b92791

รายงานการวิจัย

การผลิตตัวอ่อนแมวโดยวิธีโคลนนิ่ง

(Producing of cat embryos by using cloning technique)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ.2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgements)

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงพยาบาลสัตว์อิทธิเวช และคลีนิครักสัตว์ที่อนุเคราะห์รังไข่แมวสำหรับการทดลองและคำแนะนำในการผ่าตัดเก็บรังไข่ สมาชิกห้องปฏิบัติการโคลนนิ่งสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย
พฤษภาคม 2547

บทคัดย่อ

(Abstract)

เมื่อนำรังไข่ของแมวที่ฉีดด้วย eCG และกลุ่มควบคุมมาเก็บไข่สามารถเก็บได้ 20.1 ± 19.2 ใบ/ตัว และ 7.1 ± 8.3 ใบ/รังไข่ ไข่ที่เก็บจากรังไข่ของแมวที่ฉีดด้วย eCG และกลุ่มควบคุมเมื่อนำมาเลี้ยงในหลอดแก้วมีอัตราการสุก 62.7 ± 4.6 และ 37.6 ± 10.7% จากการนำไข่สุกมากระตุ้นด้วย 7%Et-OH + CHX-CD หรือ CHX-CD เพียงอย่างเดียว ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส 12.9 และ 16.4% ตามลำดับ จากนั้นใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่งและทดสอบกระตุ้นการแบ่งตัวด้วยน้ำยา 2 ชนิด จากการทดลองพบว่ากระตุ้นด้วย 7%Et-OH + CHX-CD ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะมอรูลาและบลาสโตซีสสูงกว่าที่กระตุ้นด้วย CHX-CD อย่างเดียวในเซลล์ต้นแบบทั้ง 2 ชนิด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าอัตราการสุกของไข่ที่เก็บจากรังไข่แมวที่ฉีดด้วย eCG สูงกว่าที่เก็บจากรังไข่กลุ่มควบคุม การเจริญเติบโตในหลอดแก้วถึงระยะมอรูลาและบลาสโตซีสจากการโคลนนิ่งด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและเซลล์แกรนูโลซาในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 7%Et-OH + CHX-CD มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD อย่างเดียว

Abstract

The average number of cat oocytes collected from ovaries of eCG stimulated donor and control group was 20.1 ± 19.2 oocytes/queen and 7.1 ± 8.3 oocytes/ovary. The *in vitro* maturation rate of cat oocytes collected from ovaries of eCG stimulated donor and control group was 62.7 ± 4.6 and 37.6 ± 10.7%. The parthenogenetic embryos developed to blastocyst stage of matured oocytes treated with 7%Et-OH + CHX-CD and CHX-CD was 12.9 and 16.4% respectively. The ear fibroblasts and granulosa cells were used as donor cells for cloning and testing with 2 activation treatments. It was found that the treatment with 7%Et-OH + CHX-CD gave higher morulae and blastocysts rate than those with CHX-CD alone in both donor cell types, but there were not significantly different. In conclusion, the maturation rate of oocytes from eCG treated was higher than control. The *in vitro* development to morula and blastocyst stage of reconstructed embryos with ear fibroblasts and granulosa cells treated with 7%Et-OH + CHX-CD was higher than CHX-CD alone.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ I
บทคัดย่อภาษาไทย II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III
สารบัญเรื่อง IV
สารบัญรูปภาพ V
สารบัญตาราง VI
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 3
บทที่ 3 ผลการทดลอง 8
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุป 16
เอกสารอ้างอิง 19
ประวัติผู้วิจัย 25

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1. ไข่แมวที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว สังเกตุได้จาก first polar body (ลูกศรชี้) 4

รูปที่ 2. การดูดนิวเคลียสออกโดยการกดให้ first polar body และ ไซโตพลาสซึมทะลักออกมานอกไข่ 5

รูปที่ 3. a) เซลล์ไฟโบรบลาสที่เจริญออกมาจากชิ้นหนังหูแมว 6

b) เซลล์ไฟโบรบลาสเจริญแบบ sub-confluence

รูปที่ 4. a) เซลล์แกรนูโลซาหลังจากดูดออกมาจากถุงไข่ 6

b) เซลล์แกรนูโลซาหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 3-4 วัน

รูปที่ 5. การฉีดเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) แบบเข้าไปใน Perivitelline space 7

รูปที่ 6. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) เข้ากับไข่ด้วยกระแสไฟฟ้าที่จ่ายผ่าน Fusion electrode 8

รูปที่ 7. การจำแนกไข่แมวออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบเปลือกไข่ 9

รูปที่ 8. ตัวอ่อน Parthenogenetic 11

รูปที่ 9. การเจริญของตัวอ่อนแมวที่เลี้ยงในหลอดแก้วระยะต่างๆ 14

รูปที่ 10. แสดงกลไกการกระตุ้นให้มีการสร้าง mRNA โดยการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน eCG 16

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. แสดงอัตราการสุกของไข่แมวของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง 10

ตารางที่ 2. การเจริญในหลอดแก้วของตัวอ่อน Parthenogenetic จากการกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD 11

ตารางที่ 3 การเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD 13

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

โคลนนิ่ง

การโคลนนิ่ง หรือ การย้ายฝากนิวเคลียส เริ่มทำการทดลองครั้งแรกในปี ค.ศ. 1952 โดย Briggs และ King โดยทำการทดลองในกบ (*Rana pipiens)* จากการทดลองพบว่านิวเคลียสจากเซลล์ตัวอ่อนสามารถย้ายฝากสู่ไข่ใบใหม่และสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนกบได้ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เริ่มทดลองครั้งแรกในหนูถีบจักรโดย Illmensee and Hoppe (1981) โดยใช้เซลล์จาก Inner cell mass (ICM) และเซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ การทำให้นิวเคลียสของเซลล์ต้นแบบเข้าสู่ไข่ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ Sendai virus หรือใช้กระแสไฟฟ้า (McGrath และSolter, 1983) เป็นต้น แต่การใช้กระแสไฟฟ้าเป็นที่นิยมมากกว่า เพราะสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว ได้ทำการทดลองใช้กระแสไฟฟ้าเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไซโตพลาสซึมผู้รับในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่นกัน เช่น แกะ (Willadsen และคณะ, 1986; Smith and Wilmut, 1989) โค (Prather และคณะ, 1987; Bondioli และคณะ, 1990) สุกร (Prather และคณะ, 1989) กระต่าย (Stice and Robl, 1989) และลิง (Meng และคณะ, 1997) เป็นต้น

การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

ในช่วงแรกของการทำโคลนนิ่งนิยมใช้เซลล์จากตัวอ่อน (Embryonic cell) เป็นเซลล์ต้นแบบ แต่หลังจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในแกะ (Wilmut และคณะ, 1997) จึงได้มีการทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดในเวลาต่อมา เช่น โค (Cibelli และคณะ, 1998; Kato และคณะ, 1998), หนูถีบจักร (Wakayama และคณะ, 1998), แพะ (Baguisi และคณะ, 1999) และสุกร (Polejaeva และคณะ, 2000; Onishi และคณะ, 2000; Betthauser และคณะ, 2000) , ม้า (Galli และคณะ, 2003), กระต่าย (Li และคณะ, 2002), หนูขาว (Zhou และคณะ, 2003) เป็นต้น

วิธีการทำโคลนนิ่ง

การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถทำได้โดยต้องมีสิ่งที่สำคัญคือ เซลล์ต้นแบบ และไซโตพลาสซึมผู้รับ โดยเซลล์ต้นแบบต้องนำมาจากส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย

สัตว์ที่เราต้องการโคลนนิ่งเช่น ใบหู (Parnpai และคณะ, 2000) ผิวหนังหน้าท้อง (Lorthongpanich และคณะ, 2004) กล้ามเนื้อ (Li และคณะ, 2002) เซลล์คิวมูลัส เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ เซลล์ผิวหนัง (Kato และคณะ, 2000) เป็นต้น ส่วนไซโตพลสซึมผู้รับได้มาจากไข่ของสัตว์ชนิดเดียวกัน ที่ถูกนำมาเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว แล้วดูดนิวเคลียสของไข่ออกไปแล้วนำมาฉีดเซลล์ต้นแบบใส่เข้าไป จากนั้นเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไข่ ซึ่งทำได้โดยการใช้กระแสไฟฟ้า จากนั้นคัดเลือกเฉพาะใบที่เชื่อมกันสำเร็จไปกระตุ้นด้วยสารเคมีเพื่อให้เกิดการแบ่งตัว แล้วเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วเพื่อให้เจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ ต่อไป

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบประสบความสำเร็จได้ลูกสัตว์เกิดมาหลายชนิด แต่ยังไม่มีรายงานการประสบความสำเร็จการทำโคลนนิ่งสัตว์เลี้ยงเช่น สุนัขและแมว จนกระทั่งปี ค.ศ. 2002 ได้มีการรายงานความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งแมวเป็นครั้งแรกในโลกจากการใช้เซลล์คิวมูลัสเป็นเซลล์ต้นแบบ โดย Shin และคณะ (2002) จากความสำเร็จในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถทำโคลนนิ่งแมวได้และลูกแมวโคลนนิ่งมีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์

การทำโคลนนิ่งแมวในประเทศไทยเป็นสิ่งที่มีประโยชน์สำหรับการอนุรักษ์สัตว์หายากหรือสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ เช่น แมวลายหินอ่อน หรือ เสือ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามรายงานเกี่ยวกับการทำโคลนนิ่งแมวยังมีอยู่น้อยมากในปัจจุบัน เมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น จึงทำให้มีข้อมูลพื้นฐานน้อย ดังนั้นการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นที่จะทำการทดลองเพื่อหาข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เกี่ยวกับการทำโคลนนิ่งแมวและการเลี้ยงตัวอ่อนแมวในหลอดแก้ว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบสิทธิภาพการเจริญของตัวอ่อนแมวที่โคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ต้นแบบต่างชนิดกัน คือ เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและเซลล์แกรนูโลซา
2. เปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งที่ใช้ไซไตพลาสซึมผู้รับที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 และ 28 ชั่วโมง
3. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

(Materials and Methods)

2.1. สัตว์ทดลอง

เลี้ยงแมวโตเต็มวัยอายุ 9 เดือน – 3 ปี เพศเมียในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 24 ± 2°C และควบคุมแสงโดยจัดให้มีแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมงเพื่อช่วยควบคุมวงรอบการเป็นสัด อาหารและน้ำให้แบบ *ad libitum*

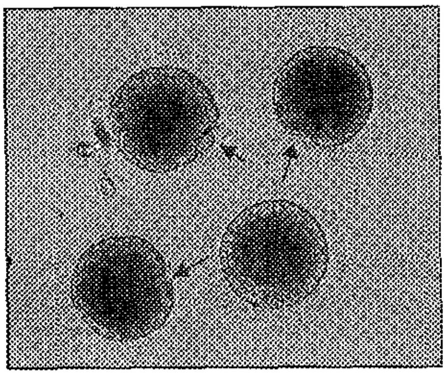
2.2. แหล่งที่มาของไข่

2.2.1. จากคลีนิคสัตวแพทย์ (กลุ่มควบคุม): เก็บรังไข่ของแมวเพศเมียที่ทำการผ่าตัดทำหมันที่คลีนิคสัตวแพทย์โดยวางยาสลบแมวด้วย 0.002 mg/kg Atrophine และ 0.5 mg/kg Xylazine จากนั้นอีก 5-10 นาทีตามด้วย 20 mg/kg Ketamine hydrochloride หลังจากแมวสลบจึงทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง แล้วตัดมดลูกเพื่อทำหมัน จากนั้นตัดรังไข่ออกจากตัวมดลูกแล้วแช่รังไข่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ภายใต้อุณภูมิห้องขณะนำเข้าห้องทดลอง จากนั้นใช้ใบมีดโกนกรีดรังไข่แต่ละข้างเป็นชิ้นบางๆในน้ำยา Modified Dulbecco Phosphate Buffer Saline (mDPBS) + 0.1% Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Sigma, P-0930) แล้วทำการหาไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (Cumulus oocyte complexes, COCs) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2.2. จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (Superstimulation) : แมวจะถูกฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้ไข่เจริญมากขึ้นด้วย Equine Chorionic Gonadotropin (eCG, Folligon®, Intervet, Netherlands) จำนวน 200 iu โดยแบ่งเป็น 100 iu ในวันแรก (วันที่ 0) และ 50 iu ในวันที่ 2 และ 3 หลังจากฉีด eCG ครั้งแรกนาน 168 ชั่วโมงจึงทำการผ่าตัดแมวเพื่อดูดเก็บไข่จากรังไข่ โดยวางยาสลบแมวด้วย 0.002 mg/kg Atrophine และ 0.5 mg/kg Xylazine จากนั้นอีก 5-10 นาทีตามด้วย 20 mg/kg Ketamine hydrochloride หลังจากแมวสลบจึงทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เมื่อพบรังไข่จะทำการดูดไข่ออก โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 ml เชื่อมต่อกับเข็มขนาด 26G เจาะเข้าที่ถุงไข่แล้วทำการดูดไข่ออกจากถุงไข่ จากนั้นนำส่วนที่ดูดได้มาละลายในน้ำยา mDPBS + 0.1% PVP แล้วหาไข่ ที่มี COCs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3. การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว (*In vitro* Maturation)

ไข่ที่หาได้ทั้งหมดจะถูกนำมารวมกันและคัดแยกเกรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเทคนิคของ Johnston และคณะ (1989) ซึ่งจัดเป็น Grade 1: Excellent: เป็นไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบทั่วทั้งไข่อย่างน้อย 2 ชั้น สีของไซโตพลาสซึมเป็นสีดำเรียบเสมอกัน Grade 2: Good/Fair เป็นไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่บ้างแต่ไม่ทั้งหมด สีของไซโตพลาสซึมเป็นสีดำเรียบเสมอกัน Grade3: Degenerated เป็นไข่ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ สีของไซโตพลาสซึมซีดจาง ลักษณะไข่บิดเบี้ยว ไม่กลม คัดเลือกเฉพาะไข่เกรด 1 และ เกรด 2 มาทำการทดลองโดยเลี้ยงไข่ในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วในอัตราส่วนไข่ 10 ใบ/น้ำยา 50 µl ในจานเลี้ยงเซลล์ 35 mm (Nunc) คลุมหยดน้ำยาด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) เลี้ยงภายใต้ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 ที่มีอุณหภูมิ 38° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ 28 ชั่วโมง น้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วประกอบด้วยน้ำยา TCM199 ที่เติมด้วย 0.36mM Na Pyruvate, 2.2mM Ca Lactate, 2.0mM L-Glutamine, 1.13mM Cystein, 0.3% Bovine Serum Albumin (BSA, fatty acid free), 0.5 iu./ml eCG, 1 iu./ml Human Chlorionic Gonadotropin (HCG, Chlorulon®, Intervet, Netherlands)



รูปที่ 1. ไข่แมวที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว สังเกตุได้จาก first polar body (ลูกศรชี้)

