ห ๑๖๕๑๐

รหัสโครงการ SUT3-304-45-12-20

รายงานการวิจัย

การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวดาว *(Felis bengalensis)* โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบและใช้โอโอไซท์แมวบ้าน *(Felis catus)* เป็นไซโตปลาส

Cloning of leopard cat (*Felis bengalensis*) embryo by using skin fibroblasts of leopard cat as donor cell and domestic cat (*Felis catus*) oocyte as cytoplast

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รายงานการวิจัย

การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวดาว (*Felis bengalensis*) โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบและใช้โอโอไซท์แมวบ้าน (*Felis catus*) เป็นไซโตปลาส

Cloning of leopard cat (*Felis bengalensis*) embryo by using skin fibroblasts of leopard cat as donor cell and domestic cat (*Felis catus*) oocyte as cytoplast

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมโครงการ

ผศ.น.สพ.ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ.2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2548

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgements)

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโรงพยาบาลสัตว์อิทธิเวช และคลีนิครักสัตว์ที่อนุเคราะห์รังไข่แมวสำหรับการทดลอง และคำแนะนำในการผ่าตัดเก็บรังไข่ สมาชิกห้องปฏิบัติการโคลนนิ่งสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร และผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

มกราคม 2548

บทคัดย่อ

(Abstract)

การทดลองนี้ได้ทำการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังหน้าท้องแมวดาวเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบฉีดเข้าไปในไข่แมวบ้านที่ดูดสารพันธุกรรมออกแล้ว โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับการโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวบ้านโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบและตัวอ่อน Parthenogenetic ในขบวนการโคลนนิ่งพบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาวสูงกว่าเซลล์แมวบ้าน (84.5% และ63.3%) หลังจากนั้นแบ่งตัวอ่อนออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล นาน 5 นาทีและกระตุ้นต่อด้วย CHX-CD นาน 5 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่สองกระตุ้นด้วย CHX-CD นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมดในหลอดแก้วเพื่อตรวจสอบการแบ่งตัวและการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส พบว่า ในกลุ่มแรก ตัวอ่อนแมวดาวมีอัตราการแบ่งตัวต่ำกว่าตัวอ่อนแมวบ้านและตัวอ่อน Parthenogenetic ในขณะที่ตัวอ่อนแมวบ้านและตัวอ่อน Parthenogenetic มีอัตราการแบ่งตัวใกล้เคียงกัน แต่อัตราการเจริญสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ของตัวอ่อน Parthenogenetic สูงกว่าตัวอ่อนแมวดาวแต่ใกล้เคียงกับตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง (59.7%, 12.0%; 35.5%, 9.2% และ 40.0%, 11.2% ตามลำดับ) ในกลุ่มที่สอง พบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนทั้งสามชนิดใกล้เคียงกัน แต่การเจริญสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีสของตัวอ่อน Parthenogenetic มีสูงกว่าตัวอ่อนแมวดาวและแมวบ้านโคลนนิ่ง (43.3%, 16.4%; 37.5%, 7.9% และ 29.3%, 5.2% ตามลำดับ) จากการทดลองสรุปได้ว่าตัวอ่อนแมวดาวโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสามารถเจริญจนถึงระยะบลาสโตซีสได้และวิธีการกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล นาน 5 นาทีและกระตุ้นต่อด้วย CHX-CD นาน 5 ชั่วโมง เป็นวิธีที่ทำให้ได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสมากกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD นาน 5 ชั่วโมง

Abstract

In this study, we performed cloning of leopard cat using fibroblast cells from abdominal skin compared with ear fibroblast of domestic cat and parthenogenetic activation. From the experiments, we found that the fusion rate between leopard cat fibroblast and enucleated domestic cat oocytes was higher than domestic cat cells (84.5% and 63.3% respectively). Both groups of the reconstructed embryos were separated into 2 groups. The first group was activated by 7% ethanol for 5 minutes then followed by CHX-CD for 5 h. The second group was directly cultured in CHX-CD for 5 h. (without ethanol). Then, all of the activated embryos were cultured *in vitro* to evaluate the cleavage rates and embryo developmental rates. After fist group activation, we found that the cleavage of leopard cat embryos were lower than domestic cat embryos and parthenogenetic embryos as well. While the developmental rates of domestic cat embryos and parthenogenetic embryos were similar. However, the development and blastocyst stage of parthenogenetic embryos were higher than domestic cat embryos but similar to leopard cat embryos (59.7%, 12.0%; 35.5%, 9.2% and 40.0%, 11.2%, respectively). For the second group, the cleavage rates of leopard cat, domestic cat and parthenogenetic embryos were similar. However, the development and blastocyst stage of parthenogenetic embryos were higher than leopard cat and domestic cat embryos (43.3%, 16.4%; 37.5%, 7.9% and 29.3%, 5.2%, respectively). The results from this experiment can be concluded that leopard cat could be cloned by using domestic cat oocytes as recipient cytoplast and the suitable activation procedures for cloned leopard cat embryos is 7% ethanol for 5 min then followed by CHX-CD for 5 h.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
สารบัญเรื่อง	IV
สารบัญรูปภาพ	V
สารบัญตาราง	VI
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	4
บทที่ 3 ผลการทดลอง	10
บทที่ 4 วิจารณ์และสรุป	15
เอกสารอ้างอิง	17
ประวัติผู้วิจัย	23

