Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Theriogenology
Theriogenology 64 (2005) 1185–1196
www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the

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).

0093-691X/$ – see front matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.001

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 Phamaceuticals, Tokyo, Japan) and 1 μg/mL estradiol 17β. 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% CO_2 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-cm^2 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 (LN_2). 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 cytoplasms

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 μL droplets of IVM medium covered with mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO_2 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% hyarulonidase and washed five times in the Emcare holding medium. Oocytes with an extruding first polar body were placed in 5 μg/mL cytochalasin B for 15 min, and enucleated by a micromanipulator under an inverted microscope (200× 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 μm in diameter [14], was inserted into the perivitelline space of the cytoplast, using a slit in the zona pellucida dissected at enucleation. The donor cell-cytoplast couplets were fused in the Zimmermann medium by two direct currents (2.4 kV/cm for 15 μs in cattle, and 2.6 kV/cm for 17 μs in buffalo; the distance between electrodes was about 110 μm) 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 μg/mL cycloheximide + 1.25 μg/mL cytochalasin D in mSOFaa medium + 10% FBS in a humidified atmosphere of 5% CO_2 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% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 at 38.5 °C for 2 days (20 embryos per 100 μL 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% CO_2 in air at 38.5 °C for 5 days (10 embryos per 100 μL 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

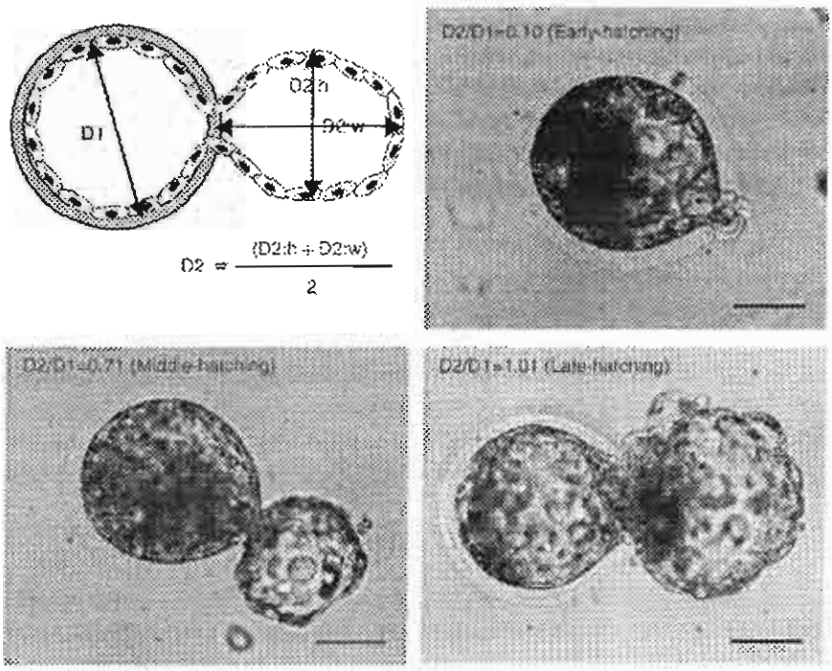


Fig. 1. Classification of hatching stage of bovine and swamp buffalo SCNT blastocysts. Hatching blastocysts were classified into one of three groups according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona (D2) to embryonic diameter inside the zona (D1); Early-hatching stage: D2/D1 = 0.01–0.70, 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. Vitrification and cryosurvival assay

2.3.1. Vitrification 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 vitrification 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 vitrification solution. One to three embryos were placed on a sheet of each Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) in a small volume of the vitrification solution (<1 μL). The Cryotop device was plunged into LN_2 after the embryos were exposed to the vitrification 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% CO_2 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 $PGF_{2\alpha}$ 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 probablility 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)[x]	20/30(67)[x,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 ($P < 0.05$).
[x] Within a row, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).
[y] Within a row, ratios with a different superscript were different ($P < 0.05$).

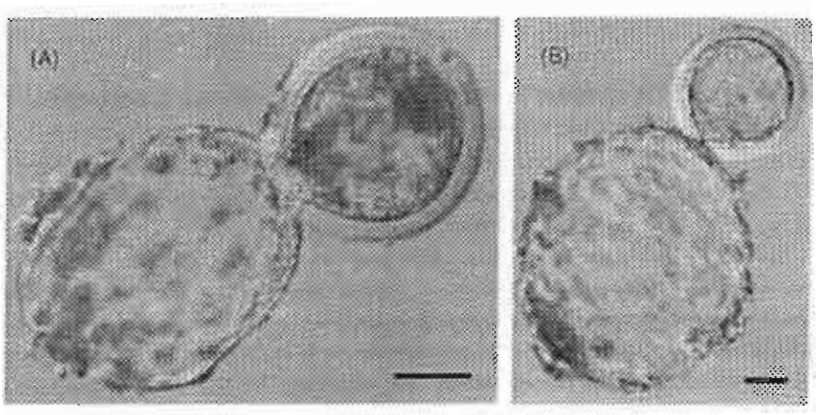


Fig. 2. Photographs of the SCNT blastocysts surviving 24 h after vitrification and warming: (A) bovine and (B) buffalo. During post-warm culture, buffalo embryos appeared to develop slightly faster than bovine embryos. Scale bar = 50 μm.

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 vitirification 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. Kamsomdee, 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] Hochi 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] Hochi 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] Parnpai R, Laowtammathron 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 Embryo Transfer Society
Portland, Oregon, 10–14 January 2004

Volume 16(1,2) 2004

www.publish.csiro.au

104 EFFECT OF HATCHING STATUS ON VITRIFICATION OF CLONED BOVINE BLASTOCYSTS

C. Laowtammathron[A], *T. Terao*[B], *C. Lorthongpanich*[A], *S. Muenthaisong*[A], *T. Vetchayan*[A], *S. Hochi*[B], *and R. Parnpai*[A]

[A]Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand; [B]Faculty 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]

[A]CryoLogic Pty Ltd, 54 Geddes St., Mulgrave, Victoria 3170; [B]Animal 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.

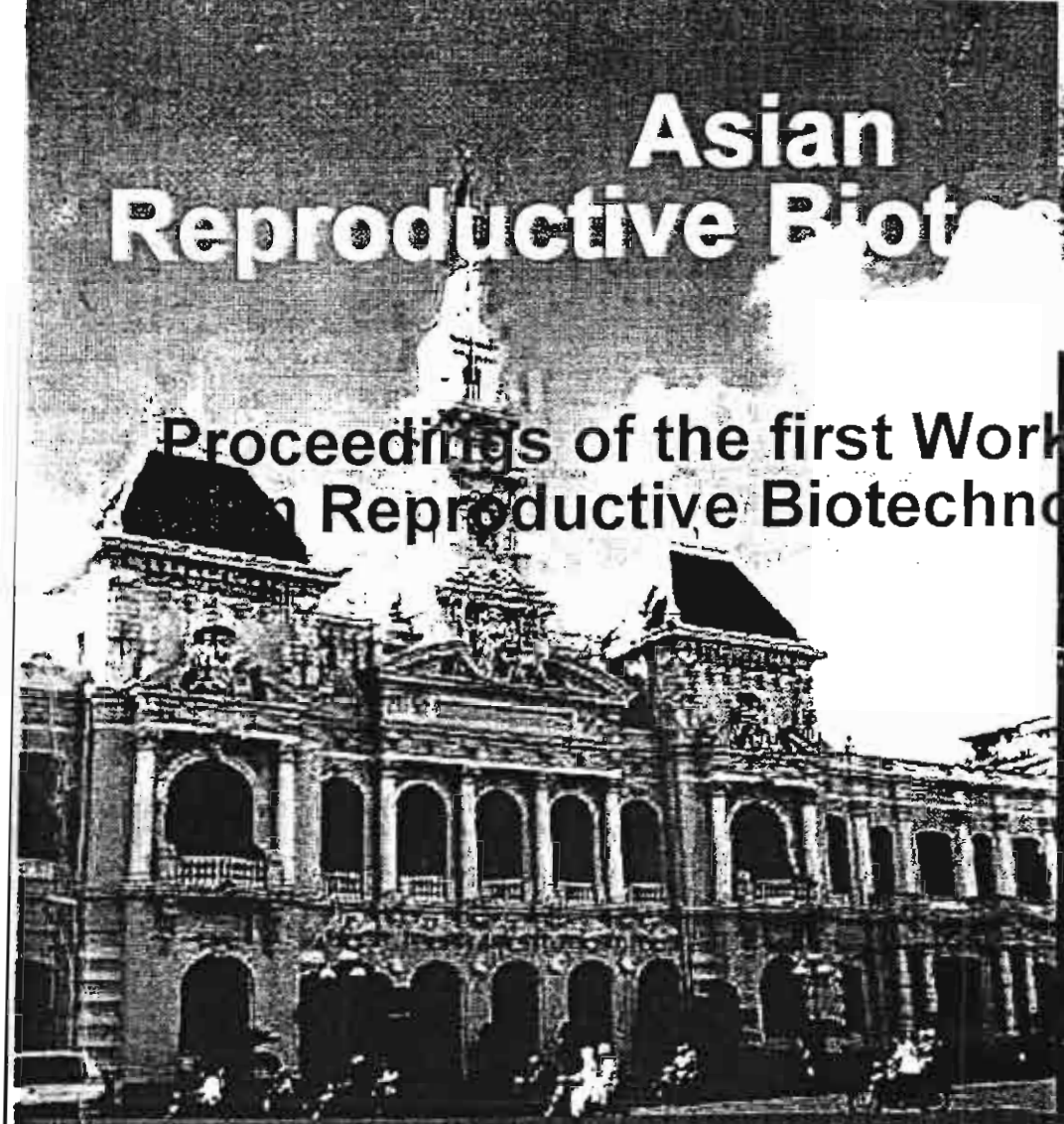
Table 1. Re-expansion and hatching rates of graded thawed bovine embryos vitrified by OPS or CLV methods

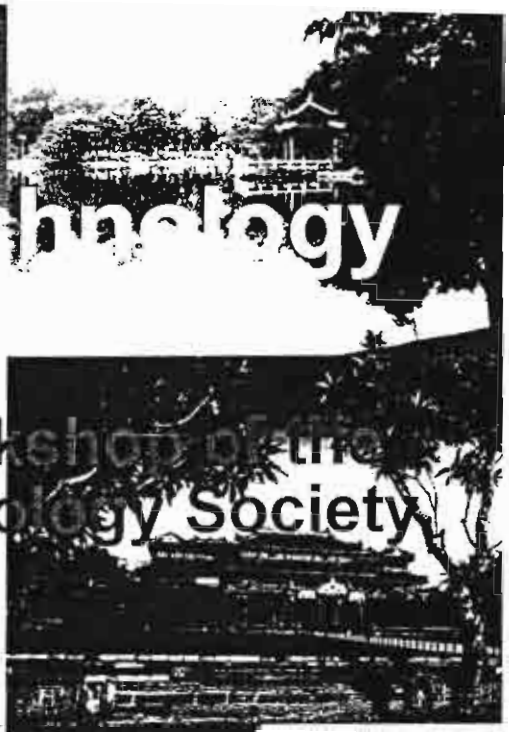
Embryo Grade	Method	# Frozen/thawed	# Re-expanded (%)	# Hatched (%)
Grade 1	OPS	92	81 (88)	75 (82)
	CLV	78	72 (92)	69 (88)
Grade 2/3	OPS	53	35 (66)	24 (45)
	CLV	35	31 (91)	26 (76)

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



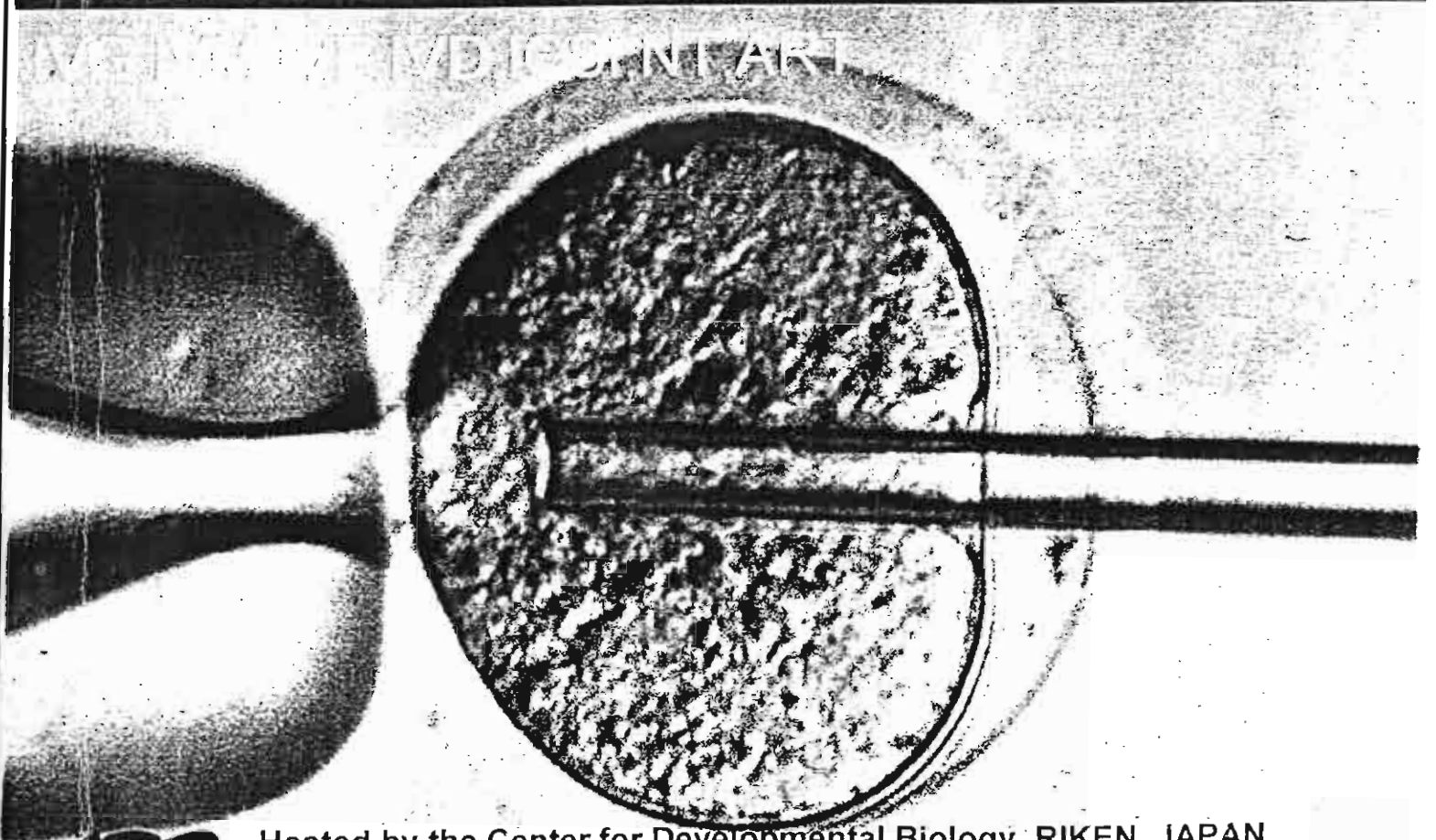


* Hanoi

* 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 LAOWTAMMATHRON[1], Tasuma TERAO[2], Chanchao LORTHONGPANICH[1], Suchitra MUENTHAISONG[1], Tawatchai VETCHAYAN[1], Shinichi HOCHI[2] and Rangsun PARNPAI[1]

[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 dimeter 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 accessed 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 12 th 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%CO_2 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 μg/ml E_2 under humidified atmosphere of 5%CO_2 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-cytoplast 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 μsec 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 μg/ml cycloheximide + 1.25 μg/ml cytochalasin D for 5 h under humidified atmosphere of 5%CO_2 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%CO_2, 5%O_2, 90%N_2 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%CO_2 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 $PGF_{2\alpha}$ 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). Efficience 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)

ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก Vitrification

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

ชุติ เหล่าธรรมธร[1] ทัสสุมา เทราโอ[2] จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์[1] สุจิตรา หมื่นไธสง[1],
ธวัชชัย เวชยันต์[1] ชินิชิ โฮชิ[2] และ รังสรรค์ พาลพ่าย[1]

Chuti Laowtammathron[1], Tasuma Terao[2], Chanchao Lorthongpanich[1], Sujitra Mueanthaisung[1],
Tavatchai Vetchayan[1], Shinichi Hochi[2], and Rangsun Parnpai[1]

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) หลังจากเลี้ยงในหลอด,แก้ว 24 ชั่วโมงพบว่าตัวอ่อนกลุ่ม C มีอัตรารอด 80% (24/30) ซึ่งมากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่ม A 77% (23/30) ,และกลุ่ม B 74% (20/27) ตามลำดับ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า hatching stage ไม่มีผลต่ออัตรารอดของตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งที่แช่แข็งโดยวิธี 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 dimeter 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

Key Words: cloning, vitrification, hatching stage

C. Laowtammathron: cnutv@yahoo.com

คำนำ

นับตั้งแต่มีการค้นพบ Cryoprotectant ชนิดแรก คือ Glycerol ซึ่งช่วยให้อสุจิไก่มีความอยู่รอดหลังจากแช่แข็ง หลังจากนั้นจึงมีการใช้ Glycerol กันอย่างแพร่หลายในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งปศุสัตว์ ต่อมาในปี 1972 Whittingham *et al.* สามารถแช่แข็งตัวอ่อนหนูถีบจักรระยะ 8 เซลล์และหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนมีลูกหนูเกิดมา ความสำเร็จนี้ทำโดยการลดอุณหภูมิลงช้าๆ (Slow – rate freezing) หลังจากนั้นก็มีการแช่แข็งตัวอ่อน กระต่าย วัวและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายชนิดโดยอาศัยหลักการของ Whittingham ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 Rall and Fahy ได้คิดค้นวิธี Vitrification ขึ้นเพื่อที่จะแช่แข็งตัวอ่อนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยปราศจากผลึกน้ำแข็งโดยใช้สารที่มีความเข้มข้นของ Cryoprotectant ที่สูง ต่อมาในปี ค.ศ. 1986 Massip *et al.*เป็นนักวิทยาศาสตร์ทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการทำ Vitrification ตัวอ่อนโค และเป็นทีมแรกที่ประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนที่ทำ Vitrification แล้ว แม่วัวตัวรับมีการตั้งท้อง หลังจากนั้นเทคนิคนี้ก็ได้รับการพัฒนาเรื่อยมา การแช่แข็งตัวอ่อนส่วนใหญ่จะเป็นตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วเท่านั้น ในปี 1999 Nguyen *et al.* ได้ทดลอง Vitrification ตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งระยะ blastocysts โดยใช้ หลอดเก็บน้ำเชื้อ แต่การทดลอง Vitrification ส่วนใหญ่ยังคงใช้ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และยังไม่มีรายงานการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งโดยเปรียบเทียบ hatching stage มาก่อน ตัวอ่อนที่ผลิตจากหลอดแก้วจะมีอัตรารอดสูงสุดที่ระยะ expand blastocyst แต่สำหรับตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีโคลนนิ่งตัวอ่อนจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ก่อนโดยที่ไม่เข้าระยะ expand blastocyst เนื่องจากขบวนการโคลนนิ่งจะทำให้ zona pellucida เกิดรูขึ้น ดังนั้นเมื่อตัวอ่อนเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้น ก็จะสามารถเคลื่อนตัวอ่อนจาก zona pellucida ได้ทันที ในการทดลองนี้ต้องการที่จะทดสอบผลกระทบของ hatching stage ต่ออัตราการรอดหลังจากแช่แข็งโดยวิธี Vitrification ของตัวอ่อนวัวโคลนนิ่งอายุ 7 วัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

วิธีการทำโคลนนิ่งจะทำตามที่มีรายงานมาแล้วของ รังสรรค์ และคณะ (2543) และ Parnpai *et al.* (2000) ซึ่งกล่าวโดยย่อได้ดังนี้ คือ การเก็บเซลล์ไฟโบรบลาสจากหนังหู โดยจะล้างทำความสะอาดบริเวณใบหูให้สะอาด จากนั้นเก็บชิ้นส่วนหนังหูโดยใช้เครื่องเจาะ จะได้หนังหูมีลักษณะเป็นวงกลมขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้มีดขูดขนออกจากบริเวณหนังหูด้านบนและด้านล่างออกให้หมด แล้วลอกหนังออกจากกระดูกอ่อนแล้วตัดหนังให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางเรียงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มิลลิเมตร แล้วกดทับด้วยแผ่นกระจกสไลด์ จากนั้นจึงเติมน้ำยา αMEM+10%FCS 5 ซีซี แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO_2 in air จะเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากจนเกือบเต็มภาชนะ จะทำการขยายการเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากๆ แล้วจึงนำไปแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนที่จะทำการโคลนนิ่งประมาณ 2-3 วันจะทำการละลายเซลล์ต้นแบบออกมาเลี้ยงใหม่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้เป็นเซลล์ต้นแบบต่อไป จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ใช้เข็มเบอร์ 21 ต่อกับกระบอกฉีดยา เจาะดูดไข่ออกจากถุงฟอลลิเคิลและเลือกเฉพาะไข่คุณภาพดีเลี้ยงในน้ำยาที่ประกอบด้วย TCM199 + 10%FCS, 50 IU/ml HCG (Chorulon , Intervet), 0.02 AU/ml FSH (Antrin , Denka Phamaceutical) และ 1 μg/ml E_2. และนำไปเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 20-21 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อยเซลล์คูมูลัสที่อยู่รอบๆ ไข่ออกให้หมดด้วย 0.2% Hyalulonidase คัดเฉพาะไข่ที่สุกแล้ว (มี First polar body) มาดูดนิวเคลียสของไข่ทิ้งไปโดยใช้ Micromanipulator ในน้ำยาที่มี 5 μg/ml Cytochalasin B ผสมอยู่ และยืนยันผลโดยการนำส่วนที่ดูดออกมาได้ไปย้อมในสี Hoechst 33342 และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง UV หลังจากนั้นจะล้างไข่ 5 ครั้งในน้ำยา TCM 199-Hepes + 10%FCS (199H-10%FCS) แล้วเก็บไข่ในน้ำยานี้จนกว่าจะฉีดเซลล์ต้นแบบ

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าสู่ไข่จะต้องแยกเซลล์ไฟโบรบลาสออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวก่อนโดยน้ำยา Trypsin/EDTA จากนั้นเลือกเซลล์ที่มีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 14-16 μm ฉีดเข้าที่บริเวณ perivitelline space ในน้ำยา 199H-10%FCS

หลังจากฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าสู่ไข่แล้วจะนำไข่มาทำการเชื่อมเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ย้ายไข่เข้าน้ำยา Zimmermann fusion medium ก่อนจ่ายกระแสไฟฟ้าจะต้องจัดให้ตำแหน่งของไข่และเซลล์ต้นแบบอยู่ระนาบเดียวกันกับ Fusion Electrode ทั้ง 2 ข้าง และตำแหน่งของเซลล์ต้นแบบจะต้องอยู่กึ่งกลางระหว่าง Fusion Electrode จากนั้นจึงจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ DC pulse 24 Volt นาน 15 μsec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา 199H-10%FCS 5 ครั้ง 1 ชั่วโมงต่อมาจึงตรวจการเชื่อมระหว่างไข่และเซลล์ต้นแบบ

การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว

นำไข่ที่เชื่อมเซลล์ต้นแบบสำเร็จแล้วมากระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวในน้ำยาที่มี 7% Ethanol นาน 5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+10%FCS (mSOF10) ที่มี 10 μg/ml Cycloheximide และ 1.25 μg/ml Cytochalasine 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 μl. ภายใต้ 5% CO_2 5% O_2 90% N_2 จากนั้นจะคัดเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa-LAA ร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่วัว (10 ตัวอ่อน/100μl.) ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 5 วัน โดยจะเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูดน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่ง และแทนที่ด้วย น้ำยาใหม่ ใช้เวลาเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมด 7 วัน ก่อนที่จะนำไปแช่แข็ง

การแช่แข็งตัวอ่อน

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

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 หลังจากจัดกลุ่มตัวอ่อนได้,แล้วก็จะนำตัวอ่อนมาล้าง 4 ครั้งในน้ำยา TCM199-Hepes+20%FCS (199H-20%FCS) จากนั้นจะนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา 199H+20%FCS ที่มี 10%Ethylene glycol(EG) + 10% Dimethysulphoxide (DMSO) นาน 2 นาที ,แล้วย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา Vitrification (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

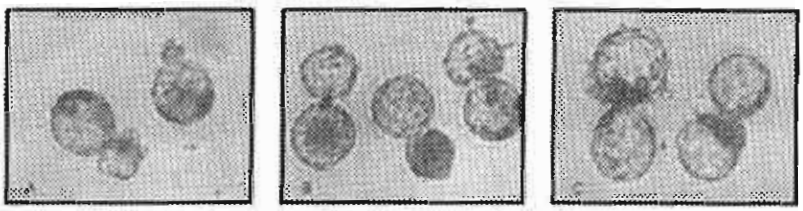


Figure1 ตัวอ่อนอายุ 7 วัน ในกลุ่ม A, B, และ C ก่อนการแช่แข็ง

การละลายตัวอ่อน

การละลายตัวอ่อนจะใช้วิธี Serial dilution โดยที่ส่วนปลายของ Cryotop ที่มีตัวอ่อนอยู่จะถูกย้ายจากไนโตรเจนเหลวมาแช่ไว้ใน 0.5M sucrose เพื่อให้ตัวอ่อนหลุดจาก Cryotop หลังจากนั้นตัวอ่อนจะอยู่ในน้ำยานี้ 5 นาทีจากนั้นจะย้ายไปไว้ที่น้ำยา 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0M sucrose นานน้ำยาละ 5 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้งในน้ำยา mSOFaa-LAA cและนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa-LAA ที่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โดนาน 24 ชั่วโมง การบันทึกผลการทดลองจะทำหลังจากละลายตัวอ่อนเสร็จสิ้นทันที,และ 24ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ความแตกต่างของผลการทดลองจะวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA

ผลการทดลองและวิจารณ์

จาก Table 1 หลังจากที่แช่แข็งและละลาย (Figure 2) พบว่า ตัวอ่อนในกลุ่ม B ,และ C มีรูปร่างปกติทั้งหมด (27/27 และ 30/30 ตามลำดับ) ตัวอ่อนในกลุ่ม A มีรูปร่างปกติ 93% (28/30) กลังจากเลี้ยงตัวอ่อนในหลอด,แก้ว 24 ชั่วโมงพบว่าตัวอ่อนในกลุ่ม C มีอัตรารอดสูง 80% (24/30) รองลงมาคือตัวอ่อนในกลุ่ม B มีอัตรารอด 74% (20/27) และ A มีอัตรารอดต่ำสุด (77%, 23/30) ความอยู่รอดของตัวอ่อนทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการทดลองพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะช้าลง 12 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับตัวอ่อนสด ,เนื่องจากตัวอ่อนหลังจากการแช่แข็งและละลายจะได้รับบาดเจ็บจากขบวนการดังกล่าว ดังนั้นจึงต้องมีการซ่อม,แซมตัวเองก่อนที่จะเจริญเติบโตต่อไป

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 ตัวอ่อนก่อนและหลังการเซ่แข็งที่ชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 24 หลังการละลาย; A: ตัวอ่อนก่อนเซ่แข็ง B:ตัวอ่อนหลังจากละลายที่ชั่วโมงที่ 0, C: ตัวอ่อนหลังจากละลายที่ชั่วโมงที่ 48

สรุป

จากผลการทดลองเซ่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งอายุ 7 วันที่ระยะ hatching blastocyst ที่มีขนาดต่างกัน พบว่าขนาดของ hatching blastocyst ไม่มีผลต่ออัตราการอดของตัวอ่อนหลังจากแช่แข็งและละลาย

คำนิยม

การทดลองนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้น.เบบ. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์. 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

Massip, A., P. Van Der Zwalmen, B. Scheffen, and F. Ectors. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo-letters 7:270-273. Quoted I. *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)

การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

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

รังสรรค์ พาลพ่าย[1] ชุติ เหล่าธรรมธร[1] จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์[1] สุจิตรา หมื่นไธสง[1] ธวัชชัย เวชยันต์[1]
เสวียน ส้มหวาน[1] เพลิน เมินกระโทก[2] สมพงษ์ ปาติตัง[2] สุริยา กิจสำเร็จ[3] และ สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์[3]

Rangsun Parnpai[1], Chuti Laowtammathron[1], Chanchao Lorthongpanich[1], Suchitra Muenthaisong[1]
Tawatchai Vetchayun[1], Savian Somvan[1], Plern Mernkratoke[2], Sompong Patitang[2]
Suriya Kitsumrej[3], and Sombat Siriudomset[3]

บทคัดย่อ

เก็บเซลล์ใบหูจากโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ที่มีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยมและจากโคนมลูกผสมขาวดำเพศเมียที่มีประวัติการให้น้ำนม 8,000 กก./ปี มาเลี้ยงเก็บไว้เป็นเซลล์ต้น,แบบทำโคลนนิ่ง นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตจากเซลล์ต้น,แบบโคนม จำนวน 8 ตัวอ่อน ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ 4 ตัว (2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60, 180, 200 และ 220 วัน 50% (2/4) ,และย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อ จำนวน 56 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 36 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 ,และ 180 วัน 36.1% (13/36) และได้อัตราการตั้งท้องในวันที่ 200 ,และ 220 วัน 33.3% (12/36) ,และ 30.5% (11/36) โดยมีโคตัวรับในกลุ่มนี้ 2 ตัว ,ท้งในวันที่ 186 ,และ 209 ของการตั้งท้อง โคตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวได้คลอดลูกตามธรรมชาติ 1 ตัวมีสุขภาพ ,แข็ง,แรงดี 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 recipients (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] เอสเคพัทยา 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 โคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีมีไม่พอเพียงที่จะผลิตน้ำนม.และเนื้อเพื่อการบริโภคภายในประเทศ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศปีละเกือบหมื่นล้านบาท การผลิตโคนมเกษตรกรต้องการเฉพาะเพศเมีย ส่วนโคเนื้อเกษตรกรต้องการทั้งสองเพศ สัดส่วนของลูกเพศเมียและเพศผู้เป็น 1:1 การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถกำหนดเพศ.และพันธุกรรมโคได้ ในบ้านเรามีรายงานความสำเร็จการโคลนนิ่งโคมาแล้ว (รังสรรค์ .และคณะ, 2543; Pampai *et al.*, 2000; 2002) การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นใบหูขนาด 5 x 5 มม. จากโคเนื้อพันธุ์บราห์มัน (Brahman) เพศผู้ชื่อตูมตาม ซึ่งมีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยม.และจากโคนมลูกผสมขาวดำ (HF) เพศเมียหมายเลข 346 ซึ่งมีประวัติการให้น้ำนม 8,000 กก./ปี มาทำความสะอาดแล้วเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS ที่อุณหภูมิ 37 C, 5% CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4 –5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ .แล้วแช่.เข็งเซลล์เก็บไว้ใช้งานที่ passage 3 ก่อนใช้งานจะนำเซลล์ที่แช่.เข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS เป็นเวลานาน 2-3 วัน .แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย Trypsin/EDTA เพื่อให้เซลล์.แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

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 Phamaceutical) .และ 1 μg/ml E_2 เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5 C, 5% CO_2 in air นาน 21 ชั่วโมง

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

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline 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% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 1% FCS ในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5 C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa + 5% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5 C, 5% CO_2 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 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่งถึงระยะบลาสโตซีส (31.80%) ใกล้เคียงกับที่มีรายงานมาแล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2543; Parnpai *et al.*, 2002) แสดงว่าเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตเองมีประสิทธิภาพสูงในการเชื่อมเซลล์และการได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสซึ่งเป็นระยะพร้อมย้ายฝากให้โคตัวรับ

จาก Table 2 ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคนม จำนวน 8 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 4 ตัว (2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 , 180, 200 และ 220 วัน 50% (2/4) ส่วนการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อ 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 ตูมตาม2 และจากการตรวจวิเคราะห์ DNA microsatellite (Marker TGLA126) ของโคตัวรับ ตูมตามซึ่งเป็นเจ้าของเซลล์ต้นแบบ และ ตูมตาม2 พบว่า ตูมตามและตูมตาม 2 มี DNA เหมือนกันทุกประการและแตกต่างจาก DNA ของตัวรับ (Figure 1) นอกจากนี้โคตัวรับอีก 1 ตัวได้รับการผ่าตัดทำคลอดในวันที่ 26 ตุลาคม 2546

ได้ลูกโคเกิดมา 1 ตัวมีน้ำหนักแรกเกิด 45 กิโลกรัม,และมีรูปร่างปกติทุกประการ,และเสียชีวิตหลังคลอด 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%)

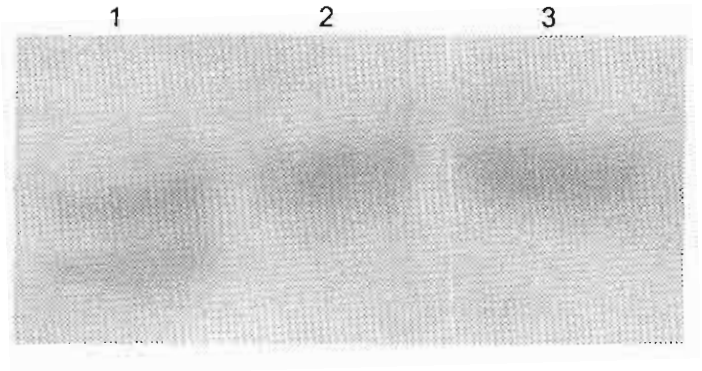


Figure 1 DNA microsatellite analysis comparison of recipient (1), Donor cells (2) and cloned calf (3)

สรุป

จากผลการทดลองนี้,แสดงให้เห็นว่าสามารถประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้น,แบบโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม ได้โคตัวรับตั้งท้องจนถึง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่มีรายงานมา,และมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill *et al.*, 2000) ดังนั้นเทคโนโลยีโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยมโดยกำหนดเพศและพันธุกรรมได้ตามต้องการ

คำนิยม

การทดลองนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิงโดยใช้เซลล์ไบหุเป็นเซลล์ต้น,แบบ การประชุมวิชาการ[illegible]
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์ 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.

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.

Parnpai, 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.

เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ 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"

การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน

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

ธวัชชัย เวชยันต์[1] ชุติ เหล่าธรรมธร[1] จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์[1] สุจิตรา หมื่นไธสง[1] ปิยมาศ การสมดี[1]
มารินา เกตุทัต คาร์นส์[1] เพลิน เมินกระโทก[2] สมพงษ์ ปาติตัง[2] สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์[3] สุริยา กิจสำเร็จ[3]
และรังสรรค์ พาลพ่าย[1]

Tawatchai Vetchayun[1] Chuti Laowtammathron[1] Chanchao Lorthongpanich[1] Suchitra Muenthaisong[1]
Piyamas Karnsomdee[1] Mariena Ketudat Cairns[1] Plem Meuankatoke[2] Sompong Patitung[2]
Sombat Siriudomsate[3] Suriya Kitsumret[3] and Rangsun Pampai[1]

บทคัดย่อ

เก็บชิ้นใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยม มาเลี้ยงแช่แข็งเก็บไว้เป็นเซลล์ต้นแบบทำโคลนนิ่งโดย ฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในช่อง Perivitelline space ของไซโตพลาสซึมผู้รับ จากนั้นทำการเชื่อมเซลล์แล้วนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วเป็นเวลา 7 วัน นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ 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 มีแถบDNAเหมือนกับโคต้นแบบทุกประการ และ แตกต่างจากแถบ DNAของแม่โคตัวรับ 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

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
School of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakon Ratchasima 30000
[2]ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี,Suranaree University of Technology Farm
[3]เอสเคพัทยา แรนช์ อ. บางละมุง จ. ชลบุรี, SK Pattaya Ranch, Banglamoong, Chonburi

คำนำ

โคพันธุ์บราห์มันเป็นโคเนื้อพันธุ์พื้นฐานที่ใช้ปรับปรุงโคเนื้อพันธุ์พื้นเมืองของไทยให้เป็นโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง- บราห์มัน ซึ่งสามารถนำไปสร้างโคเนื้อและโคนมลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเมืองไทยได้ การผลิตโคบราห์มันพันธุ์แท้เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์ภายในประเทศจึงมีความจำเป็นมาก การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถจำลองพันธุกรรมและลักษณะทางกายภาพของโคลักษณะดีเยี่ยมที่ใช้เป็นต้นแบบขึ้นมาใหม่ได้ซึ่งบ้านเรามีรายงานความสำเร็จจากการโคลนนิ่งมาแล้ว (รังสรรค์และคณะ, 2543 ; Pampai *et al.*, 2000; 2002)การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคบราห์มัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นส่วนของใบหู ขนาด 5 x 5 มม. จากโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ซื่อตูมตาม (999/1) ซึ่งมีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยม มาทำความสะอาดแล้วเลี้ยงในน้ำยา Alpha Minimum Essential Medium (αMEM, Sigma, M-7145) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37° C, 5% CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 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 Phamaceutical) และ 1 μg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-8875) และนำไปเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ / 100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C, 5 %CO_2 in air นาน 21 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อยเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบ ๆ ไข่ออกให้หมดด้วย 0.2 % Hyaluonidase คัดเฉพาะไข่ที่สุกแล้ว (มี First polar body) มาดูดนิวเคลียสทิ้งไปโดยใช้ Micromanipulator ในน้ำยาที่มี 5 μg/ml Cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ผสมอยู่และยืนยันผลโดยการนำส่วนที่ดูดออกมาได้ไปย้อมสี Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง อุลตราไวโอเลต หลังจากนั้นจะล้างไข่ 5 ครั้ง ในน้ำยา TMC 199-Hepes + 10% FBS (199H-10% FBS)

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดสารพันธุกรรมสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ Perivitteline 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 µsec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emcaer (ICP bio.) 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมงจึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ จากนั้นคัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 µg/ml Cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ10 µg/ml Cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Parnpai et al. 2000)

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 1%FBS ในหลอดแก้ว นาน 2 วัน โดยจะเลี้ยง 20 ตัวอ่อนในน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 in air จากนั้นจะคัดเฉพาะตัวตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 5%FBS ร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค (10 ตัวอ่อน/ 100µl) ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูดน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่ง และแทนที่ด้วยน้ำยาใหม่ใช้เวลาเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมด 7 วัน จะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสแล้วนำไปย้ายฝาก

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่แม่โคตัวรับ

คัดเลือกโคลูกผสมจากฟาร์ม SK Pattaya Ranch จำนวน 40 ตัว โดยคัดเอาแม่โคและโคสาวที่มีระบบสืบพันธุ์ดี อายุ 2-5 ปี รังไข่สมบูรณ์ มีวงรอบการเป็นสัดสม่ำเสมอ แสดงอาการเป็นสัดชัดเจนมาเป็นแม่โคตัวรับ โดยจะใช้ทั้งโคที่เป็นสัดธรรมชาติ หรือฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่โคตัวรับเป็นสัด หลังจากแม่โคตัวรับเป็นสัดได้ 7 วัน จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส เข้าไปในปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ ของแม่โคตัวรับ โดยฝากได้ 1-2 ตัวอ่อน /แม่โคตัวรับ 1 ตัว หลังจากนั้นอีก 60 วัน ล้วงตรวจการตั้งท้องของแม่โค เมื่อใกล้ครบกำหนดคลอด จะทำการเตรียมคลอด และให้การช่วยเหลือขณะคลอดชั่งน้ำหนักลูกโคแรกคลอดจนถึงอายุ 6 เดือน

การตรวจ DNA Microsatellite

เจาะเลือดโคต้นแบบ (ตูมตาม 999/1) แม่โคตัวรับ และลูกโคโคลนนิ่ง แยกใส่หลอดทดลองที่ผ่านการอบไอน้ำฆ่าเชื้อแล้ว 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 % ของจำนวนแม่โคอุ้มท้อง

ผลการตรวจ DNA Microsattlelite

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

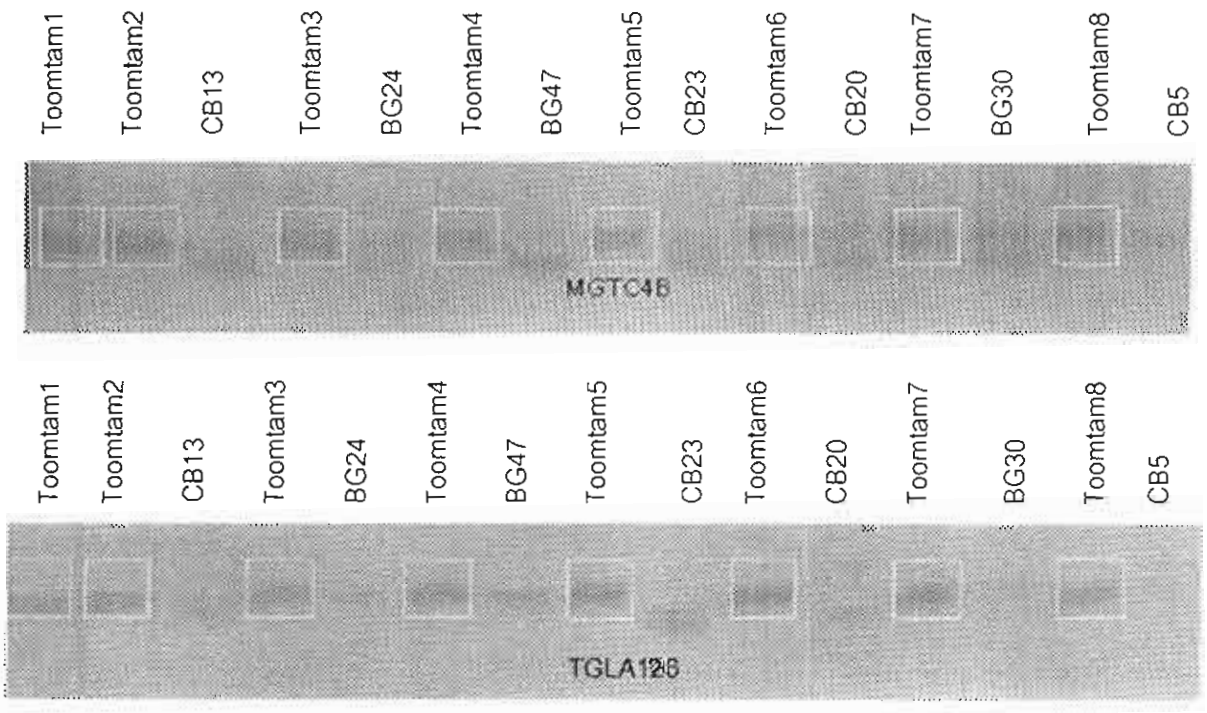


Fig1. DNA Microsttlelite of donor cells, cloned calves and recipients

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

Number	Weigh (Kg)							Growth rate
	Birth	1 m.	2 m.	3 m.	4 m.	5 m.	6 m.	(Kg/d.)
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 ดังนั้นเทคโนโลยีการโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อสายพันธุ์ดีเยี่ยมโดยให้เพศและพันธุกรรมที่ต้องการได้

คำนิยม

การทดลองนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

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

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ และ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเทคโนโลยีการโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาสัตว์

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 case of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63:1787-1794.

Parnpai R, K.Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Developmantal 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.