รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-56-36-18

รายงานการวิจัย

การเจริญจนครบกำหนดคลอดของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์หลังจากบ่มในสารเคมีที่ยับยั้งการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก

(The full term development of interspecies cloned gaur embryos after treated with histone deactylase inhibitors)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-56-36-18

รายงานการวิจัย

การเจริญจนครบกำหนดคลอดของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์หลังจากบ่มในสารเคมีที่ยับยั้งการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก

(The full term development of interspecies cloned gaur embryos after treated with histone deactylase inhibitors)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

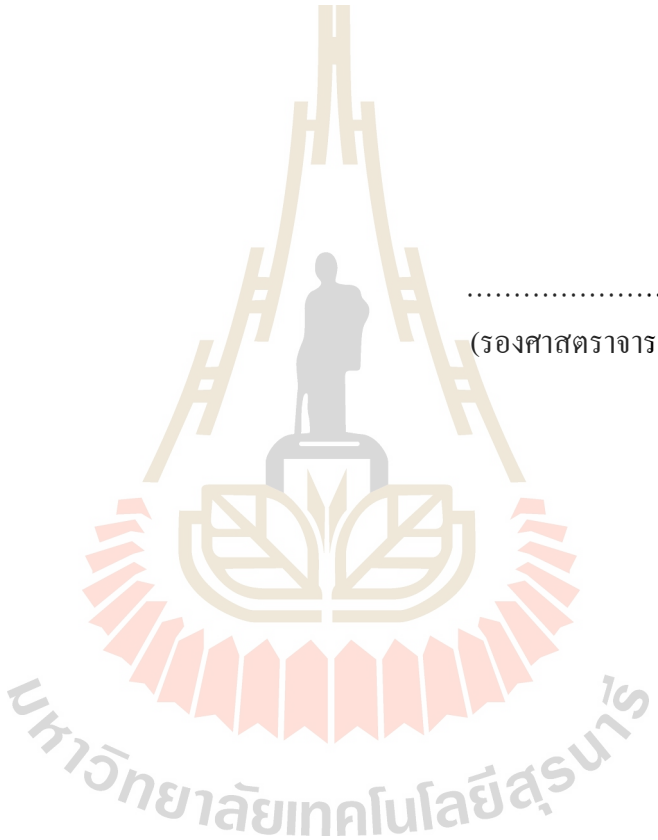
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2558 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของงคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี รวมทั้งโรงฆ่าสัตว์พระพุทธบาท จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง



……..

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

สิงหาคม 2559

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการโคลนนิ่งสามารถผลิตสัตว์เกิดมาได้หลายชนิด แต่ยังได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี และอัตราลูกสัตว์เกิดมาในอัตราต่ำ ซึ่งมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ปัจจัยหลักของเทคโนโลยีการโคลนนิ่งคือการ reprogram ที่ผิดปกติในตัวอ่อนโคลนนิ่ง สำหรับการโคลนนิ่งกระทิงจำเป็นต้องทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เนื่องจากขาดแหล่งของไซโตพลาสซึมตัวรับและสัตว์ตัวรับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลสำเร็จการโคลนนิ่งข้สมสปีชีส์ในกระทิงยังต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสนใจในการปรับปรุงการ reprogram ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ด้วยการทดสอบการใช้สารเคมี 4 ตัว ได้แก่ sodium butyric acid (NaBu) suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA) Scriptaid และ 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC) เพื่อช่วยปรับปรุงการ reprogram ให้ดีขึ้น จากผลการทดลองพบว่า NaBu ที่ความเข้มข้น 0.5 mM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง SAHA ที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง Scriptaid ที่ความเข้มข้น 0.5 μM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 5-aza-dC ที่ความเข้มข้น 0.1 μM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถช่วยเพิ่มการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ ผลการศึกษาการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีนที่ตำแหน่ง H4K5 พบว่ากลุ่มที่เติมด้วย NaBu, SAHA และ Scriptaid สามารถเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติม แต่กลุ่มที่เติม 5-aza-dC ไม่เพิ่มขึ้น การศึกษาการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1 และ Hdac1* ในตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ระยะ 8 เซลล์ และบลาสโตซีสต์ พบว่าการเติมสารเคมีทั้ง 4 ตัวสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5 และ Hat1* ในตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์และ 8 เซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่เพิ่มในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ นอกจากนี้สารเคมีทั้ง 4 ตัวสามารถลดการแสดงออกของยีน *Hdac1* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาอัตราการตั้งท้องของตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการเติมสารทั้ง 4 ตัวพบว่า มีตัวรับตั้งท้องในทุกกลุ่มทดลอง แต่มีการแท้งทั้งหมดจึงไม่มีลูกกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เกิดมา จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC สามารถเพิ่มอัตราการเจริญชองตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ถึงระยะบลาสโตซีสต์ ส่วนการเพิ่มการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีนที่ตำแหน่ง H4K5 นั้น NaBu, SAHA และ Scriptaid สามารถทำให้เพิ่มขึ้น ยกเว้น 5-aza-dC ที่ไม่ช่วยทำให้เพิ่ม

Abstract

In present, offspring of several species had been produced from cloning technology. However, the quality of cloned embryos and birth rate still low which have many factors involved. The main factor is the abnormal reprogramming of cloned embryos. In case of gaur cloning, it needs to do interspecies cloning due to lack of recipient cytoplasm and recipients. Especially, the success rate of interspecies cloning in gaur is very low when compared with another species. Thus, in this study we interested to improve reprogramming of gaur interspecies cloned embryos by using 4 chemicals treatment including sodium butyric acid (NaBu), suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA), Scriptaid and 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC). The results showed that treated with 0.5 mM NaBu for 12 h after fusing, 1 µM SAHA for 12 h after fusing, 0.5 µM Scriptaid for 12 h after fusing and 0.1 µM 5-aza-dC for 12 h after fusing significantly improved development of interspecies cloned gaur embryos to blastocyst stage when compared with another group. Treatment of NaBu, SAHA and Scriptaid significantly increased histone acetylation protein at H4K5 when compared with untreated group, but in 5-aza-dC group did not increase. Treatment of all 4 chemicals significantly increased the expression of *Oct4, Cdx2, Gcn5* และ *Hat1* genes in 1 cell and 8 cell stage embryos but did not affect in blastocysts and significantly decreased the expression of *Hdac1* gene. The results of embryo transfer showed that recipients in all groups were pregnant, however, all pregnant recipients aborted. In conclusion, NaBu, SAHA, Scriptaid and 5-aza-dC could increase development of interspecies cloned gaur embryos to blastocyst stage. NaBu, SAHA and Scriptaid could increase histone acetylation at H4K5. We could not get interspecies cloned gaur calf born from this experiment.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญภาพ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 2

1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม 4

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล 7

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล 7

3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ 7

3.2.1 วิธีการเตรียมเซลล์ต้นแบบ 7

3.2.2 วิธีการเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ 8

3.2.3 การกำจัดนิวเคลียสออกจากไข่ 8

3.2.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์ 8

3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง 9

3.2.6 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Trophectroderm และ inner cell mass 9

3.2.7 NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC treatment 9

3.2.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC 9

3.2.7.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC 9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.8 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโคตัวรับ การย้ายฝากตัวอ่อน และการตรวจการตั้งท้อง 9

3.3 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่อระดับของ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ 10

3.3.1 การวิเคราะห์ histone acethylation 10

3.3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน 11

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 13

4.1 ผลการทดลอง 13

4.1.1 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ NaBu ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ 13

4.1.2 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ SAHA ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ 14

4.1.3 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ Scriptaid ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ 15

4.1.4 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ 5-aza-dC ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ 17

4.2 ผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของระดับของการเติมหมู่อะซิติลของฮีสโตน (histone acetylation) ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ 18

4.3 ผลการศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ 19

4.4 ผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการตั้งท้องและคลอด 20

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.1 สรุปผลการวิจัย 22

5.2 ข้อเสนอแนะ 22

บรรณานุกรม 23

ประวัติผู้วิจัย 28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ไพเมอร์ของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Real time PCR 12

ตารางที่ 2 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งที่ผ่านการ treat ด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ ……. 21

