/recipient) that had been synchronized naturally or by treatment with 500 µg of PGF_{2α} analogue. Pregnancy was diagnosed on days 60 after transfer by rectal palpation.

Statistical analysis

The significant differences were determined by ANOVA using SAS program.

Results and discussion

The survival rate of day 7 cloned bovine embryos after vitrification by micro-drop technique were summarized in Table 1. The survival rate of cloned bovine embryos after 24 h of *in vitro* culture from VS35 were slightly lower than VS33 (86% VS 94%, respectively) but it was not significant different. The survival rate in this study was higher than OPS in bovine and ovine morulae to blastocysts (Kelly et al., Reprod. Fertil. Dev. 2004; 61: 267-275). Cell numbers of vitrified embryos were not different from those of VS33 and VS35 (Table 2). However, ratio of ICM and TE cell from VS35 were higher than VS33. After non-surgical transferred only 3 recipients (15.8) from fresh embryos and 2 recipients (11.8) from vitrified embryos (VS33) were pregnant (Table 3). All recipients are during 3-4 months of pregnancy. High survival rate of micro-drop vitrification of cloned bovine blastocysts were obtained by using VS33 and VS35. Difference concentration of EG and DMSO in VS33 and VS35 did not effect the survival rate at 0 h and 24 h and total cell number of cloned bovine hatching blastocyst.

Table1 Cryosurvival of cloned bovine blastocysts after vitrified by micro-drop in VS33 or VS35.

Vitrification solution	Normal morphology and survival rate	
	0 h (%)	24 h (%)
VS33	99/99 (100)	93/99 (94)
VS35	98/98 (100)	84/98 (86)

**Table 2** Mean and ratio of TE and ICM cells of vitrified cloned bovine blastocysts.

Vitrification solution	No. embryos	ICM	TE	ICM : TE	Total cell
VS33	25	31±18	99±41	1:3.2	130±50
VS35	25	26±8	102±28	1:3.9	128±30

Table 3 Pregnancy rate after transfer fresh or vitrified cloned bovine blastocysts.

Groups	No.embryos ransfer/recipient females(No.embryos/recipient)	Pregnancy rate on days 60 (%)
Fresh control	39/19 (2.0)	3/19 (15.8)
VS33	30/17 (1.8)	2/17 (11.8)

(This study was supported by Thailand Research Fund and R&D Fund of Suranaree University of Technology)

References

- French, A. J., Hall, V. J., Korfiatis, N. A., Ruddock, N. T., Vajta, G., Lewis, I. M. and Trounson, A. O. (2001). Viability of cloned bovine embryos following OPS vitrification. *Theriogenology* 57: 413.
- Gong, G., Dai, Y., Fan, B., Zhu, H., Zhu, S., Wang H., Wang, L., Tang, B., Li, R., Wan, R., Liu, Y., Huang, Y., Zhang, L., Sun, X., and Li, N. (2004). Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 69: 278-288.



- Kelly, J.M., Kleemann, D.O., Kuwayama, M., and Walker, S.K. (2004). Vitrification of *in vitro*-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. **Reprod. Fertil. Dev.** 16: 172-173.
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, M., Hochi, S., and Parnpai, R. (2005). Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology** article in press.
- Nguyen, B.X., Sotomaru, Y., Tani, T., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2000). Efficiency cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. **Theriogenology** 53: 1439-1448.
- Tecirlioglu, R.T., French, A.J., Lewis, I.M., Vajta, G., Korfiatis N.A., Hall, V.J., Ruddock, N. T., Cooney, M. A., and Trounson, A.O. (2003). Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. **Reprod. Fertil. Dev.** 15: 361-366.



เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๒

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference

สาขาสัตว์ (Subject: Animals)

สาขาสัตวแพทยศาสตร์ (Subject: Veterinary Medicine)

ค.ร.ร.ก.ม.ก.พ.น.ร. ๒๕๔๑
ค.ร.ร.ก.ม.ก.พ.น.ร. ๒๕๔๑
ค.ร.ร.ก.ม.ก.พ.น.ร. ๒๕๔๑



เกษตรศาสตร์

เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต

Agricultural Science for Life Quality Development



ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก Vitrification

The effect of hatching stage on the survival rate of cloned bovine embryos after vitrification

ชุตติ เหล่าธรรมธร¹ ทัสสุมา เทราโอ² จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์¹ สุจิตรา หมั่นไธสง¹,

ธวัชชัย เวชยันตี¹ ชินิจิ โฮจิ² และ รังสรรค์ พาลพ่าย¹

Chuti Laowtammathron¹, Tasma Terao², Chanchao Lorthongpanich¹, Sujitra Mueanthaisung¹,

Tavatchai Vetchayan¹, Shinichi Hochi², and Rangsun Parnpai¹

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ต้องการศึกษาผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งอายุ 7 วันหลังจากแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification แบ่งกลุ่มโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนภายนอก zona pellucida (D2) และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนภายใน zona pellucida (D1) กลุ่ม A: $D2/D1=0.01-0.70$ กลุ่ม B: $D2/D1=0.71-1.00$, กลุ่ม C: $1.01-1.70$ จากนั้นนำตัวอ่อนไปแช่ในน้ำยา TCM199-Hepes+20%FCS ที่มี 10%EG+10%DMSO นาน 2 นาที แล้วย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes+20%FCS ที่มี 20%EG+20%DMSO+0.5M sucrose นาน 30 วินาที โดย 10 วินาทีสุดท้ายจะนำตัวอ่อนไปวางที่ปลายของ Cryotop (1-3 ตัวอ่อน/Cryotop) แล้วจึงจุ่ม Cryotop ลงในไนโตรเจนเหลวทันที การละลายจะใช้วิธี Serial dilution 5 ขั้นตอน หลังจากละลายพบว่า ตัวอ่อนกลุ่ม B และ C มีรูปร่างปกติทั้งหมด (30/30 และ 27/27) หลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว 24 ชั่วโมงพบว่าตัวอ่อนกลุ่ม C มีอัตราการรอด 80% (24/30) ซึ่งมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่ม A 77% (23/30) และกลุ่ม B 74% (20/27) ตามลำดับ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า hatching stage ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งที่แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification