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1. ไข่แมวที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว สังเกตุได้จาก first polar body (ลูกศรชี้) 5

รูปที่ 2. การดูดนิวเคลียสออกโดยการกดให้ first polar body และ ไซโตพลาสซึมทะลักออกมานอกไข่ 6

รูปที่ 3. a) เซลล์ไฟโบรบลาสที่เจริญออกมาจากชิ้นหนังหูแมว 7

b) เซลล์ไฟโบรบลาสเจริญแบบ sub-confluence

รูปที่ 4. การฉีดเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) แบบเข้าไปใน Perivitelline space 7

รูปที่ 5. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) เข้ากับไข่ด้วยกระแสไฟฟ้าที่จ่ายผ่าน Fusion electrode 8

รูปที่ 6. ตัวอ่อน Parthenogenetic 11

รูปที่ 7. การเจริญของตัวอ่อนแมวที่เลี้ยงในหลอดแก้วระยะต่างๆ 14

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. การเจริญในหลอดแก้วของตัวอ่อน Parthenogenetic จากการกระตุ้น 11
ด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD

ตารางที่ 2 การเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู 13
แมวบ้านเปรียบเทียบกับเซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาวเป็นเซลล์
ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD.

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) และเซลล์โทรโฟบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ การทำให้นิวเคลียสของเซลล์ต้นแบบเข้าสู่ไข่ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ Sendai virus หรือใช้กระแสไฟฟ้า (McGrath และ Solter, 1983) เป็นต้น แต่การใช้กระแสไฟฟ้าเป็นที่นิยมมากกว่า เพราะสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็ว โดยในการทดลองได้ใช้กระแสไฟฟ้าเพื่อเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไซโตพลาสซึมผู้รับในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่นกัน เช่น แกะ (Willadsen และคณะ, 1986; Smith และ Wilmut, 1989), โค (Prather และคณะ, 1987 และ Bondioli และคณะ, 1990), สุกร (Prather และคณะ, 1989), กระต่าย (Stice และ 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) และหนูขาว (Zhou และคณะ, 2003) เป็นต้น

การโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ (Interspecies cloning)

การทำโคลนนิ่งต้องอาศัยปัจจัยหลักสองชนิดคือ เซลล์ต้นแบบที่เราต้องการสารพันธุกรรมของเซลล์นั้นและไซโตพลาสซึมผู้รับ โดยเซลล์ต้นแบบต้องนำมาจากส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย

สัตว์ที่เราต้องการโคลนนิ่งเช่น ใบหู (Parnpai และคณะ, 2000), เซลล์แกรนูโลซา (Lorthongpanich และคณะ, 2003), กล้ามเนื้อ (Li และคณะ, 2002), เซลล์คิวมูลัส, เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ และเซลล์ผิวหนัง (Kato และคณะ, 2000) เป็นต้น

ส่วนไซโตพลาสซึมผู้รับนั้น ในอดีตพบว่าสัตว์ที่เราต้องการโคลนและสัตว์เจ้าของไข่ต้องเป็นสัตว์ชนิดเดียวกันเท่านั้น เพื่อให้การเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งและการฝังตัวของตัวอ่อนโคลนนิ่งเกิดขึ้นได้ แต่ในปัจจุบันพบว่าเราสามารถใช้ไข่จากสัตว์ต่างชนิดเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับได้ วิธีการนี้เรียกว่าการโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ หรือการโคลนนิ่งข้ามชนิด วิธีการโคลนนิ่งแบบนี้มีประโยชน์อย่างมากในการเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ ทั้งนี้เพราะสามารถลดข้อจำกัดในเรื่องการหาสัตว์ใกล้สูญพันธุ์เพศเมียที่เป็นชนิดเดียวกัน เพื่อเป็นแหล่งผลิตไซโตพลาสซึมผู้รับ การโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ประสบความสำเร็จครั้งแรกในการโคลนนิ่งกระทิงโดยใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ (Lanza และคณะ, 2000) หลังจากนั้นก็ได้มีการทำโคลนนิ่งในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์อีกหลายชนิด เช่น แกะภูเขา (Loi และคณะ, 2001), หมีแพนด้า (Chen และคณะ, 1999) และเสือเกาหลี (Hwang และคณะ, 2000) เป็นต้น