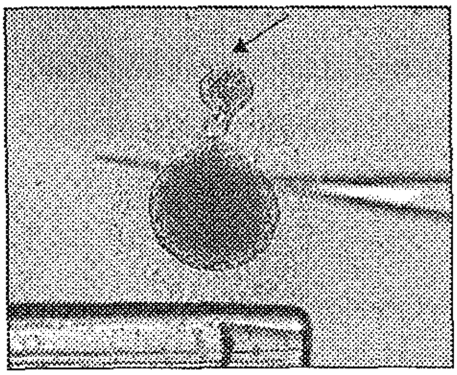
2.4. การทำ Parthenogenetic activation

เมื่อเลี้ยงไข่ในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง จะนำไข่มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.2% Hyarulonidase เพื่อคัดเลือกไข่สุกซึ่งอยู่ในระยะเมตาเฟส ทู (Metaphase II; MII) ซึ่งสังเกตุจากการมี first polar body อยู่ภายในไข่ (รูปที่ 1) จากนั้นแยกไข่สุกออกเป็นสองกลุ่มเพื่อทำการเปรียบเทียบผลของสารกระตุ้นสองกลุ่มต่อการเจริญของไข่ โดยกระตุ้นไข่กลุ่มแรกด้วย 7% เอทานอล นาน 5 นาที แล้วเลี้ยงต่อในน้ำยา TCM199 + 0.3% BSA ที่เติมด้วย 10 µg/ml Cycloheximide (CHX) และ 1.25 µg/ml Cytochalasin D (CD) ภายใต้ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2

ที่อุณหภูมิ 38° C นาน 5 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่สองถูกกระตุ้นโดยการเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 0.3% BSA ที่เติมด้วย CHX และ CD นาน 5 ชั่วโมง (ไม่มีเอทานอล) ภายใต้สภาวะแวดล้อมเหมือนกับกลุ่มแรก หลังจากนั้นไข่ทั้งสองกลุ่มถูกนำมาเลี้ยงต่อในน้ำยา Tyrode's medium I + 0.3% BSA ที่คลุมด้วย mineral oil ในอัตราส่วนไข่ 10 ใบ/น้ำยา 50 μl แล้วเข้าเลี้ยงภายใต้ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38° C นาน 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบอัตราการเจริญของไข่ทั้งสองกลุ่มสู่ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ แล้วนำเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเข้าเลี้ยงต่อในน้ำยา Tyrode's medium II + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) ภายใต้ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38° C นาน 5 วัน ในระหว่างการเลี้ยงจะทำการเปลี่ยนน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่งแล้วแทนที่ด้วยน้ำยาใหม่ทุกวันและบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุกวัน

2.5. การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

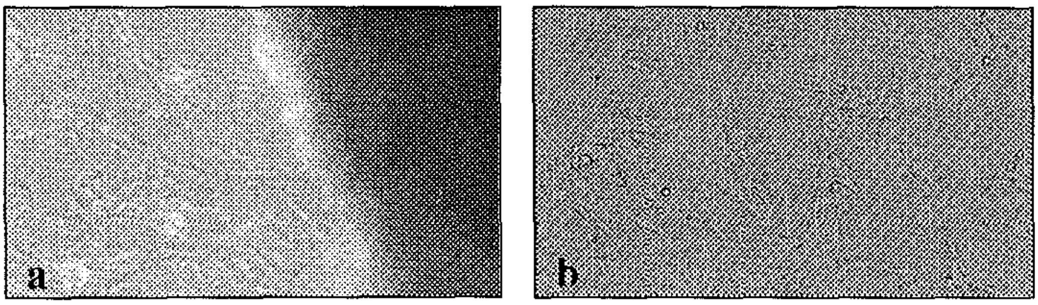
หลังจากเลี้ยงไข่ในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง จะนำไข่มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.2% Hyarulonidase แล้วคัดเลือกไข่สุกมาทำการดูดนิวเคลียสออกโดยใช้ Micromanipulator ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแช่ไข่ในน้ำยา TCM199 Hepes + 0.3% BSA ที่มี 5 μg/ml Cytochalasin B (CB) แล้วทำการตัดเปลือกไข่ (Zona pelucida) บริเวณด้านบนของ first polar body ให้ขาดออก จากนั้นกดไซโตพลาสซึมเพื่อให้ first polar body และประมาณ 10% ของไซโตพลาสซึมภายใต้ first polar body ทะลักออกมาด้านนอกไข่ (รูปที่ 2) จากนั้นนำส่วนที่ทะลักออกมาย้อมด้วยสี Hoechst 33342 แล้วส่องดูภายใต้กล้อง UV เพื่อตรวจสอบความสำเร็จของการดูดนิวเคลียส ถ้าส่วนที่ดูดออกมาได้มีจุดเรืองแสง 2 จุดอยู่ภายในหมายถึงไข่ที่ถูกดูดออกมาสามารถนำไปใช้ในการโคลนนิ่งได้ แต่ถ้าเห็นเพียงจุดเดียวจะไม่นำไข่ใบนั้นมาใช้



รูปที่ 2. การดูดนิวเคลียสออกโดยการกดให้ first polar body และ ไซโตพลาสซึมทะลักออกมานอกไข่

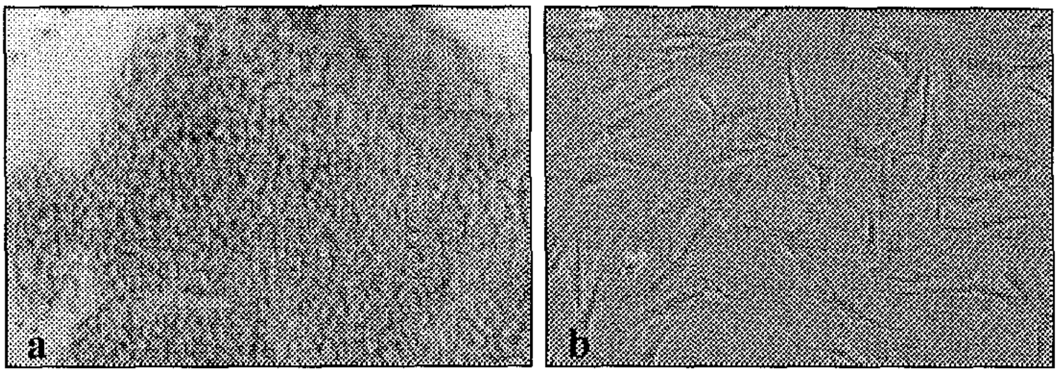
2.6. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู: ตัดชิ้นใบหูแมวขนาดประมาณ 0.5 ซ.ม. x 0.5 ซ.ม แล้วแช่ในน้ำยา mDPBS แล้วนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการแยกชิ้นหนังหูออกจากชิ้นกระดูกอ่อน ทำความสะอาดด้วย 75% เอทานอล แล้วตัดชิ้นหนังหูเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 มม. นำชิ้นหนังหูเหล่านั้นเรียงใส่จานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 60 มม. (Nunc) แล้ววางทับชิ้นหนังหูด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ alpha-Modified Minimum Essential Medium eagle (α-MEM) + 10% FBS จำนวน 5 ml แล้วนำเข้าเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 8-10 วัน (รูปที่ 3) แล้วทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บแช่แข็งไว้ใช้



รูปที่ 3. a) เซลล์ไฟโบรบลาสที่เจริญออกมาจากชิ้นหนังหูแมว
b) เซลล์ไฟโบรบลาสเจริญแบบ sub-confluence

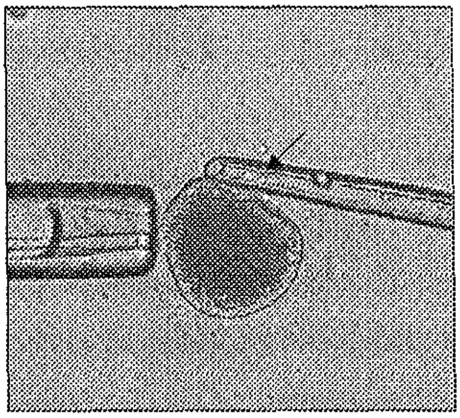
เซลล์แกรนูโลซา:เซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ที่อยู่ในถุงไข่ดังนั้นจึงสามารถเก็บได้ในระหว่างการดูดไข่ออกจากถุงไข่ เมื่อได้เซลล์แล้วนำมาล้างในน้ำยา mDPBS + 0.1% PVP จำนวน 3 ครั้ง แล้วย่อยเซลล์ด้วย trypsin/EDTA นาน 3 นาที ในระหว่าง 3 นาทีนี้ใช้ปิเปตดูดเซลล์ขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นให้ตกตะกอนที่ 3,000 รอบ นาน 5 นาที จากนั้นทำละลายเซลล์ที่ได้โดยการเติม α-MEM + 10% FBS แล้วเลี้ยงเพิ่มจำนวนในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 8-10 วัน (รูปที่ 4) แล้วทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บแช่แข็งไว้ใช้



รูปที่ 4. a) เซลล์แกรนูโลซาหลังจากดูดออกมาจากถุงไข่
b) เซลล์แกรนูโลซาหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 3-4 วัน

2.7. การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าในไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว

เมื่อต้องการใช้เซลล์ที่แช่แข็ง จะต้องละลายออกมาเลี้ยงในน้ำยา α-MEM + 10% FBS ล่วงหน้าประมาณ 2 วันก่อนทำการทดลอง จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาย่อยด้วย trypsin/EDTA เพื่อให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วเลือกเซลล์ที่มีขนาด 14-16 µm ฉีดเข้าสู่ชั้น Perivitelline space (รูปที่ 5)

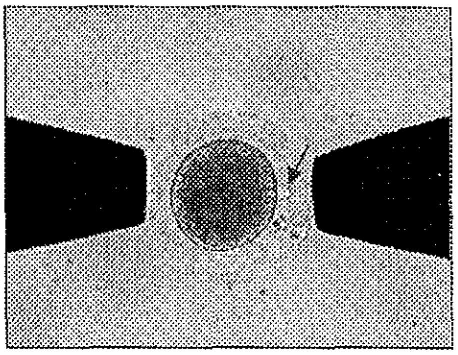


รูปที่ 5. การฉีดเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) แบบเข้าไปใน Perivitelline space

2.8. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไข่

นำไข่ที่ฉีดเซลล์ต้นแบบแล้วเข้าสู่น้ำยาสำหรับเชื่อมเซลล์ (0.3M Manitol + 0.1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) จัดตำแหน่งไข่และเซลล์ต้นแบบให้เหมาะสมแล้วทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าด้วยความแรงไฟฟ้า 30 V นาน 30 µsec ผ่าน Fusion electrode (รูปที่ 6) ที่เชื่อมต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Voltrain EP-1 (Cryologic)

หลังจากทำการเชื่อมเซลล์แล้ว 90 นาที จึงทำการตรวจสอบอัตราการเชื่อมติดของไข่กับเซลล์ต้นแบบ ไข่ที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบอย่างสมบูรณ์ที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ไข่กลุ่มแรกถูกกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล นาน 5 นาที จากนั้นนำเข้าเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 0.3% BSA ที่เติมด้วย 10 μg/ml CHX และ 1.25 μg/ml CD แล้วนำเข้าเลี้ยงภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 ชั่วโมง ไข่กลุ่มที่สองถูกกระตุ้นโดยการนำเข้าเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 0.3% BSA ที่เติมด้วย 10 μg/ml CHX และ 1.25 μg/ml CD (ไม่มีเอทานอล) แล้วเลี้ยงภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกับกลุ่มแรกนาน 5 ชั่วโมง



รูปที่ 6. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) เข้ากับไข่ด้วยกระแสไฟฟ้าที่จ่ายผ่าน Fusion electrode

2.9. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

หลังจากกระตุ้นไข่ทั้งสองกลุ่มครบ 5 ชั่วโมง จะนำไข่เข้าเลี้ยงในน้ำยา Tyrode's medium I + 0.3% BSA ในอัตราส่วนไข่ 10 ใบ/น้ำยา 50 μl ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 48 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจสอบอัตราการเจริญสู่ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ของไข่ทั้งสองกลุ่มแล้วนำเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเข้าเลี้ยงต่อในน้ำยา Tyrode's medium II + 10% FBS ภายใต้ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38° C นาน 5 วัน ในระหว่างการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วจะทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนออกครึ่งหนึ่งทุกๆ 2 วันและทำการบันทึกผลการเจริญของตัวอ่อนทุกวัน

2.10. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบค่าทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS)

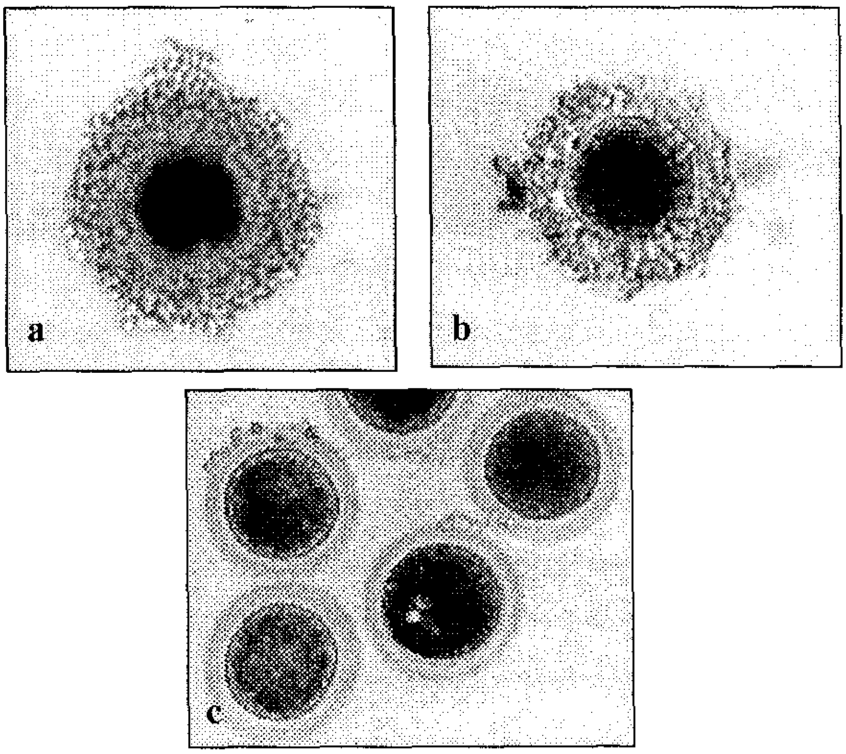
บทที่ 3

ผลการทดลอง

(Results)

3.1. ปริมาณไข่ที่ได้จากแหล่งต่างๆ

จากการทดลองพบว่ารังไข่ของแมวจากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน eCG เป็นเวลา 7 วัน มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้นฮอร์โมน (กลุ่มควบคุม) หลังจากเจาะดูดไข่จากรังไข่แมวที่ถูกกระตุ้นฮอร์โมนจำนวน 37 ตัว ได้ไข่ทั้งหมด 744 ใบ (เฉลี่ย 20.1 ± 19.2 ใบ/ตัว) ในจำนวนนี้พบว่า 659 ใบ (88.5 %) เป็นไข่เกรด 1 และเกรด 2 และ 85 ใบ (11.4 %) เป็นไข่เกรด 3 (รูปที่ 7) สำหรับไข่จากกลุ่มควบคุมได้มาจากรังไข่แมวที่ไม่ได้กระตุ้นฮอร์โมนจำนวน 60 รังไข่ ได้ไข่ 425 ใบ (เฉลี่ย 7.1 ± 8.3 ใบ/รังไข่) จากจำนวนนี้พบว่าไข่ 274 ใบ (64.5 %) เป็นไข่เกรด 1 และ เกรด 2 และ 151 ใบ (35.5%) เป็นไข่เกรด 3



รูปที่ 7. การจำแนกไข่แมวออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบเปลือกไข่

a) เกรด 1: Excellent b) เกรด 2: Good/Fair c) เกรด 3: Degenerated

3.2. ผลการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว

ไข่เกรด 1 และเกรด 2 จากทั้งกลุ่มที่ถูกกระตุ้นฮอร์โมนและกลุ่มควบคุมถูกนำมาเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการสุกของไข่จากกลุ่มที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (64.3 ± 4.6% และ 37.6 ± 10.7%) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงอัตราการสุกของไข่แมวของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง

กลุ่ม	**จำนวนไข่ที่เข้าเลี้ยง**	**จำนวน (%) ไข่สุก**
กระตุ้นด้วยฮอร์โมน eCG	659	424 (64.3 ± 4.6)[a]
ควบคุม	274	103 (37.6 ± 10.7)[b]

[a, b] แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.01$, Anova test

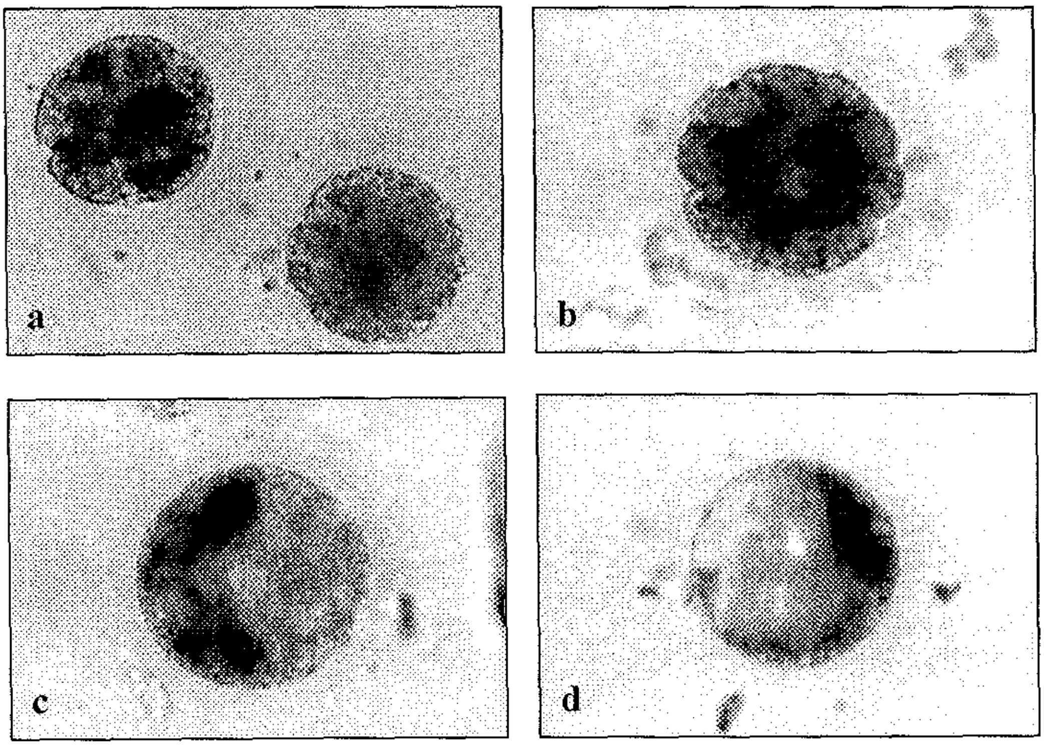
3.3. ผลของการทำ Parthenogenetic activation

จากการเลี้ยงตัวอ่อน Parthenogenetic ในหลอดแก้วนาน 7 วัน พบว่าตัวอ่อนกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD มีการเจริญเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD เป็นดังนี้ อัตราการแบ่งตัว (90.3 ต่อ 85.0%) การเจริญสู่ระยะ 8-เซลล์ (72.6 ต่อ 46.3%) และการเจริญสู่ระยะมอรูลา (59.7 ต่อ 43.3%) (ตารางที่ 2) แต่อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของกลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD เพียงอย่างเดียวกลับสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD (16.4% ต่อ 12.9%) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากการเลี้ยงตัวอ่อน parthenogenetic ในหลอดแก้วพบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นดังนี้ ที่ 48 ชั่วโมงหลังเลี้ยงในหลอดแก้วพบตัวอ่อนระยะ 8-16 เซลล์ ที่ 96 ชั่วโมงพบตัวอ่อนระยะ 16 เซลล์ถึงระยะมอรูลา ที่ 120 ชั่วโมงพบระยะคอมแพคมอรูลา และระยะบลาสโตซีส และที่ 144-168 ชั่วโมงพบตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (รูปที่ 8) ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทำ parthenogenetic ทุกใบจะขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นจะสังเกตุได้จากเปลือกไข่มีขนาดบางลงและไข่ขยายใหญ่ขึ้น แต่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากวิธีนี้จะไม่สามารถเกิดการ Hatching ออกมานอกเปลือกไข่ได้

ตารางที่ 2. การเจริญในหลอดแก้วของตัวอ่อน Parthenogenetic จากการกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD

กลุ่ม	การแบ่งตัว (%)	8-เซลล์ (%)	มอรูลา (%)	บลาสโตซีส (%)
7% เอทานอล + CHX-CD	56/62 (90.3)	45/62 (72.6)	37/62 (59.7)	8/62 (12.9)
CHX-CD	57/67 (85.0)	31/67 (46.3)	29/67 (43.3)	11/67 (16.4)



รูปที่ 8. ตัวอ่อน Parthenogenetic a). ระยะ 8-เซลล์ และ 16 เซลล์ b). มอรูลา c). เออรีบลาสโตซีส และ d). บลาสโตซีส

3.5. ผลการผลิตตัวอ่อนแมวโคลนนิ่ง

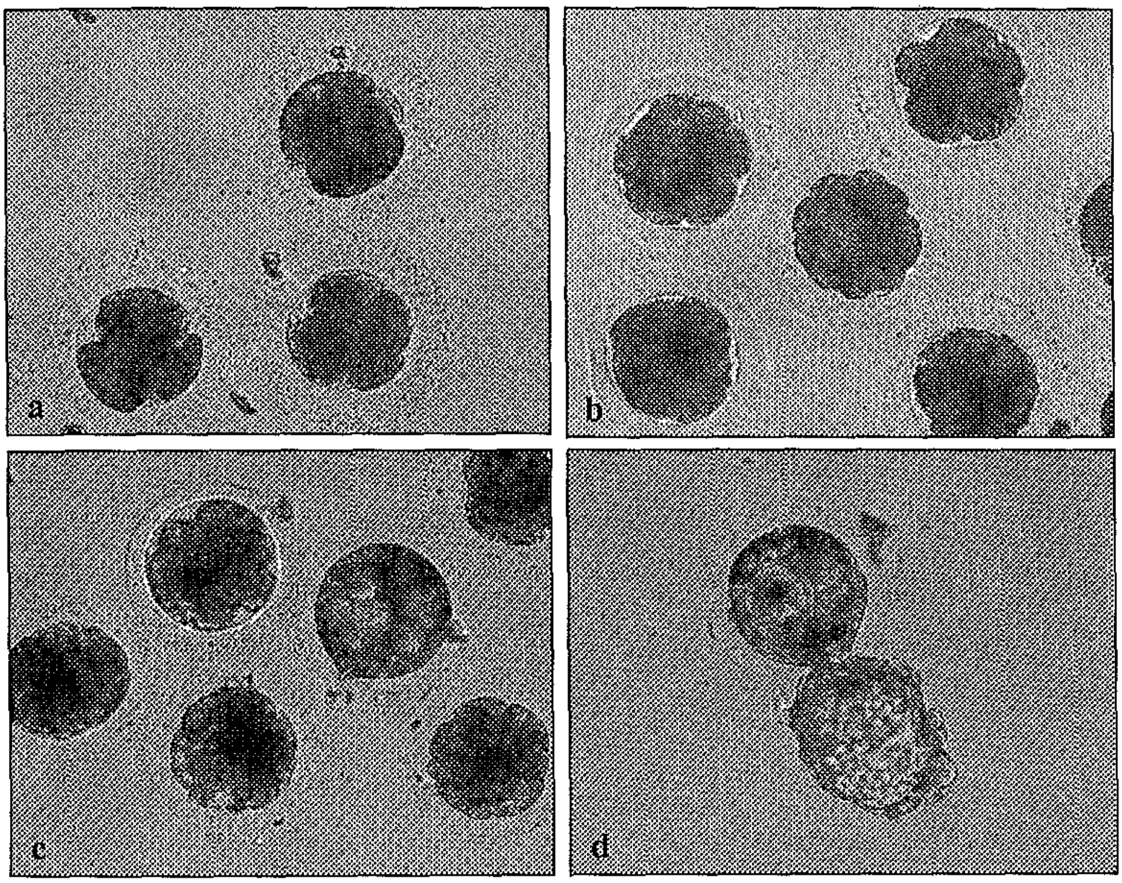
หลังจากทำการเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไข่และตรวจสอบการเชื่อมติดแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างของการเชื่อมติดระหว่างเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิด คือเซลล์ใบหูมีการเชื่อมติด 63.3% (119/188) และเซลล์แกรนูโลซามีการเชื่อมติด 66.1% (127/192) นำเฉพาะไข่ใบที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบอย่างสมบูรณ์มาแยกออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกนำไปกระตุ้นให้ไข่แบ่งตัวด้วย

7% เอทานอล + CHX-CD และกลุ่มที่สองกระตุ้นด้วย CHX-CD การเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนจากทั้งสองกลุ่มเซลล์ต้นแบบไม่แตกต่างกัน แต่การเจริญของตัวอ่อนแมวสู่ระยะมอรูลาของทั้งสองกลุ่มเซลล์ต้นแบบที่ถูกกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD สูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD (40.0 และ 45.3% ต่อ 29.3 และ 33.3%) แต่อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนแมวที่ใช้เซลล์ใบหูและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD มีสูงกว่ากระตุ้นด้วย CHX-CD เพียงอย่างเดียว (11.4 และ 12.5% ต่อ 5.2 และ 6.3%) (ตารางที่ 3) พบว่าตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งจะเจริญสู่ระยะ 8-16 เซลล์ ที่ 96 ชั่วโมง เจริญสู่ระยะ 16 เซลล์และมอรูลา ที่ 120 ชั่วโมง เจริญสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส และ ที่ 144-168 ชั่วโมง เจริญสู่ระยะบลาสโตซีส และ Hatching บลาสโตซีส ตัวอ่อนแมวระยะต่างๆ แสดงในรูปที่ 9

ตารางที่ 3 การเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD.

เซลล์ต้นแบบ	จำนวนไข่เข้าเชื่อมเซลล์	อัตราเชื่อมติด (%)	กลุ่มกระตุ้น	จำนวนเข้าเลี้ยง	อัตราการแบ่งตัว (%)	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญสู่ระยะ		
						8-เซลล์	มอรูลา	บลาสโตซีส
EFC	188	119 (63.3%)	7% เอทานอล + CHX-CD	60	51 (85.0)	33 (55.0)	24 (40.0)	7 (11.7)
			CHX-CD	58	49 (84.5)	27 (46.6)	17 (29.3)	3 (5.2)
GC	192	127 (66.1%)	7% เอทานอล + CHX-CD	64	55 (85.9)	43 (67.2)	29 (45.3)	8 (12.5)
			CHX-CD	63	51 (80.9)	29 (46.0)	21 (33.3)	4 (6.3)

EFC = เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู, GC = เซลล์แกรนูโลซา



รูปที่ 9. การเจริญของตัวอ่อนแมวที่เลี้ยงในหลอดแก้วระยะต่างๆ

a) 2-4 เซลล์ (30 ชั่วโมง) b) 8-เซลล์ – มอรูลา (วันที่ 2-3)

c) มอรูลา – เออรีบลาสโตซีส (วันที่ 4-5) d) แฮชชิ่งบลาสโตซีส (วันที่ 7)

3.6 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วที่เวลา 24 และ 28 ชั่วโมง

จากการทดลองเปรียบเทียบเวลาเลี้ยงไข่ในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 และ 28 ชั่วโมง แล้วนำไปทำโคลนนิ่ง พบว่าอัตราการสุกของไข่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงนานขึ้น 212/330 (64.3%) และ 146/211 (69.2%) อัตราการแบ่งตัวใกล้เคียงกัน 51/60 (85.0%) และ 60/69 (86.9%) แต่อัตราการเจริญสู่ระยะมอรูลา 24/51 (47.0) และ 22/60 (36.7%) และบลาสโตซีส 7/51 (13.7%) และ 5/60 (8.3%) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งที่เลี้ยงในหลอดแก้ว ที่ใช้เวลาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว นาน 24 และ 28 ชั่วโมง

เวลาเลี้ยงไข่	ไข่สุก (%)	เชื่อมติดสำเร็จ (%)	เข้าเลี้ยง	การแบ่งตัว (%)	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญสู่ระยะ		
					8-เซลล์	มอรูลา	บลาสโตซีส
24 ช.ม.	212/330 (64.2%)	119/188 (63.3%)	60	51/60 (85.0)	33/60 (55.0)	24 /51 (47.1)	7/51 (13.7)
28 ช.ม.	146/211 (69.2%)	69/110 (62.7%)	69	60/69 (86.9%)	44/69 (63.8%)	22 /60 (36.7%)	5/60 (8.3)

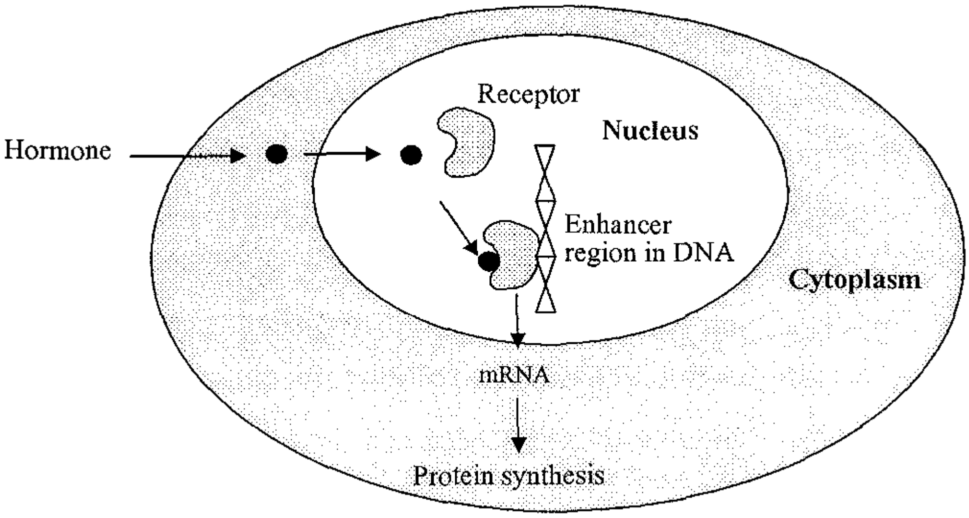
บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

(Discussion and Conclusion)

การใช้ฮอร์โมนเช่น eCG หรือ hCG กระตุ้นให้เกิดการเจริญของไข่และกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ในสัตว์ เช่น ในวัว (Boland และคณะ, 1991), ลิง (Wolf และคณะ, 1990), กระต่าย (Maurer และคณะ, 1968) และหนู (Edwards และ Fowler, 1960) เป็นต้น สำหรับแมว การใช้ฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นไข่และรังไข่มีรายงานในการทำ IVF (Goodrowe และคณะ, 1988; Johnston และคณะ, 1991; Donohue และคณะ, 1992; Swanson และคณะ, 1996) และทำผสมเทียม (Howard และคณะ, 1992) เช่นกัน

จากผลการทดลองพบว่าไข่จากแมวที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีอัตราการสุกในหลอดแก้วสูงกว่าไข่ที่ได้จากกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่างของระดับฮอร์โมนโกนาโดโธปินในกระแสเลือดไม่เท่ากัน จากการทดลองของ Coffee (1998) พบว่าฮอร์โมน eCG มีส่วนสำคัญในการสุกของไข่ โดยการทำหน้าที่เป็น Primary messenger ส่งสัญญาณไปตามเซลล์ต่างๆ และเข้าจับกับ Recepter ที่ Transcription Factor จากนั้น Hormone-Receptor complex จะทำการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นให้เกิดการทรานสคริปชั่นให้ได้ mRNA มากขึ้น (รูปที่ 10) และจากรายงานของ Dale (1989) พบว่าปริมาณของ mRNA ที่เพิ่มมากขึ้นจะเป็นตัวกระตุ้นให้ไข่สุกมากขึ้น ดังนั้นความแตกต่างของระดับฮอร์โมนโกนาโดโธปินในกระแสเลือดจึงมีผลต่ออัตราการสุกของไข่ได้



รูปที่ 10 แสดงกลไกการกระตุ้นให้มีการสร้าง mRNA โดยการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน eCG

เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้วิธีการวางยาและยาสลบชนิดเดียวกับคลินิกสัตวแพทย์ที่นำรังไข่มาใช้ในการทดลองเพื่อเป็นกลุ่มควบคุม ดังนั้นยาสลบจึงไม่น่าจะมีผลกระทบต่อผลการทดลอง

สำหรับการทำโคลนนิ่ง เมื่อได้ไข่สุกแล้วต้องนำไข่สุกมาดูดนิวเคลียสทิ้งก่อนนำไปใช้โคลนนิ่ง การดูดนิวเคลียสออกสามารถทำได้ 2 วิธี วิธีแรกคือ นำไข่ที่สุกแล้วใส่ลงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ CB และ Hoechst 33342 จากนั้นทำการดูดนิวเคลียสของไข่ออกด้วย Aspiration pipette แล้วส่องส่วนที่ดูดได้ทันทีด้วยแสง UV เพื่อตรวจสอบความสำเร็จ (Wilmut และคณะ, 1997; Cibelli และคณะ, 1998, Baguisi และคณะ, 1999) ไข่ที่ถูกดูดนิวเคลียสออกทั้งหมดเท่านั้นจึงถูกนำมาใช้ในการโคลนนิ่งขั้นตอนต่อไป วิธีที่สองคือ นำไข่ที่สุกแล้วใส่ลงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ CB แล้วตัดเปลือกไข่บริเวณเหนือ first polar body ให้ขาดออกด้วยปิเปตแก้ว แล้วกดไข่ให้ first polar body และไซโตพลาสซึมใต้ first polar body ทะลักออกมานอกไข่ประมาณ 10% (Parnpai และคณะ, 1999; Kurosaka และคณะ, 2002) ทำอย่างนี้จนครบทุกใบ แล้วจึงนำเฉพาะส่วนที่ถูกกดออกมาแช่ในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Hoechst 33342 แล้วทำการตรวจสอบเฉพาะส่วนที่ถูกกดออกมาภายใต้แสง UV และเนื่องจาก Hoechst 33342 เป็นสารที่มีคุณสมบัติสามารถเข้าแทรกในระหว่างสาย DNA จึงอาจเป็นอันตรายต่อการเจริญของตัวอ่อน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้การดูดนิวเคลียสออกด้วยวิธีที่สอง เพราะไม่ต้องการให้ไข่สัมผัสกับ Hoechst 33342

เซลล์ต้นแบบควรเลือกเซลล์ที่มีขนาด 14-16 µm เพราะเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 ซึ่งเหมาะสำหรับใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ ตำแหน่งการวางเซลล์ต้นแบบเป็นสิ่งที่สำคัญมากต่อการเชื่อมติดของเซลล์ต้นแบบและไข่ ตำแหน่งที่เหมาะสมคือวางให้เซลล์ต้นแบบสัมผัสทั้งเปลือกไข่และไซโตพลาสซึม เพื่อเพิ่มอัตราความสำเร็จในการเชื่อมเซลล์ การเชื่อมเซลล์สามารถทำได้สองวิธี คือ ใช้ Fusion chamber ซึ่งนิยมใช้สำหรับโคลนนิ่งสัตว์หลายชนิด เช่น แกะ (Wilmut และคณะ, 1997) โค (Cibelli และคณะ, 1998; Kato และคณะ, 1998) แพะ (Baguisi และคณะ, 1999) หมู (Polejaeva และคณะ, 2000) แมว (Fahrudin และคณะ, 2001; Du และคณะ, 2002; Gomes และคณะ, 2002; และ Hwang และคณะ, 2000) หรือ Fusion electrode (Parnpai และคณะ, 1999; 2000; 2001; Miyoshi และคณะ, 2001) ข้อดีของการเชื่อมเซลล์ด้วย Fusion electrode คือสามารถจัดตำแหน่งเซลล์ต้นแบบให้เหมาะสมก่อนทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าได้ ทำให้ความสำเร็จในการเชื่อมเซลล์มีสูงขึ้นกว่าการใช้ Fusion chamber (Miyoshi และคณะ, 2001) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ Fusion electrode ในการผลิตตัวอ่อนแมวโคลนนิ่ง

จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งสามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสได้ในวันที่ 6-7 ของการเลี้ยงในหลอดแก้ว และเจริญสู่ระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส ในวันที่ 7 แต่ตัวอ่อน

Parthenogenetic ไม่สามารถเจริญจนถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสได้ เนื่องจากการแฮชชิ่งของตัวอ่อนต้องอาศัยการแสดงออกของยีนจากทั้งของพ่อและแม่ แต่ตัวอ่อน Parthenogenetic มีเฉพาะสารพันธุกรรมที่ได้จากแม่เท่านั้น จึงไม่สามารถเจริญจนถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสได้

จากการเปรียบเทียบอัตราการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 28 ชั่วโมงพบว่าอัตราการสุกของไข่ที่เวลา 28 ชั่วโมงจะสูงกว่า 24 ชั่วโมง และอัตราการแบ่งตัวและการเจริญสู่ระยะต่างๆของตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกัน แต่การเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนกลุ่มที่เลี้ยงนาน 28 ชั่วโมง ต่ำกว่ากลุ่มที่เลี้ยง 24 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Skrzyszowska และคณะ (2002) ที่ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบเวลาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง 35 ชั่วโมง และ 43 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสจะลดลงตามสัดส่วนของเวลาที่เลี้ยงไข่ในหลอดแก้ว นั่นคือเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 43 ชั่วโมง จะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่ำกว่าเลี้ยงเพียง 24 ชั่วโมง

สาเหตุที่การเลี้ยงตัวอ่อนที่ 28 ชั่วโมงมีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต่ำกว่าการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง ยังไม่มีรายงานแน่ชัด โดยเฉพาะการทดลองในเชิงลึกระดับอณูโมเลกุล (Molecular) จากการทดลองของ Sato และคณะ (1994) พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนเป็นเวลานานจะทำให้มีการสังเคราะห์ cAMP เพิ่มมากขึ้นและ cAMP จะยับยั้งการทำงานของ MPF ทำให้ต่ำลง เมื่อระดับ MPF ของไข่ต่ำลงหลังจากไข่ผ่านระยะ MII ไปแล้ว จะเรียกว่า ไข่แก่ (Aged oocyte) ซึ่งมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนระยะหลังการแบ่งตัว และในการทดลองของ Kikuchi และคณะ ในปี 2000 ที่ได้ทำการทดลองในไข่หมู พบว่าปัจจัยหนึ่งที่อาจเกี่ยวข้องกับการแก่ของไข่และมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหมูคือระดับของ Maturation/Meiosis/Meitosis Promoting factor (MPF) ที่จะลดลงเมื่อไข่แก่ ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะต่างๆ

ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบต่างชนิดกัน ผลที่ได้พบว่าการเจริญของตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Skrzyszowska และคณะ (2002) ที่เปรียบเทียบเซลล์คิวมูลัสกับเซลล์ผิวหนังลูกอ่อน และการทดลองของ Farudin และคณะ (2001) ทำการทดลองโดยใช้เซลล์ผิวหนังตัวอ่อนและเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่เป็นเซลล์ต้นแบบ

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า

1. ไข่ที่ได้จากแมวเพศเมียที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน eCG จำนวน 200 iu. จะมีอัตราการสุกหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมงสูงกว่ากลุ่มที่ไม่กระตุ้นฮอร์โมน
2. ความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน
3. วิธีการกระตุ้นสองวิธีที่ใช้ในการทดลองให้ผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งไม่แตกต่างกัน
4. ตัวอ่อน Parthenogenetic สามารถเจริญได้สูงสุดถึงระยะเอ็กซ์แพนบลาสโตซีสเท่านั้น
5. การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 28 ชั่วโมงมีอัตราการสุกสูงกว่าไข่ที่เลี้ยง 24 ชั่วโมง แต่การเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต่ำกว่า

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W., and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnol.** 17: 456-461.

Betthauser, J., Forsberg, E., Augenstein, M., Childs, L., Eilertsen, K., Enos, J., Forsythe, T., Golueke, P., Jurgella, G., Koppang, R., Lesmeister, T., Mallon, K., Mell, G., Misica, P., Pace, M., Pfister-Genskow, M., Strelchenko, N., Voelker, G., Watt, S., Thompson, S., and Bishop, M. 2000. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. **Nat. Biotechnol.** 18: 1055-1059.

Boland, M.P., Goulding, D., and Roche, J.F. 1991. Alternative gonadotropins for superovulation in cattle. **Theriogenology** 35: 5-17.

Bondioli, K.R., Westhusin, M.E., and Looney, C.R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. **Theriogenology** 33: 165-174.

Briggs, R., and King, T.J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cell into enucleated frogs' eggs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 38: 455-463.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A., and Robl, J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** 280: 1256-1258.

Coffee, C.J. 1998. **Metabolism.** Regulation of metabolism. Connecticut: Fence Creek.

Dale, B. 1989. **Fertilization in Animals.** Translated by Pinkasiri, K. Bangkok: Kurusapa Ladprao.

Donoghue, A.M., Johnston, L.A., Munson, L., Brown, J.L., and Wildt, D.E. 1992. Influence of gonadothopin treatment on follicular maturation, *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biol. Reprod.** 46: 972-980.

Du, F.L., Jiang, S., Tian, X.C., Avner, D., and Yang, X. 2002. Parthenogenetic activation and somatic nuclear transfer in domestic cats using *in vitro* matured oocytes. **Theriogenology** 57: 409.

Edwards, R.G., and Fowler, R.E. 1960. Superovalation treatment of adult mice: their subsequent natural fertility and response to further treatment. **J. Endocrinol.** 21: 147-154.

Fahrudin, M., Otoi, T., Murakami, M., Karja, N.W.K., Ooka, A., and Suzuki, T. 2001. The effects of culture medium on *in vitro* development of domestic cat embryos reconstructed by nuclear transplantation. **Theriogenology** 55: 268.

Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., and Lazzari, G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. **Nature**. 425(6959): 680.

Gomez, M.C., Pope, C.E., Harris, R.F., King, A., and Dresser, B.L. 2002. *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed by transfer of cumulus cells at different electrical currents. **Theriogenology** 57: 415.

Goodrowe, K.L., Howard, L.G., and Wildt, D.E. 1988. Comparison of embryo overy, oestradiol-17β and progesterone profiles in domestic cats *(Felis catus)* at natural or induced oestrus. **J. Reprod. Fertil.** 82: 553-561.

Howard, J.G., Barone, M.A., Donoghue, A.M., and Wildt, D.E. 1992. The effect of pre-ovulatory anesthesia on ovulation in laparoscopically-inseminated domestic cats. **J. Reprod. Fertil.** 96: 175-186.

Hwang, W., Kim, K., Kim, G., Jin, Y., Kim, Y., Chung, H., Yoon, T., Han, C., Eo, Y., and Lee, B. 2000. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger *(Panthera altalica)*. **Theriogenology** 53: 271.

Illmensee, K., and Hoppe, P.C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell** 23: 9-18.

Johnston, L.A., Donoghue, A.M., O'brien, S.J., and Wildt, D.E. 1991. Culture medium and protein supplementation influence *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat. **J. Exp. Zoo.** 257: 350-359.

Johnston, L.A., O'Brien, S.J., and Wildt, .E. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. **Gamete Res.** 24: 343-356.

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science** 282: 2095-2098.

Kato, Y., Tani, T., and Tsunoda, Y. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **J Reprod Fertil**. 120:231-7.

Kikuchi, K., Naito, K., Naguchi, J,m Shimada, A., Kaneko, H., Yanashita, M., Aoki, F., Tojo., H and Toyoda, Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: A regulation of aging in porcine oocyte. **Biol. Reprod.** 63: 715-722.

Kurosaka, S., Nagao, Y., Minami, N., Yamada, M., and Imai, H. 2002. Dependence of DNA systhesis and in vitro development of bovine nuclear transfer embryos on the stage of the cycle of donor cells and recipient cytoplasts. **Biol. Reprod.** 67: 643-647.

Li, G.P., Chen, D.Y., Lian, L., Han, Z.M., Zhu, Z.Y., and Seidel, G.E. Jr. 2002. Rabbit cloning: improved fusion rates using cytochalasin B in the fusion buffer. **Mol Reprod Dev.** 61:187-91.

Lorthongpanich, C.,Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., and Parnpai, R. 2004. *In vitro* development of enucleated domestic cat oocyte reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. **Reprod. Fertil Dev.** 149.

McGrath, J., and Solter, D. 1983. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. **Science** 220: 1300-1302.

Meng, L., Ely, J.J., Stouffer, R.L., and Wolf, D.P. 1997. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. **Biol. Reprod.** 57: 454-459.

Maurer, R.R., Hunt, W.L., and Foote, R.H. 1968. Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotropins in Dutch-belted rabbits. **J. Reprod. Fertil.** 15: 93-103.

Miyoshi, K., Gibbons, J., Rzucidlo, S., Arat, S., and Stice, S.L. 2001. Effective fusion method for reconstruction of bovine embryos from granulosa cells and enucleated oocytes. **Theriogenology** 55: 280.

Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., and Perry, A.C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science** 289: 118-1190.

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

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

Parnpai, R., Tasripoo, K., and Kamonpatana, M. 2001. Developmental potential of vitrified cloned swamp buffalo morulae derived from granulosa cells. **Theriogenology** 55: 284.

Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A., and Campbell, K.H. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature** 407: 86-90.

Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eyestone, W.H., and First, N.L. 1987. Nuclear transfer in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol. Reprod.** 37: 859-866.

Sato, E., Inoue, M., Takahashi, Y., and Toyoda, Y. 1994. Glycosaminoglycans prevent induction of fragmentation of porcine stimulated by dibutyryl cAMP in culture. **Cell Struct Funct.** 19: 29-36.

Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., and Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. **Nature** 415: 859.

Skrzszowska, M., Katska, L., Rynska, B., Kania, G., Smorag, Z., and Pienkowski, M. 2002. *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. **Theriogenology**. 58: 1615-1621.

Smith, L.C., and wilmut, I. 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. **Biol. Reprod.** 40: 1027-1035.

Stice, S.L., and Robl, J.M. 1989. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol. Reprod.** 39: 657-664.

Swanson, W.F., Roth, T.L., and Godke, R.A. 1996. Persistence of the developmental block of *in vitro* fertilized domestic cat embryos to temporal variation in culture conditions. **Mol. Reprod. Dev.** 43: 298-305.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. 1998. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature** 394: 369-374.

Wakayama, T., and Yanagimachi, R. 2001. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. **Mol. Reprod. Dev.** 58: 367-383.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 385: 810-813.

Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature** 320: 63-65.

Wolf, D.P., Thomson, J.A., Zelinski-Wooten, M.B., and Stouffer, R.L. 1990. *In vitro* fertilization-embryo transfer in nonhuman primates. The technique and its applications. **Mol. Reprod. Dev.** 27: 261-280.

Zhou, Qi., Renard, J.P., Friec, G.L., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., and Cozzi, J. 2003. Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation. **Science**. 302: 1179.