ABSTRACT

This experiment was undertaken to examine the effect of hatching stage of day 7 cloned bovine embryos on the survival rate after vitrification. Embryos were classified into three groups according to extruding embryonic diameter from zona pellucida (D2) to embryonic diameter inside zona pellucida (D1), group A: $D2/D1=0.01-0.70$, group B: $0.71-1.00$, group C: $1.01-1.70$. Embryos were exposed to 10%EG+10%DMSO in TCM199-Hepes+20%FCS for 2 minute and placed to 20%EG+10%DMSO+0.5M sucrose in TCM199-Hepes+20%FCS for 30 second. One to three embryos were placed on the sheet of Cryotop and vitrified in liquid nitrogen. Embryos were warmed by serial dilution (5 steps) and all of embryos in group B and C were normal morphology (30/30, 27/27). After *in vitro* cultured for 24 h, 80% embryos in group C, A, B were survived (80%, 24/30; 77%, 23/30; 74% 20/27 respectively). In conclusion, hatching stage of cloned bovine blastocysts was not effect on the survival rate after vitrification and warming.

¹ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology

² Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Nagano, Japan

คำนำ

นับตั้งแต่มีการค้นพบ Cryoprotectant ชนิดแรก คือ Glycerol ซึ่งช่วยให้สpermatozoa มีความอยู่รอดหลังจากแช่แข็ง หลังจากนั้นจึงมีการใช้ Glycerol กันอย่างแพร่หลายในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งปศุสัตว์ ต่อมาในปี 1972 Whittingham *et al.* สามารถแช่แข็งตัวอ่อนหนูถีบจักรระยะ 8 เซลล์และหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนมีลูกหนูเกิดมา ความสำเร็จนี้ทำโดยการลดอุณหภูมิลงช้าๆ (Slow – rate freezing) หลังจากนั้นก็มีแช่แข็งตัวอ่อน กระต่าย วัวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิดโดยอาศัยหลักการของ Whittingham ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 Rall and Fahy ได้คิดค้นวิธี Vitrification ขึ้นเพื่อที่จะแช่แข็งตัวอ่อนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยปราศจากผลึกน้ำแข็งโดยใช้สารที่มีความเข้มข้นของ Cryoprotectant ที่สูง ต่อมาในปี ค.ศ. 1986 Massip *et al.* เป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการทำ Vitrification ตัวอ่อนโคและเป็นทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนที่ทำ Vitrification แล้วเมื่อดำเนินการตั้งท้อง หลังจากนั้นเทคนิคนี้ก็ได้รับการพัฒนาเรื่อยมา การแช่แข็งตัวอ่อนส่วนใหญ่จะเป็นตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วเท่านั้น ในปี 1999 Nguyen *et al.* ได้ทดลอง Vitrification ตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งระยะ blastocysts โดยใช้หลอดเก็บน้ำเชื้อ แต่การทดลอง Vitrification ส่วนใหญ่ยังคงใช้ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และยังไม่มียางานการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งโดยเปรียบเทียบ hatching stage มาก่อน ตัวอ่อนที่ผลิตจากหลอดแก้วจะมีอัตราการรอดสูงสุดที่ระยะ expand blastocyst แต่สำหรับตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีโคลนนิ่งตัวอ่อนจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ก่อนโดยไม่เข้าระยะ expand blastocyst เนื่องจากขบวนการโคลนนิ่งจะทำให้ zona pellucida เกิดรูขึ้น ดังนั้นเมื่อตัวอ่อนเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น ก็จะสามารถเคลื่อนตัวออกจาก zona pellucida ได้ทันที ในการทดลองนี้ต้องการที่จะทดสอบผลกระทบของ hatching stage ต่ออัตราการรอดหลังจากแช่แข็งโดยวิธี Vitrification ของตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งอายุ 7 วัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

วิธีการทำโคลนนิ่งจะทำตามที่มีรายงานมาแล้วของ รังสรรค์ และคณะ (2543) และ Parnpai *et al.* (2000) ซึ่งกล่าวโดยย่อได้ดังนี้ คือ กวักเก็บเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหนังหมู โดยจะล้างทำความสะอาดบริเวณใบหูให้สะอาด จากนั้นเก็บชิ้นส่วนหนังหมูโดยใช้เครื่องเจาะ จะได้หนังหมูมีลักษณะเป็นวงกลมขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้มีดชุดขนออกจากบริเวณหนังหมูด้านบนและด้านล่างออกให้หมด แล้วลอกหนังออกจากกระดูกอ่อนแล้วตัดหนังให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางเรียงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร แล้วกดทับด้วยแผ่นกระจกใส จากนั้นจึงเติมน้ำยา α MEM+10%FCS 5 ซีซี แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO₂ in air จะเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากจนเกือบเต็มภาชนะ จะทำการขยายการเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากๆ แล้วจึงนำไปแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนที่จะทำการโคลนนิ่งประมาณ 2-3 วันจะทำการละลายเซลล์ต้นแบบออกมาเลี้ยงใหม่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้เป็นเซลล์ต้นแบบต่อไป จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ให้เข็มเบอร์ 21 ตอกกับกระบอกฉีดยาเจาะดูดไซโตพลาสซึมออกจากถุงฟอลลิเคิลและเลือกเฉพาะไซโตพลาสซึมที่เลี้ยงในน้ำยาที่ประกอบด้วย TCM199 + 10%FCS, 50 IU/ml HCG (Chorulon , Intervet), 0.02 AU/ml FSH (Antrin , Denka Pharmaceutical) และ 1 μ g/ml E_2 และนำไปเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μ ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 20-21 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วยไซโตรอบบ์ ไซโตพลาสซึมให้หมดด้วย 0.2% Hyaluronidase คัดเฉพาะไซโตพลาสซึมที่สุกแล้ว (มี First polar body) มาดูดนิวเคลียสของไซโตพลาสซึมโดยใช้ Micromanipulator ในน้ำยาที่มี 5 μ g/ml Cytochalasin B ผสมอยู่ และยืนยันผลโดยการนำส่วนที่ดูดออกมาได้ไปย้อมในสี Hoechst 33342 และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง UV หลังจากนั้นจะล้างไซ 5 ครั้งในน้ำยา TCM 199-Hepes + 10%FCS (199H-10%FCS) แล้วเก็บไซในน้ำยานี้จนกว่าจะฉีดเซลล์ต้นแบบ