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

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

สำหรับในประเทศไทย มีสัตว์ที่ถูกขึ้นทะเบียนเป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ 15 ชนิด ในจำนวนนี้ประกอบไปด้วยสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก แต่เนื่องจากในปัจจุบันเราสามารถทำการโคลนนิ่งได้เฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น หนึ่งในจำนวนสัตว์สงวนที่น่าสนใจและมีความเป็นไปได้ค่อนข้างสูงในการทำโคลนนิ่งเพื่อเพิ่มจำนวนคือแมวดาว เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแมวบ้านซึ่งเป็นแหล่งไซโตพลาสซึมผู้รับที่หาได้ง่ายและแมวดาวยังมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแมวลายหินอ่อนที่เป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์อีกด้วย ดังนั้นแมวดาวจึงเป็นตัวแทนที่ดีในการศึกษาถึงการโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์ในสัตว์ตระกูลแมวเพื่อเป็นแนวทางในการทำโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวชนิดอื่นเช่น แมวลายหินอ่อน หรือ เสือ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการเจริญของตัวอ่อนแมวดาวที่โคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ผิวหนังหน้าท้องเป็นเซลล์ต้นแบบและใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ
2. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี
3. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ถูกกระตุ้นให้แบ่งตัวด้วยสารเคมี (Parthenogenetic activation) ต่างชนิดกัน

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง
(Materials and Methods)

2.1. สัตว์ทดลอง

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

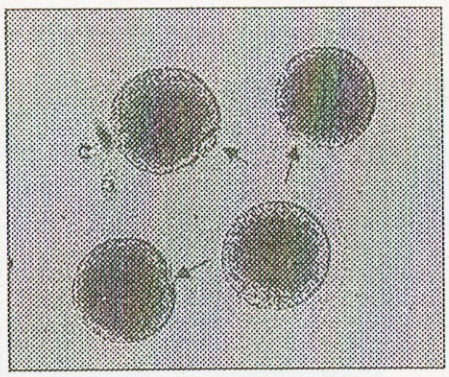
2.2. แหล่งที่มาของไข่

ไข่จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (Superstimulation) : แมวเพศเมียจะถูกฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้ไข่เจริญมากขึ้นด้วย 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 นาที ตามด้วย 20 mg/kg Ketamine hydrochloride หลังจากแมวสลบจึงทำการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง เมื่อพบรังไข่จะทำการดูดไข่ออก โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 ml เชื่อมต่อกับเข็มขนาด 26G เจาะเข้าที่ถุงไข่แล้วทำการดูดไข่ออกจากถุงไข่ จากนั้นนำส่วนที่ดูดได้มาละลายในน้ำยา modify Dulbecco Phosphate Buffer Saline (mDPBS) + 0.1% Polyvinyl Pyrolidone (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 0.36 mM Na Pyruvate, 2.2 mM Ca Lactate, 2.0 mM L-Glutamine, 1.13 mM 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)



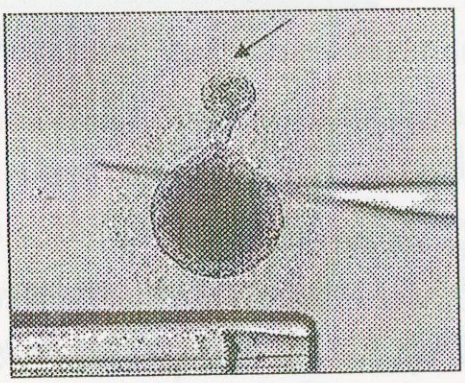
รูปที่ 1. ไข่แมวที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว สังเกตได้จาก first polar body (ลูกศรชี้)

2.4. การทำ Parthenogenetic activation

เมื่อเลี้ยงไข่ในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง จะนำไข่มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.2% Hyarulonidase เพื่อคัดเลือกไข่สุกซึ่งอยู่ในระยะเมตาเฟส ทู (Metaphase II; MII) ซึ่งสังเกตจากการมี 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 จากนั้นทำการตรวจสอบอัตราการเจริญของไข่ทั้งสองกลุ่มสู่ตัวอ่อนระยะ 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 ในระหว่างการเลี้ยงตัวอ่อนจะทำการเปลี่ยนน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่งแล้วแทนที่ด้วยน้ำยาใหม่ทุกวันและบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุกวัน

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



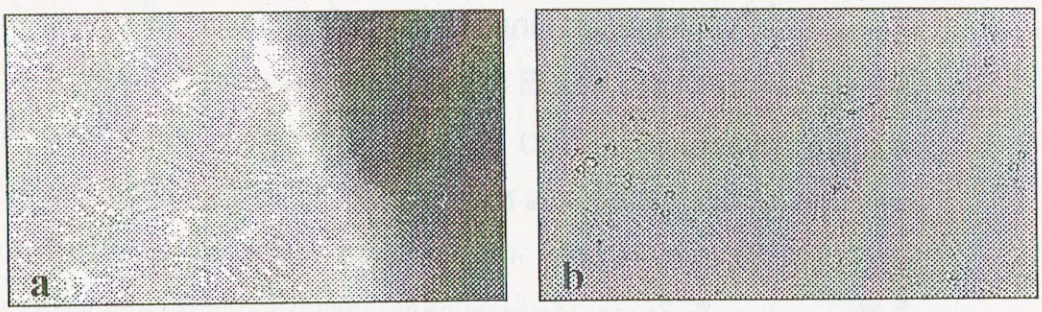
รูปที่ 2. การดูดนิวเคลียสออกโดยการกดให้ first polar body และ ไซโตพลาสซึมทะลักออกมานอกไข่

2.6. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เซลล์ไฟโบรบลาสจากชิ้นหนังหน้าท้อง: ทำการตัดชิ้นหนังหน้าท้องแมวดาวขนาดประมาณ 0.5 ซ.ม. x 0.5 ซ.ม. แล้วแช่ในน้ำยา mDPBS แล้วนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นโกนขนออก และทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล ตัดชิ้นหนังหน้าท้องเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 มม. นำชิ้นหนังหน้าท้องเหล่านั้นเรียงใส่จานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 60 มม. (Nunc) แล้ววางทับชิ้นหนังด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ alpha-Modified Minimum Essential Medium (α-MEM) + 10% FBS จำนวน 5 ml แล้วนำเข้าเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 8-10 วัน (รูปที่ 3) แล้วทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บแช่แข็งไว้ใช้

เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู: ในการทดลองนี้ได้ทำการโคลนนิ่งแมวบ้านโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมด้วย ซึ่งทำโดยการตัดชิ้นใบหูแมวขนาดประมาณ 0.5 ซ.ม. x 0.5 ซ.ม. แล้วแช่ในน้ำยา mDPBS แล้วนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำ

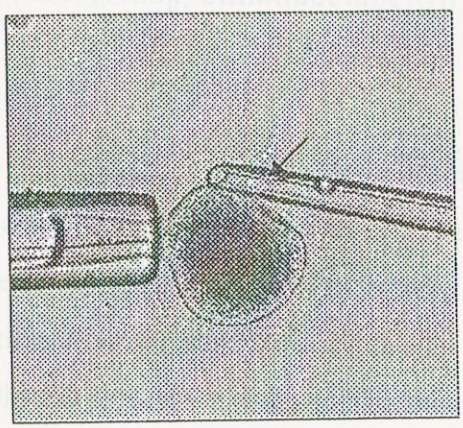
การแยกชิ้นหนังหูออกจากชิ้นกระดูกอ่อน ทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล แล้วตัดชิ้นหนังหูเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 มม. นำชิ้นหนังหูเหล่านั้นเรียงใส่จานเลี้ยงเซลล์ ขนาด 60 มม. (Nunc) แล้ววางทับชิ้นหนังหูด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ α-MEM + 10% FBS จำนวน 5 ml แล้วนำเข้าเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 8-10 วัน แล้วทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์และเก็บแช่แข็งไว้ใช้



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

2.7. การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าในไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว

เมื่อต้องการใช้เซลล์ที่แช่แข็ง จะต้องละลายออกมาเลี้ยงในน้ำยา α-MEM + 10% FBS ล่วงหน้าประมาณ 2 วันก่อนทำการทดลอง จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาย่อยด้วย trypsin/EDTA เพื่อให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วเลือกเซลล์ที่มีขนาด 14-16 μm ฉีดเข้าสู่ชั้น Perivitelline space (รูปที่ 4)

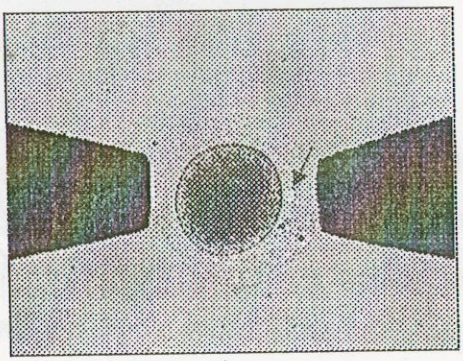


รูปที่ 4. การฉีดเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) แบบเข้าไปใน Perivitelline space

2.8. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไข่

นำไข่ที่ฉีดเซลล์ต้นแบบแล้วเข้าสู่น้ำยาสำหรับเชื่อมเซลล์ (0.3M Manitol + 0.1 mM $MgCl_2.6H_2O$) จัดตำแหน่งไข่และเซลล์ต้นแบบให้เหมาะสมแล้วทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าด้วยความแรงไฟฟ้า 30 V นาน 30 μsec ผ่าน Fusion electrode (รูปที่ 5) ที่เชื่อมต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Voltrain EP-1 (Cryologic)

หลังจากทำการเชื่อมเซลล์แล้ว 90 นาที จึงทำการตรวจสอบอัตราการเชื่อมติดของไข่กับเซลล์ต้นแบบ ไข่ที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบอย่างสมบูรณ์จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ไข่กลุ่มแรกถูกกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล นาน 5 นาที จากนั้นนำเข้าเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 0.3% BSA ที่เติมด้วย 10 μg/ml Cychoheximide (CHX) และ 1.25 μg/ml Cytochalasin D (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 5. 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 วัน และทำการบันทึกผลการเจริญของตัวอ่อนทุกวัน

2.10. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ได้ทำการทดสอบค่าทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) เพื่อใช้หาความแตกต่างของการเจริญของตัวอ่อนแมวดาวที่กระตุ้นด้วยสองวิธี

บทที่ 3
ผลการทดลอง
(Results)

3.1. ผลการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว

หลังจากเลี้ยงไข่ที่มีลักษณะ COCs จำนวน 550 ใบ ในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง พบว่าไข่แมวเจริญสู่ระยะเมตาเฟส ทู 338 ใบ คิดเป็น 61.5%

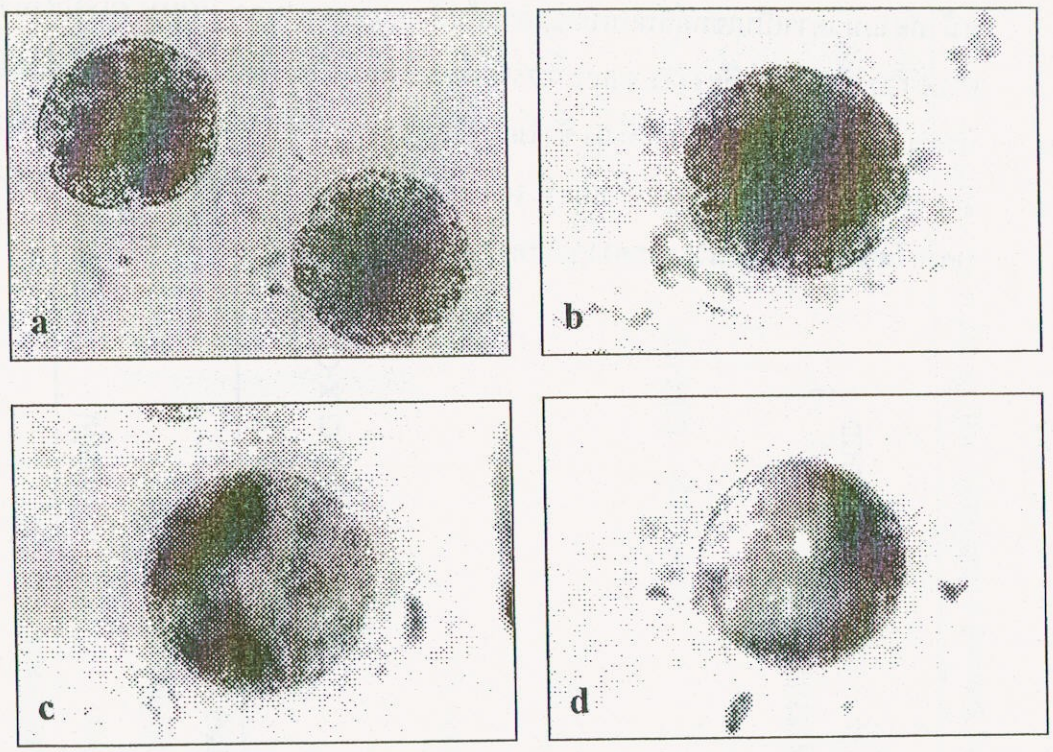
3.3. ผลของการทำ Parthenogenetic activation

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 1) แต่อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของกลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD เพียงอย่างเดียวกลับสูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD (16.4% ต่อ 12.9%) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากการเลี้ยงตัวอ่อน parthenogenetic ในหลอดแก้วพบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นดังนี้ ที่ 48 ชั่วโมง หลังเลี้ยงในหลอดแก้วพบตัวอ่อนระยะ 8-16 เซลล์ ที่ 96 ชั่วโมงพบตัวอ่อนระยะ 16 เซลล์ถึงระยะมอรูลา ที่ 120 ชั่วโมง พบระยะคอมแพคมอรูลา และระยะบลาสโตซีส และที่ 144-168 ชั่วโมง พบตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (รูปที่ 6) ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทำ parthenogenetic ทุกใบจะขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นจะสังเกตได้จากเปลือกไข่มีขนาดบางลงและไข่ขยายใหญ่ขึ้น แต่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากวิธีนี้จะไม่สามารถเกิดการแฮชชิ่งออกมานอกเปลือกไข่ได้

ตารางที่ 1. การเจริญในหลอดแก้วของตัวอ่อน Parthenogenetic จากการกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD

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



รูปที่ 6. ตัวอ่อน Parthenogenetic a) ระยะ 8-เซลล์ และ 16 เซลล์ b) มอรูลา c) เออรีบลาสโตซีส และ d) บลาสโตซีส

3.5. ผลการผลิตตัวอ่อนแมวโคลนนิ่ง

หลังจากทำการเชื่อมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไข่และตรวจสอบการเชื่อมติดแล้วพบว่าเซลล์ผิวหนังหน้าท้องมีอัตราการเชื่อมติดระหว่างเซลล์ต้นแบบกับไข่ได้มากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู โดยเซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาวมีการเชื่อมติด 84.5% (224/265) เซลล์ใบหูแมวบ้านมีการเชื่อมติด 63.3% (119/188) และนำเฉพาะไข่ใบที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบอย่างสมบูรณ์มาแยก

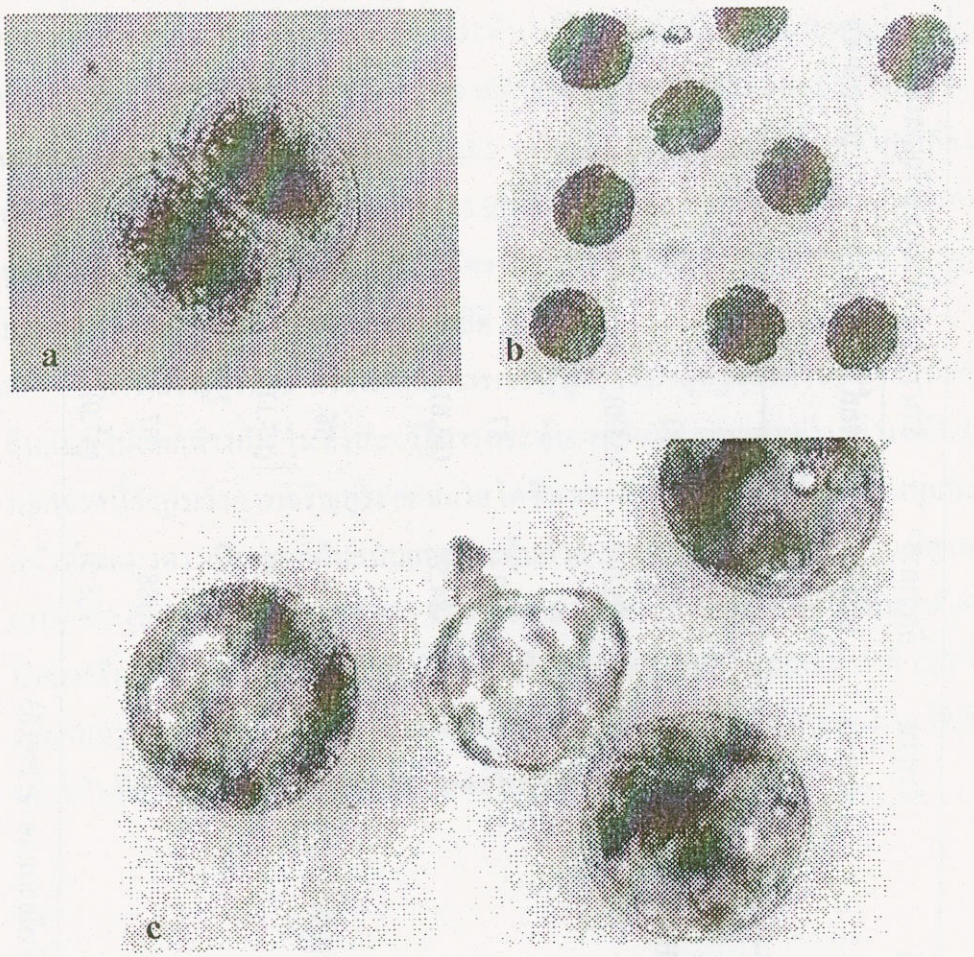
ออกเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกนำไปกระตุ้นให้ไข่แบ่งตัวด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และกลุ่มที่สองกระตุ้นด้วย CHX-CD หลังจากการกระตุ้นพบว่าตัวอ่อนแมวบ้านที่ใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD มีอัตราการแบ่งตัวใกล้เคียงกันกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วย CHX-CD เพียงอย่างเดียว (85.0% และ 84.5%) แต่ในตัวอ่อนแมวดาวพบว่าตัวอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วย CHX-CD อย่างเดียว มีอัตราการแบ่งตัวสูงกว่า 7% เอทานอล + CHX-CD (88.0% และ 77.5%) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

การเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์และการเจริญสู่ระยะมอรูลาของตัวอ่อนจากทั้งสองกลุ่มเซลล์ต้นแบบไม่แตกต่างกัน ในทั้งสองวิธีการกระตุ้น แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนแมวที่ใช้เซลล์ใบหูและเซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD มีสูงกว่ากระตุ้นด้วย CHX-CD เพียงอย่างเดียว (11.4 และ 9.25% ต่อ 5.2 และ 6.3%) (ตารางที่ 2) พบว่าตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งจะเจริญสู่ระยะ 8-16 เซลล์ ที่ 96 ชั่วโมง เจริญสู่ระยะ 16 เซลล์และมอรูลา ที่ 120 ชั่วโมง เจริญสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส และที่ 144-168 ชั่วโมง เจริญสู่ระยะบลาสโตซีสและแฮชชิ่งบลาสโตซีส ตัวอ่อนแมวระยะต่างๆ แสดงในรูปที่ 7

ตารางที่ 2 การเจริญของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูแมวบ้านเปรียบเทียบกับเซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบและกระตุ้นด้วย 7% เอทานอล + CHX-CD และ CHX-CD

เซลล์ต้นแบบ	จำนวนไข่เข้าเชื่อมเซลล์	อัตราเชื่อมติด (%)	กลุ่มกระตุ้น	จำนวนเข้าเลี้ยง	อัตราการแบ่งตัว (%)	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญสู่ระยะ		
						8-เซลล์	มอรูลา	บลาสโตซีส
EFC (แมวบ้าน)	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)
Skin cell (แมวดาว)	265	224 (87.5)	7% เอทานอล + CHX-CD	98	76 (77.5)	56 (57.1)	27 (35.5)	7 (9.2)
			CHX-CD	100	88 (88.0)	57 (57.0)	33 (37.5)	7 (7.9)

EFC = เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูแมวบ้าน, Skin cell = เซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาว; P>0.05



รูปที่ 7. การเจริญของตัวอ่อนแมวที่เลี้ยงในหลอดแก้วระยะต่างๆ

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

c) เออรีบลาสโตซีส-แฮชชิ่งบลาสโตซีสวันที่ (วันที่ 6-7)

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

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) ไข่ที่ถูกดูดนิวเคลียสออกทั้งหมดเท่านั้นจึงถูกนำมาใช้ในการโคลนนิ่ง วิธีที่สองคือ นำไข่ที่สุกแล้วใส่ลงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ CB แล้วตัดเปลือกไข่บริเวณเหนือ first polar body ให้ขาดออกด้วยปิเปตแก้ว แล้วกดไข่ให้ first polar body และไซโตพลาสซึมใต้ first polar body ทะลักออกมานอกไข่ประมาณ 10% (Parnpai และคณะ, 1999 และ 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) และแมว (Fahrudin และคณะ, 2001; Du และคณะ, 2002; Gomes และคณะ, 2002; Hwang และคณะ, 2000) หรือ Fusion electrode (Parnpai และคณะ, 1999; 2000; 2001; Miyoshi และคณะ, 2001; Lorthongpanich และคณะ, 2003) ข้อดีของการเชื่อมเซลล์ด้วย Fusion electrode คือสามารถจัดตำแหน่งเซลล์ต้นแบบให้เหมาะสมก่อนทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าได้ ทำให้ความสำเร็จในการเชื่อมเซลล์มีสูงขึ้นกว่าการใช้ Fusion chamber (Miyoshi และคณะ, 2001) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ Fusion electrode ในการผลิตตัวอ่อนแมวโคลนนิ่ง จากการทดลองพบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ผิวหนังหน้าท้องแมวดาวมีสูงกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูแมวบ้าน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะขนาดของเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังหน้าท้องแมวดาวมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ของแมวบ้าน ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับไซโตพลาสซึมของไข่มากกว่าจึงส่งผลให้อัตราการเชื่อมติดสูงกว่า

จากผลการทดลองพบว่าไข่แมวบ้านสามารถใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสำหรับแมวดาวได้ เนื่องจากเมื่อทำโคลนนิ่งแล้วตัวอ่อนแมวดาวสามารถแบ่งตัวและเจริญสู่ระยะต่างๆ ได้ไม่แตกต่างจากตัวอ่อนแมวบ้าน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเป็นสัตว์ในตระกูลเดียวกัน จึงทำให้สามารถเจริญได้ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน

ตัวอ่อนแมวดาวและตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งสามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสได้ในวันที่ 6-7 ของการเลี้ยงในหลอดแก้ว และเจริญสู่ระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสในวันที่ 7 แต่ตัวอ่อน Parthenogenetic ไม่สามารถเจริญจนถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสได้ เนื่องจากการแฮชชิ่งของตัวอ่อนต้องอาศัยการแสดงออกของยีนจากทั้งของพ่อและแม่ แต่ตัวอ่อน Parthenogenetic มีเฉพาะสารพันธุกรรมที่ได้จากแม่เท่านั้น จึงไม่สามารถเจริญจนถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสได้

ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวดาวโคลนนิ่งเปรียบเทียบกับการโคลนนิ่งแมวบ้าน ผลที่ได้พบว่าการเจริญของตัวอ่อนจากเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า

1. ไข่ของแมวบ้านสามารถใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสำหรับการทำโคลนนิ่งแมวดาวได้ และได้อัตราการเจริญของตัวอ่อนใกล้เคียงกับตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง
2. วิธีการกระตุ้นสองวิธีที่ใช้ในการทดลองให้ผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนแมวโคลนนิ่งไม่แตกต่างกัน
3. ตัวอ่อน Parthenogenetic สามารถเจริญได้สูงสุดถึงระยะเอ็กซ์แพนบลาสโตซีสเท่านั้น

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.

Chen, D.Y., Sun, Q.Y., and J.L. Liu. 1999. The giant panda (*Ailuropoda malanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. **Sci. Chin. Ser. C.** 42: 346.

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.

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.

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.

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

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.

Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., and M. Clinton. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. **Nature biotechnology** 19: 962-964.

Lorthongpanich, C.,Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., and Parnpai, R. 2003. Finding the optimum fusion parameter for cloning of cat embryos by using ear fibroblasts as donor cells. The 41st annual meeting proceeding. Kasetsart University. 84-88.

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.

Prather, R.S., Sims, M.M., and First, N.L. 1989. Nuclear transplantation in early embryos. **Biol. Reprod.** 41: 414-481.

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.

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.

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.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล : ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

วัน-เดือน-ปี เกิด : 7 มีนาคม 2502

สถานที่ทำงาน : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติการศึกษา :

ปริญญาตรี สาขาวิชาชีววิทยา	ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา	ประเทศไทย
ปริญญาโท สาขาวิชาสัตววิทยา	ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction	ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University	ประเทศญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

ประสบการณ์การฝึกอบรม :

สาขา Embryo transfer and in vitro fertilization in farm animals. ด้วยทุน British council
สถาบัน Cambridge University,U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 – กุมภาพันธ์ 2528

ประวัติการทำงาน :

1. 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. 1 พฤศจิกายน 2543 – ปัจจุบัน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ :

1. การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
2. การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ
3. Embryonic stem cell ในโค
4. Cell Technology

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์

วัน-เดือน-ปี เกิด : 10 ตุลาคม 2500

สถานที่ทำงาน : สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติการศึกษา :

ปริญญาตรี สาขาสัตวศาสตร์	ปีที่จบ 2523
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศไทย
ปริญญาโท สาขาวิชาสัตวแพทย์	ปีที่จบ 2525
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศไทย
ปริญญาเอก สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์	ปีที่จบ 2531
สถาบัน Tierärztliche Hochschule	ประเทศเยอรมัน

ประวัติการทำงาน :

1. 2525 – 2526	ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กรมปศุสัตว์
2. 2526 – 2531	ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
3. 2531 – 2535	ศูนย์ควบคุมคุณภาพชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์
4. 2535 – 2538	บริษัทแหลมทองสหการ จำกัด
5. 2538 – ปัจจุบัน	อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี