รหัสโครงการ SUT3-304-47-36-27

รายงานการวิจัย

การแช่แข็งโอโอไซท์แพะเพื่อทำโคลนนิ่งและการแช่แข็งตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

(Cryopreservation of goat oocytes for cloning and cryopreservation of cloned goat embryos)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

รศ.ดร.มณฑารพ ยมาภัย

รศ.น.สพ.มงคล โปร่งเจริญ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2547

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2553

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่เลี้ยงแพะและห้องสำหรับผ่าตัดเก็บไข่แพะ

ขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดทุกท่าน โดยเฉพาะดร. จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ดร. ชุติ เหล่าธรรมธร น.สพ.อนวัช แสงมาลี น.สพ.ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี นายสุเมธ อิ่มสุนทรรักษา น.ส. กนกวรรณ ศรีรัตนา น.ส. นุชจรินทร์ ศรีปัญญา น.ส. วันวิสาข์ ผิวสร้อย น.ส. ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ และบุคลากรในฟาร์มของศูนย์วิจัยฯ สำหรับการดูแลสุขภาพแพะตัวให้ไข่และตัวรับ การผ่าตัดเก็บไข่ การโคลนนิ่ง และการย้ายฝากตัวอ่อน

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

มิถุนายน 2553

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการทดลองเพื่อผลิตแพะโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ โดยนำเซลล์ใบหูจากแพะเพศผู้และเพศเมีย เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเพศเมีย 3 ตัว ฉีดเข้าในไข่แพะที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วทำการเชื่อมให้เซลล์ติดกันด้วยกระแสไฟฟ้า นำไข่ที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบมากระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี cytochalasin D และ cycloheximide เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มไฟโบรบลาสจากใบหู อัตราการแบ่งตัว อัตราการเจริญสู่ระยะ 2 และ 4 เซลล์ ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ ของตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์เพศผู้สูงกว่าเพศเมีย และเมื่อนำตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ ไปย้ายฝากให้แพะตัวรับ มีเพียงแพะตัวรับที่ได้รับตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้เท่านั้นที่ตั้งท้อง (2/15, 13.3%) ส่วนแพะตัวรับ 19 ตัว ที่ได้รับตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสเพศเมียไม่พบการตั้งท้อง เมื่อทำการผ่าตัดทำคลอดแพะตัวรับทั้งสอง ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมามีสุขภาพแข็งแรง แต่ลูกแพะตัวที่สองตายหลังจากคลอดได้ 32 ชั่วโมง เมื่อนำเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของลูกแพะโคลนนิ่งมาเป็นเซลล์ต้นแบบ พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะเพศผู้ แต่ไม่พบการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนให้แพะตัวรับจำนวน 12 ตัว สำหรับกลุ่มไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเพศเมีย 3 ตัว พบว่าอัตราการเชื่อมติด อัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญสู่ระยะ 2-8 เซลล์ มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามไม่พบการตั้งท้องของตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อน อย่างไรก็ตามรายงานนี้นับเป็นรายงานความสำเร็จครั้งแรกในประเทศไทย ที่สามารถผลิตลูกแพะโคลนนิ่งได้ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากไข่แพะแช่แข็งด้วยวิธี cryotop เมื่อนำไข่แช่แข็งมาทำการละลายพบว่าอัตรารอดชีวิตของไข่แช่แข็งต่ำกว่าไข่สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (92.4% และ 99.4% ตามลำดับ) และเมื่อทำการโคลนนิ่งพบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ต้นแบบกับไข่แช่แข็งและไข่สดไม่มีความแตกต่างกัน อัตราการแบ่งตัวและการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง และ parthenogenetic activation (PA) จากไข่แช่แข็งต่ำกว่าไข่สด อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญสู่ระยะมอรูล่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ได้จากการทำ PA ในกลุ่มไข่สด (10.4%) มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ เมื่อนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทำโคลนนิ่งและ PA ของกลุ่มไข่สดและไข่แช่แข็งมาทำการแช่แข็งและทำละลาย พบว่าตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็ง การศึกษาครั้งนี้นับเป็นรายงานแรกในการโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่แช่แข็งด้วยวิธี cryotop

Abstract

In this study, we demonstrated the production of cloned goats using ear fibroblasts and fetal fibroblasts as donor cell. The ear fibroblasts of male and female goat, fetal fibroblasts from 3 individuals were transferred into enucleated goat oocytes and fusion with electrical stimuli. Then, the fused oocytes were activated with 7% ethanol for 5 min followed by incubated in cycloheximide and cytochalasin D for 5 h. After activation, the reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium for 32-36 h. For ear fibroblasts group, the rates of cleavage, development to 2- and 4-cell were no significant difference but the development to 8-cell of embryo derived from male ear fibroblasts was significant higher than that of female ear fibroblasts. The 2-8 cell stage embryos were surgically transferred into the oviducts of recipients. Only the recipients carried male cloned goat embryos were pregnant (2/15, 13.3%). On the other hand, 19 recipients of cloned embryos derived from female fibroblasts were not pregnant. Both pregnant recipients delivered two healthy male kids by Caesarean section. Both kids were phenotypically and genotypically identical to the donor. Unfortunately, one kid died 32 h after birth. Ear fibroblasts from cloned goat newborn were used as donor cell. We found that the development to 8-cell was higher than that from male ear fibroblasts. However, no pregnant recipient was found after transferred embryos to 12 recipients. In fetal fibroblasts from different 3 fetuses, there was no significant difference in the rates of fusion and cleavage but the development to 2-8 cell stages were significant difference when compared among groups. However, no pregnant recipient was found after embryo transfer. This is the first report of successful birth of cloned goat in Thailand. In this study, we examined the developmental potential of cloned goat embryos from vitrified oocytes by Cryotop method. After thawing, the survival rate of vitrified oocytes was significantly lower than fresh oocytes (92.4% and 99.4% respectively). When vitrified oocytes were used as recipient cytoplasm for cloning, the result shown that there was no significant different on fusion rate between vitrified and fresh oocytes. The cleavage and development to 8-cell stage rates of cloned and parthenogenetic activation (PA) embryos derived from vitrified oocytes were significantly lower than that fresh ooctyes. However, there was no significant different on development to morula stage among groups. Moreover, the blastocyst rate of PA embryos derived from fresh oocytes was significantly higher than other groups (10.4%). Vitrified cloned and PA embryos at blastocyst stage could not recovery after thawing. This is the first report of goat cloning using vitrified oocytes by Cryotop method.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ .....ก
บทคัดย่อ .....ข
Abstract .....ค
สารบัญ .....ง
สารบัญตาราง .....ฉ
สารบัญภาพ .....ช

บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น 3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 การทดลองที่ 1 การโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่สด 6
3.1.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ 6
3.1.2 การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ 7
3.1.3 การดูดนิวเคลียสออก 9
3.1.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์ 10
3.1.5 การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว 11
3.1.6 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแพะตัวรับ และการย้ายฝากตัวอ่อน 11
3.1.7 การคำนวณค่าทางสถิติ 12
3.2 การทดลองที่ 2 การโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่แพะแช่แข็งและ
การแช่แข็งตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง 13
3.2.1 การเตรียมไข่แพะ 13
3.2.2 การแช่แข็งไข่และการละลาย 13
3.2.3 วิธีตรวจสอบการรอดชีวิตของไข่หลังการละลาย 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4 การผลิตตัวอ่อนแพะโดยวิธีโคลนนิ่ง.....14
3.2.5 การผลิตตัวอ่อนแพะโดยวิธี Parthenogenetic activation 14
3.2.6 การแช่แข็งตัวอ่อนและการละลาย.....14
3.2.7 การคำนวณค่าทางสถิติ.....14
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และข้อวิจารณ์
4.1 ผลการทดลอง.....15
4.1.1 ผลการทดลองที่ 1.....15
4.1.2 ผลการทดลองที่ 2.....17
4.2 ข้อวิจารณ์.....18
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการวิจัย 34
5.2 ข้อเสนอแนะ.....34
บรรณานุกรม.....35
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก: ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์จากการวิจัยในครั้งนี้.....42
ประวัติผู้วิจัย.....43

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
4.1	จำนวนไข่ที่เก็บจากแพะตัวให้และจำนวนไข่สุกที่เก็บได้	21
4.2	ผลของเพศเซลล์ต้นแบบไฟโบรบลาสใบหูต่อการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง	21
4.3	ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะเพศผู้	22
4.4	ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะเพศเมีย	23
4.5	สรุปผลการย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง	24
4.6	อัตราการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูลูกแพะโคลนนิ่ง (น้องกาย) เป็นเซลล์ต้นแบบ	24
4.7	ผลการย้ายฝากตัวอ่อนจากการทำ re-cloning แพะ	25
4.8	ผลของการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมีย 3 ตัว ต่อการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง	26
4.9	ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมียตัวที่ 1	27
4.10	ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมียตัวที่ 2	27
4.11	ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมียตัวที่ 3	28
4.12	อัตรารอดชีวิตของไข่แช่แข็งหลังการทำละลาย	28
4.13	การเจริญเติบโตของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ได้จากไข่สดและไข่แช่แข็ง	29

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสใบหู	7
3.2	โปรแกรมการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ตกไข่เป็นจำนวนมากของแพะตัวให้ไข่และแพะตัวรับ	8
3.3	การเก็บไข่โดยวิธีผ่าตัด	9
3.4	ไข่แพะ	9
3.5	การดูดนิวเคลียสออก	10
3.6	การฉีดเซลล์ต้นแบบ	11
3.7	การเชื่อมเซลล์	11
3.8	ตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง	12
3.9	การย้ายฝากตัวอ่อน	12
3.10	รูปร่างของ Cryotop	13
4.1	ลูกแพะโคลนนิ่งตัวที่ 1	30
4.2	แพะโคลนนิ่ง "น้องกาย"	30
4.3	ลูกแพะโคลนนิ่งตัวที่ 2	31
4.4	การย้อมสีเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของไข่แพะด้วย FDA	31
4.5	ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส	32
4.6	การย้อมสีเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนแพะด้วย FDA	33

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย

แม้ว่าจะมีรายงานความสำเร็จการโคลนนิ่งแพะแล้วก็ตาม (Baguisi et al., 1999; Reggio et al., 2001; Keefer et al., 2002) แต่ยังไม่มีรายงานการแช่แข็งไข่แพะเพื่อทำโคลนนิ่งและแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งแพะ สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการวิจัยโคลนนิ่งแพะ ดังนั้นจึงควรวิจัยเพื่อผลิตลูกแพะโคลนนิ่ง เพื่อเป็นฐานความรู้ในการวิจัยขั้นสูงต่อยอด เพื่อใช้แพะเป็น Bioreactor ผลิตโปรตีนทางการแพทย์ไว้ใช้เองในประเทศ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีราคาแพงมากและมีความต้องการใช้เป็นจำนวนมาก เช่น Human serum albumin, Factor VIII, Factor IX, Antithrombin III, Human alpha antitrypsin นอกจากนี้ควรวิจัยและพัฒนาการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนแพะเพื่อประโยชน์ในการเก็บรักษาพันธุกรรมแพะไว้ใช้งานในอนาคต การได้ข้อมูลการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งจะเป็นฐานความรู้ในการทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ เพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ป่าหายากตระกูลเดียวกับ แพะเช่น เลียงผา ได้อีก ซึ่งมีรายงานการเกิดลูกกระทิงจากการทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ระหว่างกระทิงกับโคมาแล้ว (Lanza et al., 2000)

ความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง ปัจจัยอย่างหนึ่งคือ ชนิดเซลล์ต้นแบบที่นำมาใช้ในการทำโคลนนิ่ง ซึ่งมาจากหลากหลายแหล่งเช่น เซลล์เยื่อบุเต้านม เซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนัง เซลล์ที่ได้จากตัวอ่อนและลูกอ่อน เป็นต้น จึงมีการศึกษาผลของเซลล์ต้นแบบต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่งในสัตว์หลายชนิดเช่น Yang และคณะ (2007) รายงานว่าชนิดของเซลล์ต้นแบบมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระต่ายโคลนนิ่ง การโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ลูกอ่อนได้อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการใช้เซลล์จากตัวเต็มวัย (Chavatte-Palmer et al., 2002; Heyman et al., 2002) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งที่ได้จากการใช้เซลล์ต้นแบบจากลูกอ่อนและตัวเต็มวัยไม่มีความแตกต่างกัน (Srirattana et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนบันเต็งที่ผลิตจากเซลล์เพศผู้มีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์เพศเมีย (Sansinena et al., 2005) อีกทั้งยังมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าการทำโคลนนิ่งซ้ำ (re-cloning) ในรอบที่ 2 สามารถลดอัตราแท้งและความผิดปกติหลังคลอดของลูกสัตว์โคลนได้ (Robertson et al., 1997) ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งแพะ จึงควรศึกษาชนิดและเพศของเซลล์ต้นแบบที่เหมาะสม อีกทั้งควรศึกษาการทำ re-cloning ในการทำโคลนนิ่งแพะ เพื่อให้เกิดผลสำเร็จในการทำโคลนนิ่งสูงสุด

เนื่องจากการแช่แข็งไข่ระยะ metaphase II (MII) มีความยากกว่าการแช่แข็งตัวอ่อนเนื่องจาก metaphase spindle มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเกิดการบาดเจ็บจากการแช่แข็งได้ง่าย

(Shaw et al., 2000) ดังนั้นความสำเร็จในการแช่แข็งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การเลือกวิธีการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนขึ้นอยู่กับข้อดี ความสะดวกของแต่ละวิธี อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับจำนวนไข่หรือตัวอ่อนที่ต้องการแช่แข็ง ยกตัวอย่าง เช่น การแช่แข็งแบบหยด (หยดไข่พร้อมน้ำยาแช่แข็งลงไปในไนโตรเจนเหลว) หรือวิธี solid-surface vitrification (SSV, หยดไข่พร้อมน้ำยาแช่แข็งลงไปบนโลหะที่แช่ในไนโตรเจนเหลว) เป็นวิธีที่มีราคาถูก สามารถแช่แข็งไข่หรือตัวอ่อนได้ครั้งละมากๆในเวลาอันสั้น โดยสามารถทำเป็นหยดน้ำยาเล็กๆหลายๆอัน (1-2 µl) แต่อย่างไรก็ตาม การควบคุมให้ขนาดของน้ำยาเท่ากันเป็นเรื่องที่ยาก ต้องอาศัยประสบการณ์สูง อีกทั้งไข่หรือตัวอ่อนอาจมีการสูญหายได้ เนื่องจากไข่หรือตัวอ่อนไปเกาะอยู่บริเวณพื้นผิวของปิเปตแก้วตอนทำหยดน้ำยา ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะกับการแช่แข็งไข่หรือตัวอ่อนปริมาณมากๆ (จำนวนหลักร้อย) อีกทั้งยังประหยัดเวลาอีกด้วย ส่วนวิธีแช่แข็งโดยการใช้ Cryotop จะวางไข่หรือตัวอ่อนลงบนแผ่นพลาสติกบางๆ โดยจะให้มีน้ำยาแช่แข็งน้อยที่สุด แล้วจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว (Kuwayama and Kato, 2000) โดยวิธีนี้มีความแม่นยำในการควบคุมปริมาณ น้ำยาแช่แข็งและจำนวนไข่หรือตัวอ่อน อีกทั้งยังจัดเก็บง่าย อย่างไรก็ตามจำนวนไข่หรือตัวอ่อนที่สามารถวางบน Cryotop มีจำนวนจำกัดและการแช่แข็งไข่หรือตัวอ่อนจำนวนมากจะใช้เวลานาน ดังนั้นในการทดลองนี้จะใช้วิธี Cryotop ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้างธนาคารไข่แพะ

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดของเซลล์ต้นแบบที่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งและอัตราการตั้งท้องหลังจากการย้ายฝาก

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแพะที่โคลนนิ่งโดยใช้ไข่สดและที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว

1.2.4 เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการแช่แข็งไข่แพะ

1.2.5 เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับอัตราการตั้งท้องและคลอดลูกแพะจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

นำไข่แพะระยะเมตาเฟสทู (MII) ซึ่งเป็นไข่ที่สุกแล้ว มาแช่แข็งโดยวิธี Vitrification โดยใช้ Cryotop เพื่อศึกษาอัตรารอดของไข่หลังจากทำละลาย จากนั้นจึงนำไข่ที่ได้ไปทำเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับในการทำโคลนนิ่ง การพัฒนาของตัวอ่อนสู่ระยะต่างๆและอัตราการตั้งท้องจะถูกบันทึกผลเพื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากไข่ที่ไม่ถูกแช่แข็ง

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

ศึกษาอัตรารอดของไข่แพะหลังการแช่แข็ง และศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ใช้ไข่แช่แข็งเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับโดยเปรียบเทียบกับไข่ที่ไม่ได้แช่แข็ง

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ได้ธนาคารไข่แพะ

1.5.2 สามารถทราบอัตรารอดของไข่แพะหลังจากการแช่แข็ง

1.5.3 สามารถทราบอัตราการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากการใช้ไข่สดและไข่แช่แข็งเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ

1.5.4 สามารถทราบอัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

1.5.5 ผลการศึกษาวิจัยที่ได้จะเป็นฐานความรู้ในการประยุกต์ใช้สำหรับการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ สำหรับการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ป่าใกล้สูญพันธุ์

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

นับจากผลความสำเร็จในการโคลนนิ่งแกะ (Willadsen, 1986); โค (Prather et al., 1987) และสุกร (Prather et al., 1989) จากความสำเร็จเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายต่างพยายามวิจัย เพื่อพัฒนาเทคนิคการทำโคลนนิ่งโดยเฉพาะในโค ซึ่งเป็นปศุสัตว์ที่มีความสำคัญทั้งด้านเนื้อและนม จนในที่สุดสามารถทำโคลนนิ่งโคเชิงการค้าได้ (Bondioli et al., 1990; Bondioli, 1993; Stice and Keefer, 1993) ประมาณกันว่าจำนวนลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาทั่วโลกจนถึงปี 2538 มีอยู่ระหว่าง 1,000 ถึง 2,000 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตในบริษัทเอกชนแถบอเมริกาเหนือ (Seidel, 1995) ซึ่งทั้งหมดนี้ยังคงใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบจนกระทั่งเดือนมีนาคม 2540 ได้มีรายงานการเกิดของลูกแกะดอลลี จากการโคลนนิ่งด้วยเซลล์จากต่อมน้ำนมของแกะโตเต็มวัย (Wilmut et al., 1997) นับจากนั้นเป็นต้นมานักวิทยาศาสตร์ต่างพยายามทำโคลนนิ่งในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบจนประสบความสำเร็จในหนูถีบจักร (Wakayama et al., 1998) โค (Kato et al., 1998; Cibelli et al., 1998; Vignon, et al., 1999; Wells et al., 1999; Zakhartchenko et al. 1999) แพะ (Baguisi et al., 1999; Reggio et al., 2001; Keefer et al., 2002) สุกร (Onishi et al., 2000; Polejaeva et al., 2000) แมว (Taeyoung et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการโคลนนิ่งกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน เซลล์ใบหูและเซลล์แกรนนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ (รังสรรค์และคณะ 2543b; Parnpai et al. 1999; Parnpai et al., 2000a; Parnpai et al., 2000b; Parnpai et al., 2002) ในประเทศไทย ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และทีมงานได้ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์แบรงกัสเป็นเซลล์ต้นแบบจนได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาในวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์และรายที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันพันธุ์เป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2544 นับเป็นความสำเร็จของการโคลนนิ่งโคพันธุ์บราห์มันรายแรกของโลก (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000; http://www.vet.chula.ac.th)

แพะ (*Capra aegagrus*) เป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สามารถบริโภคได้ทั้งน้ำนม และเนื้อ เนื่องจากแพะเป็นสัตว์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ประกอบกับระยะเวลาในการตั้งท้องไม่นานนัก และสามารถผลิตน้ำนมได้ดี นับตั้งแต่ Baguisi และคณะ (1999) รายงานความสำเร็จในการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งครั้งแรกของโลก โดยใช้เซลล์ลูกอ่อนเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ หลังจากนั้นมีรายงานความสำเร็จในการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์จากแหล่งต่างๆเป็นเซลล์ต้นแบบ เช่น Keefer และคณะ 2001 รายงานว่าเมื่อย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ลูกอ่อนเพศผู้ไปให้แพะตัวรับ 8 ตัว พบว่ามีแพะตัวรับตั้งท้อง 4 ตัว คิดเป็น 50% และได้ลูกเกิด 5 ตัว (ลูกแฝด 1 คู่) ต่อมา

ในปี 2002 Keefer และคณะ ได้ทำการโคลนนิ่งแพะโดยใช้เซลล์แกรนูโลซ่าและเซลล์จากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ หลังจากฝากตัวอ่อนระยะ1 เซลล์ ให้กับตัวรับ 8 และ 6 ตัว ตามลำดับ พบว่าแพะตัวรับตั้งท้องจำนวน 4 (50%) และ 1 (17%) ตัว ตามลำดับ แพะตัวรับทุกตัวสามารถตั้งท้องจนครบกำหนดคลอด ได้ลูกแพะทั้งหมด 7 (ลูกแฝด 3 คู่) และ 2 (ลูกแฝด) ตัว ตามลำดับ ทางผู้วิจัยได้สรุปว่าเซลล์จากตัวโตเต็มวัยสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่งแพะได้ ในปีเดียวกัน Ohkoshi และคณะ (2003) ได้ทำการโคลนนิ่งแพะโดยใช้เซลล์จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าของแพะตัวเต็มวัย และใช้ไข่แพะที่ได้จากการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว พบว่าอัตราการเชื่อมเซลล์ 70% อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสเป็น 3% อีกทั้งยังได้ลูกแพะเกิด 1 ตัว แต่เสียชีวิต 16 วัน หลังคลอด นอกจากนี้ Chen และคณะ (2007) รายงานความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีอัตราการตั้งท้อง 27% และมีอัตราการคลอด 83%

ในปี 2001 Isachenko และคณะ ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งไข่อ่อนแพะระยะ GV ด้วยวิธี open pull straw (OPS) ต่อมา Begin และคณะ (2003) ได้ทำการทดลองแช่แข็งไข่แพะระยะ MII พบว่าไข่แพะที่แช่แข็งด้วยวิธี SSV มีอัตรารอดชีวิตต่ำกว่ากลุ่ม control แต่ไข่แพะที่แช่แข็งด้วยวิธี cryoloop vitrification (CLV) มีอัตรารอดชีวิตไม่ต่างจากกลุ่ม control ทั้งนี้ยังมีรายงานการแช่แข็งตัวอ่อนแพะระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยวิธี OPS (El-Gayar และคณะ, 2001; Guignot และคณะ, 2006; Hong และคณะ, 2007; Yacoub และคณะ, 2010) นอกจากนี้มีรายงานว่าไข่โคแช่แข็งด้วยวิธี cryotop มีอัตราการรอดชีวิตหลังการละลายสูง (Dinnyes และคณะ, 2000; Chian และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการแช่แข็งไข่แพะโดยใช้วิธี cryotop

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 การโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่สด

3.1.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

3.1.1.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบจากใบหู

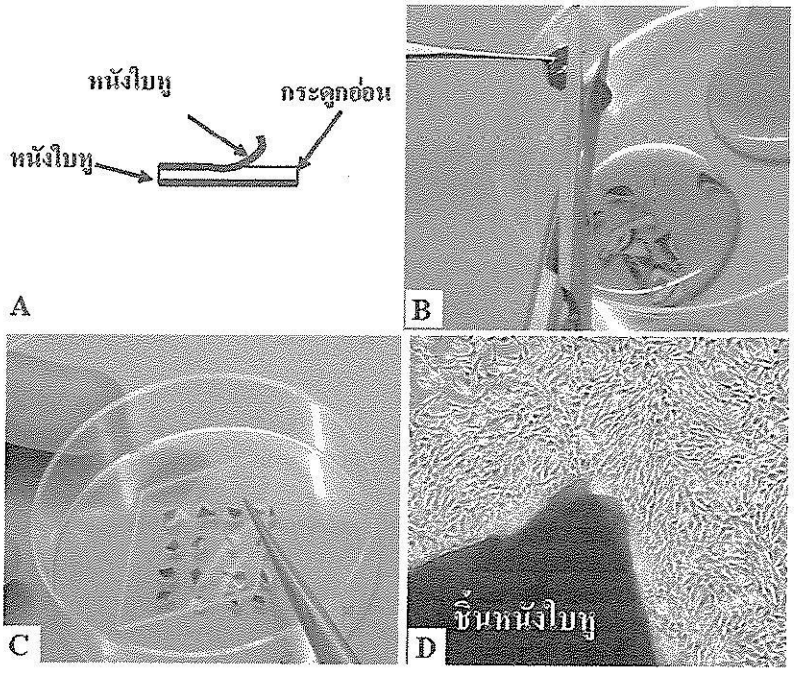
เก็บตัวอย่างหนังจากใบหูของแพะเพศผู้และเพศเมีย โดยแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อชิ้นใบหูด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อน แล้วตัดให้มีขนาด 1 x 1 มม. แล้วนำมาวางบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm ปิดด้วยกระจกแก้ว แล้วเติมน้ำยา Alpha Minimum Essential Medium (αMEM, Sigma, M-7145) + 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098) ปริมาณ 5 ml แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4–5 ของการเลี้ยง (ภาพที่ 3.1) ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ แล้วนำเซลล์ที่ passage 3 มาแช่แข็งโดยใช้น้ำยา αMEM + 10% FBS + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Germany, 116743) แล้วเก็บเซลล์ไว้ในไนโตรเจนเหลว

3.1.1.2 การเตรียมเซลล์ต้นแบบจากลูกอ่อน

เก็บเนื้อเยื่อร่างกายของลูกอ่อนแพะเพศเมียอายุ 40 วัน จำนวน 3 ลูกอ่อน แล้วนำมาทำแยกกันโดยนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปบ่มใน 0.25% trypsin (Sigma, T-4799) / EDTA (Sigma, E-4884) นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วย αMEM + 10% FBS ที่ 600 x g นาน 5 นาที แล้วจึงเลี้ยงเซลล์ใน αMEM + 10% FBS ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์เจริญจนเต็มจานเลี้ยง ก็ทำการเก็บเซลล์ เพิ่มปริมาณเซลล์ แช่แข็งเช่นเดียวกับเซลล์ใบหู

ก่อนใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่ง จะนำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา αMEM + 10% FBS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย 0.25% Trypsin /EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

สำหรับการเตรียมเซลล์ต้นแบบสำหรับการ recloning ทำโดยเก็บตัวอย่างเซลล์ใบหูจากแพะโคลนนิ่ง โดยวิธีการเลี้ยงเซลล์ การแช่แข็งทำตามวิธีเดียวกับที่ได้กล่าวข้างต้น

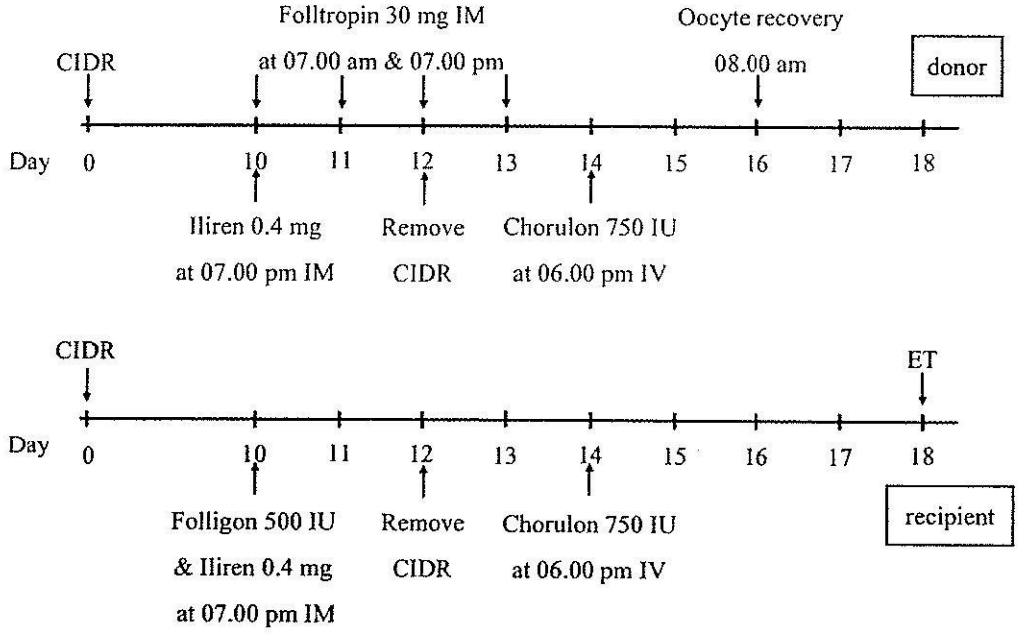


ภาพที่ 3.1 การเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสใบหู (A) การลอกหนังใบหูออกจากกระดูกอ่อน (B) การตัดชิ้นหนังใบหู (C) การวางชิ้นหนังใบหูบนจานเลี้ยงเซลล์และปิดด้วยกระจก (D) เซลล์ไฟโบรบลาสเจริญออกมาจากชิ้นใบหู

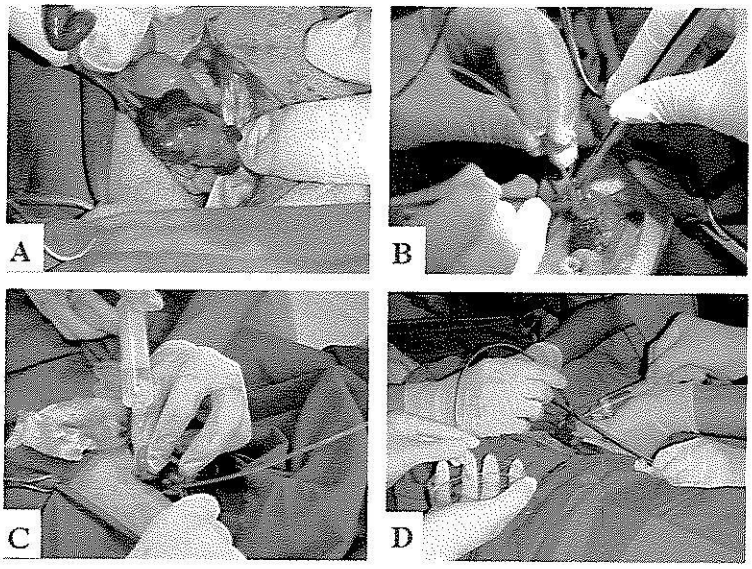
3.1.2 การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

ใช้แพะลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองเพศเมีย อายุ 8-12 เดือน มาทำเป็นแพะตัวให้ไข่ ทำการกระตุ้นให้ตกไข่จำนวนมาก โดยเริ่มจากสอด CIDR® (Pfizer Animal Health, New Zealand) ไว้ในช่องคลอดแพะเป็นเวลา 10 วัน จึงเริ่มฉีดฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH, Folltropin®, BIONICHE) 30 mg เข้ากล้ามเนื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง รวม 8 ครั้ง ในครั้งที่ 2 ของการฉีด FSH จะฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา ($PGF_{2\alpha}$, Iliren®, Intervet) 0.4 mg เข้ากล้ามเนื้อ และในครั้งที่ 6 ของการฉีด FSH ทำการดึง CIDR® ออกจากช่องคลอดของแพะ หลังจากการฉีด FSH ครั้งสุดท้าย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะฉีดฮอร์โมน Human Chlorionic Gonadotropin (HCG, Chlorulon®, Intervet) 750 IU ให้แก่แพะผ่านทางเส้นเลือดดำ (ภาพที่ 3.2) หลังจากฉีด hCG เป็นเวลา 38 ชั่วโมง ทำการเก็บไข่ด้วยวิธีผ่าตัด โดยสอดท่อเทปล่อนเข้าไปตรงปากแตรของท่อนำไข่ ส่วนปลายท่ออีกด้านหนึ่งจะถูกรองรับไว้ด้วยจานเลี้ยงเซลล์เพื่อรองรับไข่ที่ชะล้างได้ ใช้กระบอกฉีดยาซึ่งภายในบรรจุน้ำยา modified Dulbecco phosphate buffer saline (mDPBS) ที่เติมด้วย 1% FBS ที่ต่อกับเข็มฉีดยาฉีดตรงปลายปีกมดลูกเข้าไปทางท่อนำไข่ด้านที่สอดท่อเทปล่อนไว้เพื่อชะล้างไข่ออกมา (ภาพที่ 3.3) ในกรณีที่พบถุงไข่ค้างบนรังไข่จะใช้กระบอกฉีดยาซึ่งภายในบรรจุน้ำยา mDPBS เจาะดูดไข่ จากนั้นตรวจหาไข่ที่ชะล้าง (ภาพที่ 3.4A) และเจาะดูด (ภาพที่ 3.4B) ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เก็บไข่

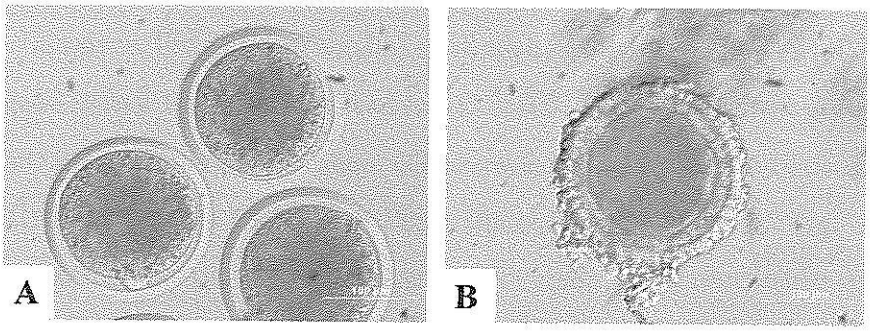
ที่ตรวจพบไว้ในน้ำยา Emcare® holding (ICP Bio, ECHM-500) นำไข่ที่เก็บได้มาเลี้ยงในน้ำยาซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical) และ 1 µg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air สำหรับไข่ที่ได้จากการชะล้างจะเลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง ส่วนไข่ที่ได้จากการเจาะดูดจะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.2 โปรแกรมการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ตกไข่เป็นจำนวนมากของแพะตัวให้ไข่และแพะตัวรับ



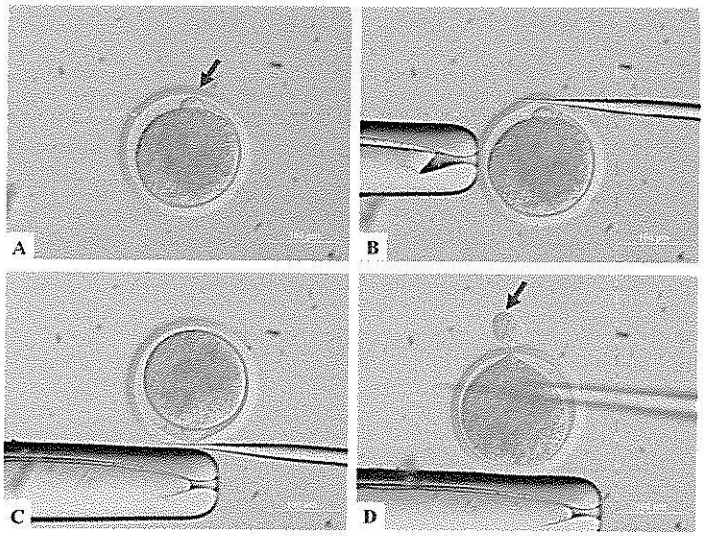
ภาพที่ 3.3 การเก็บไข่โดยวิธีผ่าตัด (A) รังไข่แพะหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ทำชะล้างเก็บโดยสอดท่อเทปล่อนเข้าไปในปากแตร (B) แล้วฉีด mDPBS + 1% PBS เข้าปีกมดลูก (C) ไข่จะถูกชะล้างออกมาทางปลายท่ออีกด้านหนึ่งซึ่งรองรับด้วยจานเลี้ยงเซลล์ (D)



ภาพที่ 3.4 ไข่แพะ (A) ไข่แพะที่ได้จากการชะล้าง (B) ไข่แพะที่ได้จากการเจาะดูด

3.1.3 การดูดนิวเคลียสออก

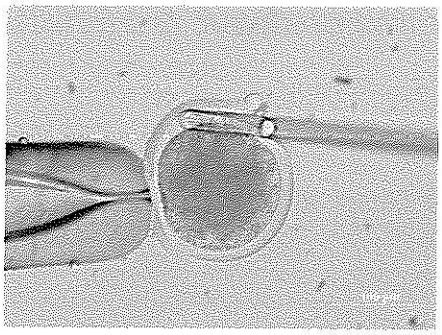
นำไข่ที่เลี้ยงไว้มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.1% hyaluronidase (Sigma, S-3506) แล้วคัดเลือกไข่ที่สุก (มี first polar body) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (ภาพที่ 3.5) ในน้ำยาที่มี 5 μg/ml cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ทำการตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 μg/ml Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอุลตราไวโอเลต



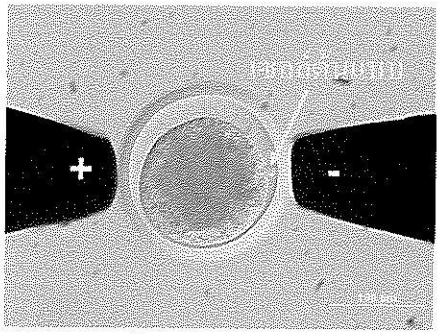
ภาพที่ 3.5 การดูดนิวเคลียสออก (A) ไข่แพะสุก ที่มี first polar body (ลูกศรชี้) (B, C) ทำการตัดเปลือกไข่เหนือตำแหน่งของ first polar body (D) กด first polar body และไซโตพลาสซึมใต้ first polar body ออก

3.1.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline space (ภาพที่ 3.6) จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmerman fusion medium (Zimmermann และ Vienken, 1982) เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 volt นาน 15 μsec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน (ภาพที่ 3.7) หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emcare® holding 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมงจึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol (Carlo Erba, 414607) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 μg/ml cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ 10 μg/ml cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Muenthaisong และคณะ, 2007)



ภาพที่ 3.6 การฉีดเซลล์ต้นแบบ



ภาพที่ 3.7 การเชื่อมเซลล์

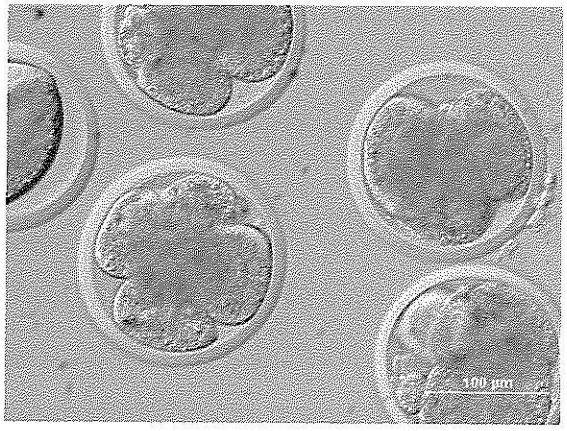
3.1.5 การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา modified oviduct synthetic fluid with amino acids (mSOFaa, Gardner และคณะ, 1994) ที่เติม 3 mg/ml fatty acid free BSA ในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 in air เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้กับแพะตัวรับ

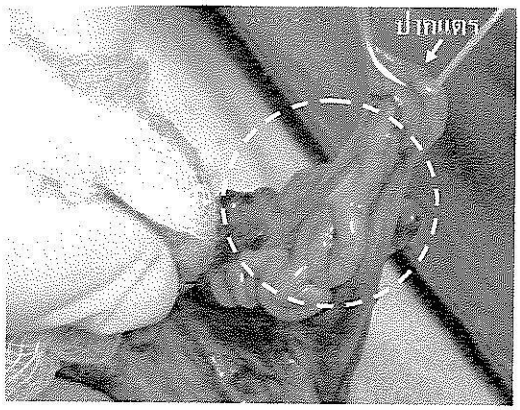
3.1.6 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแพะตัวรับ และการย้ายฝากตัวอ่อน

ใช้แพะลูกผสมพันธุ์พื้นเมือง เพศเมีย อายุ 10-12 เดือน มาทำเป็นตัวรับ โดยทำการกระตุ้นเหมือนแพะตัวให้ไข่ แต่ฉีด 500 IU equine chlorionic gonadotropin (eCG, Folligon®, Intervet) ครั้งเดียวในวันที่ 10 หลังจากสอด CIDR แทนการฉีด FSH (ภาพที่ 3.2) ในชั่วโมงที่ 86 หลังจากฉีด hCG แพะตัวรับจะถูกวางยาสลบ และผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อน โดยนำตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง ระยะ 2 ถึง 8 เซลล์ (ภาพที่ 3.8) ไปล้างในน้ำยา Emcare® holding 6 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน ในท่อย้ายฝาก (Intratubal Transfer Catheter, COOK®) ก่อนนำปลายท่อย้ายฝากสอดผ่านปากแตรเข้าไปในท่อนำไข่ของตัวรับ (ภาพที่ 3.9) แล้วจึงปล่อยตัวอ่อนที่ท่อนำไข่ทั้งสอง

ข้างๆ ละ 3-7 ตัวอ่อน หลังย้ายฝากตัวอ่อน 30 วันจะทำการตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอุลตร้าซาวด์ (Pie Medical)



ภาพที่ 3.8 ตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง



ภาพที่ 3.9 การย้ายฝากตัวอ่อน

3.1.7 การคำนวณค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

3.2 การทดลองที่ 2 การโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่แพะแช่แข็ง

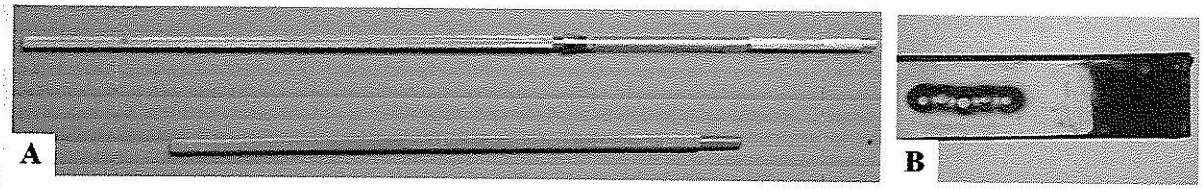
3.2.1 การเตรียมไข่แพะ

การเตรียมไข่แพะทำตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.1.2 กล่าวโดยย่อคือ ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นแพะตัวให้เพื่อให้มีการเจริญของไข่ครั้งมากๆ แต่ไม่ฉีด HCG เนื่องจากไม่ต้องการให้ไข่ตก เพราะในการทดลองนี้จะเจาะดูดไข่จากรังไข่ แล้วนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่เพื่อให้ไข่ทุกใบสุกในระยะเวลาใกล้เคียงกัน จากนั้นคัดเฉพาะไข่สุก เพื่อนำไปแช่แข็งในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การแช่แข็งไข่และการละลาย

ทำการแช่แข็งไข่โดยคัดเฉพาะไข่สุก นำมาแช่ในน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS, 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, D1435) และ 10% ethylene glycol (EG, Sigma, 102466) นาน 1 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS, 20% DMSO, 20% EG และ 0.5 M sucrose (Sigma, S1888) นาน 30 วินาที แล้วย้ายไข่จำนวน 5 ใบไปวางไว้บน Cryotop (ภาพที่ 3.10, Kitazato Supply, Tokyo, Japan) จากนั้นจุ่มปลาย Cryptop ที่มีไข่อยู่ลงในโตรเจนเหลวทันที จากนั้นนำ Cryotop ไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว

ไข่ที่ถูกแช่แข็งจะนำมาละลายโดยจุ่มปลาย Cryotop ลงในน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS และ 0.5 M sucrose อุณหภูมิ 37°C นาน 5 นาที จากนั้น ย้ายไข่ไปยังน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS นาน 5 นาที จากนั้นนำไปเลี้ยงในน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS ภายใต้อุณหภูมิ 38.5°C ที่ 5% CO_2 in air นาน 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.10 รูปร่างของ Cryotop (A) Cryotop (B) ปลายของ Cryotop ที่มีไข่อยู่

3.2.3 วิธีตรวจสอบการรอดชีวิตของไข่หลังการละลาย

หลังจากทำละลายและเลี้ยงในน้ำยา 1 ชั่วโมง ไข่จะถูกตรวจสอบการรอดชีวิตโดยวิธีการย้อมด้วย fluorescein diacetate (FDA) ตามวิธีของ Morh และ Trounson (1980) โดยแช่ไข่ในน้ำยา PBS ที่มี 2.5 µg/ml FDA และ 5 mg/ml BSA ที่ 38.5°C นาน 2 นาที (ไม่ให้ถูกแสง) จากนั้นล้างในน้ำยา PBS ที่มี 5 mg/ml BSA 3 ครั้ง แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวจะเป็นไข่ที่ยังมีชีวิต และคัดเฉพาะไข่ที่มีชีวิตนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยไข่กลุ่มนี้จะเรียกว่าไข่แช่แข็ง

3.2.4 การผลิตตัวอ่อนแพะโดยวิธีโคลนนิ่ง

ไข่สุกที่ใช้ในการโคลนนิ่งจะมีด้วยกัน 2 กลุ่ม คือ ไข่สด กับ ไข่แช่แข็ง โดยกลุ่มไข่สดจะผ่านการย้อม FDA เหมือนกับกลุ่มไข่แช่แข็ง การผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งทำตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.1.3-3.1.4 เลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา mSOFaa ที่เติม 3 mg/ml fatty acid free BSA ในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 in air เป็นเวลา 7 วัน โดยบันทึกการเจริญของตัวอ่อนทุกวัน

3.2.5 การผลิตตัวอ่อนแพะโดยวิธี Parthenogenetic activation

ในการทดลองนี้จะใช้ตัวอ่อนที่ได้จากการทำ Parthenogenetic activation (PA) เป็นกลุ่มควบคุม โดยนำไข่สุกทั้งในกลุ่มของไข่สดและไข่แช่แข็งมาทำการกระตุ้นให้แบ่งตัวโดยกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 µg/ml CD และ 10 µg/ml CHX ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนดังวิธีในข้อ 3.1.5

3.2.6 การแช่แข็งตัวอ่อนและการละลาย

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของกลุ่มไข่สดและไข่แช่แข็งมาทำการแช่แข็งและละลายตามวิธีในข้อ 3.2.2

หลังจากละลาย นำตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อน จากนั้นที่ชั่วโมงที่ 72 ของการเลี้ยง นำตัวอ่อนมาทำการย้อมตรวจสอบด้วยสี FDA เพื่อบันทึกอัตรารอดของตัวอ่อน ดังวิธีในข้อ 3.2.3

3.2.7 การคำนวณค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการทดลองที่ 1

4.1.1.1 ผลของเพศของเซลล์ต้นแบบต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

การเตรียมไข่แพะเพื่อใช้เป็นไซโตพลาสซึมในการโคลนนิ่งสำหรับกลุ่มที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ จากการกระตุ้นแพะตัวให้ไข่จำนวน 27 ตัว สามารถเก็บไข่ได้ทั้งหมด 191 ใบ เมื่อนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาพบว่าได้ไข่สุก 169 ใบ (88.5%) สำหรับกลุ่มที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ จากการกระตุ้นแพะตัวให้ไข่จำนวน 36 ตัว สามารถเก็บไข่ได้ทั้งหมด 238 ใบ เมื่อนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาพบว่าได้ไข่สุก 213 ใบ (89.5%, ตารางที่ 4.1) จากนั้นนำไข่สุกที่ได้ไปทำการโคลนนิ่ง จากตารางที่ 4.2 พบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ไฟโบรบลาส (86.9% และ 91.9%) อัตราการแบ่งตัว (81.7% และ 83.8%) อัตราการเจริญสู่ระยะ 2 เซลล์ (24.4% และ 30.6%) และ 4 เซลล์ (39.7% และ 49.1%) ของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้และเพศเมีย เป็นเซลล์ต้นแบบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ สูงกว่าตัวอ่อนที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศเมีย (17.6% และ 4.0% ตามลำดับ, $P<0.001$)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งระยะ 2-8 เซลล์ที่ได้จากกลุ่มไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 106 และ 134 ตัวอ่อน ตามลำดับ ไปย้ายฝากให้แพะตัวรับจำนวน 15 และ 19 ตัว ตามลำดับ (เฉลี่ย 7 ตัวอ่อน/ตัวรับ) ดังแสดงในดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ผลการย้ายฝากพบว่าแพะตัวรับที่ได้รับตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากแพะเพศผู้ ตั้งท้อง 2 ตัว (13.3%, ตารางที่ 4.5) ได้ทำการผ่าตัดทำคลอดแพะตัวรับตัวแรกเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม 2550 (ตั้งท้อง 154 วัน) ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเพศผู้ มีน้ำหนักแรกเกิด 2 กิโลกรัม มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงดี และตั้งชื่อว่า "น้องกาย" (ภาพที่ 4.1) น้องกายมีการเจริญเติบโตที่ปกติและมีสุขภาพแข็งแรงดีจนถึงปัจจุบันนี้ (มีนาคม 2553, ภาพที่ 4.2A) ส่วนแพะตัวรับอีกตัวที่ตั้งท้องได้ผ่าตัดทำคลอดเมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม 2550 (ตั้งท้อง149 วัน) ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเพศผู้ มีน้ำหนักแรกเกิด 2 กิโลกรัม (ภาพที่ 4.3) มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง แต่เสียชีวิตหลังคลอด 32 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แพะตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศเมียไม่พบการตั้งท้อง

4.1.1.2 การเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของแพะโคลนนิ่งเป็นเซลล์ต้นแบบ (re-cloning)

ทำการกระตุ้นแพะตัวให้ไข่จำนวน 24 ตัว สามารถเก็บไข่ได้ทั้งหมด 148 ใบ เมื่อนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาพบว่าได้ไข่สุก 135 ใบ (94.4%, ตารางที่ 4.1) เมื่อนำไปทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะโคลนนิ่ง (น้องกาย) เป็นเซลล์ต้นแบบ พบว่าอัตราการเชื่อมติด 91.9% อัตราการแบ่งตัว 88.3% อัตราการเจริญสู่ระยะ 2 เซลล์ 19.2% และ 4 เซลล์ 36.7% มีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติเมื่อเปรียบกับการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ (ตารางที่ 4.6) แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ (32.5%) ของตัวอ่อนที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูน้องกายมีค่าสูงกว่าตัวอ่อนที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้ (17.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนจำนวน 106 ตัวอ่อน ให้กับแพะตัวรับจำนวน 12 ตัว (เฉลี่ย 8 ใบ/ตัวรับ) ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.7 แต่ไม่พบการตั้งท้องของตัวรับ

4.1.1.3 ผลของการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนแพะที่แตกต่างกัน 3 ตัว ต่อการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

ทำการกระตุ้นแพะตัวให้ไข่จำนวน 31, 12 และ 15 ตัว ตามลำดับ สำหรับเก็บไข่สำหรับกลุ่มที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนเพศเมียตัวที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ พบว่าได้ไข่ทั้งหมด 171, 74 และ 112 ใบ ตามลำดับ เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำยา พบว่าได้ไข่สุกจำนวน 128, 62 และ 99 ใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จากตารางที่ 4.8 พบว่า อัตราการเชื่อมติดและอัตราการแบ่งตัว ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง หลังจากการเลี้ยงตัวอ่อนเป็นระยะเวลานาน 32-36 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญสู่ระยะ 2 เซลล์ของตัวอ่อนที่ได้จากการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนตัวที่ 2 มีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ตัวอ่อนที่ได้จากไฟโบรบลาสลูกอ่อนตัวที่ 3 มีอัตราการเจริญสู่ระยะ 4 เซลล์ (56.7%) สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่มีอัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนของทุกกลุ่มการทดลอง จำนวน 87, 44 และ 72 ใบ ให้กับแพะตัวรับจำนวน 10, 6 และ 8 ตัว ตามลำดับ (เฉลี่ย 7-9 ตัวอ่อน/ตัวรับ) ดังแสดงในตารางที่ 4.9, 4.10 และ 4.11 พบว่าไม่มีแพะตัวรับใดตั้งท้อง

4.1.2 ผลการทดลองที่ 2

4.1.2.1 อัตรารอดชีวิตของไข่แพะแช่แข็งหลังการทำละลาย

จากการกระตุ้นแพะตัวให้ไข่จำนวน 60 ตัว สามารถเก็บไข่ได้ทั้งหมด 448 ใบ เมื่อนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาพบว่าได้ไข่สุก 365 ใบ (81.5%) หลังจากนั้นแบ่งไข่สุกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไข่สดและไข่แช่แข็ง โดยกลุ่มไข่แช่แข็งจะทำการแช่แข็งไข่ไว้ในในไตรเจนเหลวนาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำละลายแล้วเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกนาน 1 ชั่วโมง โดยไข่จากทั้งกลุ่มไข่สดและไข่แช่แข็งจะทำการย้อมด้วย FDA เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของไข่ พบว่ากลุ่มไข่สดมีอัตรารอดชีวิตสูงกว่ากลุ่มไข่แช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ซึ่งคิดเป็น 99.4% และ 92.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12, ภาพที่ 4.4)

4.1.2.2 การเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ได้จากการใช้ไข่สดและไข่แช่แข็ง

จากตารางที่ 4.13 อัตราการเชื่อมติดของเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูกับไข่สดและไข่แช่แข็งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเป็น 93.2% และ 96.8% ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากไข่สดมีอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ สูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากไข่แช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนที่ได้จากโคลนนิ่งและตัวอ่อนที่ได้จาก PA ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบในไข่ชนิดเดียวกัน ($P>0.05$) นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะมอรูล่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง ($P>0.05$) อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ได้จากการทำ PA ในกลุ่มไข่สด (10.4%) มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) บลาสโตซีสจากกลุ่มต่างๆแสดงดังภาพที่ 4.5

4.1.2.3 การแช่แข็งตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งและ PA ที่ได้จากไข่สดและไข่แช่แข็ง

เมื่อนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการโคลนนิ่งและ PA จากกลุ่มไข่สด (2 และ 5 ตัวอ่อน ตามลำดับ) และไข่แช่แข็ง (1 และ 2 ตัวอ่อน ตามลำดับ) มาทำการแช่แข็งแล้วทำการละลายโดยวิธีการเดียวกับการแช่แข็งไข่ระยะ MII หลังการทำละลายนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วย FDA พบว่ามีการเรืองแสงสีเขียวเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.6) แสดงว่าหลังจากการทำละลายตัวอ่อนไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็ง

4.2 ข้อวิจารณ์

จากการทดลองพบว่า สามารถผลิตตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ อัตราการแบ่งตัว อัตราการเจริญสู่ระยะ 2-8 เซลล์มีค่าใกล้เคียงกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ (Ohkoshi และคณะ, 2003) แต่อย่างไรก็ตามการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ ของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้สูงกว่าการใช้เซลล์เพศเมีย ซึ่ง Sansinena และคณะ (2005) รายงานว่าตัวอ่อนบันเต็งที่ได้จากการใช้เซลล์เพศผู้ในการโคลนนิ่ง มีอัตราการแบ่งตัวและการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนที่ใช้เซลล์เพศเมีย

นับตั้งแต่ Baguisi และคณะ (1999) รายงานความสำเร็จในการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ลูกอ่อนครั้งแรกของโลก หลังจากนั้นมีรายงานความสำเร็จในการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์จากลูกอ่อน และเซลล์คิวมูลัส เป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีอัตราการตั้งท้องระหว่าง 17-25% และอัตราการคลอดระหว่าง 60-80% (Lan และคณะ, 2006; Behboodi และคณะ, 2005; Keefer และคณะ, 2002; Reggio และคณะ, 2001) นอกจากนี้ Chen และคณะ (2007) รายงานความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีอัตราการตั้งท้อง 27% และมีอัตราการคลอด 83% ในการทดลองนี้ได้นำตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ ไปย้ายฝากให้แพะตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องเป็น 13.3% และมีอัตราคลอด 100% เมื่อใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่รายงานก่อนหน้านี้

ในการทดลองครั้งนี้ ได้นำเซลล์ใบหูของลูกแพะโคลนนิ่งมาเป็นเซลล์ต้นแบบในการทำ re-cloning พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์มีค่าสูงกว่าการใช้ใบหูเพศผู้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการตั้งท้องของแพะตัวรับหลังย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Wakayama และคณะ (2000) ที่ใช้เซลล์จากลูกหนูโคลนนิ่งมาเป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่ง generation ถัดไป ซึ่งพบว่าอัตราลูกเกิดลดลง เมื่อ generation เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามลูกเกิดที่ได้ไม่มีความผิดปกติแต่อย่างใด

จากการศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อน จากลูกอ่อนแพะทั้ง 3 ตัว เป็นเซลล์ต้นแบบ พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะ 2, 4 และ 8 เซลล์ มีค่าแตกต่างกัน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ในตัวอ่อนกระบือโคลนนิ่ง (Shi และคณะ, 2007) พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะของตัวอ่อนกระบือโคลนนิ่งมีค่าต่างกันเมื่อใช้เซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนคนละตัวกัน ซึ่งคาดว่าความสามารถในการ reprogramming ของเซลล์ต้นแบบขึ้นอยู่กับสารพันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบแต่ละตัว ดังนั้น การเลือกใช้เซลล์ต้นแบบที่ดีมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพของการโคลนนิ่ง

นอกจากนี้ในส่วนของการทดลองที่ 1 พบว่าเมื่อย้ายฝากตัวอ่อนให้แพะตัวรับ มีเพียงตัวอ่อนที่ได้จากการใช้เซลล์ใบหูแพะเพศผู้เท่านั้นที่สามารถฝังตัวและเจริญจนครบกำหนดคลอดได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาอัตราการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ใบหูเพศผู้

ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์ใบหูเพศเมียและเซลล์ลูกอ่อนเพศเมียทั้ง 3 ตัว เป็นที่น่าสังเกตว่ามีลูกแพะเกิดจากกลุ่มตัวอ่อนแพะที่ผลิตโดยใช้เซลล์ต้นแบบเพศผู้เท่านั้น อย่างไรก็ตามไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นผลจากเพศของเซลล์ต้นแบบ เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้เซลล์ต้นแบบเพศผู้เพียงตัวเดียว จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันในตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง (Kato et al., 2000) และตัวอ่อนหนูโคลนนิ่ง (Wakayama et al., 2000)

อย่างไรก็ตามในการผลิตตัวอ่อนโค (Yadav et al., 1993) และหนู (Mittwoch, 1993) ด้วยการปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าตัวอ่อนเพศผู้สามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้เร็วกว่าตัวอ่อนเพศเมีย จากรายงานพบว่าหลังการปฏิสนธิ โครโมโซม Y จะมีการแสดงออกของปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (Pergament et al., 1994) นอกจากนี้ Batchelder และคณะ (2005) เมื่อใช้เซลล์ต้นแบบที่มาจากแหล่งเดียวกันเช่น เซลล์แกรนูโลซ่า แต่มาจากตัวต้นแบบคนละตัวกัน มาทำโคลนนิ่งโค พบว่าเปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสไม่มีความแตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญจนครบกำหนดคลอดแตกต่างกัน ซึ่ง Fu และคณะ (2008) รายงานว่าพันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบที่แตกต่างกัน มีผลต่อประสิทธิภาพของการโคลนนิ่งโคที่ได้เปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสแตกต่างกัน จากที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ตัวสัตว์ที่ให้เซลล์ต้นแบบ (พันธุกรรมของเซลล์ต้นแบบ) มีผลต่อความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน

ในส่วนของการทดลองที่ 2 การแช่แข็งไข่แพะโดยวิธี cryotop ถึงแม้ว่าอัตราการรอดชีวิตของไข่แช่แข็ง จะต่ำกว่าไข่สด แต่อัตราการรอดชีวิต (92%) ของไข่แช่แข็งนี้มีค่าสูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ Begin และคณะ (2003) ได้รายงานว่าอัตรารอดชีวิตของไข่แพะที่แช่แข็งด้วยวิธี SSV เท่ากับ 60% และวิธี cryloop มีค่าเท่ากับ 89% อย่างไรก็ตาม ไม่มีรายงานเกี่ยวกับการแช่แข็งโดยวิธี crytop ดังนั้นรายงานนี้ จึงเป็นรายงานฉบับแรกที่แช่แข็งไข่แพะโดยวิธีนี้ เมื่อนำไข่แช่แข็งไปทำการโคลนนิ่งพบว่าไข่แช่แข็ง มีความสามารถในการเชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบไม่แตกต่างกับกลุ่มไข่สด นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเชื่อมติดในการทดลองนี้ (93-96%) สูงกว่ารายงานที่มีก่อนหน้านี้ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 43-87% (Keefer และคณะ, 2002; Das และคณะ, 2003; Lan และคณะ, 2006) อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญจนถึงระยะมอรูล่าของตัวอ่อนโคลนนิ่งและ PA ที่ได้จากไข่สดไม่มีความแตกต่างกัน อีกทั้งยังมีค่าใกล้เคียงกับรายงานที่มีก่อนหน้านี้ (Ohkoshi และคณะ, 2003; Begin และคณะ, 2003; Das และคณะ, 2003; Lan และคณะ 2006) อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Ohkoshi และคณะ 2003 แต่ต่ำกว่ารายงานฉบับอื่นๆที่ได้ตัวอ่อนบลาสโตซีสเป็น 14-17% (Lan และคณะ, 2003; Izquierdo และคณะ, 2006) เปอร์เซ็นต์บลาสโตซีสที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเซลล์ต้นแบบที่แตกต่างกันและระบบการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว อย่างไรก็ตาม Rodriguez-Dorta และคณะ (2007) พบว่าตัวอ่อนแพะที่เลี้ยงด้วยน้ำยา SOF

สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แพะ (28% และ 20% ตามลำดับ) แต่การเลี้ยงตัวอ่อนแช่แข็งร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แพะช่วยเพิ่มอัตราการตั้งท้องและยังได้ลูกเกิดที่มีสุขภาพแข็งแรง (Rodriguez-Dorta และคณะ, 2007) อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนแพะ PA ในการทดลองนี้ มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Begin และคณะ (2003) อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ได้จากไข่แช่แข็งไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอ่อนที่ได้จากการโคลนนิ่งและ PA อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากไข่แช่แข็งในการทดลองนี้ มีค่าสูงกว่ารายงานของ Begin และคณะ (2003) ซึ่งทำการแช่แข็งไข่แพะด้วยวิธี SSV และ Cryoloop แล้วนำไข่แช่แข็งมาทำ PA พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากการแช่แข็งโดยวิธี SSV ไม่สามารถพัฒนาจนถึงระยะมอรูล่าได้ ในขณะที่ตัวอ่อนที่ได้จากการแช่แข็งด้วยวิธี cryoloop สามารถพัฒนาถึงระยะมอรูล่าได้เพียง 3% แต่ไม่สามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้ ถึงแม้ว่าในการทดลองครั้งนี้อัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากไข่แช่แข็งมีค่าต่ำกว่าตัวอ่อนที่ได้จากไข่สด แต่ก็สอดคล้องกับรายงานในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น Muenthaisong และคณะ (2007) พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนกระบือโคลนนิ่งที่ได้จากไข่แช่แข็งโดยวิธี cryotop มีค่าต่ำกว่าการใช้ไข่สด (10 กับ 15% ตามลำดับ) สำหรับการศึกษาในโค พบว่าตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ได้ไข่แช่แข็งด้วยวิธี SSV สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสต่ำกว่าตัวอ่อนที่ได้จากไข่สด (Dinnyes และคณะ, 2000; Atabay และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามไม่พบรายงานเกี่ยวกับการใช้ไข่แพะแช่แข็งในการทำโคลนนิ่ง ดังนั้นรายงานนี้จึงเป็นรายงานฉบับแรกในการทำโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่แช่แข็ง สำหรับการแช่แข็งตัวอ่อน ในการทดลองครั้งนี้พบว่าตัวอ่อนไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติเหมือนก่อนการแช่แข็งได้ อาจเนื่องมาจากสูตรน้ำยาในการแช่แข็งและละลายไม่เหมาะสมกับตัวอ่อนแพะ อย่างไรก็ตามสูตรน้ำยาแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ให้ผลดี เมื่อใช้กับตัวอ่อนกระบือและโค (Laowtammathron และคณะ, 2005; Muenthaisong และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงควรศึกษาหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนแพะต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 4.1 จำนวนไข่ที่เก็บจากแพะตัวให้และจำนวนไข่สุกที่เก็บได้

Donor cells	No. of oocyte donors	No. of oocytes recovery	No. of MII oocytes (%)
Male ear fibroblasts	27	191	169 (88.5)
Female ear fibroblasts	36	238	213 (89.5)
Guy's ear fibroblasts	24	143	135 (94.4)
Female fetal fibroblasts #1	31	171	128 (74.9)
Female fetal fibroblasts #2	12	74	62 (83.8)
Female fetal fibroblasts #3	15	112	99 (88.4)

ตารางที่ 4.2 ผลของเพศเซลล์ต้นแบบไฟโบรบลาสใบหูต่อการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

Fibroblast types	No. of replications	Fused (%)	Cultured	Cleaved (%)	No. (%) embryo developed to		
					2-cell	4-cell	8-cell
Male ear	9	133/153 (86.9)	131	107 (81.7)	32 (24.4)	52 (39.7)	23 (17.6)[a]
Female ear	10	182/198 (91.9)	173	145 (83.8)	53 (30.6)	85 (49.1)	7 (4.0)[b]

Different superscripts within column indicate significant differences (P<0.01).

ตารางที่ 4.3 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะเพศผู้

Exp. No.	Recipient No.	Left-oviduct			Right -oviduct			Total	Pregnant Status
		2-C	4-C	8-C	2-C	4-C	8-C		
1	21	3	4	0	3	3	0	13	+
2	18	1	3	0	3	1	1	9	-
3	07	1	2	0	2	1	0	6	-
	31	1	2	0	1	1	1	6	-
4	41	0	2	1	0	2	1	6	-
	42	1	1	1	2	1	1	7	-
5	08	0	2	1	0	2	1	6	-
6	04	1	3	0	1	2	0	7	-
	33	0	3	0	1	1	1	6	-
7	19	1	2	0	1	3	0	7	-
	17	1	3	0	1	3	0	8	-
8	10	0	0	3	0	0	3	6	+
	43	0	0	3	0	0	3	6	-
9	34	2	0	1	2	1	0	6	-
	28	2	2	0	1	2	0	7	-

ตารางที่ 4.4 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะเพศเมีย

Exp. No.	Recipient No.	Left-oviduct			Right -oviduct			Total	Pregnant Status
		2-C	4-C	8-C	2-C	4-C	8-C		
1	03	0	2	1	1	2	0	6	-
	35	1	2	0	1	3	0	7	-
2	29	1	2	1	1	2	0	7	-
	47	0	3	0	1	1	1	6	-
3	08	2	0	0	1	1	0	4	-
	04	2	0	0	3	0	0	5	-
4	17	2	1	0	2	1	0	6	-
	07	2	1	0	1	3	0	7	-
5	31	1	4	0	2	3	0	10	-
	38	0	4	1	1	4	0	10	-
6	19	4	0	0	3	1	0	8	-
	41	1	1	0	2	2	0	6	-
7	18	2	2	0	2	2	1	9	-
	49	2	2	0	2	2	0	8	-
8	33	1	1	0	0	1	1	4	-
	02	3	1	0	1	2	0	3	-
9	S13	1	2	1	1	2	1	8	-
10	S14	0	0	5	0	0	5	10	-
	S16	0	0	5	0	0	5	10	-

ตารางที่ 4.5 สรุปผลการย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

Donor cells	No. of embryos transfer	No. of recipients (%)	No. of pregnant recipient (%)
Male ear fibroblasts	106	15	2 (13.3)
Female ear fibroblasts	134	19	0
Guy's ear fibroblasts	106	12	0
Female fetal fibroblasts #1	87	10	0
Female fetal fibroblasts #2	44	6	0
Female fetal fibroblasts #3	72	8	0

ตารางที่ 4.6 อัตราการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูลูกแพะโคลนนิ่ง (น้องกาย) เป็นเซลล์ต้นแบบ

Fibroblast types	No. of replications	Fused (%)	Cultured	Cleaved (%)	No. (%) embryo developed to		
					2-cell	4-cell	8-cell
Guy's ear	6	120/131 (91.6)	120	106 (88.3)	23 (19.2)	44 (36.7)	39 (32.5)[a]
Male ear	9	133/153 (86.9)	131	107 (81.7)	32 (24.4)	52 (39.7)	23 (17.6)[b]

Different superscripts within column indicate significant differences (P<0.05).

ตารางที่ 4.7 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนจากการทำ re-cloning แพะ

Exp. No.	Recipient No.	Left-oviduct			Right -oviduct			Total	Pregnant Status
		2-C	4-C	8-C	2-C	4-C	8-C		
1	R1	1	0	2	0	2	1	6	-
	R2	1	0	2	0	2	1	6	-
2	R3	0	2	1	1	2	0	6	-
	R4	1	1	0	0	2	0	4	-
3	R5	0	2	3	0	0	0	5	-
	R6	1	2	0	1	2	0	6	-
4	R7	0	4	4	2	0	5	15	-
	R8	2	2	4	0	3	4	15	-
5	R9	1	3	2	1	3	1	11	-
	R10	2	3	1	2	2	1	11	-
6	21	2	1	2	1	2	2	10	-
	10	0	0	0	4	4	3	11	-

ตารางที่ 4.8 ผลของการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมีย 3 ตัว ต่อการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

Individuals	No. of replications	Fused (%)	Cultured	Cleaved (%)	No. (%) embryo developed to		
					2-cell	4-cell	8-cell*
1	8	111/120 (92.5)	103	86 (83.5)	30 (29.1)[a]	24 (23.3)[c]	29 (28.2)[a]
2	4	58/62 (93.5)	58	44 (75.9)	7 (12.1)[b]	23 (39.7)[b]	14 (24.1)[a]
3	7	90/92 (97.8)	90	76 (84.4)	18 (20.0)[ab]	51 (56.7)[a]	7 (7.7)[b]

Values with different superscripts within each column are significantly different ($P<0.05$)

*$P<0.01$

ตารางที่ 4.9 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมียตัวที่ 1

Exp. No.	Recipient No.	Left-oviduct			Right -oviduct			Total	Pregnant Status
		2-C	4-C	8-C	2-C	4-C	8-C		
1	S26	1	0	3	0	1	3	8	-
2	S32	0	0	0	2	5	1	8	-
3	S3	3	2	1	0	0	0	6	-
	S1	0	0	0	3	1	2	6	-
4	S2	2	1	1	2	2	0	8	-
5	S30	2	2	4	0	0	0	8	-
	S35	6	2	1	2	2	0	13	-
6	S3	1	2	4	1	4	2	14	-
7	434	0	2	3	0	2	3	10	-
8	428	1	0	2	0	0	3	6	-

ตารางที่ 4.10 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมียตัวที่ 2

Exp. No.	Recipient No.	Left-oviduct			Right -oviduct			Total	Pregnant Status
		2-C	4-C	8-C	2-C	4-C	8-C		
1	S1	0	3	0	1	2	0	6	-
	S2	0	2	0	0	2	0	4	-
2	S3	0	1	2	0	1	2	6	-
	S4	0	1	2	0	1	3	7	-
3	S5	1	3	0	1	3	0	8	-
4	S6	2	1	3	2	3	2	13	-

ตารางที่ 4.11 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสลูกอ่อนแพะเพศเมียตัวที่ 3

Exp. No.	Recipient No.	Left-oviduct			Right -oviduct			Total	Pregnant Status
		2-C	4-C	8-C	2-C	4-C	8-C		
1	S25	4	1	0	0	5	0	10	-
	S32	4	1	0	0	5	0	10	-
2	S29	1	3	0	3	2	0	9	-
3	S30	5	1	0	4	2	0	12	-
4	S31	3	0	0	2	0	0	5	-
5	S5	1	3	0	0	2	1	7	-
6	S7	3	2	0	4	1	0	10	-
7	S9	1	3	0	1	2	2	9	-

ตารางที่ 4.12 อัตรารอดชีวิตของไข่แช่แข็งหลังการทำละลาย

Treatments	No. of oocytes examined	No. (%) of live oocytes
Fresh oocytes	144	143 (99.4)[a]
Vitrified oocytes	178	164 (92.4)[b]

Different superscripts within column indicate significant differences (P<0.01).

Number of replication = 5

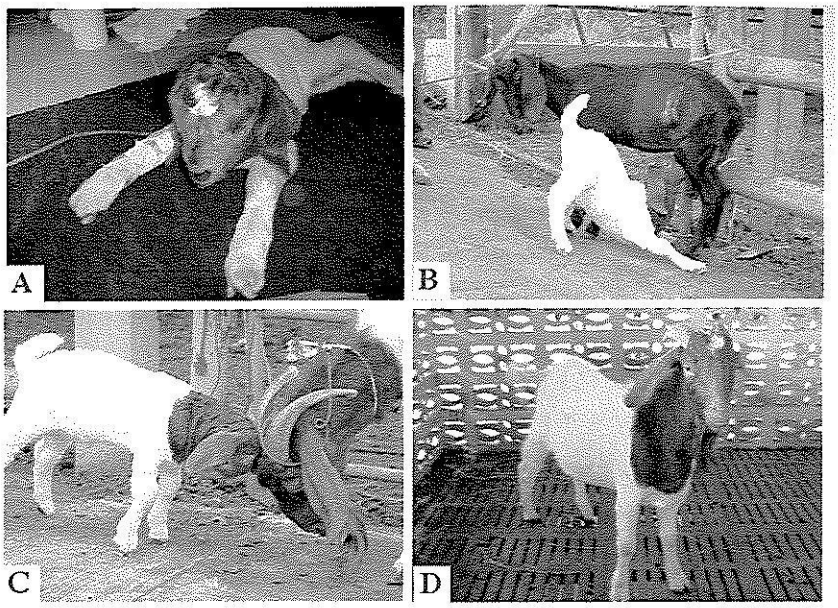
ตารางที่ 4.13 การเจริญเติบโตของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่ได้จากไข่สดและไข่แช่แข็ง

Oocyte types	Treatments	No. of replication	Fused (%)	Cultured	Cleaved (%)	No. (%) embryos developed to		
						8-Cell	Morula	Blastocyst
Fresh	SCNT	5	68/73 (93.2)	68	55 (80.9)[a]	37 (54.4)[a]	14 (20.6)	2 (2.9)[b]
	PA	6	-	67	61 (91.0)[a]	40 (59.7)[a]	18 (26.9)	7 (10.4)[a]
Vitrified	SCNT	6	90/93 (96.8)	90	24 (26.7)[b]	20 (22.2)[b]	9 (10.0)	1 (1.1)[b]
	PA	6		71	17 (23.9)[b]	15 (21.1)[b]	8 (11.3)	2 (2.8)[b]

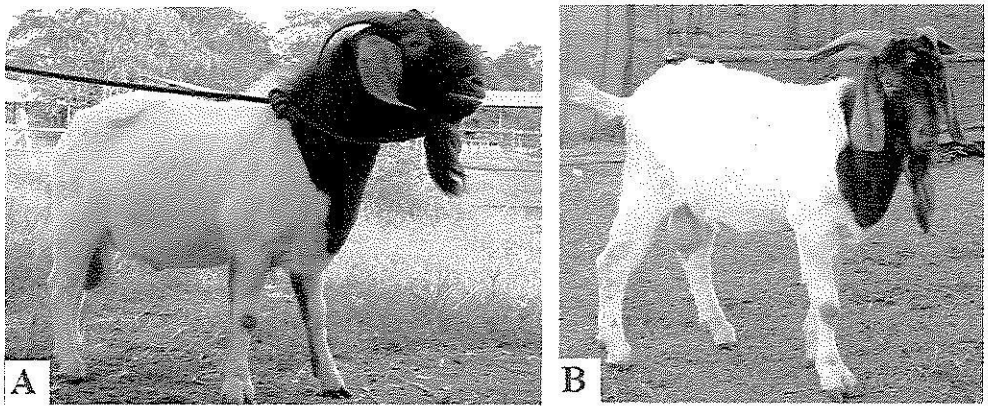
Different superscripts within column indicate significant differences ($P<0.01$).

SCNT = Somatic cell nuclear transfer

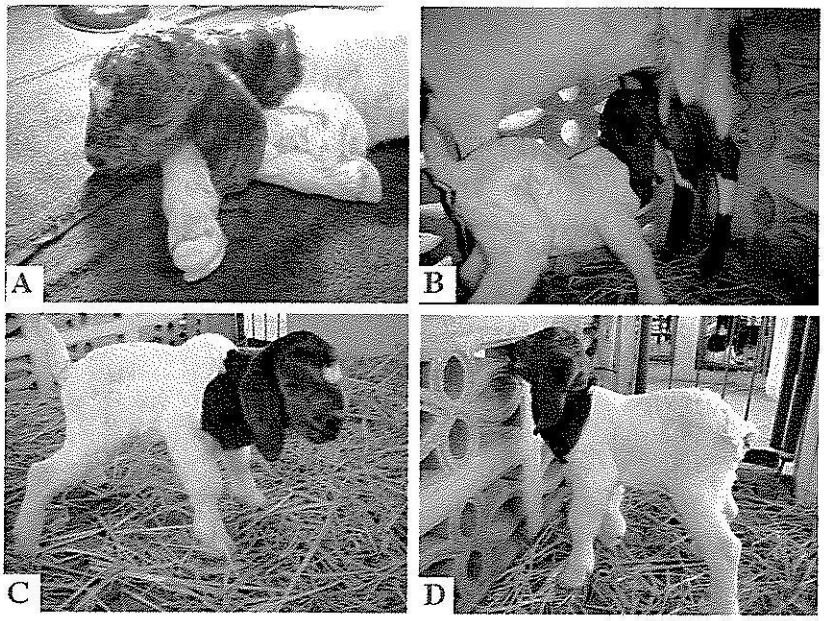
PA = Parthenogenetic activation



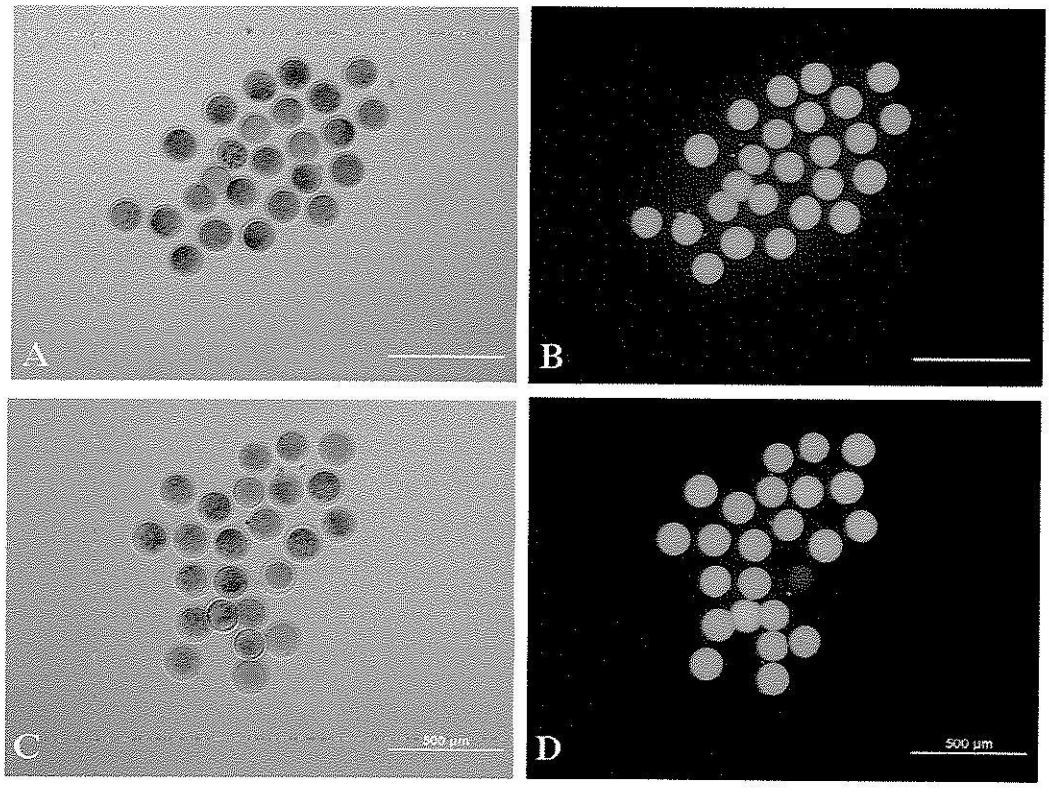
ภาพที่ 4.1 ลูกแพะโคลนนิ่งตัวที่ 1 (A) ขณะแรกเกิด, (B) อายุประมาณ 1 เดือน พร้อมแพะตัวรับและ (C) แพะต้นแบบ (D) แพะโคลนนิ่งขณะอายุ 2 ปี



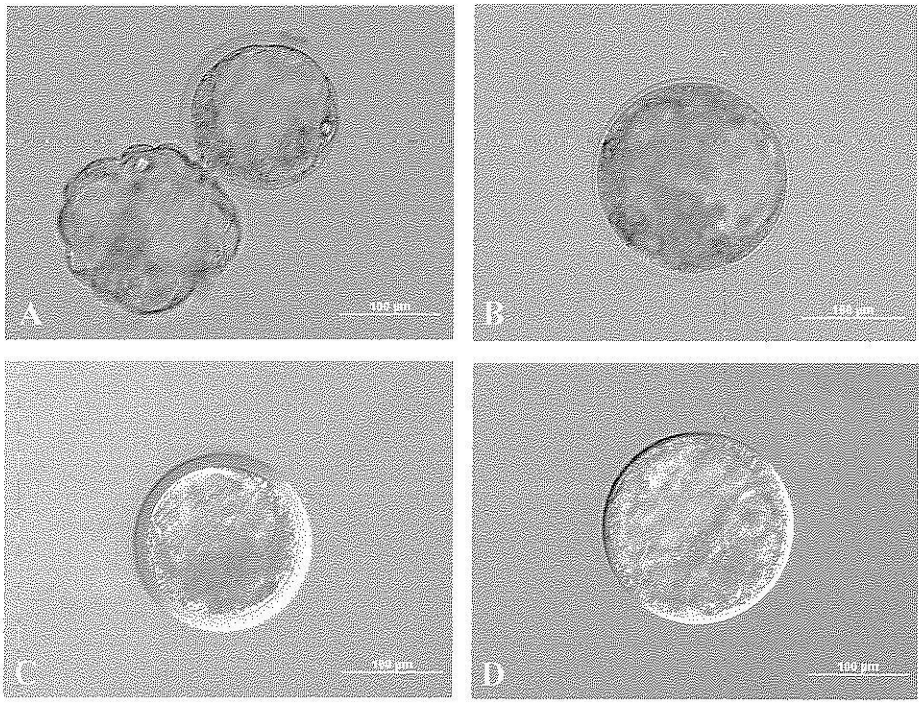
ภาพที่ 4.2 แพะโคลนนิ่ง "น้องกาย" (A) น้องกาย อายุ 2 ปี 10 เดือน และ (B) แพะต้นแบบ



ภาพที่ 4.3 ลูกแพะโคลนนิ่งตัวที่ 2 (A) ขณะแรกเกิด และ (B-D) 3 ชั่วโมงหลังคลอด



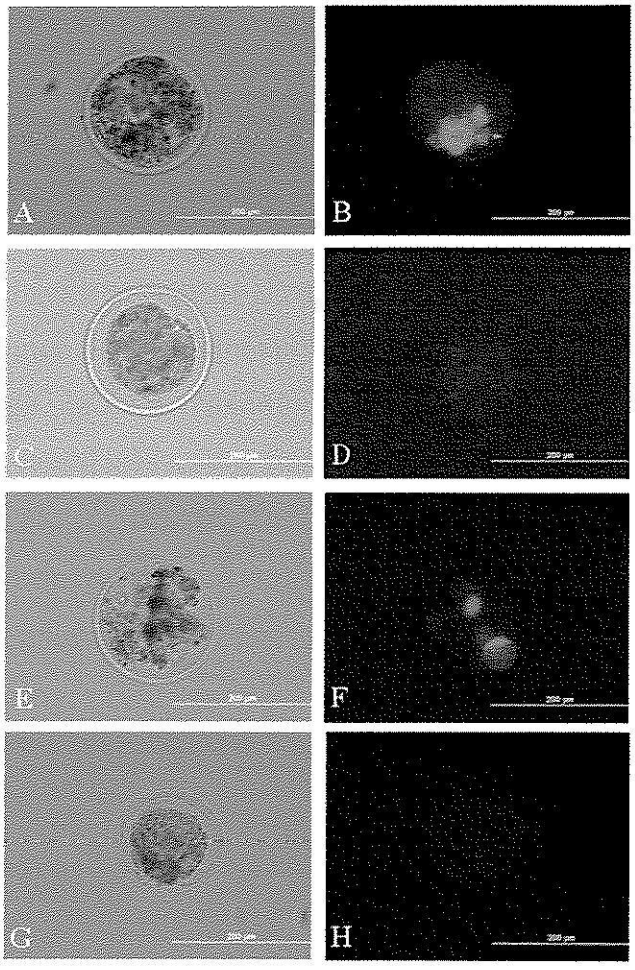
ภาพที่ 4.4 การย้อมสีเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของไข่แพะด้วย FDA
กลุ่มไข่สด: ภาพภายใต้แสงสว่าง (A) และแสงอัลตร้าไวโอเลต (B)
กลุ่มไข่แช่แข็ง: ภาพภายใต้แสงสว่าง (C) และแสงอัลตร้าไวโอเลต (D)



ภาพที่ 4.5 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

ตัวอ่อนที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง (A) และ PA (B) โดยใช้ไข่สด

ตัวอ่อนที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง (C) และ PA (D) โดยใช้ไข่แช่แข็ง



ภาพที่ 4.6 การย้อมสีเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนแพะด้วย FDA

กลุ่มไข่สด (A-D): ตัวอ่อนที่ได้จากการโคลนนิ่ง (A, B) และ PA (C, D)
ภาพภายใต้แสงสว่าง (A, C) และแสงอัลตร้าไวโอเลต (B, D)

กลุ่มไข่แช่เย็น (E-H): ตัวอ่อนที่ได้จากการโคลนนิ่ง (E, F) และ PA (G, H)
ภาพภายใต้แสงสว่าง (E, G) และแสงอัลตร้าไวโอเลต (F, H)

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า สามารถใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูและลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบในผลิตตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งได้ และได้ลูกเกิดแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้ นับว่าเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ที่สามารถผลิตลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู นอกจากนี้การแช่แข็งไข่แพะด้วยวิธี cryotop มีอัตรารอดชีวิตหลังการละลายสูงและยังสามารถนำไข่แช่แข็งมาใช้เป็นไซโตพลาสผู้รับในกระบวนการทำโคลนนิ่งได้อีกด้วย การศึกษาการโคลนนิ่งแพะในครั้งนี้เป็นการสร้างองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับใช้พัฒนาและผลิตแพะดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อผลิตโปรตีนทางการแพทย์ หรืออาจใช้ในการช่วยอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าหายากตระกูลเดียวกับแพะที่ใกล้สูญพันธุ์ได้อีก เช่น เลียงผา

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการทดลองพบว่าแพะตัวให้และตัวรับสายพันธุ์ Saanen มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ดีกว่าแพะพันธุ์พื้นเมือง แต่อย่างไรก็ตาม แพะสายพันธุ์ Saanen มีราคาสูงกว่าและมีความต้านทานต่อสภาวะอากาศที่เปลี่ยนแปลงได้ไม่ดีเท่าแพะพันธุ์พื้นเมือง ดังนั้นจึงควรเลี้ยงแพะในโรงเรือนปิด

5.2.2 สำหรับการทดลองในอนาคต ควรจะมีการทดลองเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการโคลนนิ่งเช่น การใช้ระบบการเลี้ยงร่วมกับเยื่อบุท่อนำไข่แพะ หรือการเติมสารเคมีบางชนิดเช่น Trichostatin A เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ reprogramming ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

5.2.3 ควรมีการศึกษาเพื่อหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการแช่แข็งตัวอ่อนแพะ

5.2.4 ควรศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากการใช้ไข่แพะแช่แข็ง

บรรณานุกรม

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. (2543a). ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิงโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *การประชุมวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38.* สาขาสัตว์. 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. (2543b). การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38.* สาขาสัตว์. 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

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

Atabay, E.C., Takahashi, Y., Katagiri, S., Nagano, M., Koga, A. and Kanai, Y. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology* 61: 15-23.

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.

Batchelder, C.A., Hoffert, K.A., Bertolini, M., Moyer, A.L., Mason, J.B., Petkov, S.G., Famula, T.R. and Anderson, G.B. 2005. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Cloning Stem Cells* 7: 238-254.

Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A. and Keefer, C. L. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.

Behboodi E., Ayres S.L., Memili E., O'coin N M., Chen L.H., Reggio B.C.,Landry A.M., Gavin W.G., Meade H.M., Godke R.A. and Echelard Y. 2005. Health and reproductive profiles of malaria antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 7: 107-118.

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

Bondioli, K.R. (1993). Nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 274-275.

Chavatte-Palmer, P., Heyman, Y., Richard, C., Monget, P., LeBourhis, D., Kann, G., Chilliard, Y., Vignon, X. and Renard, J.P. 2002. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol. Reprod.* 66: 1596–1603.

Chen D.Y., Jiang, M.X., Zhao Z.J., Wang H.L., Sun Q.Y., Zhang L.S., Li R.C., Cao H.H., Zhang Q.J. and Ma D.L. 2007. Cloning of asian yellow goat (*C. hircus*) by somatic cell nuclear transfer: telophase enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection. *Mol. Reprod. Dev.* 74: 28-34.

Chian, R. C., Kuwayama, M., Tan, L., Tan, J., Kato, O. and Nagai, T. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification..*J. Reprod. Dev.* 50: 685-696.

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. Clones transgenic calves produced from nonquescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.

Das, S.K., Majumdar, A.C. and Taru Sharma, G. 2003. *In vitro* development of reconstructed goat oocytes after somatic cell nuclear transfer with fetal fibroblast cells. *Small Ruminant Research* 48: 217-225.

Dinnyés, A., Dai, Y., Jiang, S. and Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 63: 513-518.

Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Beyman Z., Memili E. and N. First. 1998. Bovine oocyte as a universal recipient cytoplasm in mammalian nuclear transfer. *Theriogenology* 49 : 389.

El-Gayar, M. and Holtz, W. 2001. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J. Anim. Sci.* 79: 2436-2438.

Farin, P.W. and Farin, C.E. 1995. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: Survival and fetal development. *Biol. Reprod.* 52 : 676-682.

Fu, J., Guan, P., Zhao, L., Li, H., Huang, S., Zeng, F. and Zeng, Y. 2008. Effects of donor cells on *in vitro* development of cloned bovine embryos. *J. Genet. Genomics* 35: 273-278.

Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, A. and Batt, P. A. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 50: 390-400.

Guignot, F., Bouttier, A., Baril, G., Salvetti, P., Pignon, P., Beckers, J. F., Touzé, J. L., Cognié, J., Traldi, A. S., Cognié, Y. and Mermillod, P. 2006. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology* 66: 1004-1011.

Heyman, Y., Chavatte-Palmer, P., LeBourhis, D., Camous, S., Vignon, X., and Renard, J.P. 2002. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol. Reprod.* 66: 6–13.

Hong, Q. H., Tian, S. J., Zhu, S. E, Feng, J. Z., Yan, C. L., Zhao, X. M., Liu, G. S. and Zheng, S. M. 2007. Vitrification of boer goat morulae and early blastocysts by straw and open-pulled straw method. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 34-38.

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

Isachenko, V., Alabart, J. L., Nawroth, F., Isachenko, E., Vajta, G. and Folch, J. 2001. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo. Letters.* 22: 157-162.

Izquierdo, D., Villamediana, P., López-Bejar, M. and Paramio, M.T. 2002. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology* 57: 1431-1441.

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: 231-237.

Keefer, C. L., Baldassarre, H., Keyston, R., Wang, B., Bhatia, B., Bilodeau, A. S., Zhou, J. F., Leduc, M., Downey, B. R., Lazaris, A. and Karatzas, C. N. 2001. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol. Reprod.* 64: 849-856.

Keefer, C.L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A.S., Zhou, F.J., Kafidi, N., Wang, B., Baldassarre, H. and Karatzas, C.N. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.* 66: 199-203.

Kuwayama, M. and Kato, O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 17: 477 (abstract).

Lan, G.C., Chang, Z.L., Luo, M.J., Jiang, Y.L., Han, D., Wu, Y.G., Han, Z.B., Ma, S.F. and Tan, J.H. 2006. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 834-840.

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

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

Mittwoch, U. 1993. Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum. Reprod.* 8: 1550-1555.

Mohr, L. R. and Trounson, A. O. 1980. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 58: 189-196.

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.

Ohkoshi, K., Takahashi, S., Koyama, S., Akagi, S., Adachi, N., Furusawa, T., Fujimoto, J., Takeda, K., Kubo, M., Izaike, Y. and Tokunaga, T. 2003. *In vitro* oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. *Cloning Stem Cells* 5: 109-115.

Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H. and Perry, A.C.F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289: 1188-1190.

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 oviductal epithelial cells. *Buffalo J.* 15: 371-384.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000a. 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. 2000b. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, July 2-6, 2000. Abstract Vol. 2: 241.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Theriogenology* 57: 443.

Pergament, E., Fiddler, M., Cho, N., Johnson, D. and Holmgren, W.J. 1994. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum. Reprod.* 9: 1730-1732.

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

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

Prather, R.S., Sim, M.M. and First, N.L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41: 414-418.

Reggio, B.C., James, A.N., Green, H.L., Gavin, W.G., Behboodi, E., Echelard, Y. and Godke, R.A. 2001. Cloned Transgenic Offspring Resulting from Somatic Cell Nuclear Transfer in the Goat: Oocytes Derived from Both Follicle-Stimulating Hormone-Stimulated and Nonstimulated Abattoir-Derived Ovaries. *Biol. Reprod.* 65: 1528-1533.

Robertson, D. 1997. "Gene," another landmark in farmyard cloning. *Nat. Biotechnol.* 15: 833.

Rodríguez-Dorta, N., Cognié, Y., González, F., Poulin, N., Guignot, F., Touzé, J.L., Baril, G., Cabrera, F., Alamo, D., Batista, M., Gracia, A. and Mermillod, P. 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. *Theriogenology* 68: 908-913.

Sansinena, M. J., Hylan, D., Hebert, K., Denniston, R. S. and Godke, R. A. 2005. Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. Theriogenology 63: 1081-1091.

Seidel, G.E. 1995. Sexing, bisection and cloning embryo: perspectives and applications to animal breeding. In: *Proc. of Symposium on Reproduction and Animal Breeding*. Milan, 147-154.

Shi, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J. and Liu, Q. 2007. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.* 77: 285-291.

Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59–72.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa, S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and Parnpai, R. 2010. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 56: 49-54.

Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1993. Multiple generation bovine embryo cloning. *Biol. Reprod.* 48: 715-719.

Taeyoung, S., Kraemer, D., Pryor, J., Lui, l., Rugila, j., Howe, L., Buck, S., Murphy, K. Lyons, L. and Westhusin, M.W. 2002. Nature published online. 14 February 2002. *Nature* 723.

Vignon, X., LeBourthis, D., Chesne, P., Marchal, J., Heyman, Y. and Renard, J.P. 1999. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. *Theriogenology* 51: 216.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M. Jonhson, 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., Shinkai, Y., Tamashiro, K.L., Niida, H., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., Ogura, A., Tanemura, K., Tachibana, M., Perry, A.C., Colgan, D.F., Mombaerts, P. and Yanagimachi, R. 2000. Cloning of mice to six generations. *Nature* 407: 318-319.

Wells, D.N., Misica, P.M. and Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60: 996-1005.

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

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

Yacoub, A. N., Gauly, M. and Holtz, W. 2010. Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development. *Theriogenology* doi:10.1016/j.theriogenology.2009.11.028

Yadav, B.R., King, W.A. and Betteridge, K.J. 1993. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 434-439.

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.

Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prelle, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J. Reprod. Fert.* 115: 325-331.

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

ภาคผนวก ก

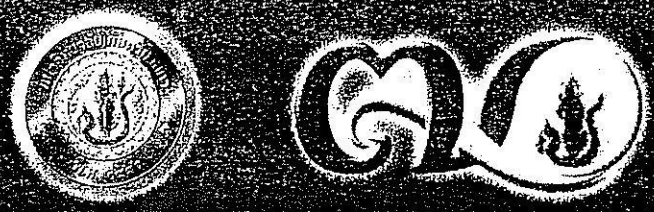
ส่วนหนึ่งของการทดลองที่ 1 นี้ ได้นำไปเสนอผลงานระดับชาติและระดับนานาชาติดังนี้

Oral presentation

Phewsoi, W., Sripunya, N., Srirattana, K., Sangmalee, A., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Davahudee, R., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2008. Birth of cloned goats using ear fibroblasts as a donor cell. *Proceeding of the 46th Kasetsart University Annual Conference,* 29 January- 1 Febuary 2008, Bangkok, Thailand. 19-24.

Poster presentation

Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich C., Laowtammathron C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. (2007). Birth of cloned goat: a preliminary study for conservation of endangered mountain goat. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology conference*, 24-26 November 2007, National University of Singapore, Singapore. 80.



เนื่องในมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษาครบ ๘๐ พรรษา

๕ ธันวาคม ๒๕๕๐

เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๖ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

The Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference

มก 2

สาขาสัตว์

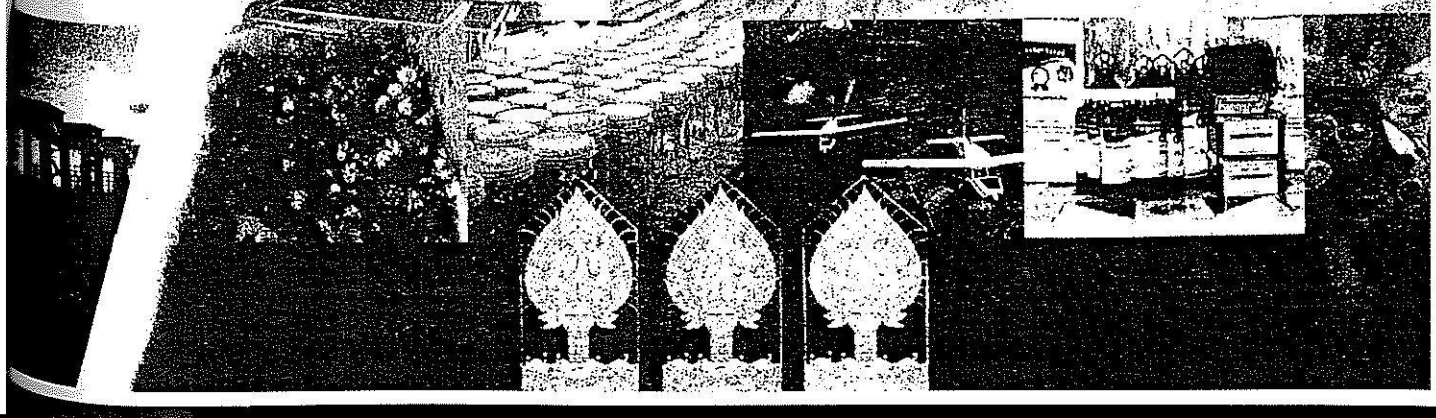
(Subject: Animals)

สาขาสัตวแพทยศาสตร์

(Subject: Veterinary Medicine)

"เกษตรศาสตร์เทิดพระเกียรติ ๘๐ พรรษา
เพื่อประชาไทยอยู่เย็นเป็นสุข"

"Kasetsart University celebrates His Majesty's 80th birthday
and 80 years of peace and prosperity in the Kingdom"



ลูกแพะเกิดจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ

Birth of Cloned Goats Using Ear Fibroblasts as a Donor Cell

วันวิสาข์ ผิวสร้อย[1] นุชจรินทร์ ศรีปัญญา[1] กนกวรรณ ศรีรัตนา[1] อนวัช แสงมาลี[1] ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ[1]
สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา[1] ชุติ เหล่าธรรมธร[1] จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์[1] ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี[1]
มารินา เกตุทัต-คาร์นส์[1] และ รังสรรค์ พาลพ่าย[1]
Wanwisa Phewsoi[1], Nucharin Sripunya[1], Kanokwan Srirattana[1], Anawat Sangmalee[1],
Kwanrudee Keawmungkun[1], Sumeth Imsoonthornruksa[1], Chuti Laowtammathron[1], Chanchao
Lorthongpanich[1], Retvin Davahudee[1], Mariena Ketudat-Cairns[1], and Rangsun Parnpai[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการทดลองเพื่อผลิตแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบโดยนำเซลล์จากแพะเพศผู้ และเพศเมียฉีดเข้าในไข่แพะที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วเชื่อมให้เซลล์ติดกันด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าอัตราเชื่อมติดของเซลล์แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (87.2% และ 94.2% ตามลำดับ) นำไข่ที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบมากระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี cytochalasin D และ cycloheximide เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง ตัวอ่อนจากเซลล์ทั้งสองเพศมีอัตราการแบ่งตัวแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ(84.2% และ 82.3% ตามลำดับ) นำตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ไปย้ายฝากให้แพะตัวรับเฉลี่ย 7 ตัวอ่อน/ตัวรับ ตรวจการตั้งท้องด้วยอัลตราซาวที่ 30 วันหลังฝากตัวอ่อนพบว่า แพะตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนที่เกิดจากเซลล์เพศผู้ตั้งท้อง 2/15 ตัว (13.3%) ส่วนแพะตัวรับ 16 ตัว ที่รับฝากตัวอ่อนที่เกิดจากเซลล์เพศเมียไม่พบการตั้งท้อง ทำการผ่าตัดทำคลอดแพะตัวรับทั้งสองได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว มีสุขภาพแข็งแรง แต่ลูกแพะตัวที่สองตายหลังจากคลอดได้ 32 ชั่วโมง

ABSTRACT

This study was purposed to demonstrate the production of cloned goats using ear fibroblasts as donor cell. The fibroblasts of male and female goat were transferred into enucleated goat oocytes and then fused by electrical stimuli. The fusion rates of both cells were no significantly different (87.2% vs 94.2%, respectively). Then, the fused oocytes were activated with 7% ethanol for 5 min followed by incubated in cycloheximide and cytochalasin D for 5 h. After activation, the reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium for 32-36 h. The 2-8 cell stage embryos were surgically transferred into the oviducts of recipient at the average of 7 embryos/recipient. Ultrasonography at day 30 indicated that 2/15 recipients (13.3%) received embryos derived from male fibroblasts were pregnant. However, 16 recipients of cloned embryos derived from female fibroblasts were not pregnant. Both pregnant recipients delivered two healthy male kids by Caesarean section. Both kids were phenotypically and genotypically identical to the donor. Unfortunately, one kid died 32 h postnatal.

Key Words: goat, cloning, ear fibroblasts

Wanwisa Phewsoi: rain_ame@hotmail.com

[1] ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology

บทนำ

แพะ (*Capra aegagrus*) เป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สามารถบริโภคได้ทั้งน้ำนม และเนื้อ เนื่องจากแพะเป็นสัตว์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ประกอบกับระยะเวลาในการตั้งท้องไม่นานนัก และสามารถผลิตน้ำนมได้ดี นักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจในการศึกษาการดัดแปลงพันธุกรรมแพะ เพื่อให้ได้แพะที่สามารถผลิตโปรตีนทางการแพทย์ ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีการโคลนนิ่งในการผลิตลูกแพะดัดแปลงพันธุกรรม นับตั้งแต่ Baguisi และคณะ (1999) รายงานความสำเร็จในการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ลูกอ่อนครั้งแรกของโลก หลังจากนั้นมีรายงานความสำเร็จในการผลิตลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์จากลูกอ่อน และเซลล์คิวมูลัสเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีอัตราการตั้งท้องคือ 17-25% และอัตราการคลอด คือ 60-80% (Lan *et al.*, 2006 ; Behboodi *et al.*, 2005; Keefer *et al.*, 2002; Reggio *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เซลล์ชนิดอื่นเป็นเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่งแพะ โดย Chen และคณะ (2007) รายงานความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีอัตราการตั้งท้องคือ 27% และมีอัตราการคลอดคือ 83% สำหรับประเทศไทยยังไม่รายงานความสำเร็จในการโคลนนิ่งแพะ ดังนั้นจึงควรวิจัยเพื่อผลิตลูกแพะโคลนนิ่ง เพื่อเป็นฐานความรู้ในการวิจัยขั้นสูงต่อยอด เพื่อใช้แพะเป็นตัวผลิตโปรตีนทางการแพทย์ไว้ใช้เองในประเทศ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีราคาแพงมาก และมีความต้องการใช้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้การได้ข้อมูล การผลิตลูกแพะโคลนนิ่งจะเป็นฐานความรู้ในการทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ป่าหายากตระกูลเดียวกับแพะ เช่น เลียงผาได้อีกด้วย ในการวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาการโคลนนิ่งแพะโดยใช้เซลล์ ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ และศึกษาอัตราการตั้งท้องของแพะตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างหนังใบหูของแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ (Figure 1A) และเมียไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดผิวหนังให้มีขนาด 1 x 1 มม. แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำยา Alpha Minimum Essential Medium (αMEM, Sigma, M-7145) + 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4-5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง จึงขยายให้มีจำนวนมากๆ แล้วนำเซลล์ที่ passage 3 มาแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนใช้นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้ มาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย Trypsin /EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

ใช้แพะลูกผสมพันธุ์พื้นเมืองเพศเมีย อายุ 8-12 เดือน มาทำเป็นแพะตัวให้ไข่ ทำการกระตุ้นให้ตกไข่จำนวนมาก โดยเริ่มจากสอด CIDR® (Pfizer Animal Health, New Zealand) ไว้ในช่องคลอดแพะเป็นเวลา 10 วัน จึงเริ่มฉีดฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH, Folltropin®, BIONICHE) 30 mg เข้ากล้ามเนื้อทุกๆ 12 ชั่วโมง รวม 8 ครั้ง ในครั้งที่ 2 ของการฉีด FSH ฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา ($PGF_{2\alpha}$,

Iliren®, Intervet) 0.4 mg เข้ากล้ามเนื้อ และในครั้งที่ 6 ของการฉีด FSH ทำการดึง CIDR® ออกจากช่องคลอดของแพะ หลังจากการฉีด FSH ครั้งสุดท้าย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ฉีดฮอร์โมน Human Chlorionic Gonadotropin (HCG, Chlorulon®, Intervet) 750 IU ให้แก่แพะผ่านทางเส้นเลือดดำ หลังจากฉีด hCG เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ทำการเก็บไข่ด้วยวิธีผ่าตัด โดยสอดท่อเทปล่อนเข้าไปตรงปากแตรของท่อนำไข่ ส่วนปลายท่ออีกด้านหนึ่งจะถูกรองรับไว้ด้วยจานเลี้ยงเซลล์เพื่อรองรับไข่ที่ชะล้างได้ ใช้กระบอกฉีดยาซึ่งภายในบรรจุน้ำยา modified Dulbecco phosphate buffer saline (mDPBS) ที่เติมด้วย 1% FBS ที่ต่อกับเข็มฉีดยา ฉีดตรงกลางปีกมดลูกเข้าทางด้านท่อนำไข่ที่สอดท่อเทปล่อนไว้เพื่อชะล้างไข่ออกมา ในกรณีที่พบถุงไข่ค้างบนรังไข่จะใช้กระบอกฉีดยาซึ่งภายในบรรจุน้ำยา mDPBS เจาะดูดไข่ จากนั้นตรวจหาไข่ที่ชะล้างและเจาะดูดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เก็บไข่ที่ตรวจพบไว้ในน้ำยา Emcare holding (ICP Bio) นำไข่ที่เก็บได้มาเลี้ยงในน้ำยาซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical) และ 1 µg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air สำหรับไข่ที่ได้จากการชะล้างจะเลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง ส่วนไข่ที่ได้จากการเจาะดูดจะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง

การดูดนิวเคลียสออกจากไข่

นำไข่ที่เลี้ยงไว้มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.1% hyaluronidase (Sigma, S-3506) แล้วคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว (มี first polar body) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับในน้ำยาที่มี 5 µg/ml cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอุลตราไวโอเลต

การฉีดเซลล์ต้นแบบและ เชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่แต่ละใบที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmerman fusion medium เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 volt นาน 15 µsec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emcare holding 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมง จึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 µg/ml cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ 10 µg/ml cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Parnpai *et al.*, 2000)

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่เติม 3 mg/ml fatty acid free BSA ในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 in air เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอ่อนไปย้ายฝากให้กับแพะตัวรับ

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะตัวรับ และการย้ายฝากตัวอ่อน

ใช้แพะพันธุ์ผสมพื้นเมือง เพศเมีย อายุ 10-12 เดือน มาทำเป็นตัวรับ โดยทำการกระตุ้นเหมือนแพะตัวให้ไข่ แต่ฉีด 500 IU equine chlorionic gonadotropin (eCG, Folligon®, Intervet) ครั้งเดียวในวัน 10หลังจากสอด CIDR แทนการฉีด FSH หลังจากฉีด hCG เป็นเวลา 50 ชั่วโมง แพะตัวรับจะถูกวางยาสลบ และผ่าตัดเปิดช่องท้อง เพื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อน โดยนำตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง ระยะ 2 ถึง 8 เซลล์ ไปล้างในน้ำยา Emcare holding 6 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน ในท่อย้ายฝาก (Intratubal Transfer Catheter, COOK®) ก่อนนำปลายท่อย้ายฝากสอดผ่านปากแตรเข้าไปในท่อนำไข่ของตัวรับ แล้วจึงปล่อยตัวอ่อนที่ท่อนำไข่ทั้งสองข้างๆ ละ 3 - 7 ตัวอ่อน หลังย้ายฝากตัวอ่อน 30 วันจะทำการตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอุลตร้าซาวด์ (Pie Medical)

การคำนวณค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการกระตุ้นแพะตัวให้ จำนวน 61 ตัว มีการตกไข่จำนวนมาก แล้วทำการชะล้างด้วยน้ำยา mDPBS+1% FBS เพื่อเก็บไข่ที่ตกลงมาในท่อนำไข่ สามารถชะล้างไข่ได้ทั้งหมด 424 ใบ และสามารถเจาะดูดไข่ที่ยังค้างอยู่ในรังไข่ได้ทั้งหมด 62 ใบ ซึ่งเมื่อนำไข่ที่เก็บได้ไปเลี้ยงในน้ำยาเพื่อให้ไข่เจริญพร้อมปฏิสนธิ พบว่า มีไข่เจริญพร้อมปฏิสนธิจำนวน 372 ใบ (76.5%) จากนั้นจึงนำไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิไปดูดนิวเคลียสออก เพื่อทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสใบหูจากแพะเพศผู้และเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ ผลการทดลองแสดงใน Table1

Table 1 *In vitro* development of cloned goat embryos derived from male and female ear fibroblasts

Donor cell	Fused	Cleavage	1-C	2-C	4-C	8-C
Male	157/180	128/152	21	39	63	26[a]
	(87.2%)	(84.2%)	(13.8%)	(25.7%)	(41.4%)	(17.1%)
Female	163/173	116/141	21	49	56	6[b]
	(94.2%)	(82.3%)	(14.9%)	(34.8%)	(39.7%)	(4.3%)

Values with different superscripts within each column are significantly different (P<0.05)

จาก Table 1 พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู ที่ได้จากแพะเพศผู้ และเพศเมีย มีอัตราการเชื่อมติดกับไซโตพลาสของไข่แพะไม่ต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 87.2% และ 94.2% ตามลำดับ และอัตราการแบ่งตัว หลังจาก

กระตุ้นด้วยสารเคมี และเลี้ยงเป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน (84.2% และ 82.3% ตามลำดับ) มีอัตราการแบ่งตัวสู่ระยะ 2 และ 4 เซลล์ ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ ของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากแพะเพศผู้ (17.1%) มีค่าสูงกว่าตัวอ่อนโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากแพะเพศเมีย (4.3%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

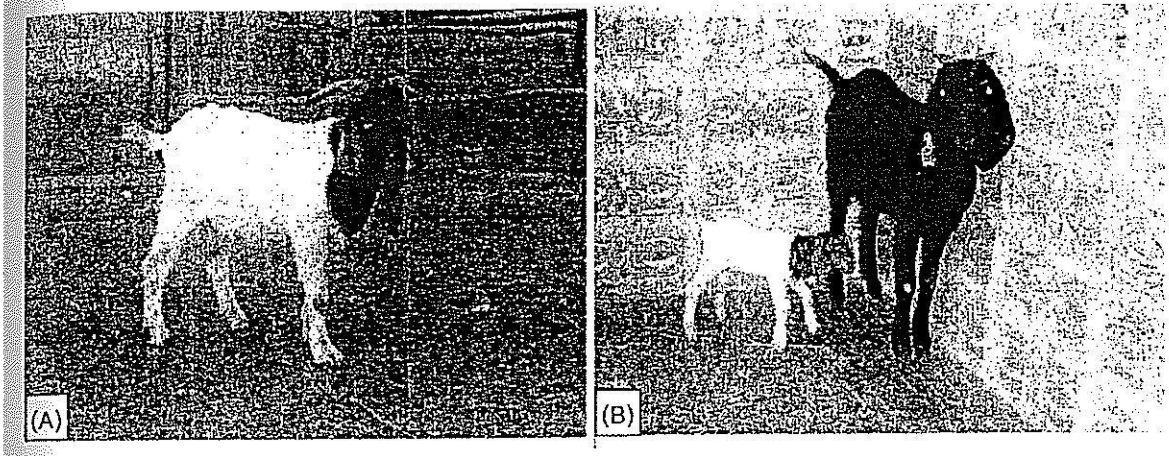


Figure 1 The male goat, donor of ear fibroblast (A) and the first cloned goat and its foster-mother (B)

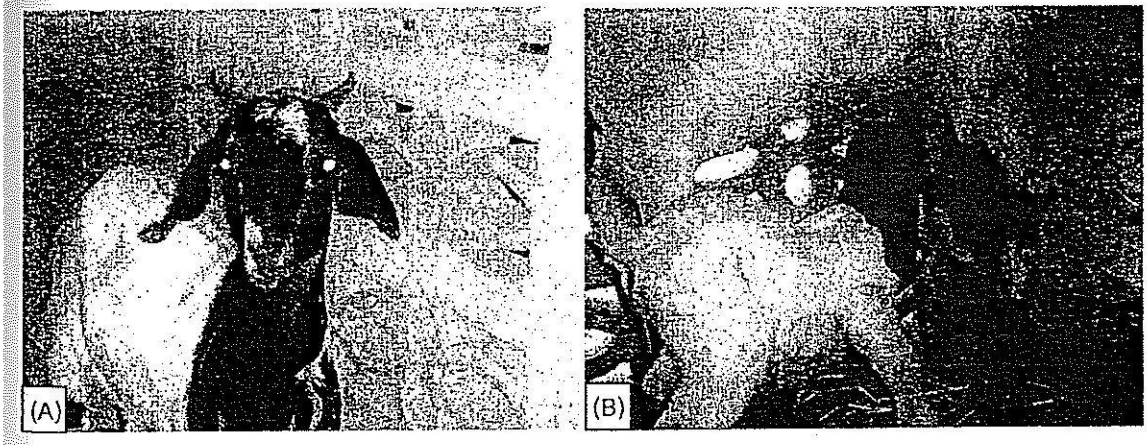


Figure 2 The recipient of the second cloned goat (A) and the second cloned goat at aged 28 hours (B)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากแพะเพศผู้ และเพศเมีย จำนวน 106 และ 107 ตัวอ่อน ตามลำดับ ให้กับแพะตัวรับจำนวน 15 และ 16 ตัว ตามลำดับ (เฉลี่ย 7ตัวอ่อน/ตัวรับ) พบว่าแพะตัวรับที่ได้รับตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากแพะเพศผู้ ตั้งท้อง 2 ตัว (13.3%) ได้ทำการผ่าตัดทำคลอดแพะตัวรับตัวแรกเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม 2550 (ตั้งท้อง154 วัน) ได้ลูกแพะโคลนนิ่ง เพศผู้ เกิดมามีน้ำหนักแรกเกิด 2 กิโลกรัม มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง และตั้งชื่อว่า "น้องกาย" (Fig. 1B) ส่วนแพะตัวรับอีกตัวที่ตั้งท้องได้ผ่าตัดทำคลอดเมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม 2550 (ตั้งท้อง149 วัน) ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเพศผู้ เกิดมามีน้ำหนักแรกเกิด 2 กิโลกรัม (Figure 2B) มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง แต่เสียชีวิตหลังคลอด 32 ชั่วโมง ส่วนแพะตัวรับที่ย้ายฝากตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากแพะเพศเมียไม่พบการตั้งท้อง

สรุป

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า สามารถผลิตแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งอัตราการตั้งท้องและการคลอดมีค่าใกล้เคียงกันกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากความสำเร็จในงานวิจัยครั้งนี้นับว่าเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ที่สามารถผลิตลูกแพะโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู ซึ่งเป็นการสร้างองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับใช้พัฒนาและผลิตแพะดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อผลิตโปรตีนทางการแพทย์ หรืออาจใช้ในการช่วยอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าหายากตระกูลเดียวกับแพะที่ใกล้สูญพันธุ์ได้อีก เช่น เลียงผา

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

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

Behboodi E., S.L. Ayres, E. Memili, N M. O'coin, L.H. Chen, B.C. Reggio, A.M. Landry, W.G. Gavin, H.M. Meade, R.A. Godke, and Y. Echelard. 2005. Health and reproductive profiles of malaria antigen-producing transgenic goats derived by somatic cell nuclear transfer. Cloning Stem Cells 7: 107-118.

Chen D.Y., M.X. Jiang, , Z.J. Zhao, H.L. Wang, Q.Y. Sun, L.S. Zhang, R.C. Li, H.H. Cao, Q.J. Zhang, and D.L. Ma. 2007. Cloning of asian yellow goat (C. hircus) by somatic cell nuclear transfer: telophase enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection. Mol. Reprod. Dev. 74: 28–34.

Lan G.C., Z.L. Chang, M.J. Luo, Y.L. Jiang, D. Han, Y.G. Wu, Z.B. Han, S.F. Ma, and J.H Tan. 2006. Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. Mol. Reprod. Dev. 73: 834–840.

Keefer C.L., R. Keyston, A. Lazaris, B. Bhatia, I. Begin, A.S. Bilodeau, F.J. Zhou, N. Kafidi, B. Wang, H. Baldassarre, and C.N. Karatzas. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. Biol. Reprod. 66: 199–203.

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

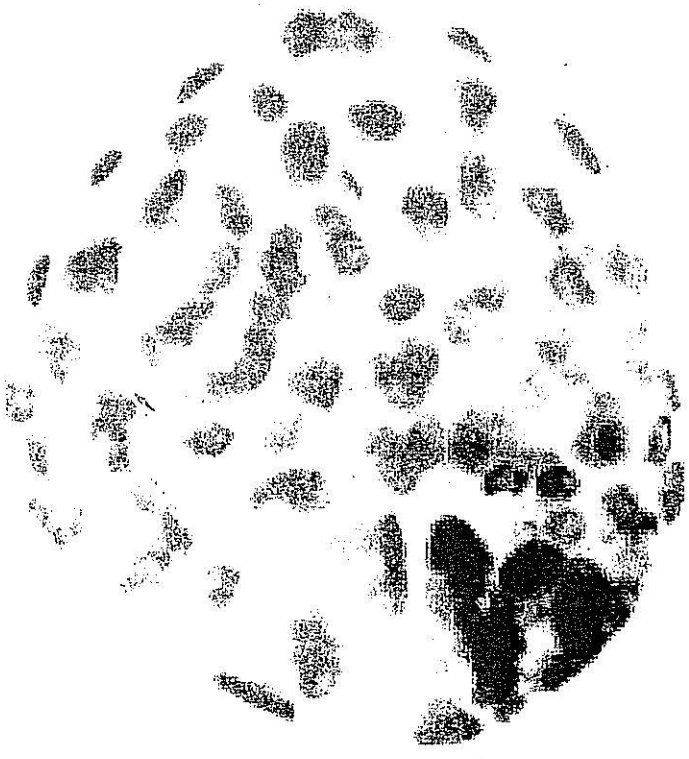
Reggio B.C., A.N. James, H.L. Green, W.G. Gavin, E. Behboodi, Y. Echelard, and R.A. Godke. 2001. Cloned Transgenic Offspring Resulting from Somatic Cell Nuclear Transfer in the Goat: Oocytes Derived from Both Follicle-Stimulating Hormone-Stimulated and Nonstimulated Abattoir-Derived Ovaries. Biol. Reprod. 65: 1528–1533.

Asian Reproductive Biotechnology Society

The 4th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society

"Reproductive Biotechnology, Stem Cells and Regenerative Medicine"

Singapore, November 24-



ARBS Hosted by the Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan
& the National University of Singapore, Singapore

P 12

BIRTH OF CLONED GOATS: A PRELIMINARY STUDY FOR CONSERVATION OF ENDANGERED MOUNTAIN GOAT

Anawat SANGMALEE, Kanokwan SRIRATTANA, Nucharin SRIPUNYA, Wanwisa PHEWSOI, Kwanrudee KEAWMUNGKUN, Sumeth IMSOONTHORNRUKSA, Chanchao LORTHONGPANICH, Chuti LAOWTAMMATHRON, Mariena KETUDAT-CAIRNS, and Rangsun PARNPAI*

Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

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

The purpose of this study is to determine whether goat can be produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT), and yet, as a model to study interspecies SCNT in serow (*Capricornis sumatraensis*), an endangered mountain goat. Adult ear fibroblasts from a male Boer goat were cultured *in vitro* and used as donor cells. *In vivo*-matured caprine oocytes surgically collected from the oviducts of 61 superovulated donors to use as recipient cytoplast. The matured oocytes were enucleated, donor cell microinjected and fused in ZFM fusion medium. The cell-oocyte couplets were placed between both tips of the fusion electrode for electro-stimulated with 2 DC pulses of 26V, 15 μsec apart. Then, the reconstructed embryos were activated by 7% ethanol for 5 min followed by incubated in 10 μg/ml cycloheximide and 1.25 μg/ml cytochalasin D under 5% CO_2, 38.5°C in air for 5 h. After activation, the reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium supplemented with 3 mg/ml BSA in the ratio of 20 oocytes/100 μl under humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 at 38.5°C until the embryos were transferred to the oviducts. At 36 h post activation, a total of 106 reconstructed embryos were surgically transferred into the oviducts of 15 synchronized recipient does at the average of 8 embryos / recipient. Ultrasonography at day 30 indicated that two recipients were pregnant, one with single fetuses, the other with twins. However, only one of the twins was carried to term. On day 150, both recipients delivered two healthy male kids by Caesarean section. Both kids were phenotypically and genotypically identical to the donor. Unfortunately, one kid died 24 h postnatal. In conclusion, we have demonstrated that goat can be produced by SCNT and this technique will be applied for interspecies SCNT of serow using domestic goat cytoplasts and serow somatic cells. This study was supported by CHO-A Pharmaceutical Co., Ltd., South Korea and Suranaree University of Technology.

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. 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 องเมือง จ.นครราชสีมา

4. ประวัติการศึกษา

4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

4.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541

สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

4.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council

สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

4.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

5. ประวัติการทำงาน:

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

- 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

6. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

6.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

6.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

6.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

6.4 Embryonic stem cells

6.5 Cryopreservation of gametes and embryos

7. ผลงานวิจัย

7.1. ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R.** and Heraud, P. **2009.** Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by FT-IR spectroscopy. ***J. Mol. Struct.*** 967: 189-195.

Laowtammathron, C., Cheng, E.C., Cheng, P.H, Snyder, B.R., Yang, S.H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. **2009.** Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. ***BMC Cell Biology.*** Accepted 24 December, 2009.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R. 2009.** Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. ***Reprod. Fertil. Dev.*** Accepted 5 October, 2009.

Sripunya, N., Somfai, T., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R. 2009.** A comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 56: 176-181.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2009. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 56: 49-54.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Lorthongpanich, C., Heraud, P. and **Parnpai.** R. 2009. FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst. *J. Mol. Struct.* 933: 104-111.

Suteevun-Phermthai, T., Curchoe, C.L., Evans, A.C., Boland, E., Rizos, D., Fair, T., Duffy, P., Sung, L.Y., Du, F., Chaubal, S., Xu, J., Wechayant, T., Yang, X., Lonergan, P., **Parnpai, R.**, and Tian, X. 2009. Allelic switching of the imprinted *IGF2R* gene in cloned bovine fetuses and calves. *Anim. Reprod. Science.* 116: 19-27.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Development of single blastomere derived mouse embryos, outgrowths and embryonic stem cells. *Reproduction.*135: 805-813.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Chemical enhancement in embryo development and stem cell derivation from single blastomeres *Cloning Stem Cells* 10: 503-512.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A.W.S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development of interspecies cloned monkey embryo reconstructed with bovine enucleated oocyte. *J. Reprod. Dev.* 54: 306-313.

Parnpai, R. 2007. Production of cloned embryos in buffalo. *Ital. J. Anim. Sci.* 6. Suppl. 2: 102-106.

Chan, A.W.S., Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitche, K. and **Parnpai, R.** 2007. Competence of early embryonic blastomeres for establishment of embryonic stem cell line. *Fertility and Sterility* 88: S396-S396.

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.

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.

Suteevun, T., **Parnpai, R.**, Smith, S.L., Chang, C.C., Muenthaisong, S. and Tian, X.C. 2006. Epigenetic characteristics of cloned and in vitro-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *J. Anim. Sci.* 84: 2065-2071.

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

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Cloning of pig embryo by using ear fibroblasts and tail muscle cells as donor nuclei : Effect of time after maturation and fusion parameters on the rate of fusion and development of embryo. *Thai J. Agri. Sci.* 34: 187-194.

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 (3): 371-384.

7.2. ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2546. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *Lab.Today.* 2: 33-37.

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. อดีต ปัจจุบัน และ อนาคตของการย้ายฝากตัวอ่อน. *เวชสารสัตวแพทย์* 16: 258-269.

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สม สวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. การย้ายฝากตัวอ่อน (E.T.) ในประเทศไทย. *แก่นเกษตร* 15: 271-280.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์. 2545. แนวทางการโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย.* 10: 82-85.

7.3. นำเสนอในการประชุมนานาชาติ

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Takeda, K., Nagai T. and **Parnpai, R.** 2009. Somatic cell nuclear transfer in swamp buffalo. *Proceeding of Buffalo Propagation Conference, 17 December, 2009, Tainan, Taiwan, RPC.*

Srirattana, K., Takeda, K., Matsukawa, K., Tasai, M., Akagi, S., Nirasawa, K., Nagai, T., Y., Kanai, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2009. Quantitative analysis of mitochondrial DNA in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) interspecies cloned embryos. *Proceeding of the 6th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society conference, 16-20 November, 2009, Siem Reap City, Cambodia.* P.57.

Parnpai, R. 2009. Progress of inter-species somatic cell nuclear transfer in bovidae and felidae family. *Proceeding The 7th Asian Symposium on Animal Biotechnology.* Chungbuk National University, Korea, 19 June, 2009.

Suksawaeng, S. Danna, Y. and **Parnpai, R.** 2009. Heart chicken may able to maintain and induce mice embryonic stem cells to form hepatic plate-like structure. *Proceeding of the 4th World Congress on Regenerative Medicine,* 12-14 March 2009, Bangkok, Thailand. p.174.

Srirattana K., Laowtammathron C., Devahudi R., Imsoonthornruksa S., Sangmalee A., Tunwattana W., Lorthongpanich C., Sripunya N., Keawmungkun K., Phewsoi W., Ketudat-Cairns M., and **Parnpai R.** 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of inter-species cloned gaur (*Bos gaurus*) embryos. *Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society,* 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 21: 126.

Liang Y. Y., Ye D. N., Laowtammathron C., Phermthai T., and **Parnpai R.** 2009. In vitro production of swamp buffalo embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments. *Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society,* 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 21: 230.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression profile of Oct4 in pre-implantation embryo of cloned endangered felid species. *Proceeding of the 4th Asian*

Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 89.

Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Effect of activation treatments on development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 137.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Niches, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2007. Embryonic stem cell establishment from mouse single blastomere. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 112.

Parnpai, R. 2007. The progress of interspecies SCNT: Bovidae and felidae cases. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 46.

Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Birth of cloned goat : a preliminary study for conservation of endangered mountain goat. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 80.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Telomerase activity of in inter-species somatic cell nuclear transfer gaur embryos. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 130.

Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. *Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society,* 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 141.

Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Kumpong, O., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression and distribution of Oct-4 in interspecies-cloned long-tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos. *Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society,* 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 149.

Parnpai, R., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Muenthaisong, S., and Ketudat Cairns, M. 2006. Recent status of somatic cell nuclear transfer for conservation of endangered species. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 44-47.

Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Somsa, W., Kongsila, A., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Development of interspecies cloned long tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos after reconstructed with bovine enucleated oocytes and culturing in different condition. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 125-126.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Tangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos taurus*) embryos. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 134-135.

Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Tanwatana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Differentiation of marbled cat (*Pardofelis marmorata*) nuclei after reconstructed with enucleated domestic cat and bovine oocytes. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference,* 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 140.

Parnpai, R., Muenthaisong, S., Suteevun, T., Na-Chiangmai, A., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Sanghuayphrai, N. and Ketudat Cairns, M. 2006. Production of swamp buffalo emryos: Comparison of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer techniques. *Proceeding of the 5th Asian Buffalo* Congress, Naning, China, 18-22 April, 2006, p. 616-620.

Curchoe, C., Suteevun, T., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Analysis of the expression pattern of the imprinted *IGF2R* gene in cloned cattle. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p* 159.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron C., Monson R.L., M. Wiltbank., Sangsitavong S., **Rarnpai R.** and Rutledge, J.J. 2005. Kinetic changes of *in vitro* produced bovine sexed pre-implantation embryos. 2005. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology*, Bangkok, Thailand, 3-4 November, 2005, p.157.

Sang-ngam, C., Imsoonthornruksa S., Tangthai C., Srirattana, K., Tunwattana, W., Muenthaisong, S., Laowtammathron C., Lorthongpanich, C., Ketudart-cairn, M. and **Parnpai, R.** 2005. Interspecies nuclear transfer using female and male gaur *(Bos gaurus)* skin fibroblasts reconstructed with enucleated bovine oocytes. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p 170.*

Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Expression of chromatin remodeling genes in cloned and IVF swamp buffalo embryos. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p* 97-99.

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

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, Imsoonthornsuksa, S., Tangthai, C., Sang-ngam, C., Hochi, S., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2005. Developmental potential of parthenogenetic activation of swamp buffalo embryos between fresh and vitrified oocytes. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 93-97.

Parnpai, R. 2005. Somatic cell nuclear transfer of cattle and buffalo in Thailand. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 4-16.

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

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

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T.,Wongviriya, W, Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. Cloning of leopard cat embryos using enucleated domestic cat oocytes as recipient cytoplast. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference.* Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April 2004. p. 61.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod .Fert. Dev.* 16: 149.

Parnpai, R., Laowtammathron, C., Terao,T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., and Hochi, S. 2004. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference.* Portland, USA, 10-14 January, 2004, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 180-181.

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Somwan, S., Muankatoke, P., Patitung, S. and **Parnpai, R.** 2003. Production of dairy and beef cattle by cloning technology. *Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar and Symposium.* Mie University, Mie, Japan, 21 October 2003. p. 389-393.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi S. and **Parnpai. R.** 2003. Effect of Ficoll in vitrification solution on the post-warmed development of vitrified cloned bovine hatching blastocysts. *Proceeding of Stem Cell and*

Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 48-51.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Terao, T. Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2003. Developmental potential of cloned swamp buffalo embryo reconstructed with vitrified matured oocytes. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends.* Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 43-47.

Parnpai, R. 2003. Mammalian somatic cell cloning status in Thailand. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present Status and Future Trends.* Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003, p. 18-26.

Parnpai, R. and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference.* Auckland, New Zealand, 11-15 January, 2003, Published in *Theriogenology* 59: 279.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference.* Foz Do Iguassu, Brazil, 12-15 January, 2002,, Published in *Theriogenology* 57: 443.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Developmental potential of vitrified cloned swamp buffalo morulae derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Omaha, USA, 13-16 January, 2001, Published in *Theriogenology* 55: 284.

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. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Masstricht, The Netherlands, 9-11 January, 2000. Published in *Theriogenology* 53: 239.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction.* Stockholm, Sweden, 2-6 July 2000, Abstracts Volume 2: 241.

Parnpai, R., Chuangsoongneon, U. and Kamonpatana, M. 1991. Assessment of optimum time for acrosome reaction in swamp buffalo frozen semen. *Proceeding of the 3rd World Buffalo Congress*, Varna, 17-19 May, 1991.

Parnpai, R. and Kamonpatana, M. 1990. Swamp buffalo oocyte maturation in vitro: The optimum assessment using 199 media supplement with FSH, 17β-estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum. *Proceeding of the 5th AAAP Animal Science Congress*, Taipei, Taiwan, 27May -1 June, Vol. III, p. 223.

Parnpai, R., Sophon, S. and Kamonpatana, M. 1987. Short period storage of mouse embryo. *Proceeding of the 4th AAAP Animal Science Congress*, Hamilton, New Zealand, 1-6 February, 1987, p. 261.

Parnpai, R., Intarachote, P., Sophon, S., Wattanodorn, P., Kurdchuchurn, P., Tantrakul, S., Suwankumjaya, T., Srisakwatana, K. and Kamonpatana, M. 1986. Embryo transfer of dairy crossbred cows in tropical environment. *Paper Presented to International Symposium on Modern Advance in Animal Reproduction,* Bangkok, 20-23October, 1986.

Parnpai, R. and Kamonpatana, K. 1989. Optimization of culture media supplement with FSH, 17β-estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum in vitro oocyte maturation of swamp buffaloes. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29November, 1989, p. IV-3.

Prongcharoen, M., Chewataworn, S., Chumrasboon, C., **Parnpai, R.**, and Kamonpatana, M. 1989. Surgical embryo transfer in goat: Effect of breeds on superovulatory response. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. V-4.

Sridech, P., Suwankumjaya, T., **Parnpai, R.**, Meebumroong, K., Intarachote, P. and Kamonpatana, M. 1989. Reciprocal embryo transfer between beef and dairy cattle: Using beef cattle as donor and dairy cattle as recipient. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. V-3.

7.4. นำเสนอในการประชุมระดับชาติ

Srirattana K., Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C., Lorthongpanich C., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Devahudi R., Sangmalee A., Tunwattana W., Somsa W., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of

cloned cattle embryos and inter-species cloned gaur embryos. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 10-16.

Laowtammathron C., Srirattana K., Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Davahudee R., Thongprapai T. Chaimongkol C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Birth of cloned calves after transferred frozen embryos using drop vitrified technique. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 99-105.

Liang Y.Y., Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Srirattana K., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Laowtammathron C., Ye D.N., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of chemical activation treatments on the development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 78-86.

Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Srirattana K., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Laowtammathron C., Davahudee R., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of donor cell source on development and quality of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 87-94.

Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Sangmalee A., Srirattana K., Laowtammathron C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2008. Expression of nuclear reprogramming genes in cloned endangered felid embryos. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* p. 292-297.

Thumanu K., Tanthanuch W., Lorthongpanich C. and Parnpai R. 2008. Comparison between synchrotron infrared microspectroscopic mappings and focal plane array imaging of mouse blastocyst. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 131.

Rattanasuk S., Parnpai R. and Ketudat-Cairns M. 2008. Comparison of primers used for bovine sex determination. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 184.

ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย อนวัช แสงมาลี ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี รุ่ง จันตาบุญ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 25-30.

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา ชุติ เหล่าธรรมธร วันวิสาข์ ผิวสร้อย ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ วันชัย ตันวัฒนะ ธรรมนูญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. การผลิตกระทิงโคลนนิ่งโดยเทคนิคการโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 78-84.

วันวิสาข์ ผิวสร้อย นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. ลูกแพะเกิดจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 19-24.

อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ฤทธิ์วิณห์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2551. ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 85-90.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2008. Oct4 expression in cloned embryo of endangered feline family. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 344-348.

Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2008. Evaluation of activation treatments of bovine oocyte after intracytoplasmic sperm injection. Proceeding of the 4th

Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008, Khon Kaen, Thailand, p. 349-352.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., Chan, A.W.S. and **Parnpai, P.** 2008. Supplemented compound enhances success rate of ES cell establishment from single blastomere. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 340-343.

Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Birth of cloned goats by somatic cell nuclear transfer : Possibility of endangered mountain goat conservation. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 332-335.

Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development and telomerase activity of gaur embryos derived from inter–species somatic cell nuclear transfer. Proceeding of the 4th Symphosium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 336-339.

ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ธรรมนูญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2550. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและอัตราการพัฒนาในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคนมโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็งจากพ่อโค 5 ตัว. ***เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45.*** สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 245-250.

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา อนวัช แสงมาลี รุ่ง จันตาบุญ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2550. อัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคบราห์มันแช่แข็งแบบย้ายฝากโดยตรงหรือการล้างตัวอ่อนแบบ 3 ขั้นตอนก่อนนำไปย้ายฝาก. ***เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45.*** สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ , หน้า 260-265

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Imsoontronruksa, S., Srirattana, K., Sangsritavong, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Production of sexed bovine embryos by *in vitro*

fertilization. การประชุม RGJ seminar series XLVII "Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies". 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 7

Imsoontronruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of hatching stage on cryosurvival of cloned domestic cat blastocyst after vitrification. การประชุม RGJ seminar series XLVII "Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies". 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 59.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoontronruksa, S., Sripunya, N., Thangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. การประชุม RGJ seminar series XLVII "Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies". 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 47-48.

ธวัชชัย เวชยันต์ ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.

สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพาณิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แตงไทย ธวัชชัย เวชยันต์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2548. การเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระบือปลัก Parthenogenetic activation จากโอโอไซท์สดและโอโอไซท์แช่แข็งโดยวิธี Vitrification. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านการพัฒนากลุ่มงานวิจัยในเครือข่ายอุดมศึกษานครราชสีมา, ประจำปี 2548.* หน้า 37-39.

สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แตงไทย ทัสสุมา เทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.**2548. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 59-66.

สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม วันชัย ตันวัฒนะ สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2548. การเจริญของตัว

อ่อนกระทิงโคลนนิ่งโดยใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 73-77.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2547. การเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนควายโคลนนิ่งหลังจากการแช่แข็งไข่โดยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 83-87.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ วัชระ วงศ์วิริยะ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2547. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสจากผิวหนังแมวดาวเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตวแพทย์.* กรุงเทพฯ, หน้า 351-355.

ชุติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว์.* กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42.* สาขาสัตว์. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.

รังสรรค์ พาลพ่าย ธวัชชัย เวชยันต์ ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *บทคัดย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่อง กลุ่มงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547.* หน้า 29.

สุจิตรา หมื่นไธสง ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แตงไทย ทัสสุมา เทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2547. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *บทคัดย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่องกลุ่มงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547.* หน้า 26.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมื่นไธสง วัชระ วงษ์วิริยะ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2546. การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวดาว (*Felis bengalensis*) ข้ามชนิดโดยใช้ไข่แมวบ้าน

(Felis catus) เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน*. พิษณุโลก, หน้า 112-115.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมื่นไธสง และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2546. การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมว โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาวิทยาศาสตร์* กรุงเทพฯ, หน้า 84-88.

ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง และ **รังสรรค์ พาลพ่าย**. 2546 การทดสอบการผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษา นครราชสีมา ประจำปี* 2546. หน้า 54-55.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์*. กรุงเทพฯ, หน้า 86-89.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาสัตว์*. กรุงเทพฯ, หน้า 79-85.

8.5. 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.

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.

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.

9. รางวัลที่ได้รับ

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

9.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

9.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

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

9.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

9.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

9.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง "การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง" ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

10. การจดสิทธิบัตร

13.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช "อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์" ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัติเมื่อเดือนเมษายน 2550

13.2. 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

รศ.ดร. มณฑารพ ยมาภัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวมณฑารพ ยมาภัย

(ภาษาอังกฤษ) Miss Montarop Yamabhai

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

2. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 292 คลองมอญ ซ.วัดครุฑ อิสรภาพ 35 กรุงเทพ 10700

3. ประวัติการศึกษา

3.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ (เกียรตินิยม) ปีที่จบ 2532
สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศ ไทย

3.2 ปริญญาเอก สาขาวิชา อณูชีววิทยา ปีที่จบ 2541
สถาบัน University of North Carolina at Chapel Hill ประเทศ สหรัฐอเมริกา

3.3 การวิจัยหลังปริญญาเอก สาขาวิชา Molecular Cell Biology ปีที่จบ 2545
สถาบัน U of Texas, Southwestern Med. Ctr. ประเทศ สหรัฐอเมริกา

3.4 ฝึกอบรมสาขา เทคโนโลยีชีวภาพ ในหัวข้อ "modern methods in biotechnology"
ณ. Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Braunschweig, Germany
ประเทศ เยอรมันนี ระหว่างเดือน กันยายน - พฤศจิกายน 2452.

4. ผลงานวิจัย

4.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Yamabhai M, Anderson RG: Second cysteine-rich region of EGFR contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 2002, 277:24843-24846

Kay BK, Kasanov J, Yamabhai M: Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods* 2001, 24:240-246.

Yamabhai M, Kay BK: Mapping protein-protein interactions with alkaline phosphatase fusion proteins. *Methods Enzymol* 2001, 332:88-102.

de Beer T, Hoofnagle AN, Enmon JL, Bowers RC, Yamabhai M, Kay BK, Overduin M: Molecular mechanism of NPF recognition by EH domains. *Nat Struct Biol* 2000, 7:1018-1022.

Adams A, Thorn JM, Yamabhai M, Kay BK, O'Bryan JP: Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J Biol Chem* 2000, 275:27414-27420.

Santolini E, Salcini AE, Kay BK, Yamabhai M, Di Fiore PP: The EH network. *Exp Cell Res* 1999, 253:186-209.

Hussain NK, Yamabhai M, Ramjaun AR, Guy AM, Baranes D, O'Bryan JP, Der CJ, Kay BK, McPherson PS: Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem* 1999, 274:15671-15677.

Kay BK, Yamabhai M, Wendland B, Emr SD: Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci* 1999, 8:435-438.

Yamabhai M, Hoffman NG, Hardison NL, McPherson PS, Castagnoli L, Cesareni G, Kay BK: Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem* 1998, 273:31401-31407.

Yamabhai M, Kay BK: Examining the specificity of Src homology 3 domain--ligand interactions with alkaline phosphatase fusion proteins. *Anal Biochem* 1997, 247:143-151.

4.2 ผลงานวิจัยอื่นๆ

Yamabhai, M., Hussain, N.K., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., Ramjaun, A.R., McPherson, P.S., O'Bryan, J.P., Der, C.J., and Kay, B.K., Intersectin: A novel adaptor protein involved in endocytosis. Symposium on endocytosis and intracellular trafficking, 10-23 September, 1998. The department of Biochemistry and Biophysics, Iowa state university, USA.

Yamabhai, M., and Kay, B.K. Ligand specificity of intersectin's EH domains. 2nd International conference on combinatorial library methods for basic research and drug discovery, January 10-12, 1999, University of Arizona, Tucson, USA (recipient of the travel award)

Adams, A., Yamabhai, M., Kay, B.K., and O'Bryan, J.P. Intersectin, a novel adaptor

protein with conserved EH and SH3 domains regulates endocytosis and signal transduction pathways independent of MAPK. Keystone meeting on oncogene networks in signal transduction, *9-14 April, 1999.*

Adams, A., Thorn, J., Yamabhai, M., Blackshear P., Kay, B.K., O'Bryan, J.P. 1999, Cold Spring Habour Tyrosine phosphorylation meeting, USA.

Yamabhai, M. and Kay, B.K. Developing Assays for High-Throughput Screens (HTS) of *Small molecule Libraries with Alkaline Phosphatase Fusion System.* 11th Annual meeting of the Thai society for biotechnology, 15-18 November, 1999, Phuket, Thailand.

Yamabhai, M., Anderson, RGW. Mechanism of EGFR localization to caveolae. Annual meeting of Amer Soc Cell Biolgy, December 8-12, 2001. Convention center, San Francisco, CA, USA.

5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

1. อณูชีววิทยา (Molecular Biology)
2. การตัดต่อทางพันธุกรรม (Genetic engineering)
3. ชีววิทยาของเซลในระดับโมเลกุล (Molecular Cell Biology)
4. เทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวฟาจ (Phage Displayed Technology)
5. เภสัชศาสตร์

6. รางวัลที่เคยได้รับ

1. ทุน STDB (Science and Technology Development Board) Scholarship จาก สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เมื่อปี 2534
2. ทุน Fulbright Pre-doctoral Fellowship จาก ทุนมูลนิธิการศึกษาไทย-อเมริกัน เมื่อปี 2535
3. ทุนรัฐบาลไทย ไปเรียนในระดับปริญญาเอก ในช่วงปี 2537-2541
4. รางวัลการเสนอผลงานวิจัยในงาน International conference on combinatorial library methods for basic research and drug discovery, *January 10-12, 1999* ณ. University of Arizona, Tucson, USA เดือน มกราคม 2542
5. ทุน NIH Postdoctoral Training จาก National Institute of Health ประเทศ สหรัฐอเมริกา ในระหว่าง เมษายน 2543 – มีนาคม 2545

7. งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

1. โครงการวิจัยต่อเนื่องเรื่องการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของโปรตีนบนผิวฟาจเพื่อการศึกษาอันตรกริยาระหว่างโปรตีน จาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในช่วงปี 2542-2543 เป็นจำนวนเงิน71,500 บาท
2. การศึกษาคุณสมบัติการมีอันตรกริยาของโดเมน SH3 และโดเมน ENTH โดยใช้เทคโนโลยีการแสดงออกของเปบไทด์หรือโปรตีนบนผิวฟาจ จาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โครงการสนับสนุนนักวิจัยใหม่ ในช่วงปี 2542-2544 เป็นจำนวนเงิน 200,000 บาท

รศ.น.สพ.มงคล โปร่งเจริญ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย มงคล โปร่งเจริญ

(ภาษาอังกฤษ) *Mr. Mongkol Prongcharoen*

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

2. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอ เมือง จังหวัด ขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40002

ที่อยู่บ้าน: 964 บ้านโนนม่วง ต.ศิลา อ.เมือง จ.ขอนแก่น
รหัสไปรษณีย์ 40000 โทรศัพท์ 043-343-726

3. ประวัติการศึกษา

3.1 ปริญญาตรีสาขา สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต	ปีที่จบ 2532
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ประเทศ ไทย
3.2 ปริญญาโทสาขา	ปีที่จบ
สถาบัน	
3.3 ปริญญาเอกสาขา	ปีที่จบ
สถาบัน	

3.4 อื่น ๆ

- Diploma in Animal Reproduction, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala ประเทศสวีเดน
- Certificate in Equine Obstetrics and the Postpartum Mare, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala ประเทศสวีเดน
- ผ่านการฝึกอบรม ระบบสืบพันธุ์ม้า ประเทศเนเธอแลนด์ ปี 2543

4. ผลงานวิจัย

4.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

-

4.2 ผลงานวิจัยอื่น ๆ

มงคล โปร่งเจริญ. 2540. การใช้อัลตราซาวด์ตรวจระบบสืบพันธุ์ในโค. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. 81 หน้า

มงคล โปร่งเจริญ. 2545. การผสมเทียมในม้า. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. 253 หน้า

มงคล โปร่งเจริญ. 2542. ผลของชนิดสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งและระดับความเข้ม ข้นต่าง ๆ ต่ออัตรารอดของตัว อสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งสุนัข. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 9: 27-34.

Prongcharoen, M., Chewataworn, S., Chumrasboon, C., Parnpai, R., and Kamonpatana, M. 1989. Surgical embryo transfer in goat: Effect of breeds on superovulatory response. *The 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, November 27-29, pp. V-4.

5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

5.1 การย้ายฝากตัวอ่อนโค แพะ

5.2 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

5.3 การจัดการระบบสืบพันธุ์ในโคนม ม้า

5.4 การผสมเทียมในสุนัข

5.5 การใช้อัลตราซาวด์ตรวจระบบสืบพันธุ์ในโค