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าสู่ไซจะต้องแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวก่อนโดยน้ำยา Trypsin/EDTA จากนั้นเลือกเซลล์ที่มีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 14-16 μ m ฉีดเข้าที่บริเวณ perivitelline space ในน้ำยา 199H-10%FCS

หลังจากฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าสู่ไซแล้วจะนำไซมาทำการเชื่อมเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ย้ายไซเข้าน้ำยา Zimmermann fusion medium ก่อนจ่ายกระแสไฟฟ้าจะต้องจัดให้ตำแหน่งของไซและเซลล์ต้นแบบอยู่ระนาบเดียวกันกับ Fusion Electrode ทั้ง 2 ข้าง และตำแหน่งของเซลล์ต้นแบบจะต้องอยู่กึ่งกลางระหว่าง Fusion Electrode จากนั้นจึงจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ DC pulse 24 Volt นาน 15 μ sec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไซไปล้างในน้ำยา 199H-10%FCS 5 ครั้ง 1 ชั่วโมงต่อมาจึงตรวจการเชื่อมระหว่างไซและเซลล์ต้นแบบ

การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว

นำไซที่เชื่อมเซลล์ต้นแบบสำเร็จแล้วมากระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวในน้ำยาที่มี 7% Ethanol นาน 5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+10%FCS (mSOF10) ที่มี 10 μ g/ml Cycloheximide และ 1.25 μ g/ml Cytochalasin D ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำตัวอ่อนเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.2%BSA + 0.1%Linoleic acid albumin (mSOFaa-LAA) นาน 2 วัน โดยจะเลี้ยง 20 ตัวอ่อนในน้ำยา 100 μ l. ภายใต้ 5% CO_2 5% O_2 90% N_2 จากนั้นจะคัดเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa-LAA ร่วมกับเซลล์เยื่อปูดนำไข่วัว (10 ตัวอ่อน/100 μ l.) ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 5 วัน โดยจะเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่ง และแทนที่ด้วย น้ำยาใหม่ ใช้เวลาเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมด 7 วัน ก่อนที่จะนำไปแช่แข็ง

การแช่แข็งตัวอ่อน

ตัวอ่อนเกรด 1 และ 2 อายุ 7 วัน จะถูกแช่แข็งโดยวิธี Vitrification โดยใช้ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo) เป็นภาชนะที่ใช้ในการแช่แข็ง จากการเจริญเติบโตของตัวอ่อนพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Figure 1) ซึ่งจะแบ่งได้จากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนที่โผล่ออกมาจาก zona pellucida (D2) ทารกกับส่วนที่

อยู่ภายใน zona pellucida (D1) หากผลลัพธ์ที่ได้อยู่ในช่วง 0.01-0.70 จะจัดให้อยู่ในกลุ่ม A และการผลลัพธ์ที่ได้อยู่ในช่วง 0.71-1.00 จะจัดให้อยู่ในกลุ่ม B และหาก ผลลัพธ์ที่ได้อยู่ในช่วง 1.01-1.70 จะจัดให้อยู่ในกลุ่ม C หลังจากจัดกลุ่มตัวอ่อนได้แล้วก็นำตัวอ่อนมาล้าง 4 ครั้งในน้ำยา TCM199-Hepes+20%FCS (199H-20%FCS) จากนั้นจะนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา 199H+20%FCS ที่มี 10%Ethylene glycol(EG) + 10% Dimethylsulphoxide (DMSO) นาน 2 นาที แล้วย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา Vittrification (199H-20%FCS ที่มี 20% EG + 20% DMSO + 0.5M sucrose) นาน 30 วินาที ประมาณ 10 วินาทีก่อนที่เวลาจะครบ 30 วินาที ตัวอ่อนจะถูกย้ายไปไว้ที่ปลายของ Cryotop (1-3ตัวอ่อน/Cryotop) หลังจากนั้นจึงจุ่ม Cryotop ในไนโตรเจนเหลว และปิดส่วนปลายของ Cryotop ด้วยจุกอุด แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว

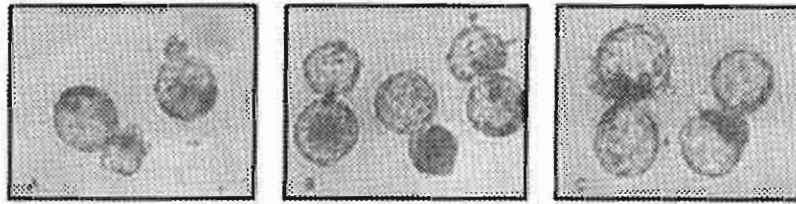


Figure1 ตัวอ่อนอายุ 7 วัน ในกลุ่ม A, B, และ C ก่อนการแช่แข็ง

การละลายตัวอ่อน

การละลายตัวอ่อนจะใช้วิธี Serial dilution โดยที่ส่วนปลายของ Cryotop ที่มีตัวอ่อนอยู่จะถูกย้ายจากไนโตรเจนเหลวมาแช่ไว้ใน 0.5M sucrose เพื่อให้ตัวอ่อนหลุดจาก Cryotop หลังจากนั้นตัวอ่อนจะอยู่ในน้ำยานี้ 5 นาที จากนั้นจะย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0M sucrose นานน้ำยาละ 5 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งในน้ำยา mSOFaa-LAA cและนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa-LAA ที่มีเซลล์เยื่อหุ้มท่อไข่โต นาน 24 ชั่วโมง การบันทึกผลการทดลองจะทำหลังจากละลายตัวอ่อนเสร็จสิ้นทันทีและ 24 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ความแตกต่างของผลการทดลองจะวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA

ผลการทดลองและวิจารณ์

จาก Table 1 หลังจากแช่แข็งและละลาย (Figure 2) พบว่า ตัวอ่อนในกลุ่ม B และ C มีรูปร่างปกติทั้งหมด (27/27 และ 30/30 ตามลำดับ) ตัวอ่อนในกลุ่ม A มีรูปร่างปกติ 93% (28/30) หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว 24 ชั่วโมงพบว่าตัวอ่อนในกลุ่ม C มีอัตราการรอดสูง 80% (24/30) รองลงมาคือตัวอ่อนในกลุ่ม B มีอัตราการรอด 74% (20/27) และ A มีอัตราการรอดต่ำสุด (77%, 23/30) ความอยู่รอดของตัวอ่อนทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะช้าลง 12 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับตัวอ่อนสด เนื่องจากตัวอ่อนหลังจากการแช่แข็งและละลายจะได้รับบาดเจ็บจากกระบวนการดังกล่าว ดังนั้นจึงต้องมีการซ่อมแซมตัวเองก่อนที่จะเจริญเติบโตต่อไป

Table 1 The survival of cloned bovine hatching blastocysts after vitrification and warmed

Groups	No. embryos vitrification	Normal morphology (%)	24h after thaw (%)
A	30	28/30 (93)	23/30 (77)
B	27	27/27 (100)	20/27 (74)
C	30	30/30 (100)	24/30 (80)



Figure 2 ตัวอ่อนก่อนและหลังการแช่แข็งที่ชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 24 หลังการละลาย; A: ตัวอ่อนก่อนแช่แข็ง B: ตัวอ่อนหลังจากละลายที่ชั่วโมงที่ 0, C: ตัวอ่อนหลังจากละลายที่ชั่วโมงที่ 48

สรุป

จากผลการทดลองแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งอายุ 7 วันที่ระยะ hatching blastocyst ที่มีขนาดต่างกัน พบว่าขนาดของ hatching blastocyst ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนหลังจากแช่แข็งและละลาย

คำนิยม

การทดลองนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดี ด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38 สาขาสัตว. 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- Massip, A., P. Van Der Zwalm, B. Scheffen, and F. Ectors. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-letters* 7:270-273. Quoted in Gordon. 1994. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. Laboratory production of cattle embryos. 320-323.
- Nguyen, B.X., Y. Sotomaru, T. Tani, Y. Kato, and Y. Tsunoda. 2000. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology* 53:1,439-1448.

Parnpai R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Theriogenology* 53:239.

Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 313:573-575.

Whittingham, D.G., S.P. Leibo, and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 178 (59):411-4.



เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๒

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference

สาขาสัตว์ (Subject: Animals)

สาขาสัตวแพทยศาสตร์ (Subject: Veterinary Medicine)

ค.ร.ว.ก.ม.ภ.พ.น.ร. ๒๕๔๖
ค.ร.ว.ก.ม.ภ.พ.น.ร. ๒๕๔๖
ค.ร.ว.ก.ม.ภ.พ.น.ร. ๒๕๔๖



เกษตรศาสตร์

เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต

Agricultural Science for Life Quality Development



การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

The use of cloning technology to produce exotic beef and dairy cattle

รังสรรค์ พาลพ่าย¹ ชุตติ เหล่าธรรมธร¹ จันทร์เจ้า ลือทองพานิชย์¹ สุจิตรา นมื่นไธสง¹ ธวัชชัย เวชยันต์¹

เสวียน สัมหวาน¹ เพลิน เมินกระโทก² สมพงษ์ ปาติตัง² สุริยา กิจสำเริง³ และ สมบัติ สิริอุดมเศรษฐ³

Rangsun Parnpai¹, Chuti Laowtammathron¹, Chanchao Lorthongpanich¹, Suchitra Muenthaisong¹

Tawatchai Vetchayun¹, Savian Somvan¹, Plern Mernkratoke², Sompong Patitang²

Suriya Kitsumrej³, and Sombat Siriudomset³

บทคัดย่อ

เก็บเซลล์ใบหูจากโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ที่มีประวัติพันธุ์กรรมดีเยี่ยมและจากโคนมลูกผสมขาวดำเพศเมียที่มีประวัติการให้น้ำนม 8,000 กก./ปี มาเลี้ยงเก็บไว้เป็นเซลล์ต้นแบบทำโคลนนิ่ง นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคนม จำนวน 8 ตัวอ่อน ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ 4 ตัว (2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งครรภ์ 60, 180, 200 และ 220 วัน 50% (2/4) และย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อ จำนวน 56 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 36 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งครรภ์ 60 และ 180 วัน 36.1% (13/36) และได้อัตราการตั้งครรภ์ในวันที่ 200 และ 220 วัน 33.3% (12/36) และ 30.5% (11/36) โดยมีโคตัวรับในกลุ่มนี้ 2 ตัวแท้งในวันที่ 186 และ 209 ของการตั้งครรภ์ โคตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวได้คลอดลูกตามธรรมชาติ 1 ตัวมีสุขภาพแข็งแรงดี และโคตัวรับอีก 1 ตัวได้รับการผ่าตัดทำคลอด ลูกที่เกิดมา 1 ตัวมีรูปร่างปกติและเสียชีวิตหลังคลอด 15 นาที โคตัวรับที่เหลือมีกำหนดคลอดภายในสิ้นเดือนธันวาคม 2546 จากการตรวจ DNA microsatellite พบว่าลูกโคที่เกิดมามีแถบ DNA เหมือนกับโคต้นแบบทุกประการ และแตกต่างจาก DNA ของโคตัวรับ

ABSTRACT

Ear skin of exotic Brahman bull and female dairy cattle were cultured and frozen storage for use as donor cells for cloning. Eight blastocysts derived from dairy cattle cells were transferred to 4 recipient's (2 embryos/recipient), the pregnancy rate of this group at 60, 180, 200 and 220 days was 50% (2/4). Fifty six blastocysts derived from Brahman bull cells were transferred to 36 recipients (1-2 embryos/recipient), the pregnancy rate of this group at 60 and 180 days was 36.1% (13/36) and at 200 and 220 days was 33.3% (12/36) and 30.5% (11/36). Two recipients carried cloned Brahman fetus aborted at day 186 and 209 of pregnant. One pregnant recipient gave naturally birth 1 healthy cloned calf and another one recipient was gave birth by cesarian section to 1 cloned calf with normal morphology and died 15 minute after birth. Rest of pregnant recipients will give birth within the end of

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, Suranaree University of Technology

² ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, Suranaree University of Technology

³ เอสเคฟาร์ม แรนช์, SK Pattaya Ranch

December 2003. DNA microsatellite analysis of cloned calf and donor cells showed the same pattern and obviously different from recipient.