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบด้วย NaBu ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ 14
ภาพที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบด้วย SAHA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ 15
ภาพที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบด้วย Scriptaid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ 16
ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบด้วย 5-aza-dC ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ 18
ภาพที่ 4.5 การแสดงระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนตำแหน่ง H4K5 ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ถูกทดสอบด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC จากความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม 19
ภาพที่ 4.6 แสดงผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของยีน Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1, Hdca1 ในตัวอ่อนระยะ1 เซลล์ ระยะ 8 เซลล์ และบลาสโตซีสต์ 20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กระทิง (*Bos gaurus*) จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทที่ 2 ของประเทศไทย พบได้ที่เขาแผงม้า ในอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ และอุทยานแห่งชาติเขาอ่างฤาไน ทั้งนี้สหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (IUCN) จัดให้กระทิงอยู่ในระดับ CR (Critically Endangered) หมายถึงมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในพื้นที่ธรรมชาติขณะนี้ ปัจจุบันประชากรกระทิงในประเทศไทยลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการลักลอบล่าเพื่อเอาเนื้อและเขา เทคโนโลยีช่วยในการเจริญพันธุ์เช่น การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน การปฏิสนธิในหลอดแก้ว ไม่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์อย่างกระทิงได้ เนื่องจากขาดแคลนไข่และตัวรับ การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการทำโคลนนิ่งสัตว์ใกล้สูญพันธุ์โดยใช้ไข่และตัวรับจากสัตว์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ในปัจจุบันมีความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์รวมถึงลูกเกิดของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์หลายชนิดโดยใช้วิธีโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการผลิตลูกสัตว์ยังต่ำอยู่มาก ความสำเร็จขึ้นอยู่กับการเกิด reprogramming ที่สมบูรณ์ของเซลล์ต้นแบบที่ใช้ในการโคลนนิ่ง ช่วยให้ตัวอ่อนมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการเจริญของตัวอ่อนและลูกอ่อนที่เหมาะสม จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าเกือบ 50% ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งมีระดับของ DNA methylation และ histone acetylation ที่แตกต่างจากตัวอ่อนโคที่ได้จากวิธีปฏิสนธิในร่างกายหรือหลอดแก้ว ในทางทฤษฎีการทำให้กระบวนการ reprogramming ของเซลล์ต้นแบบให้เกิดอย่างสมบูรณ์อาจจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ จากการวิจัยที่มีมาก่อนพบว่า sodium butyrate (NaBu), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) และ 6-(1,3-dioxo-1H, 3H-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-hexanoic acid hydroxyamide (Scriptaid) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำหน้าที่ยับยั้งการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก (histone deacetylase inhibitor, HDACi) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำโคลนนิ่งในสัตว์หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีสารเคมีอีกตัวหนึ่งคือ 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ยับยั้งการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methyltransferase inhibitor, DNMTi) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งได้เช่นกัน ปัจจุบันมีคณะวิจัยเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นที่ประสบความสำเร็จในการผลิตลูกกระทิงโคลนนิ่งคือ คณะวิจัยของบริษัท Advanced Cell Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถผลิตลูกกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ 1 ตัว แต่เสียชีวิต 2 วันหลังคลอด (Lanza et al.,

2000) และคณะวิจัยของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เกิดมา 1 ตัว แต่เสียชีวิต 12 ชั่วโมงหลังคลอด (Srirattana et al., 2012) เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ การทดลองนี้จะทำการศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่อการเจริญเติบโตจนครบกำหนดคลอดของตัวอ่อนกระทิงที่ได้จากการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

1.2.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC

1.2.3 ศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่อระดับ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

1.2.4 ศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่ออัตราการตั้งท้องและลูกเกิดหลังย้ายฝากตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ให้กับโคตัวรับ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำไข่โคมากำจัดสารพันธุกรรมออก แล้วฉีดเซลล์กระทิงเพศผู้เข้าไปในไข่โค จากนั้นหลอมรวมเซลล์กระทิงกับไข่โคด้วยกระแสไฟฟ้า เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่มี NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆที่กำหนด หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนจนครบ 7 วัน บันทึกอัตราการเจริญของตัวอ่อน คุณภาพของตัวอ่อน ย้อมนับเซลล์ วิเคราะห์หาระดับของ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการเจริญของตัวอ่อน นอกจากนี้ ทำการผลิตตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้าสปีชีย์โดยใช้ชนิดของสารเคมี ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ 2 ใบ ย้ายฝากเข้าสู่โคตัวรับ บันทึกอัตราการตั้งท้อง การเจริญของลูกอ่อนจนครบกำหนดคลอด และอัตราลูกเกิด

1.4 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การใช้สารเคมีในกลุ่มของ HDACi และ DNMTi จะช่วยทำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่างๆที่สำคัญต่อการเจริญของตัวอ่อนเป็นปกติ ซึ่งช่วยส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์สูงขึ้น ช่วยลดความผิดปกติของตัวอ่อน ช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์หลังจากย้ายฝากให้โคตัวรับ และได้ลูกเกิดที่ไม่มีความผิดปกติ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิดของสารเคมี ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ อีกทั้งยังทราบข้อมูลของระดับ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์หลังจากการบ่มด้วยสารเคมี ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการโคลนนิ่งกระทิงในครั้งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประชากรกระทิง หรือการเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ชนิดอื่นๆ อีกทั้งนำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับชาติและนานาชาติ หรือมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ ผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทหรือเอก อย่างน้อย 1 คน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

ในปี 2000 Lanza และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ โดยใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งสามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์คิดเป็น 12% และได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อน 44 ใบ ให้แก่โคตัวรับ 32 ตัว พบว่ามีโคตัวรับ 8 ตัว ตั้งท้องซึ่งคิดเป็น 25% มีโคตัวรับเพียงตัวเดียวเท่านั้นที่สามารถอุ้มท้องจนครบกำหนดคลอดได้ ลูกกระทิงโคลนนิ่งมีน้ำหนักแรกเกิด 36 กิโลกรัมมีสุขภาพดีแรกคลอดแต่เสียชีวิตอีก 2 วันต่อมา Mastromonaco และคณะ (2007) พบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์มีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์ที่ต่ำ (18.1%) เกี่ยวข้องกับการที่ตัวอ่อนเจริญเติบโตช้า จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนน้อย มีจำนวนเซลล์ตายและมีการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ จากผลการทดลองของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่า อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์และคุณภาพของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ไม่แตกต่างกันกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง อีกทั้งไม่พบความแตกต่างเมื่อใช้เซลล์กระทิงเพศผู้และเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่ง (Sang-ngam et al., 2005) นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์สู่ระยะบลาสโตซีสต์ (33-38%) สูงกว่ารายงานของ Lanza et al. (2000) และ Mastromonaco et al. (2007) และเมื่อนำตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ พบว่าตัวรับสามารถอุ้มท้องจนครบกำหนดคลอดได้ และได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เพศผู้เกิดมา 1 ตัว (Srirattana et al., 2012) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า Trichostatin A (TSA) ซึ่งเป็น HDACi สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งในสัตว์หลายชนิดเช่น หนูถีบจักร (Kishigami et al., 2006, 2007; Rybouchkin et al., 2006; Tsuji et al., 2009; Costa-Borges et al., 2010; Dai et al., 2010; Hai et al., 2011; Kang and Roh, 2011), โค (Lee et al., 2011; Akagi et al., 2011), สุกร (Zhang et al., 2007; Li et al., 2008; Beebe et al., 2009; Matinez-Diaz et al., 2010; Himaki et al., 2010; Kim et al., 2011) และกระต่าย (Shi et al., 2008a) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ TSA ในการโคลนนิ่งกระต่าย (Meng et al., 2009) และสุกร (Zhoa et al., 2010) ทำให้เกิดการตายหลังคลอดของลูกเกิด นอกจากนี้จากผลการศึกษาของทีมวิจัยของศูนย์เทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด พบว่า TSA ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์และอัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ (Srirattana et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของทีมวิจัยอื่นที่พบว่า TSA ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ของตัวอ่อนมนุษย์-กระต่าย (Shi et al., 2008b), แมวดาว-แมวบ้าน (Lee et al., 2010) และ แมว black footed cat-แมวบ้าน (Gómez et al., 2011) จากรายงานข้างต้นอาจสรุปได้ว่า TSA ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า สารเคมีที่อยู่ในกลุ่ม HDACi ตัวอื่นๆก็สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งด้วยเช่นกัน

Butyric acid เป็นกรดไขมันสายสั้น ซึ่งสังเคราะห์ได้ในร่างกายโดยธรรมชาติจากการย่อยสลายเส้นใยอาหารที่ปลายลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Bugaut and Bentejac, 1993; Russo et al., 1997) NaBu เป็นเกลือของ butyric acid ซึ่งนับว่าเป็น HDACi อีกตัว มีรายงานการเติม NaBu ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ต้นแบบก่อนนำไปใช้ในการโคลนนิ่ง พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (Shi et al., 2003) และตัวอ่อนกระต่ายโคลนนิ่ง (Yang et al., 2007) นอกจากนี้ Shi และคณะ (2003) ยังพบว่า NaBu มีประสิทธิภาพในการเพิ่มเปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสต์ได้สูงกว่า TSA อีกทั้งยังพบว่าระดับของ histone acetylation เพิ่มขึ้นเมื่อบ่มเซลล์ fibroblast ของสุกรด้วย NaBu (Mohana Kumar et al., 2007) Das และคณะ (2010) พบว่าการบ่มตัวอ่อนสุกรโคลนนิ่งด้วย 5.0 mM นาน 4 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์ และระดับ histone acetylation ยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย

SAHA หรืออีกชื่อหนึ่งคือ vorinostat ซึ่งเป็น HDACi อีกตัวซึ่งเป็นสารยับยั้งเอ็นไซม์ HDACs ที่มีฤทธิ์แรง เช่นเดียวกับ TSA ที่สามารถยับยั้งการทำงาน class I และ II (a และ b) ของ HDAC (Marks et al, 2001; Marks and Dokmanovic, 2005) ด้วยคุณสมบัติของ SAHA ที่คล้าย TSA น่าจะส่งผลต่อการเพิ่ม reprogramming ของ donor nucleus ได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานปี 2010 โดย Ono และคณะ ศึกษาเปรียบเทียบความจำเพาะของ HDACi แต่ละตัวเช่น TSA, SAHA, oxamflatin, valproic acid โดยบ่มสารเคมีต่างๆกับตัวอ่อนหนูถีบจักรโคลนนิ่งด้วยความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าการใช้ SAHA ความเข้มข้น 1 μM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสต์สูงสุดถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Ono et al., 2010) และเมื่อนำตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งระยะ 2 เซลล์จากผลข้างต้น ย้ายฝากไปยังตัวรับ พบว่า SAHA ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM สามารถเพิ่มจำนวนลูกหนูที่ปกติ 9.4% เมื่อเทียบกับ 50 nM TSA (2.6%) นอกจากนี้ SAHA และ TSA ยังสามารถเพิ่มจำนวนของ inner cell mass (ICM) และลดจำนวนเซลล์ตายของ ICM ในระยะบลาสโตซีสต์อีกด้วย (Ono et al., 2010) จากผลของ SAHA ที่กล่าวข้างต้น น่าจะเพิ่มประสิทธิภาพ reprogramming ของ donor nucleus ในการทำโคลนนิ่งโคได้เช่นกัน

scriptaid ซึ่งเป็น HDACi อีกตัวหนึ่ง ซึ่งมีรายงานว่า การบ่มตัวอ่อนสุกรโคลนนิ่งด้วย scriptaid (500 nM นาน 14 ชั่วโมง) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าการใช้ TSA และยังเพิ่มกิจกรรมของการแปรรหัสพันธุกรรม (transcription) และการผลิตโปรตีน (translation) อีกด้วย (Su et al., 2000) นอกจากนี้ Zhao และคณะ (2010) พบว่าตัวอ่อนสุกรโคลนนิ่งระยะ 1 เซลล์ที่บ่มใน scriptaid มีระดับ histone acetylation เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว นอกจากนี้ scriptaid ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการโคลนนิ่งหนูถีบจักร (Van Thuan et al., 2009) และสุกร (Zhao et al., 2009, 2010) Whitworth และคณะ (2011) พบว่าการใช้ scriptaid สามารถทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *H3F3A, CAPG* และ *SEPT7* ในตัวอ่อนสุกรโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสต์เท่ากับตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง

นอกจากนี้สารเคมีในกลุ่ม DNMTi คือ 5-aza-dC มีรายงานพบว่า 5-aza-dC สามารถเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์ อัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเมื่อใช้ร่วมกับ TSA (Wang et al., 2011a, b) อย่างไรก็ตาม ไม่มีรายการการใช้ 5-aza-dC ในสัตว์ชนิดอื่นๆนอกจากโค

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น สารเคมีในกลุ่ม HDACi และ DNMTi นี้ น่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ reprogramming ของ donor cell ในการทำโคลนนิ่งกระทิงข้ามสปีชีส์ได้ อีกทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของสารเคมีตัวอื่นๆ นอกจาก TSA ที่มีต่อตัวอ่อนโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ ในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาต่อยอดองค์ความรู้ที่มีอยู่เดิมของคณะผู้วิจัย คือศึกษาหาสารเคมีที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการโคลนนิ่งกระทิง เพื่อเพิ่มโอกาสในการผลิตลูกกระทิง อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ชนิดอื่นๆได้ นอกจากนี้ การศึกษาระดับโมเลกุลของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เช่น ระดับ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนต่างๆ จะช่วยให้เข้าใจชีววิทยาระดับโมเลกุลของตัวอ่อนโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ เพื่อนำไปปรับปรุงประสิทธิภาพของการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้อีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการผลิตตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ การวิเคราะห์ระดับของ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน ใช้ฟาร์มศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ให้แก่โคตัวรับ

3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

3.2.1 วิธีการเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังกระทิงเพศผู้โดยใช้ปืนเก็บเนื้อเยื่อสำหรับเก็บชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณด้านท้ายลำตัว นำชิ้นเนื้อเยื่อเก็บไว้ในน้ำเกลือ แช่ไว้ในน้ำแข็งระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำความสะอาดผิวหนังที่เก็บมาด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทำการโกนขน แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% อีกครั้งหนึ่งก่อนนำเข้าตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นเลาะส่วนที่เป็นชั้นไขมันออกจากผิวหนัง แล้วนำชิ้นผิวหนังมาตัดให้มีขนาด 1 x 1 มม. จากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยา alpha-Modified Minimum Essential Medium (αMEM, Sigma, M-7145) + 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37°C, ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเริ่มเจริญขึ้นมาจากชั้นผิวหนังประมาณวันที่ 4–5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ แล้วแช่แข็งเซลล์เก็บไว้ใช้งานที่ Passage ที่ 4 ในไนโตรเจนเหลว ก่อนทำการโคลนนิ่งจะนำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา αMEM + 10% FBS เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย 0.25% Trypsin/EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นจึงนำเซลล์เหล่านี้ไปใช้เป็นเซลล์ต้นแบบสำหรับการทำโคลนนิ่งต่อไป โดยใช้เฉพาะ passage ที่ 4 เท่านั้น

3.2.2 วิธีการเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์โดยแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มขนาด 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่จากถุงไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้น นำมาล้างในน้ำยา modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS) + 0.1% polyvinyl pyrolidone (PVP, Sigma, P-0930) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02

AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1μg/ml 17ß-estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (Parnpai และคณะ, 1999)

3.2.3 การกำจัดนิวเคลียสออกจากไข่

หลังจากเลี้ยงไข่นาน 21 ชั่วโมง นำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.1% hyaluronidase (Sigma, S-3506) แล้วคัดเลือกไข่ระยะ metaphase II (MII, มี first polar body) นำไปกำจัดนิวเคลียสออกโดยใช้ micromanipulator (Narishige, Japan, model M0188NE) ภายใต้กล้อง inverted microscope (Olympus, Japan, model IX71) โดยบ่มไข่ในน้ำยาที่มี 5 μg/ml cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) นาน 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตแก้วปลายแหลมตัดเปลือกไข่บริเวณเหนือ first polar body จากนั้นใช้ปิเปตกดให้ first polar body และไซโตพลาสซึมที่อยู่ใต้ first polar body ออกมาประมาณ 10% ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 μg/ml Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอุลตราไวโอเลต

3.2.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-16 μm) เข้าไปในบริเวณ perivitteline space จากนั้นทำการเชื่อมเซลล์ทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยนำไข่ที่ฉีดเซลล์ต้นแบบแล้วครั้งละ 1 ใบ ไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmermann fusion medium (Zimmermann และ Vienken, 1982) เชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 Volt นาน 15 μsec ทำ 2 ครั้ง ต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา Syngro™ (Bioniche Animal Health, USA) แล้วพักไว้ 1 ชั่วโมง จึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ จากนั้นคัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol (Carlo Erba, France, 414607) เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 μg/ml cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ 10 μg/ml cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Muenthaisong และคณะ, 2007)

3.2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา modified oviduct synthetic fluid with amino acids medium (mSOFaa, Gardner และคณะ, 1994) ในสัดส่วน 20 ใบ ต่อน้ำยา 100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa ในสัดส่วน 10 ใบ ต่อน้ำยา 100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมง และบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุกวัน

3.2.6 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Trophectroderm และ inner cell mass

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์คุณภาพดีในวันที่ 7 ของการเลี้ยง นำมาย้อมเพื่อนับจำนวน trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) โดยปรับปรุงวิธีการย้อมจากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Suteevun และคณะ, 2006) กล่าวคือ ย่อยเปลือกตัวอ่อนออกโดยบ่มใน 0.5% protease (Sigma, P-8811) จากนั้นนำตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือก (Zona-free blastocyst) มาบ่มใน 10% rabbit anti-gaur fibroblasts antibodies เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement (Sigma, S-1639), 10 µg/ml propidium iodide (Sigma, P-4170) และ 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma, B-2883) นาน 30 นาที แล้วจึงผนึกตัวอ่อนบนสไลด์แก้วด้วย glycerol (Merck, 4094) ปิดทับด้วยแผ่น cover slip แล้วจึงนำไปส่องนับจำนวนเซลล์ TE (ติดสีแดง) และ ICM (ติดสีน้ำเงิน) ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

3.2.7 NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC treatment

3.2.7.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC

หลังจากการเชื่อมเซลล์ไข่และเซลล์ต้นแบบแล้ว ไข่จะถูกบ่มในน้ำยา Syngro™ ที่มี NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ความเข้มข้นต่างๆ (NaBu ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2 mM, SAHA ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 µM, Scriptaid ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 µM และ 5-aza-dC ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.1, 1 µM) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นไข่และเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่เติม NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ความเข้มข้นต่างๆ จนครบ 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น

3.2.7.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC

จากข้อ 13.1.7.1 จะทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC จากนั้นจะศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้ หลังจากการเชื่อมเซลล์ไข่และเซลล์ต้นแบบแล้ว ไข่จะถูกบ่มในน้ำยา Syngro™ ที่มี NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ความเข้มข้นที่เหมาะสม นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้นไข่และเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่เติม NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ความเข้มข้นที่เหมาะสม จนครบ 6, 12, 18 ชั่วโมง จากนั้นย้ายตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มี NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยกลุ่มควบคุมคือตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยสารเคมีใดๆ

3.2.8 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโคตัวรับ การย้ายฝากตัวอ่อน และการตรวจการตั้งท้อง

ใช้โคนมลูกผสมที่มีอายุระหว่าง 2-3 ปี ในฟาร์มศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดโดยสอด CIDR (Pfizer) ไว้ในช่องคลอด 8 วัน แล้วดึงออกและฉีดฮอร์โมน Prostaglandin $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) 375 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 8 หลังจากดึง CIDR ออกและตรวจการเป็นสัดหลังจากฉีดฮอร์โมน $PGF_2\alpha$ 60 ชั่วโมง การย้ายฝากตัวอ่อนทำได้โดยนำตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งระยะบลาสโตซีสต์ที่บ่มด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่

ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมไปล้างในน้ำยา Syngro™ 3 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน 1-2 ใบ ในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ซีซี นำไปใส่ในปืนฉีดตัวอ่อน (IMV) ซึ่งสวมด้วย ET sheath และ sanitary sheath ทำการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-7.5 วัน ซึ่งจะปล่อยตัวอ่อนเข้าสู่ปีกมดลูกข้างที่ตกไข่ โดยจะย้ายฝาก 2 ตัวอ่อนให้โคตัวรับ 1 ตัว ตามวิธีที่รายงานโดย รังสรรค์ และสรรเพชญ (2530)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อน 45 วัน จะตรวจการตั้งท้องของโคตัวรับด้วยอัลตราซาวด์ และล้วงตรวจการตั้งท้องทางทวารหนักอีกครั้ง ภายหลังการย้ายฝาก 60 วัน โคที่ตั้งท้องจะได้รับการล้วงตรวจเพื่อยืนยันทุกเดือน จนกว่าจะครบกำหนดคลอด

3.3 การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่อระดับของ histone acetylation และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC สำหรับการเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต์สูงสุด ในการทดลองครั้งนี้จะทำการศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่มีต่อระดับของ histone acetylation, DNA methylation และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน โดยจะทำการผลิตตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ ดังวิธีในหัวข้อ 13.1 โดยใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม แล้วนำตัวอ่อนมาทำการทดลองโดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ไม่ได้ผ่านการบ่มด้วยสารเคมีดังนี้

3.3.1 การวิเคราะห์ histone acethylation

เก็บตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ ระยะ 1 เซลล์, 8 เซลล์ และบลาสโตซีสต์ โดยล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยา PBS + 0.1% PVP จากนั้นบ่มตัวอ่อนใน 4% paraformaldehyde นาน 30 นาที บ่มในน้ำยา PBS + 0.5% triton X-100 นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยา PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นบ่มใน 2N HCl นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยา PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง แล้วบ่มในน้ำยา blocking solution นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้ายตัวอ่อนไปบ่มในน้ำยา blocking solution + primary antibody (Ac-H4K5) ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที แล้วจึงบ่มในน้ำยา PBS + 0.1% PVP + secondary antibody นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้โดนแสง) แล้วล้างตัวอ่อนด้วย PBS + 0.1% PVP จำนวน 4 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที (ป้องกันไม่ให้โดนแสง) จากนั้นย้อมตัวอ่อนด้วย DAPI แล้ว mount ตัวอ่อนลง slide แล้วนำไปส่องภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

3.3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

เก็บตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ระยะ 1 เซลล์, 8 เซลล์ และ บลาสโตซีสต์ มาทำการสกัด mRNA โดยใช้ Oligo (dT) 25 นิวคลีโอไทด์ที่ติดอยู่กับเม็ดแม่เหล็ก (Dynabeads mRNA purification kit, Dynal) แล้วนำ mRNA ที่ได้มาทำการสังเคราะห์สายดีเอนเอคู่สม (cDNA) โดยบ่ม mRNA ที่สกัดได้ในอุณหภูมิ 55 °C นาน 1 ชั่วโมง ในสารละลายที่มี 1x first stand buffer, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM of each dNTP, 40U RNasin ribonuclease inhibitor (Invitrogen) และ 200U Superscript III RNase H-RT (Invitrogen) นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ เช่น *Oct4, Cdx2, GCN-5, HAT1, HDAC1* และ *HDAC7* (ตารางที่ 1) ในเชิงปริมาณ โดยใช้ Bio-Rad's SSO Fast EvaGreen supermix, SYBR (Bio rad) ด้วยเครื่อง Chromo4 Four-Color Real-Time PCR Detection System (Bio rad)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 ไพเมอร์ของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Real time PCR

Gene	**Primer sequences (5'-3')**	**Accession number**	**Reference**
Oct-4	F: CCACCCTGCAGCAAATTAGC R: CCACACTCGGACCACGTCTT	NM_174580	Iager et al., 2008
Cdx2	F: GCAAAGGAAAGGAAAATCAACAA R: GGGCTTGGGACGCTTCT	XM_871005	Iager et al., 2008
GCN-5	F: CAGAATGTCTTTTCCCACCAG R: GGATTCAGCTCACACTCCATC	U57316	McGraw et al., 2003
HAT1	F: AGATATATAAGGCTGACATGAC R: CTGTAATATCAAGAACTGTAGG	NM_003642	McGraw et al., 2003
HDAC1	F: ACTACTACGACGGGGATGTTG R: GCCAAGACGATATCATTGACG	XM_01767	McGraw et al., 2003
HDAC7	F: AGGACACCATGCAGATCATTC R: ATCAAATCCAGCAGACACCAG	AF239243	McGraw et al., 2003

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

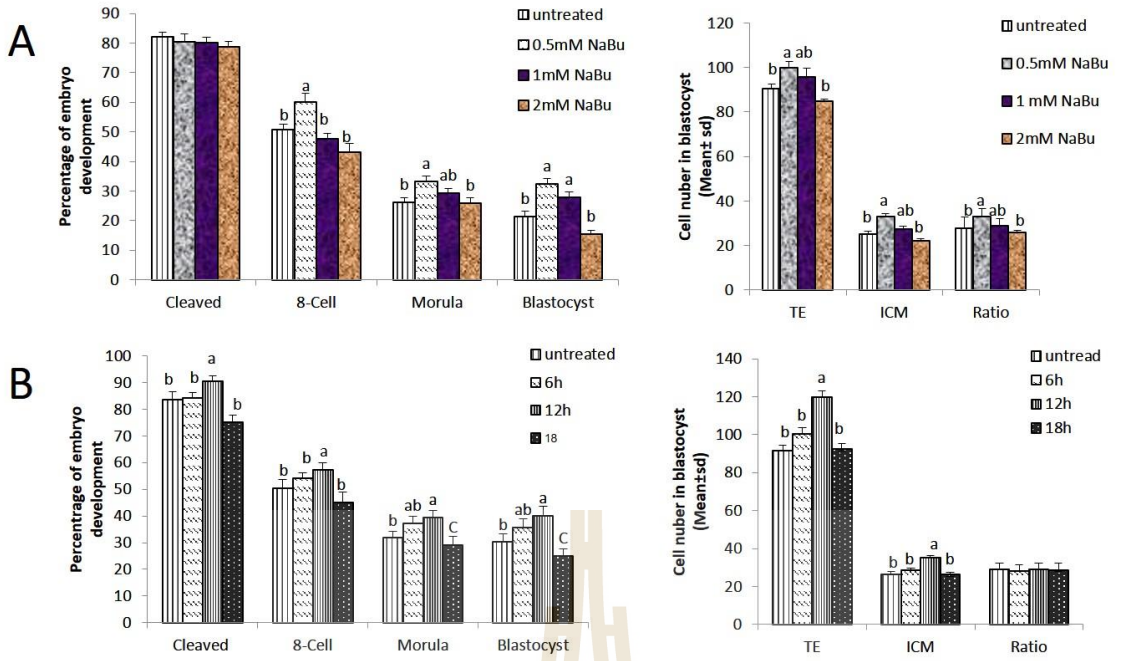
4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ NaBu ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์

จากการทดสอบตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ด้วย NaBu ที่ความเข็มข้นแตกต่างกันเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเจริญเติบโตของตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ พบว่าแต่ละกลุ่มการทดสอบของ NaBu ให้อัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกันทางสถิติคือ 79.0-80.5% แต่อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 0.5 mM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ มีอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ (63/123, 60%) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (60/120, 50.0%), 1mM NaBu (59/123, 47.9%) และ 2 mM NaBu (60/126, 47.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ของกลุ่ม 0.5 mM NaBu สามารถเพิ่มการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาร์ (43/123, 34.9%) และบลาสโตซีสต์ (42/123, 34.1%) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.1A) นอกจากนี้หลังจากที่ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสต์แล้ว ได้นำมาทำการนับจำนวนเซลล์ของ ICM และTE ดังแสดงผลในภาพ 4.1A ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า จำนวนเซลล์ของ ICM และ TE ในกลุ่ม 0.5 mM NaBu มีจำนวนเซลล์ของ ICM และTE สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการทดสอบ NaBu ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ โดยได้นำตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ทดสอบด้วยความเข้มข้น 0.5 mM ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงในภาพ 4.1B ผลการทดลองพบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ในกลุ่มที่ทดสอบด้วย 0.5 mM ด้วยระยะเวลาในการบ่ม 12 ชั่วโมง เพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ (71/124, 57.3%) มอรูลาร์ (49/124, 40%) และบลาสโตซีสต์ (48/124, 39%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ผลของการนับเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio พบว่า มีจำนวนเซลล์ ICM, TE สูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพ 4.1B)

จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการใช้ NaBu ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์คือ ความเข้มข้นที่ 0.5mM ทดสอบเป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ สามารถส่งผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี



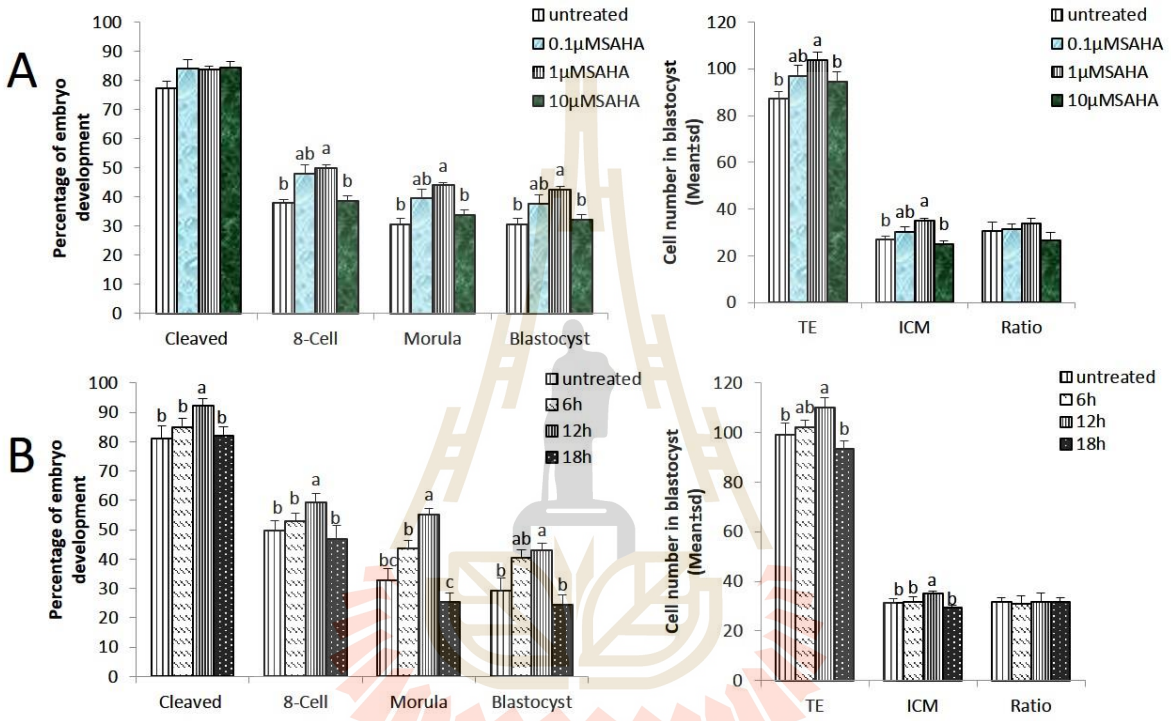
ภาพที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบด้วย NaBu ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ A) ผลของ NaBu ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และจำนวนเซลล์ ICM และ TE, B) ผลของ NaBu ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของและจำนวนเซลล์ ICM, TE และ TE/ICM ratio: ^{a,b} บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

4.1.2 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ SAHA ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์

เพื่อศึกษาผลของการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์หลังจากถูกทดสอบด้วย SAHA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1,10 μM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.2A ผลการศึกษาพบว่า แต่ละกลุ่มการทดสอบของ SAHA ให้อัตราการแบ่งตัวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 μM สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ (61/120, 50%) มอรูลาร์ (53/120, 44%) และบลาสโตซีสต์ (51/120, 42.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ของ ICM และ TE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 4.2A)

จากผลดังกล่าวตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์จะถูกทดสอบด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1 μM เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.2B พบว่า กลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยความเข้มข้น 1 μM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถเพิ่มอัตราการแบ่งตัว (120/130,

92%) การเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์นิ่งเข้าสู่ 8 เซลล์ (77/130, 59%) ระยะมอรูลาร์ (72/130, 55%) และบลาสโตซีสต์ (56/130, 43%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพ 4.2B) นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ระดับความเข้มข้น 1 μM บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ของ ICM และ TE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ระยะบลาสโตซีสต์ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ดี



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบด้วย SAHA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ A) ผลของ SAHA ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, B) ผลของ SAHA ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, ^{a,b}บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

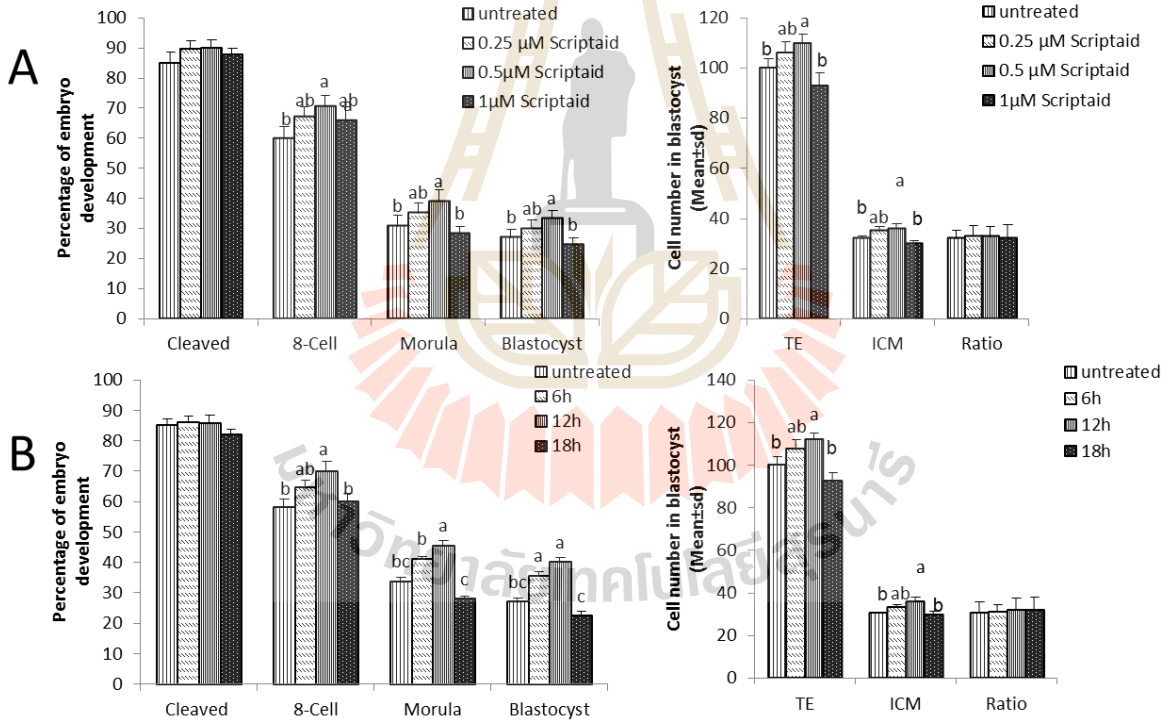
4.1.3 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ Scriptaid ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์

เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Scriptaid โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0, 0.25, 0.5, 1 μM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ ดังแสดงผลในภาพ 4.3A พบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์แต่ละกลุ่มการทดสอบของ Scriptaid มีอัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปี

ซีส์เจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ ระยะมอรูลาร์ ตลอดจนบลาสโตซีสต์ ของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น 0.5 µM สามารถเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และที่สำคัญกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น 0.5 µM สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ICM, TE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพ 4.3A)

หลังจากที่ทราบความเข้มข้นของการทดสอบด้วย Scriptaid ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์แล้ว ตัวอ่อนจะถูกทดสอบด้วยความเข้มข้นที่ดีที่สุดคือ 0.5 µM ของ Scriptaid แล้วบ่มด้วยระยะเวลาที่ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.3B พบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เจริญเข้าสู่ 8 เซลล์ ระยะมอรูลาร์ ตลอดจนบลาสโตซีสต์ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) หลังถูกบ่มด้วย 0.5 µM Scriptaid เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ICM, TE ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้อีกด้วย

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้น 0.5 µM ของ Scriptaid บ่มด้วยระยะเวลา 12 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ดีที่สุด



ภาพที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบด้วย Scriptaid ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ A) ผลของ Scriptaid ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, B) ผลของ Scriptaid ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, ^{a,b,c}บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ P<0.05