Key words: beef and dairy cattle, cloning
R. Parnpai: rangsun@ccs.sut.ac.th

คำนำ

โคเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีมีไม่พอเพียงที่จะผลิตน้ำนมและเนื้อเพื่อการบริโภคภายในประเทศ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศปีละเกือบหมื่นล้านบาท การผลิตโคนมเกษตรกรต้องการเฉพาะเพศเมีย ส่วนโคเนื้อเกษตรกรต้องการทั้งสองเพศ สัดส่วนของลูกเพศเมียและเพศผู้เป็น 1:1 การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถกำหนดเพศและพันธุกรรมโคได้ ในบ้านเรามีรายงานความสำเร็จการโคลนนิ่งโคมาแล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2543; Parnpai *et al.*, 2000; 2002) การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นใบหูขนาด 5 x 5 มม. จากโคเนื้อพันธุ์บราห์มัน (Brahman) เพศผู้ชื่อตุ้มตาม ซึ่งมีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยมและจากโคนมลูกผสมขาวดำ (HF) เพศเมียหมายเลข 346 ซึ่งมีประวัติการให้น้ำนม 8,000 กก./ปี มาทำความสะอาดแล้วเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS ที่อุณหภูมิ 37 C, 5% CO₂ in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4-5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ แล้วแช่แข็งเซลล์เก็บไว้ใช้งานที่ passage 3 ก่อนใช้งานจะนำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย Trypsin/EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไฮโดพลาสซิมผู้รับ

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์แช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาดูดไข่ออกจากรังไข่โดยใช้เข็มเบอร์ 21 ต่อกับกระบอกฉีดยา จากนั้นทำการหาไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และนำไข่คุณภาพดีเลี้ยงในน้ำยา IVM ในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil น้ำยา IVM ประกอบด้วย TCM199 + 10%FCS, 50 IU/ml HCG (Chorulon , Intervet), 0.02 AU/ml FSH (Antrin , Denka Pharmaceutical) และ 1 μ g/ml E₂ เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μ l ที่อุณหภูมิ 38.5 C, 5% CO₂ in air นาน 21 ชั่วโมง

หลังจากเลี้ยงไข่ในน้ำยา IVM ครบ 21 ชั่วโมง จะนำมาย่อยเซลล์คิวมูล์ลัสออกด้วย 0.2% Hyaluronidase แล้วคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว (มี 1st polar body) นำมาดูดนิวเคลียสออกด้วย micromanipulator และตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้มาย้อมด้วย 5 μ g/ml Hoechst 33342 และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง UV

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitelline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmermann fusion medium เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้าโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 µg/ml Cytochalasin D และ 10 µg/ml Cycloheximide (CD + CHX) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C, 5% CO₂ in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 1% FCS ในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อไข่โคในน้ำยา mSOFaa + 5% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5 °C, 5% CO₂ in air เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่งแล้วเปลี่ยนด้วยน้ำยา mSOFaa + 10% FCS ทุกๆ 12 ชั่วโมง จะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วรวม 7 วัน

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ความแตกต่างของผลการทดลองจะวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA

ผลการทดลอง

Table 1 *In vitro* development of cloned bovine embryos derived from ear fibroblasts

Fused (%)	Embryos cultured	Cleaved (%)	8-cell (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
464/548	451	393/451	292/451	173/393	125/393
(84.67)		(87.14)	(64.75)	(44.02)	(31.80)

จาก Table 1 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่งถึงระยะบลาสโตซิสต์ (31.80%) ไม่แตกต่างกับที่มีรายงานมาแล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2543; Parnpai *et al.*, 2002) แสดงว่าเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตเองมีประสิทธิภาพสูงในการเชื่อมเซลล์และการได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ซึ่งเป็นระยะพร้อมย้ายฝากให้โคตัวรับ

จาก Table 2 ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคนม จำนวน 8 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 4 ตัว (2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 , 180, 200 และ 220 วัน 50% (2/4) ส่วนการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคนเนื้อ จำนวน 56 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 36 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 และ 180 วัน 36.1% (13/36) ได้อัตราการตั้งท้อง 200 และ 220 วัน 33.3% (12/36) และ 30.5% (11/36) โดยมีโคตัวรับในกลุ่มนี้ 2 ตัวแท้งในวันที่ 186 และ 209 ของการตั้งท้อง โคตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวคลอดลูกตามธรรมชาติออกมา 1 ตัวในวันที่ 25 ตุลาคม 2546 มีน้ำหนักแรกเกิด 32.5 กก. มีสุขภาพแข็งแรงดีได้รับการตั้งชื่อว่า ตามตาม2 และจากการตรวจวิเคราะห์ DNA microsatellite (Marker TGLA126) ของโคตัวรับ ตามตามซึ่ง เป็นเจ้าของเซลล์ต้นแบบ และ ตามตาม2 พบว่า ตามตามและตามตาม 2 มี DNA เหมือนกันทุกประการและแตกต่างจาก DNA ของตัวรับ (Figure 1) นอกจากนี้โคตัวรับอีก 1 ตัวได้รับการผ่าตัดทำคลอดในวันที่ 26 ตุลาคม 2546

ได้ลูกโคเกิดมา 1 ตัวมีน้ำหนักแรกเกิด 45 กิโลกรัมและมีรูปร่างปกติทุกประการและเสียชีวิตหลังคลอด 15 นาที โคตัวรับที่เหลือมีกำหนดคลอดภายในสิ้นเดือนธันวาคม 2546

Table 2 Pregnancy rate after transferred cloned bovine embryos to recipients.

Breed of donor cell	No. of embryos transferred	No. of recipients	Pregnant at 60 d	Pregnant at 180 d	Pregnant at 200 d	Pregnant at 220 d
HF	8	4	2 (50%)	2 (50%)	2 (50%)	2 (50%)
Brahman	56	36	13 (36.1%)	13 (36.1%)	12 (33.3%)	11 (30.5%)
Total	64	40	15 (37.5%)	15 (37.5%)	14 (35.0%)	13 (32.5%)

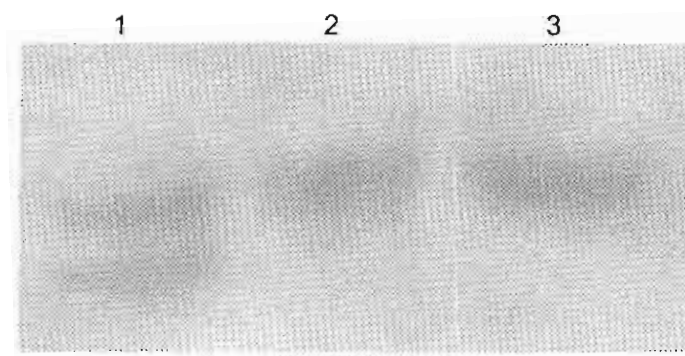


Figure 1 DNA microsatellite analysis comparison of recipient (1), Donor cells (2) and cloned calf (3)

สรุป

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อและโคนมพันธุ์เยี่ยม ได้โคตัวรับตั้งท้องจนถึง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่มีรายงานมาและมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill *et al.*, 2000) ดังนั้นเทคโนโลยีโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อและโคนมพันธุ์เยี่ยมโดยกำหนดเพศและพันธุ์กรรมได้ตามต้องการ

คำนิยาม

การทดลองนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

- Hill, J.H., R.C. Burghardt, K. Jones, C.R. Long, C.R. Looney, T. Shin, T.E. Spencer, J.A. Thompson, Q.A. Winger, and M.E. Westhusin. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63: 1787-1794.
- Pampai, R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Theriogenology* 53: 239.
- Pampai, R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Theriogenology* 57: 443.



เรื่องเดิมการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๓ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

The Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference

เล่มที่ 5

สาขา สัตว์

(Subject: Animals)

สาขา อุตสาหกรรมเกษตร

(Subject: Agro-Industry)

๑-๔ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๘

ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน



เกษตรศาสตร์

เพื่อสังคมแห่งความรู้และการแข่งขันในเวทีโลก

"Agricultural Science for Knowledge Based Societies and World Competitiveness"



การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน Growth Performance of Cloned Calves Derived from Ear Fibroblasts of Exotic Brahman Bull.

อวัชชัย เวชยันต์¹ ชุตติ เหล่าธรรมธร¹ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์¹ สุจิตรา หมั่นไธสง¹ ปิยะมาศ การสมดี¹
มารีนา เกตุทัต คาร์นส์¹ เฟลิน เมินกระโทก² สมพงษ์ ปาติตัง² สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์³ สุริยา กิจสำเริง³
และรังสรรค์ พาลพ่าย¹

Tawatchai Vetchayun¹ Chuti Laowtammathron¹ Chanchao Lorthongpanich¹ Suchitra Muenthaisong¹
Piyamas Karnsomdee¹ Mariena Ketudat Cairns¹ Plem Meuankatoke² Sompong Patilung²
Sombat Siriudomsate³ Suriya Kitsumret³ and Rangsun Pampai¹

บทคัดย่อ

เก็บชิ้นใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยม มาเลี้ยงแช่แข็งเก็บไว้เป็นเซลล์ต้นแบบทำโคลนนิ่งโดย ฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในช่อง Perivitelline space ของไข่โตพลาสซิมผู้รับ จากนั้นทำการเชื่อมเซลล์แล้วนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วเป็นเวลา 7 วัน นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่ได้ จำนวน 64 ตัวอ่อนย้ายฝากให้แม่โคตัวรับ 40 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ) จากการทดลองพบว่าแม่โคตัวรับตั้งท้อง 35.0% (14/40) แท้งก่อนคลอด 28.5% (4/14) ลูกโคตายหลังคลอด 28.5% (4/14) ลูกโคโคลนนิ่งคลอดปกติ 50.0% (7/14) ลูกโคมีน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ย 41.2 กิโลกรัม อัตราการเจริญเติบโตระยะกินนมเฉลี่ย 920 กรัม/วัน ผลการตรวจ DNA microsatellite พบว่าลูกโคที่เกิดมาทั้ง 7 ตัว มีแถบ DNA เหมือนกับโคต้นแบบทุกประการ และ แตกต่างจากแถบ DNA ของแม่โคตัวรับ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ยและอัตราการเจริญเติบโตระยะกินนมเฉลี่ยของลูกโคโคลนนิ่งสูงกว่าค่ามาตรฐาน

ABSTRACT

Ear skin of exotic Brahman bull cattle were cultured and frozen storage for use as donor cells in cloning experiment. Sixty four cloned blastocysts were transferred to 40 recipient (1-2 embryo / recipient). From the experiment found that 14 recipients getting pregnant 35.0% (14/40). From these, aborted recipients were 28.5%(4/14) and postnatal death of calves were 28.5%(4/14). Finally, clone calves were born 50% (7/14) with normal morphological appearance and healthy. The average birth weigh was 41.2 kg and daily weight gain was 920 g. The DNA microsatellite analysis of cloned calves and donor cells showed the same pattern and obviously different from recipients. The results of this experiment were revealed that birth weight and daily weight gain were 41.2 kilograms and 920 grams, respectively.

Key Words : cloning, cattle, growth rate

T Vetchayun : vetchayun@hotmail.com

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

School of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000

²ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, Suranaree University of Technology Farm

³เอสเคฟาร์ม แวนซ์ อ. บางละมุง จ. ชลบุรี, SK Pattaya Ranch, Banglamong, Chonburi

คำนำ

โคพันธุ์บราห์มันเป็นโคเนื้อพันธุ์พื้นฐานที่ใช้ปรับปรุงโคเนื้อพันธุ์พื้นเมืองของไทยให้เป็นโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง- บราห์มัน ซึ่งสามารถนำไปสร้างโคเนื้อและโคนมลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเมืองไทยได้ การผลิตโคบราห์มันพันธุ์แท้เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์ภายในประเทศจึงมีความจำเป็นมาก การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถจำลองพันธุกรรมและลักษณะทางกายภาพของโคลักษณะดีเยี่ยมที่ใช้เป็นต้นแบบขึ้นมาใหม่ได้ซึ่งบ้านเรามีรายงานความสำเร็จจากการโคลนนิ่งมาแล้ว (วังสรรพ และคณะ, 2543 ; Pampai *et al.*, 2000; 2002) การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสโตของพ่อโคบราห์มัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นส่วนของใบหู ขนาด 5 x 5 มม. จากโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ชื่อตุ้มตาม (999/1) ซึ่งมีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยม มาทำความสะอาดแล้วเลี้ยงในน้ำยา Alpha Minimum Essential Medium (α MEM, Sigma, M-7145) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO₂ in air เซลล์ไฟโบรบลาสโตจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4-5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จะทำการขยายการเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากๆ แล้วนำไปแช่แข็ง เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนที่จะทำการโคลนนิ่งประมาณ 2-3 วัน จะทำการละลายเซลล์ต้นแบบออกมาเลี้ยงใหม่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย (Gibco, 2725-024)/EDTA (BDH, 100935V) เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จะใช้เซลล์ถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ ไว้ในน้ำเกลือขณะเข้าห้องปฏิบัติการ ใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาเจาะดูดไข่ออกจากถุงฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 มม. และเลือกเฉพาะไข่คุณภาพดีเลี้ยงในน้ำยาที่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) + 10%FBS 50 IU/ml HCG (Chorulon[®], Intervet), 0.02AU/ml FSH (Antrin[®], Denka Pharmaceutical) และ 1 μ g/ml 17 β -estradiol (Sigma, E-8875) และนำไปเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ / 100 μ l ที่อุณหภูมิ 38.5 °C, 5 %CO₂ in air นาน 21 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อยเซลล์ด้วยวิธีที่รอบๆ ไข่ออกให้หมดด้วย 0.2 % Hyaluronidase คัดเฉพาะไข่ที่สุกแล้ว (มี First polar body) มาดูดนิวเคลียสทิ้งไปโดยใช้ Micromanipulator ในน้ำยาที่มี 5 μ g/ml Cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ผสมอยู่และยืนยันผลโดยการนำส่วนที่ดูดออกมาได้ไปย้อมสี Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง อัลตราไวโอเลต หลังจากนั้นจะล้างไข่ 5 ครั้ง ในน้ำยา TMC 199-Hepes + 10% FBS (199H-10% FBS)

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดสารพันธุกรรมสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ Perivitelline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmerman fusion medium เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า ก่อนจ่ายกระแสไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดย

เครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 Volt นาน 15 μ sec ทำ 2 ครั้งต่อเนื้อกัน หลังจากนั้นจะนำไปล้างในน้ำยา Emcaer (ICP bio.) 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมงจึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ จากนั้นคัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 μ g/ml Cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ 10 μ g/ml Cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO₂ in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Pampai et al. 2000)

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 1%FBS ในหลอดแก้ว นาน 2 วัน โดยจะเลี้ยง 20 ตัวอ่อนในน้ำยา 100 μ l ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ in air จากนั้นจะคัดเฉพาะตัวตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 5%FBS ร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มไข่โค (10 ตัวอ่อน/ 100 μ l) ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO₂ in air เป็นเวลา 5 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูดน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่ง และแทนที่ด้วยน้ำยาใหม่ใช้เวลาเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมด 7 วัน จะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสแล้วนำไปย้ายฝาก

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่แม่โคตัวรับ

คัดเลือกโคลูกผสมจากฟาร์ม SK Pattaya Ranch จำนวน 40 ตัว โดยคัดเลือกแม่โคและโคสาวที่มีระบบสืบพันธุ์ดี อายุ 2-5 ปี รังไข่สมบูรณ์ มีวงรอบการเป็นสัดสม่ำเสมอ แสดงอาการเป็นสัดชัดเจนมาเป็นแม่โคตัวรับ โดยจะใช้ทั้งโคที่เป็นสัตว์ธรรมชาติ หรือฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่โคตัวรับเป็นสัด หลังจากแม่โคตัวรับเป็นสัดได้ 7 วัน จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส เข้าไปในปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ ของแม่โคตัวรับ โดยฝากได้ 1-2 ตัวอ่อน /แม่โคตัวรับ 1 ตัว หลังจากนั้นอีก 60 วัน ล้างตรวจการตั้งท้องของแม่โค เมื่อใกล้ครบกำหนดคลอด จะทำการเตรียมคลอด และให้การช่วยเหลือขณะคลอดซึ่งน้ำหนักลูกโคแรกคลอดจนถึงอายุ 6 เดือน

การตรวจ DNA Microsatellite

เจาะเลือดโคต้นแบบ (ตาม 999/1) แม่โคตัวรับ และลูกโคโคลนนิ่ง แยกใส่หลอดทดลองที่ผ่านกาบอบไอน้ำฆ่าเชื้อแล้ว นำเลือดของตัวอย่างที่ได้มาสกัด Genomic DNA เพื่อใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการตรวจสอบแล้วนำ genomic DNA ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มขยายปริมาณ ณ ตำแหน่งที่จำเพาะด้วย DNA microsatellite primer (MGTC4B และ TGLA126) โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) นำ PCR product ที่ได้ของแต่ละตัวอย่าง มาแยกหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนที่เพิ่มขยายปริมาณได้ด้วย 6% Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จากนั้นตรวจสอบความแตกต่างของชิ้น PCR product ของแต่ละตัวอย่างด้วย วิธี silver staining

ผลการทดลอง

การตั้งท้องและการคลอด

จากการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง 64 ตัวอ่อน ให้กับแม่โคตัวรับ 40 ตัว ตัวละ 1-2 ตัวอ่อน มีแม่โคตั้งท้อง 14 ตัว คิดเป็น 35% ของตัวรับทั้งหมด มีแม่โคตัวรับแท้งลูก 4 ตัว ก่อนคลอด ในวันที่ 186, 209, 234 และ 251 ของการตั้งท้อง คิดเป็น 28.5% ของโคที่ตั้งท้อง มีแม่โคตัวรับที่ตั้งท้องจนคลอด 10 ตัว ในจำนวนนั้นมีลูกโคโคลนนิ่งตายหลังคลอด 4 ตัว ในจำนวนนี้มีลูกแฝด 1 คู่ และมีลูกโคโคลนนิ่ง คลอดปกติ และมีชีวิตรอดจำนวน 7 ตัว คิดเป็น 50 % ของจำนวนแม่โคตั้งท้อง

ผลการตรวจ DNA Microsatellite

จากการตรวจหา DNA Microsatellite ด้วย primer MGTC4B และ TGLA126 พบว่า DND ของลูกโคโคลนนิ่งทั้ง 7 ตัว (Toomtam 2-8) ให้แถบเหมือนกับ DNA ของตัวตาม 999/1 (Toomtam 1) ซึ่งเป็นเจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ (Fig. 1) และแตกต่างจากแม่โคตัวรับ (BG13, BG24, BG47, CB23, CB20, BG30 และCB5)

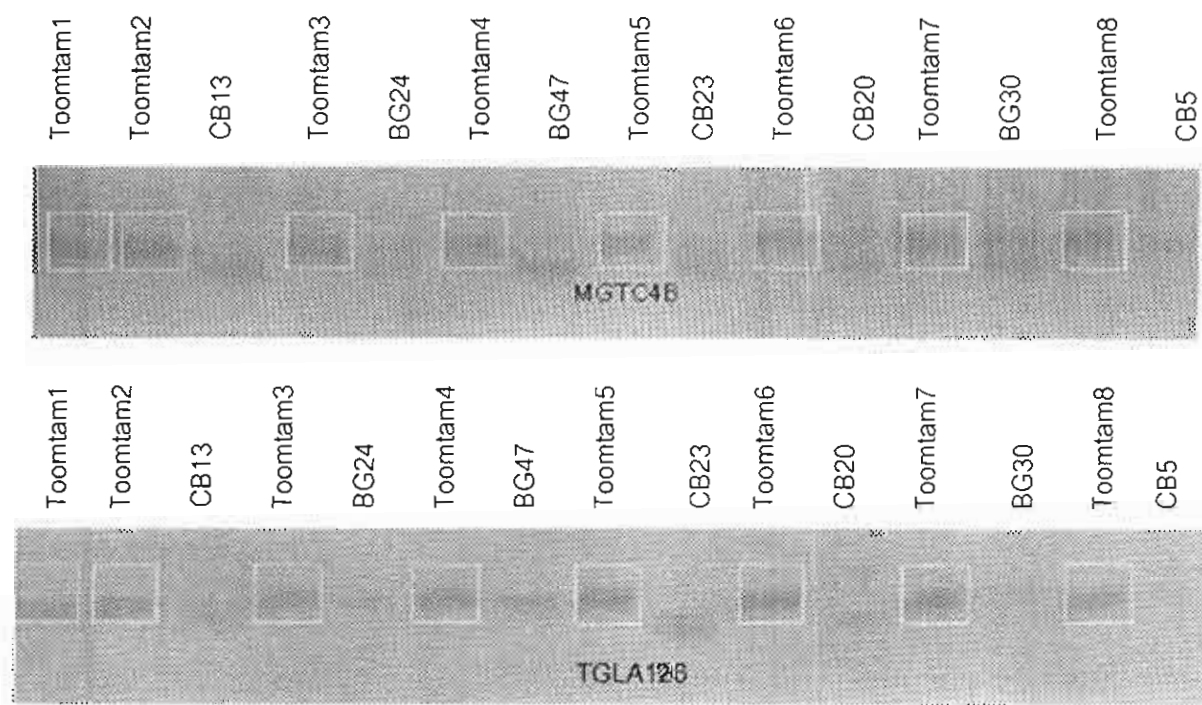


Fig1. DNA Microsatellite of donor cells, cloned calves and recipients

Table 1. Body weight of cloned calves at birth upto 6 month.

Number	Weigh (Kg)							Growth rate (Kg/d.)
	Birth	1 m.	2 m.	3 m.	4 m.	5 m.	6 m.	
Tumtam 2	32.5	61.0	104.5	136.5	170.0	198.5	227.0	1.08
Tumtam 3	45.0	78.5	109.5	147.0	176.5	210.0	229.0	1.02
Tumtam 4	44.5	61.0	91.0	140.0	140.0	181.5	201.0	0.86
Tumtam 5	46.0	59.5	81.5	115.0	115.0	129.0	146.0	0.55
Tumtam 6	40.0	67.5	96.5	157.0	157.0	184.5	202.0	0.90
Tumtam 7	42.5	78.5	107.5	159.0	159.0	183.0	206.0	0.90
Tumtam 8	38.0	89.5	118.0	186.0	186.0	210.0	240.0	1.12
Mean	41.2	70.7	101.2	148.6	157.6	185.2	207.2	0.92

จาก Table1. พบว่าน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ยของลูกโคโคลนนิ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยมาตรฐานของโคพันธุ์บราห์มันในประเทศไทย ที่รายงานโดยศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง (31.6 กิโลกรัม) ดังนั้นแม่โคตัวรับควรมีขนาดใหญ่ กระดูกเชิงกรานกว้างไม่มีประวัติการคลอดยาก และเมื่อครบกำหนดคลอดควรดูแลพิเศษ เตรียมคลอดและให้การช่วยเหลือขณะคลอด อัตราการเจริญเติบโตขณะกินนมเฉลี่ยของลูกโคโคลนนิ่ง (920 กรัม/วัน) สูงกว่าค่าเฉลี่ยมาตรฐานของโคพันธุ์รามันในประเทศไทย ที่รายงานโดยศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง (730 กรัม/วัน)

สรุป

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อสายพันธุ์ดี ได้ลูกโคโคลนนิ่งที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังนั้นเทคโนโลยีการโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อสายพันธุ์ดีเยี่ยมโดยให้เพศและพันธุ์กรรมที่ต้องการได้

คำนิยาม

การทดลองนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย ขุติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา นนีนไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ และ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเทคโนโลยีการโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาสัตว

3-6 กุมภาพันธ์ 2547, 94-98.

- Hill, J.H., R.C. Burghardt, K. Jones, C.R. Long, C.R. Looney, T. Shin, T.E. Spencer, J.A. Thomason, Q.A. Winger, and M.E. Westhusin. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63:1787-1794.
- Parnpai R, K.Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryo derived from quiescent and non quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Theriogenology* 53:239.
- Parnpai R, K.Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts and granulose cells. *Theriogenology* 57:443.