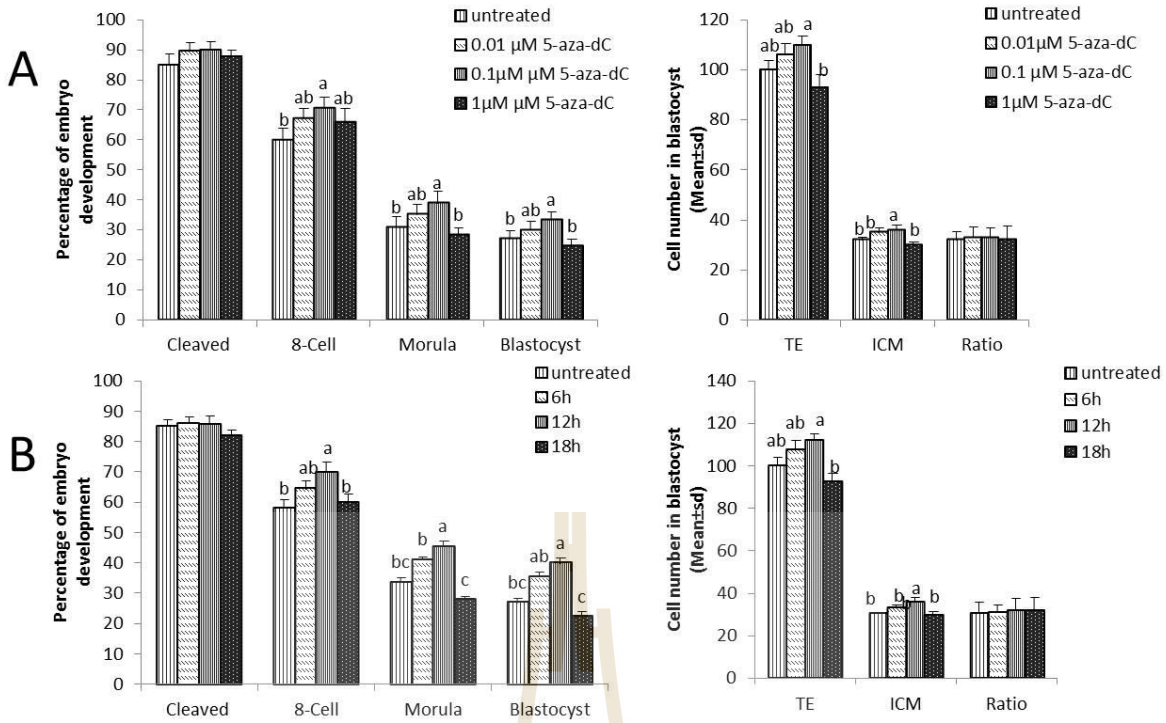
4.1.4 การหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการใช้ 5-aza-dC ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์

เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-aza-dC โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0, 0.01, 0.1, 1 μM เป็นเวลา 12 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์และคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ ดังแสดงผลในภาพ 4.4A พบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์แต่ละกลุ่มการทดสอบของ 5-aza-dC มีอัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าในกลุ่ม 0.1 μM สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ ระยะมอรูลาร์ ตลอดจนบลาสโตซีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และที่สำคัญกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น 0.1 μM สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ICM, TE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ภาพ 4.3A)

หลังจากที่ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-aza-dC ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์แล้ว ตัวอ่อนจะถูกทดสอบด้วยความเข้มข้นที่ดีที่สุดคือ 0.1 μM 5-aza-dC แล้วบ่มด้วยระยะเวลาที่ 0, 6, 12, 18 ชั่วโมงหลังเชื่อมเซลล์ ดังแสดงผลในภาพ 4.4B ซึ่งพบว่า ตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์หลังจากถูกบ่มด้วย 0.1 μM 5-aza-dC เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ ระยะมอรูลาร์ ตลอดจนบลาสโตซีสต์ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ICM, TE ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้อีกด้วย

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 μM 5-aza-dC บ่มด้วยระยะเวลา 12 ชั่วโมง สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ดีที่สุด

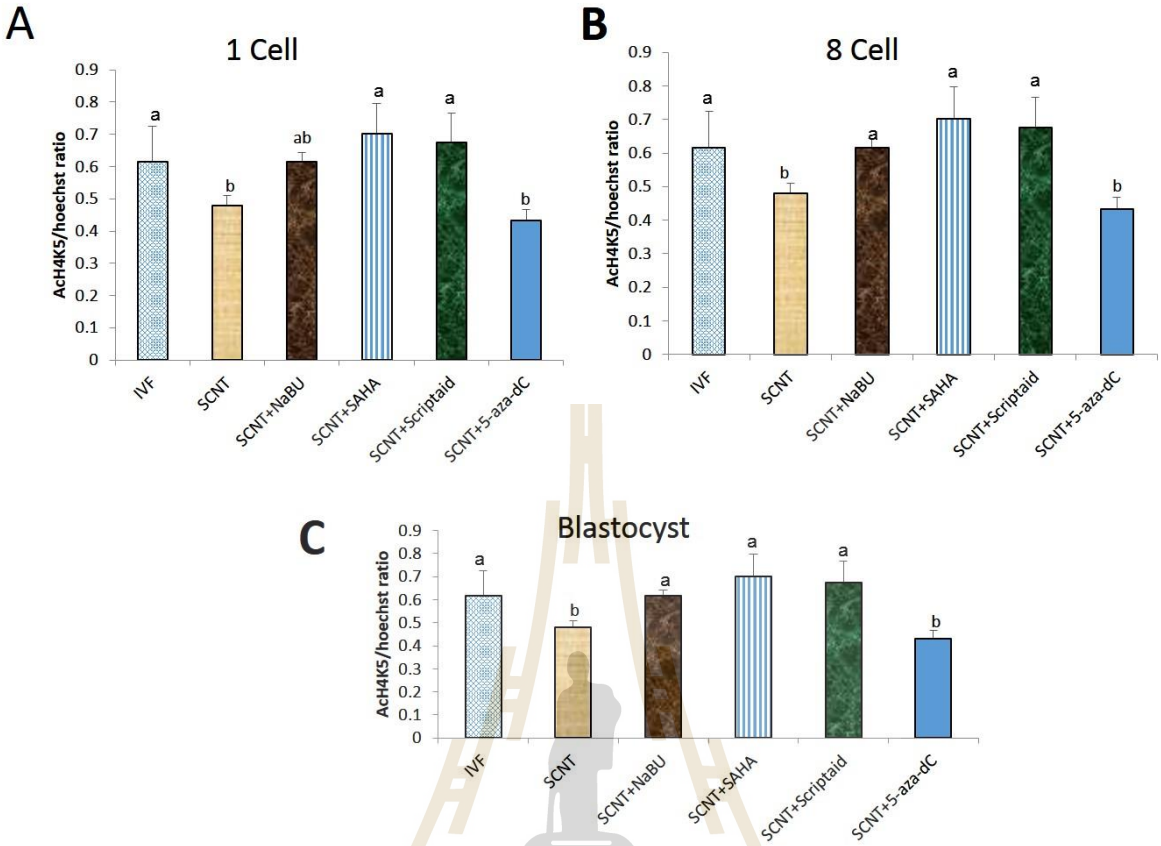
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบด้วย 5-aza-dC ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ A) ผลของ 5-aza-dC ที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, B) ผลของ 5-aza-dC ที่ทดสอบด้วยระยะเวลาต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและจำนวนเซลล์ ICM และ TE, ^{a,b,c}บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

4.2 ผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของระดับของการเติมหมู่อะซิติลของฮีสโตน (histone acetylation) ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

เพื่อหาระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนที่ตำแหน่ง H4K5 ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ถูกทดสอบด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ตามความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะทำการทดสอบด้วยวิธี immunostaining ดังแสดงผลในภาพ 4.5 ซึ่งผลการทดลองพบว่า กลุ่ม NaBu, SAHA, และScriptaid สามารถเพิ่มการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตน ที่ตำแหน่ง H4K5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระยะ 1 เซลล์ 8 เซลล์ และระยะบลาสโตซีสต์ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ดีกว่ากลุ่มตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ไม่ได้ถูกทดสอบ แต่พบว่ากลุ่ม 5-aza-dC ไม่สามารถเพิ่มระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนตำแหน่ง H4K5 ได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การทดสอบตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ด้วย NaBu, SAHA, และ Scriptaid สามารถเพิ่มระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนตำแหน่ง H4K5 ได้ดี

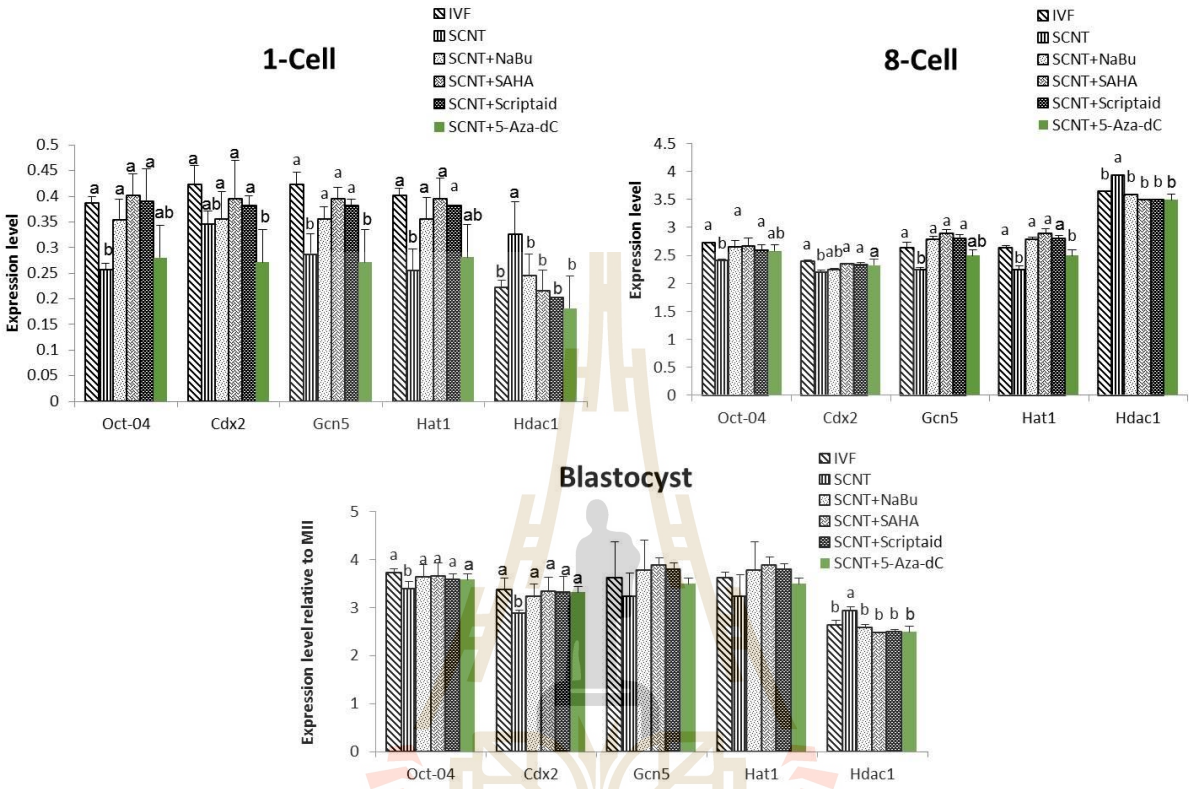


ภาพที่ 4.5 การแสดงระดับของการเติมหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนตำแหน่ง H4K5 ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ถูกทดสอบด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC จากความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม A) ระยะ1 เซลล์ B) ระยะ 8 เซลล์ และC) ระยะบลาสโตซีสต์ ^{a,b}บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

4.3 ผลการศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

จากการศึกษาผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1, Hdac1* ในตัวอ่อนระยะ1 เซลล์ ระยะ 8 เซลล์ และบลาสโตซีสต์ ดังแสดงในภาพ 4.6 ซึ่งพบว่าหลังจากที่ทดสอบด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสม สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และช่วยลดการแสดงแสดงออกของยีน *Hdac1* ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ระยะ 1 เซลล์ และ ระยะ 8 เซลล์ นอกจากนี้พบว่าในกลุ่มตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ที่ถูกบ่มด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4 และ Cdx2* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการแสดงออกของยีน *Gcn5, Hat1* ที่ระยะบลาสโตซีสต์ไม่แตกต่างกัน ตรงกันข้าม การแสดงออกของยีนระยะ

บลาสโตซีสต์ในตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ของกลุ่มที่ทดสอบด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC สามารถลดการแสดงออกของยีน *Hdac1* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.6 แสดงผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1, Hdca1* ในตัวอ่อนระยะ1 เซลล์ ระยะ 8 เซลล์ และบลาสโตซีสต์ ^{a,b}บนกราฟแสดงค่าทางสถิติที่ $P<0.05$

4.4 ผลของ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการตั้งท้องและคลอด

หลังจากที่นำตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ระยะบลาสโตซีสต์ของกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วย NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ที่ความเข้มข้นและการบ่มด้วยช่วงเวลาที่เหมาะสมย้ายฝากไปยังแม่โคตัวรับ พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีการท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อน 60 วัน และมีการแท้งในวันที่ 90 และกลุ่มที่ไม่ treat สารเคมี และกลุ่มที่ treat ด้วย 5-aza-dC แท้งทั้งหมดในวันที่ 120 หลังจากย้ายฝากตัวอ่อน ส่วนกลุ่มที่ treat ด้วย NaBu SAHA และ Scriptaid ยังคงมีการตั้งท้องกลุ่มละ 1 ตัว แต่แท้งหมดหลังจากย้ายฝากตัวอ่อน 150 วัน ดังตารางที่ 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งที่ผ่านการ treat ด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ

กลุ่มทดลอง	**จำนวนตัวรับ**	**ตัวรับตั้งท้องที่ 60 วัน (%)**	**ตัวรับตั้งท้องที่ 90 วัน (%)**	**ตัวรับตั้งท้องที่ 120 วัน (%)**	**ตัวรับตั้งท้องที่ 150 วัน (%)**
ไม่ได้ treat สารเคมี	10	2 (20)	1 (10)	0	0
Treated NaBu	10	2 (20)	1 (10)	1 (10)	0
Treated SAHA	10	3 (30)	1 (10)	1 (10)	0
Treated Scriptaid	10	2 (20)	1 (10)	1 (10)	0
Treated 5-aza-dC	10	2 (20)	1 (10)	0	0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า สามารถใช้ NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC เพื่อเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยังการเพิ่มขบวนการ reprogramming ด้วยขบวนการเติมหมู่กอะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนตำแหน่ง H4K5 และเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1*และลดการแสดงออกของยีน *Hdac1* ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาองค์ความรู้ในด้านการพัฒนาประสิทธิภาพการโคลนนิ่งได้เป็นอย่างดีและเป็นรายงานแรกที่มีการเปรียบเทียบการใช้สาร NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC ต่อการเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การใช้สารเคมีที่เกี่ยวของการกระบวนการ reprogramming ไม่ว่าจะเป็นการใช้สารกลุ่มที่ยับยั้งการเติมหมู่อซิติลหรือแม้กระทั้งสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการ DNA methylation เช่น 5 Aza-dC ก็มีส่วนช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการโคลนนิ่งได้เช่นกัน

5.2.2 ควรมีการศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนเพิ่มเติม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

Akagi, S., Matsukawa, K., Mizutani, E., Fukunari, K., Kaneda, M., Watanabe, S. and Takahashi, S. (2011). Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* 57: 120-126.

Beebe, L.F., McIlfatrick, S.J. and Nottle, M.B. (2009). Cytochalasin B and trichostatin a treatment postactivation improves *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cloning Stem Cells.* 11: 477-482.

Bugaut, M. and Bentejac, M. (1993). Biological effects of short chain fatty acids in nonruminant mammals. *Annu. Rev. Nutr.* 13: 217–241.

Costa-Borges, N., Santaló, J. and Ibáñez E. (2010). Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the *in vitro* development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Reprogram.* 12: 437-446.

Dai, X., Hao, J., Hou, X.J., Hai, T., Fan, Y., Yu, Y., Jouneau, A., Wang, L. and Zhou, Q. (2010). Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by m-carboxycinnamic acid bishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 285: 31002-31010.

Das, Z.C., Gupta, M.K., Uhm, S.J. and Lee, H.T. (2010). Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their *in vitro* development in pigs. *Cell Reprogram.* 12: 95-104.

Gómez, M.C., Pope, C.E., Biancardi, M.N., Dumas, C., Galiguis, J., Morris, A.C., Wang, G. and Dresser, B.L. (2011). Trichostatin a modified histone covalent pattern and enhanced expression of pluripotent genes in interspecies black-footed cat cloned embryos but did not improve *in vitro* and *in vivo* viability. *Cell Reprogram.* 13: 315-329.

Hai, T., Hao, J., Wang, L., Jouneau, A. and Zhou, Q. (2011). Pluripotency maintenance in mouse somatic cell nuclear transfer embryos and its improvement by treatment with the histone deacetylase inhibitor TSA. *Cell Reprogram.* 13: 47-56.

Himaki, T., Yokomine, T.A., Sato, M., Takao, S., Miyoshi, K. and Yoshida, M. (2010). Effects of trichostatin A on *in vitro* development and transgene function in somatic cell nuclear transfer embryos derived from transgenic Clawn miniature pig cells. *Anim. Sci. J.* 81, 558-563.

Iager, A.E., Ragina, N.P., Ross, P.J., Beyhan, Z., Cunniff, K., Rodriguez, R.M. and Cibelli, J.B. (2008). Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* 10: 371-379.

Kang, H. and Roh, S. (2011). Extended exposure to trichostatin A after activation alters the expression of genes important for early development in nuclear transfer murine embryos. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 623-631.

Kim, Y.J., Ahn, K.S., Kim, M. and Shim, H. (2011). Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing *in vitro* development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 47: 283-289.

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

Kishigami, S., Bui, H.T., Wakayama, S., Tokunaga, K., Thuan, N.V., Hikichi, T., Mizutani, E., Ohta, H., Suetsugu, R., Sata, T. and Wakayama, T. (2007). Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.*53: 165-170.

Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Diaz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, C.J., West, M.D. and Damiani, P. (2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79-90.

Lee, H.S., Yu, X.F., Bang, J.I., Cho, S.J., Deb, G.K., Kim, B.W. and Kong, I.K. (2010). Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. Theriogenology 74: 1439- 1449.

Lee, M.J., Kim, S.W., Lee, H.G., Im, G.S., Yang, B.C., Kim, N.H. and Kim, D.H. (2011). Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.* 57: 34-42.

Li, J., Svarcova, O., Villemoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., Xue, Q., Bolund, L., Yang, H., Maddox-Hyttel, P. and Vajta, G. (2008). High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology* 70: 800-808.

Marks, P.A., Richon, V.M. and Breslow, R. (2001). Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr. Opin. Oncol.* 3: 477-83.

Marks, P.A. and Dokmanovic, M. (2005). Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14: 1497– 1511.

Martinez-Diaz, M.A., Che, L., Albornoz, M., Seneda, M.M., Collis, D., Coutinho, A.R., El-Beirouthi, N., Laurin, D., Zhao, X. and Bordignon, V. (2010). Pre-and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. *Cell Reprogram.* 12: 85-94.

Mastromonaco, G.F., Favetta, L.A., Smith, L.C., Filion, F. and King, W.A. (2007). The influence of nuclear content on developmental competence of gaur x cattle hybrid *in vitro* fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 76: 514-523.

McGraw, S., Robert, C., Massicotte, L. and Sirard, M.A. 2003. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 68: 383--389.

Meng, Q., Polgar, Z., Liu, J. and Dinnyes, A. (2009). Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos.*Cloning Stem Cells* 11: 203-208.

Mohana Kumar, B., Song, H.J., Cho, S.K., Balasubramanian, S., Choe, S.Y. and Rho, G.J. (2007). Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Dev.*53: 903–913.

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., Parnpai, R. and Hochi, S. (2007). Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology* 67: 893–900.

Ono, T., Li, C., Mizutani, E., Terashita, Y., Yamagata, K. and Wakayama, T. (2010). Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. *Biol. Reprod.* 83: 929-937

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblast: Comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle epithelial cells. *Buffalo J.* 15: 371-384.

Russo, G.L., Della Pietra, V., Mercurio, C., Della Ragione, F., Marshak, D.R., Oliva, A. and Zappia, V. (1997). Down-regulation of protein kinase CKII activity by sodiumbutyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 233: 673–677.

Rybouchkin, A., Kato, Y. and Tsunoda, Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74: 1083- 1089.

Sang-ngam, C., Imsoonthornruksa, S., Tangthai, C., Srirattana, K., Tunwattana, W., Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-cairns, M. and Parnpai, R. (2005). Interspecies nuclear transfer using female and male gaur (*Bos gaurus*) skin fibroblasts reconstructed with enucleated bovine oocytes. *In Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology* 2005 *Bangkok, Thailand.* p: 170.

Shi, W., Hoeflich, A., Flaswinkel, H., Stojkovic, M., Wolf, E. and Zakhartchenko, V. (2003). Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 69: 301–309.

Shi, L.H., Ai, J.S., Ouyang, Y.C., Huang, J.C., Lei, Z.L., Wang, Q., Yin, S., Han, Z.M., Sun, Q.Y.and Chen, D.Y. (2008a). Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J. Anim. Sci.* 86: 1106-1113.

Shi, L.H., Miao, Y.L., Ouyang, Y.C., Huang, J.C., Lei, Z.L., Yang, J.W., Han, Z.M., Song, X.F., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. (2008b). Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos. *Dev. Dyn.* 237: 640-648.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. (2012). Full term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of Trichostatin A treatment. *Cell Reprogram.* Accepted 21 February 2012.

Su, G.H., Sohn, T.A., Ryu, B. and Kern, S.E. (2000). A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Res.* 60: 3137–3142.

Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., Parnpai, R. and Tian, X.C. (2006). Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *Theriogenology* 65: 1704–1715.

Tsuji, Y., Kato, Y. and Tsunoda, Y. (2009). The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2'- deoxycytidine. *Zygote* 17: 109-115.

Van Thuan, N., Bui, H.T., Kim, J.H. Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E. and Wakayama T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction* 138: 309–317.

Wang, Y.S., Xiong, X.R., An, Z.X., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S. and Zhang, Y. (2011a). Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 75: 819-825.

Wang, Y., Su, J., Wang, L., Xu, W., Quan, F., Liu, J. and Zhang, Y. (2011b). The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin a on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell Reprogram.* 13: 297-306.

Whitworth, K.M., Zhao, J., Spate, L.D., Li, R. and Prather, R.S. (2011). Scriptaid corrects gene expression of a few aberrantly reprogrammed transcripts in nuclear transfer pig blastocyst stage embryos. *Cell Reprogram.* 13: 191-204.

Yang, F., Hao, R., Kessler, B., Brem, G., Wolf, E. and Zakhartchenko, V. (2007). Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction* 133: 219–230.

Zhang, Y., Li, J., Villemoes, K., Pedersen, A.M., Purup, S. and Vajta, G. (2007). An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 9: 357-363.

Zhao, J., Ross, J.W., Hao, Y., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N. and Prather, R.S. (2009). Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 81: 525–530.

Zhao, J., Hao, Y., Ross, J.W. Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N. and Prather, R.S. (2010). Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell. Reprogram.* 12: 75–83.

Zimmermann, U. and Vienken, J. (1982). Electric field-induced cell to-cell fusion. *J. Membr. Biol.* 67: 165–182.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.
ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

6. ประวัติการทำงาน:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี

2016

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. ***J. Reprod. Dev.*** Accepted July 19, 2016. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2016. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** doi: 10.1111/asj.12623

Parnpai, R.*, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. ***Theriogenology.*** 86: 214-220. (IF=1.798; เป็นCorrespondence)

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai. R.*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. ***Stem Cell Intl.*** 3038764. (IF=2.813; เป็น Correspondence)

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. ***Theriogenology.*** 85: 509-518. (IF=1.798; เป็นCorrespondence)

2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.**, Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. ***J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*** 25: 372-380. (IF=2.104)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2015. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology***. 71: 216-223. (IF=1.587)

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong. and Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. ***Theriogenology.*** 83: 891-896. (IF=1.792)

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** 61 : 431-437. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. ***Sci. Rep.*** doi: 10.1038/srep11170. (IF=5.578)

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. ***Toxicol. Ind. Health***. pii: 0748233715579805. (IF=1.859)

2014

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Reports*** 3: 1-9. (IF=5.365)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24. (IF=0.96)

Parnpai, R.*, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 119-123. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 237-240. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44: 513-521. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 241-243. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Putkhao, K.*, Chan, A.W.S.*, Yuksel, A. and **Parnpai, R.*** 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. ***Cloning and Transgenesis*** 2: 1000116.

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. ***Cryobiology*** 69: 496-499. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.* and **Parnpai, R.*** 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 60: 336-341. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

2013

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. ***Asian-Australasian J. Anim. Sci.*** 26: 488-500. (IF=0.541)

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. ***J. Reprod. Dev.*** 59: 214-218. (IF=1.515)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 617-621. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. ***Buffalo Bulletin*** 32 (Special Issue 1): 196-203. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 613-616. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C.* and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 84: 719-725. (IF=0.96; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R***. 2013. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** 112: 141-146. (IF=1.125; เป็น Correspondence)

2012

Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., Parnpai, R*. and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. ***Mitochondrion*** 12: 506-513. (IF=3.249; เป็น Correspondence)

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.***, Ketudat-Cairns, M*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell. Reprogram.*** 14: 79-87. (IF=1.788; เป็น Correspondence)

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. ***Cryobiology*** 65: 151-156. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R**.* 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. ***Anim. Sci. J.*** 83: 630-638. (IF=0.96; เป็น Correspondence)

Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. ***Stem Cell Dev.*** 22: 1198-1205. (IF=3.727)

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M*. and **Parnpai, R*.** 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14: 248-257. (IF=1.788; เป็น Correspondence)

Takeda, K*., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. ***J. Reprod. Dev.*** 58: 323-329. (IF=1.515)

Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai**, **R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. ***Analyst*** 135: 4774-4784. (IF=4.107; เป็น Correspondence)

2011

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 385-392. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant humen leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302. (IF=2.871)

Kunkanjanawan, T., Noisa, P*. and **Parnpai, R*.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131. (IF=3.169 ; เป็น Correspondence)

Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R***. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. ***Theriogenology*** 75: 1652-1660. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R*.** 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. ***Reprod. Domestic Anim.*** 46: e67-e73. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Lorthongpanich, C*, Chuti Laowtammathron, C. and **Parnpai, R*.** 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. ***Thai J. Vet. Med.*** 41: 11-22. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Parnpai, R., Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. ***Thai J. Vet. Med*** Suppl. 41: 77-85. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 539-542. (IF=1.515)

Srirattana, K., Matsukawa,K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R**. and Takeda, K*. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82: 236-243. (IF=0.96)

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16: 057005-1. (IF = 2.859; เป็น Correspondence)

9. การเขียนตำรา-หนังสือ

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำอีทีในโค. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน*. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 41-77.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 273-288.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2549. เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค. เอกสารคำสอนวิชา 304 553 Animal Cloning Technology และ 304 554 Selected Research in Animal Cloning Technology. 389 หน้า.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2553. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน. เอกสารคำสอนวิชา 314 533 Stem Cell Technology. 238 หน้า.

Parnpai, R., Minami, N. and Yamada, M. 1998. Current status of research for the establishment of bovine embryonic stem (ES) cells. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds.), Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity. Nakanishi Printing, Kyoto, pp. 383-388.

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384. (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

10.7. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด ขณะนี้ยังคงทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวป่า อย่างต่อเนื่อง

10.8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มี.ค. 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล”

10.9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

10.10. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

11.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

11.4. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง “Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547

11.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

11.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

11.9. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.10 รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. การจดสิทธิบัติ

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัติเมื่อเดือน เมษายน 2550

12.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

12.3. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.4. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดทดลอง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.5. รังสรรค์ พาลพ่าย ศิวัช สังศรีทวงษ์ กาญจนา ปัญญาไว “ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว” เลขทะเบียน 9367 อนุมัติวันที่ 28 พ.ย. 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี