



รายงานการวิจัย

การแช่แข็งโอโอไซท์ที่กระบือปลักเพื่อทำโคลนนิ่ง  
และแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่ง

Vitrification of swamp buffalo oocytes for somatic cell nuclear  
transfer (SCNT) and vitrification SCNT swamp buffalo embryos

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาดพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ. ดร. มารินา เกตุทัต คาร์นส์

นางอัญชติ ฅ เชียงใหม่

นายนิกร สางห้วยไพร

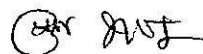
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ น.ส.สุจิตรา หมั่นไธสง ดร.จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ดร.หุติ เหล่าธรรมธร ตลอดจนสมาชิกศูนย์วิจัย เทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดทุกท่าน นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เจ้าหน้าที่สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ คุณปรานซ์ข้าว ปรุเขตต์ ขอขอบคุณโรงพยาบาล อำเภอลองหลวง จังหวัด ปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่กระบือปลัด และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 (F1) ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ในการทดลอง



.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

มีนาคม 2553



## บทคัดย่อ

การทดลองนี้ต้องการศึกษาศักยภาพในการแช่แข็งและละลายโอโอไซท์ ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิสต์หลังการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธี parthenogenetic activation (PA) และ somatic cell nuclear transfer (SCNT) โอโอไซท์ที่เลี้ยงในน้ำยา *in vitro*-matured ทั้งก่อนและหลังการกำจัดสารพันธุกรรม (MII oocytes และ enucleated oocytes ตามลำดับ) จะถูกนำไปไว้ในน้ำยาที่มี 7.5% DMSO และ 7.5% ethylene glycol (EG) นาน 4, 7 และ 10 นาที จากนั้นนำไปไว้ในน้ำยา vitrification ที่มี 15% DMSO, 15% EG และ 0.5 M sucrose นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปแช่แข็ง (ใช้ Cryotop เป็นภาชนะ) หลังจากแช่โอโอไซท์ในน้ำยานาน 4, 7 และ 10 นาที พบว่าสัดส่วนของโอโอไซท์ที่มี vitelline membrane ปกติหลังการละลายที่คล้ายกัน (66–71% ในกลุ่ม MII oocytes และ 69–71% ในกลุ่ม enucleated oocytes) อย่างไรก็ตาม พบว่า 18–20% ของโอโอไซท์ที่ปกติหลังละลายในกลุ่ม MII ไม่พบ 1<sup>st</sup> polar body ภายใน perivitelline space (ไม่สามารถนำไปใช้สำหรับการกำจัดสารพันธุกรรมได้) โอโอไซท์แช่แข็งระยะ MII จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วย 7% ethanol, 10 mg/mL cycloheximide and 1.25 mg/mL cytochalasin-D เมื่อเลี้ยงตัวอ่อนไปแล้ว 7 วัน พบว่าตัวอ่อนเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ 10–13% ของตัวอ่อนที่แช่แข็ง ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (24%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในกลุ่มโอโอไซท์ที่แช่ในน้ำยาแช่แข็งแต่ไม่ถูกแช่ลงในโตรเจนเหลวและละลาย พบว่าตัวอ่อนมีอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ในกลุ่มที่แช่ในน้ำยาแช่แข็ง 4 นาที (22%) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (23%) แต่ในกลุ่มที่แช่นาน 7 และ 10 นาที ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (14-15%) ปริมาณเซลล์ตัวอ่อนทั้งหมด (เฉลี่ย 117-132 เซลล์) และปริมาณสัดส่วนเซลล์ ICM (22-24%) ของตัวอ่อน PA ระยะบลาสโตซิสต์ที่ได้จากการแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (127 เซลล์ และ 25%) หลังการทำโคลนนิ่ง (โดยใช้โอโอไซท์แช่แข็ง) พบว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์มีความใกล้เคียงกับทั้งสามกลุ่มที่แช่ในน้ำยาแช่แข็ง (8-10%) และทั้งสามกลุ่มมีความใกล้เคียงกับกลุ่ม enucleation (7-9%) แต่กลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ปริมาณเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จากกลุ่มโอโอไซท์แช่แข็งระยะ MII และกลุ่ม enucleation (80-90 และ 82-101 เซลล์) มีปริมาณเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (135 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) สัดส่วนของเซลล์ ICM จากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ได้จากกลุ่ม MII และ enucleation หลังแช่แข็งในน้ำยานาน 7 หรือ 10 นาที (20-22%) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (24%) หรือกลุ่มแช่แข็งในน้ำยานาน 4 นาที (MII 23%, enucleated 24%) ดังนั้นการโคลนนิ่งกระป๋องปลักโดยใช้โอโอไซท์ที่ถูกแช่แข็งทั้งจากกลุ่ม MII และ enucleation ส่งผลให้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์มีปริมาณเซลล์ที่ลดลงเล็กน้อย

การทดลองแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งแบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระป๋องปลัก หลังการแช่แข็งและละลายตัวอ่อนระยะมอดูลาโดยวิธี solid surface vitrification method (SSV) การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าขนาดของเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ที่เคลื่อนตัวออกจากเปลือกมีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋องปลักหลังจากแช่แข็งด้วยวิธี vitrification และละลายหรือไม่ การทดลองแรกตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอดูลาจะถูกนำมาแช่ไว้ในน้ำยาแช่แข็งที่มี 4% EG ซึ่งละลายในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 39 °C นาน 12-15 นาที จากนั้นย้ายไปใส่ไว้ในน้ำยาแช่แข็งที่มี 35% EG, 5% polyvinylpyrrolidone, 0.4M trehalose ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS จากนั้นหยดน้ำยาปริมาณ 1-2  $\mu$ l ที่มีตัวอ่อนอยู่ 1-2 ตัวอ่อนลงไปบนผิวโลหะที่แช่อยู่ในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว ซึ่งผิวหน้าแห้งเหล็กจะมีอุณหภูมิประมาณ -150 °C การละลายตัวอ่อนจะทำได้โดยการนำหยดน้ำยาที่มีตัวอ่อนไปละลายในน้ำยา 0.3M trehalose ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 39 °C นาน 3 นาที และนำไปล้าง 5 ครั้งในน้ำยา TCM 199 + 20%FCS ตัวอ่อนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่แข็งและละลายระยะมอดูลาจะถูกเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มท่อไข่โคไโน 100  $\mu$ l ของน้ำยา SOFaa + 10% FCS ที่อุณหภูมิ 39 °C ใน 5% CO<sub>2</sub> ในอากาศ นาน 3 วัน จากตัวอ่อนจำนวน 58 ตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็ง มีตัวอ่อนที่ปกติหลังละลายจำนวน 49 ตัวอ่อน (84.5%) หลังการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วพบว่าตัวอ่อนแช่แข็งละลายระยะมอดูลาเจริญเติบโตสู่ระยะ hatching blastocyst ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (39/49; 79.6% vs 42/50; 84.0%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งด้วยวิธี SSV สามารถใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอดูลาได้ การทดลองที่สองตัวอ่อนระยะ hatching blastocysts อายุ 6.5 วันจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ early-hatching stage, middle-hatching stage and late-hatching stage โดยแบ่งตามขนาดของตัวอ่อนที่โผล่พ้นเปลือกออกมา ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสดังกล่าวจะถูกแช่แข็งในน้ำยา 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose in TCM 199-HEPES + 20% FCS โดยใช้ Cryotop เป็นภาชนะในการเก็บแช่แข็งตัวอ่อน อัตรารอดหลังการละลายและเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอ่อนกลุ่ม late-hatching stage มีความทนทานต่อการแช่แข็งสูงสุด (100%) รองลงมาคือ early-hatching stage (83%) and middle-hatching stage (75%) ตามลำดับ

## Abstract

We investigated the potential of vitrified-warmed buffalo oocytes to develop to blastocysts after parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). *In vitro*-matured oocytes before and after enucleation (MII oocytes and enucleated oocytes, respectively) were put in 7.5% DMSO and 7.5% ethylene glycol (EG) for 4, 7 and 10 min, and then vitrified using Cryotop device after 1-min equilibration in 15% DMSO, 15% EG and 0.5 M sucrose. Following 4-, 7- and 10-min exposure, proportions of the post-warm oocytes with a normal vitelline membrane were similar (66–71% in MII oocytes and 69–71% in enucleated oocytes). However, 18–20% of the normal MII oocytes had no detectable first polar body in their perivitelline space (no potential for subsequent enucleation). When the post-warm MII oocytes were treated for PA by 7% ethanol, 10 mg/mL cycloheximide and 1.25 mg/mL cytochalasin-D, parthenogenetic development into Day-7 blastocysts occurred in 10–13% of cultured oocytes, lower ( $P < 0.05$ ) than fresh (control) oocytes (24%). In the absence of the cooling and warming, blastocyst rates in the 4-min exposure group (22%), but not in the 7-min and 10-min exposure groups (14–15%), were similar to that in the fresh group (23%). The total cell number (group average 117–132 cells) and the ICM ratio (22–24%) of the PA blastocysts derived from vitrified MII oocytes were comparable with fresh oocytes (127 cells and 25%). After SCNT (with ear fibroblasts and vitrified-warmed oocytes), blastocyst rates were similar in three exposure periods for MII oocytes (8–10%) and enucleated oocytes (7–9%), but were lower ( $P < 0.05$ ) than fresh group (15%). The total cell number of the SCNT blastocysts derived from vitrified MII and enucleated oocytes (80–90 and 82–101 cells) was smaller ( $P < 0.05$ ) than from fresh oocytes (135 cells); the ICM ratio of blastocysts derived from the MII and enucleated oocytes after vitrification in 7- or 10-min exposure groups (20–22%) was not different ( $P > 0.05$ ) fresh control oocytes (24%) or those in 4-min exposure group (MII 23%, enucleated 24%). Thus, SCNT of swamp buffalo oocytes following vitrification before or after enucleation resulted in blastocysts with a slightly decreased cell number.

Cryopreservation of SCNT swamp buffalos was separated into 2 experiments. The first experiment was to examine the developmental potential of cloned swamp buffalo morulae cryopreserved by solid surface vitrification method (SSV). The second experiment was to investigate whether the hatching stage of swamp buffalo SCNT blastocysts affected cryosurvival after vitrification. The first experiment, cloned buffalo at morulae stage were vitrified by

equilibrated in 4% EG in TCM 199-HEPES + 20% FCS at 39 °C for 12-15 min before placed in vitrified solution consisting of 35% EG, 5% polyvinylpyrrolidone, 0.4M trehalose in TCM 199-HEPES + 20% FCS. Vitrified droplet consisted of 1-2 embryos were formed by dropping 1-2 µl on a metal surface cooled down to -150 °C. Thawing was performed by directed placing vitrified droplets into 0.3M trehalose in TCM 199-HEPES + 20% FCS at 39 °C for 3 min and washed 5 times in TCM 199 + 20% FCS. Fresh and frozen-thawed morulae were co-cultured with bovine oviductal epithelium cell in 100 µl droplets of SOFaa + 10%FCS at 39 °C in 5% CO<sub>2</sub> in air for 3 days. A total of 58 morulae were vitrified and 49 (84.5%) had normal morphology without lysis after thawing. The hatching rate of vitrified and fresh morulae was not different (39/49; 79.6% vs 42/50; 84.0%). This experiment demonstrated that SSV method can be used to cryopreserved cloned swamp buffalo morulae. The second experiment, hatching blastocysts were harvested at day 6.5, and classified into one of three categories, early-hatching stage, middle-hatching stage and late-hatching stage, according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona pellucida to embryonic diameter inside the zona pellucida. The blastocysts were vitrified in 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose in TCM 199-HEPES + 20% FCS, using Cryotop as a cryodevice. The post-thaw survival of the blastocysts after *in vitro* embryo culture for 24 h found that late-hatching stage (100%) had high cryo-tolerant than early-hatching stage (83%) and middle-hatching stage (75%), respectively.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
สารบัญ .....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญภาพ .....	ฉ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง .....	1
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย .....	2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย .....	3
<b>บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	
2.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ .....	4
2.2 การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ .....	4
2.3 การดูดนิวเคลียสออก .....	4
2.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์ .....	5
2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว .....	5
2.6 การแช่แข็งโอโอไซต์และวิธีการละลาย .....	5
2.7 การแช่แข็งตัวอ่อนและวิธีการละลาย .....	6
2.8 การย้ายตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Inner Cells Mass และ Trophectoderm cells ...	7
2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	8
<b>บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล</b>	
3.1 ผลการแช่แข็งโอโอไซต์ที่กระบือปลักเพื่อทำโคลนนิ่ง .....	9
3.2 ผลการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งที่กระบือปลัก .....	9
3.2.1 อัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอูลตาที่แช่แข็งและละลาย	
โดยวิธี SSV .....	10

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 อัตราอคของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์ที่แช่แข็งและ ละลายโดยใช้ Cryotop .....	10
3.2.3 ข้อวิจารณ์ .....	12
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ .....	15
บรรณานุกรม .....	17
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก: ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์จากการวิจัยในครั้งนี้ .....	23
ประวัติผู้วิจัย .....	24

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงอัตราการรอดของตัวอ่อนกระบือปลั้กระยะมอดูลาหลัง จากแช่แข็งและละลาย .....	10
ตารางที่ 2 แสดงอัตราการรอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งกระบือปลั้ ระยะบลาส โดซิสที่ 6.5 วัน หลังจากเลี้ยงในตู้อบนาน 24 ชั่วโมง .....	11

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงการวัดขนาดตัวอ่อนเพื่อแยกเป็น Early-hatching stage, Middle-hatching stage และ Late-hatching stage .....	7
ภาพที่ 2 ภาพแสดงตัวอ่อน โคลนนิ่งกระบือระยะบลาสโตซิสต์ 24 ชั่วโมง หลังการแช่แข็งและละลาย .....	12



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในขณะนี้ประชากรกระบือปลักในประเทศกำลังลดลงอย่างมากโดยในปี 2523 มีจำนวนกระบือปลักมากกว่า 6 ล้านตัว แต่ในปัจจุบันมีจำนวนกระบือปลักไม่ถึง 1 ล้านตัว ซึ่งมีสาเหตุหลักจากเกษตรกรใช้เครื่องจักรกลทำการเกษตรแทนการใช้แรงงานกระบือปลัก นอกจากนี้อัตราการสืบพันธุ์ของกระบือปลักยังต่ำกว่าโค โดยจะให้ลูก 2 ตัวในเวลา 3 ปี เมื่อเทียบกับโคที่ให้ลูกปีละ 1 ตัว จากอดีตที่ผ่านมาได้มีการนำเทคโนโลยีต่างๆมาใช้ในการเพิ่มจำนวนกระบือปลักพันธุ์ดีเช่น การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน แต่ยังไม่สามารถทำได้ในวงกว้าง และไม่สามารถเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีทั้งเพศผู้และเพศเมียไว้ใช้ขยายพันธุ์ในอนาคตได้ จากการศึกษาที่ทีมงานผู้วิจัยมีเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งในระดับห้องปฏิบัติการ (ริงสรรค์และคณะ, 2543b, Pampai et al., 1999, 2000b, 2002, 2003) นอกจากนี้นักวิชาการของกองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้ทำการคัดเลือกกระบือปลักเพศผู้และเพศเมียที่มีค่าพันธุกรรมยอดเยี่ยมเพื่อเก็บไว้ขยายพันธุ์ (อัญชลี และคณะ, 2545) ดังนั้นจึงควรมีการเก็บเซลล์ร่างกายของกระบือปลักยอดเยี่ยมเหล่านี้ไว้ในรูปธนาคารเซลล์แช่แข็งเพื่อนำไปศึกษาวิจัยด้านการโคลนนิ่ง โดยทำการศึกษาวิจัยทั้งการแช่แข็งโอโอไซท์กระบือปลักเพื่อเก็บไว้ทำโคลนนิ่ง และการแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบกระบือปลักที่คัดเลือกแล้วเหล่านี้เพื่อสร้างธนาคารตัวอ่อนกระบือปลักไว้ใช้ผลิตกระบือพันธุ์ดีในอนาคต ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงในการสูญเสียพันธุกรรมกระบือปลักที่ดีเยี่ยมในอนาคต

#### 1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ผลสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรายงานโดย Illmensee and Hope (1981) ด้วยการโคลนนิ่งหนูถีบจักรโดยใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบฉีดเข้าไปในโอโอไซท์ที่ดูคนิวเคลียสออก จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว แล้วนำไปย้ายฝากให้หนูตัวรับจนได้ลูกเกิดมา ความสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งในปศุสัตว์จนได้ลูกแกะ (Willadsen, 1986); ลูกโค (Prather et al., 1987) และลูกสุกร (Prather et al., 1989) จากความสำเร็จเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายต่างพยายามวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิคการทำโคลนนิ่ง โดยเฉพาะในโคซึ่งเป็นปศุสัตว์ที่มีความสำคัญทั้งด้านเนื้อและนม 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 ได้มีรายงานการเกิดของลูกแกะโคลนนิ่งจากการโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ที่ได้จากต่อมน้ำนมของแกะโตเต็มวัย (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 (Shin et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการโคลนนิ่งกระบือ ปลัดังโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อน เซลล์ไขกระดูกและเซลล์แกรนูโลไซตาเป็นเซลล์ต้นแบบ (รังสรรค์และคณะ 2543b; Pampai et al. 1999, 2000b, 2002, 2003) ในประเทศไทย ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และทีมงานได้ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งโคโดยใช้เซลล์ไขกระดูกเนื้อพันธุ์แบงกาสเป็น เซลล์ต้นแบบจนได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาในวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ไขกระดูกเนื้อพันธุ์บราห์มัน เพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2544 นับเป็นความสำเร็จของการโคลนนิ่งโคพันธุ์บราห์มันรายแรกของโลก (รังสรรค์และคณะ 2543a; Pampai et al. 2000; <http://www.vet.chula.ac.th>) นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ไขกระดูกเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา 7 ตัวจากเซลล์ไขกระดูกตัวเดียวกัน ตั้งแต่วันที่ 25 ตุลาคม 2546 เป็นต้นมา (รังสรรค์ และคณะ, 2547) สำหรับการโคลนนิ่งในกระบือโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบยังไม่มีรายงานความสำเร็จจนได้ลูกกระบือโคลนนิ่งเกิดมา

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างธนาคารเซลล์ร่างกายกระบือ
2. เพื่อสร้างธนาคาร โอโอไซท์กระบือ
3. เพื่อสร้างธนาคารตัวอ่อนกระบือ
4. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระบือที่โคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์สด และที่ผ่าน การแช่แข็งมาแล้ว
5. เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการแช่แข็งโอโอไซท์และตัวอ่อนกระบือโคลนนิ่ง

### 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

#### การแช่แข็งโอโอไซท์

นำโอโอไซท์กระบือปลัดังระยะ MII และ โอโอไซท์ระยะ MII ที่กำจัดสารพันธุกรรมออกแล้ว มาแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop เป็นอุปกรณ์ในการแช่แข็ง โอโอไซท์กระบือทั้งสอง

กลุ่มจะถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษของน้ำยา equilibration solution ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็ง โอโอไซท์ โดยจะแช่โอโอไซท์ในน้ำยาดังกล่าวที่ระยะเวลาที่แตกต่างกันแล้วจึงนำมาประเมินความเป็นพิษของน้ำยาเพื่อให้ได้ข้อมูลการแช่แข็ง โอโอไซท์ที่มีความเป็นพิษกับตัวอ่อนน้อยที่สุด วิธีการประเมินความเป็นพิษของน้ำยาแช่แข็ง จะใช้อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากที่นำโอโอไซท์แช่ในน้ำยาดังกล่าวโดยไม่ถูกแช่ในไนโตรเจนเหลวและกลุ่มที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว มาเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งที่ใช้โอโอไซท์ที่ถูกแช่แข็ง และตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง ซึ่งจะใช้เป็นกลุ่มควบคุม

#### การแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่ง

การทดลองนี้ต้องการศึกษาอัตราการรอดของตัวอ่อน โคลนนิ่งกระป๋องปลัด ระยะเวลาหลอดและ บลาสโตซิส โดยการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะหลอดจะแช่แข็งโดยใช้วิธี Solid surface vitrification (SSV) และการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจะแช่แข็งโดยใช้ Cryotop การแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจะศึกษาว่า ตัวอ่อนระยะใดที่มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากที่สุด การแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งจะใช้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสอายุ 6.5 วันมาแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยแบ่งระยะของตัวอ่อนบลาสโตซิส ออกเป็น 3 ระยะ คือ early-hatching stage, middle-hatching stage และ late-hatching stage

#### 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลองคือ

1. สามารถแช่แข็งโอโอไซท์กระป๋องปลัดและนำมาใช้ในการทำโคลนนิ่งได้
2. ได้วิธีการในการแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องปลัดที่มีอัตราการรอดหลังจากละลายมากกว่า 80%
3. สามารถทำธนาคารตัวอ่อนกระป๋องปลัดแช่แข็งเพื่อไว้ใช้สำหรับย้ายฝากสู่ตัวรับในอนาคต
4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปแก้ปัญหาในการวิจัยการทำโคลนนิ่งที่บางครั้งมีปริมาณโอโอไซท์สดไม่เพียงพอในการทดลอง

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างใบหูกกระบือปลักพันธุ์ดีไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร แล้วปิดทับด้วยกระจกสไลด์ ก่อนเติมน้ำยา  $\alpha$  MEM +10% FBS ปริมาณ 5 ml แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO<sub>2</sub> in air โดยเปลี่ยนน้ำยาทุก 3 วัน เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เจริญออกมาแล้วจะทำการ Passage โดยใช้สารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04%EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca<sup>++</sup> และ Mg<sup>++</sup>) แล้วนำเซลล์ไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา  $\alpha$  MEM +10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณมากๆ จนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงใหม่ในน้ำยา  $\alpha$  MEM+10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> in air แล้ว passage ทุกๆ 3-4 วัน จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

#### 2.2 การเตรียมไข่โตพลาสต์ซิมผู้รับ

ทำการเก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 21G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดโอโอไซท์จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตร ทำการคัดเลือกโอโอไซท์ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้น ไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50  $\mu$ l น้ำยาเลี้ยงโอโอไซท์ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% ซีรัมของกระบือ, 50 IU/ml HCG, 0.02 AU/ml FSH (Antrin<sup>®</sup>, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1  $\mu$ g/ml E<sub>2</sub> นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> นาน 24 ชั่วโมง

#### 2.3 การดูดนิวเคลียสออก

หลังจากเลี้ยงโอโอไซท์ 21 ชั่วโมง แล้วนำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.2% hyaluronidase แล้วคัดเลือกโอโอไซท์ที่สุกแล้ว (มี first polar body) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator

ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5  $\mu\text{g/ml}$  cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการคูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูได้ไปย้อมด้วย 5  $\mu\text{g/ml}$  Hoecht 33342

#### 2.4 การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) โดยใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitelline space ของไข่ที่คูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไข่ครั้งละใบ วางระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า จ่ายกระแสไฟฟ้า 25V/ใบ ระยะเวลาสั้น 15  $\mu\text{sec}$  2 ครั้งต่อเนื่องกัน แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+20% FBS นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted microscope คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วและนำโอโอไซท์ที่ต้องการผลิตตัวอ่อน parthenogenetic activation ไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 10% FBS ที่เติมด้วย 10  $\mu\text{g/ml}$  cycloheximide (CHX) และ 1.25  $\mu\text{g/ml}$  cytochalasin D (CD) ในตู้บ ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%  $\text{CO}_2$  นาน 5 ชั่วโมง

#### 2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา SOFaa (Gardner et al., 1994) + 1% FBS ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100  $\mu\text{l}$  ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  และ 90%  $\text{N}_2$  นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อไข่โค ในน้ำยา SOFaa + 5% FBS ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5%  $\text{CO}_2$  นาน 4 วัน

#### 2.6 การแช่แข็งโอโอไซท์และวิธีการละลาย

นำโอโอไซท์ระยะ MII และโอโอไซท์ระยะ MII ที่ผ่านการคูดนิวเคลียสออกแล้ว มาทำการแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop เป็นภาชนะเก็บโอโอไซท์ระหว่างการแช่แข็ง น้ำยาที่ใช้แช่แข็งประกอบด้วยน้ำยาหลักคือ TCM199-HEPES + 20% FBS สำหรับน้ำยา equilibration solution จะประกอบด้วย TCM199-HEPES +20% FBS ที่มี 7.5% (v/v) EG + 7.5% (v/v) DMSO โดยจะทำการทดสอบความเป็นพิษของน้ำยาแช่แข็ง โดยโอโอไซท์ทั้งสองกลุ่มจะถูกแช่ในน้ำยา equilibration solution นาน 4, 7, หรือ 10 นาที แล้วย้ายไปไว้ในน้ำยา vitrification solution ที่ประกอบด้วย TCM199-HEPES + 20% FBS ที่มี 15% (v/v) EG + 15% (v/v) DMSO + 0.5M Sucrose นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 22-24° C จากนั้นแยกโอโอไซท์เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ถูกแช่แข็งซึ่งโอโอไซท์จะถูกนำไปวางบนปลายพลาสติกของ Cryotop แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว อีกกลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวหลังจากผ่านน้ำยาแช่แข็งนาน 4, 7, หรือ 10 นาที แต่จะถูกย้ายไปไว้ในน้ำยาละลาย

โอโอไซท์ แล้วจึงนำโอโอไซท์ดังกล่าวมาทำโคลนนิ่งหรือ parthenogenetic activation เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการกำจัดสารพันธุกรรม (เฉพาะโอโอไซท์ในกลุ่มที่ถูกแช่แข็งในระยะ MII) อัตราการเชื่อมติดของโอโอไซท์กับเซลล์ต้นแบบ อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน รวมทั้งปริมาณเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

การละลายโอโอไซท์ทำโดยนำปลาย Cryotop ที่มีโอโอไซท์มาแช่ในน้ำยา 0.5M Sucrose ที่ละลายในน้ำยา TCM199-HEPES + 20% FBS นาน 5 นาที ย้ายโอโอไซท์ไปไว้ในน้ำยา TCM199-HEPES + 20% FBS แล้วจึงตรวจความปกติของโอโอไซท์เพื่อนำไปทำโคลนนิ่งต่อไป

## 2.7 การแช่แข็งตัวอ่อนและวิธีการละลาย

### 2.7.1 การแช่แข็งและละลายตัวอ่อนระยะมอรูลา

การแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋องปลักระยะมอรูลาจะแช่แข็งโดยใช้วิธี SSV ได้ โดยนำตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋องปลักระยะมอรูลาจำนวน 1-2 ตัวอ่อน มาแช่ในน้ำยา equilibration solution ที่ประกอบด้วย 4% EG ที่ละลายใน TCM 199-HEPES + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 39 °C นาน 12-15 นาที จากนั้นย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา vitrification solution ที่ประกอบด้วย 35% EG + 5% Polyvinylpyrrolidone + 0.4M Trehalose ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS จากนั้นนำตัวอ่อนและน้ำยาประมาณ 1-2  $\mu$ l ไปหยดลงบนผิวโลหะที่แช่อยู่ในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำหยคน้ำยาที่มีตัวอ่อนไปเก็บใน Cryotube และแช่ในไนโตรเจนเหลวต่อไป

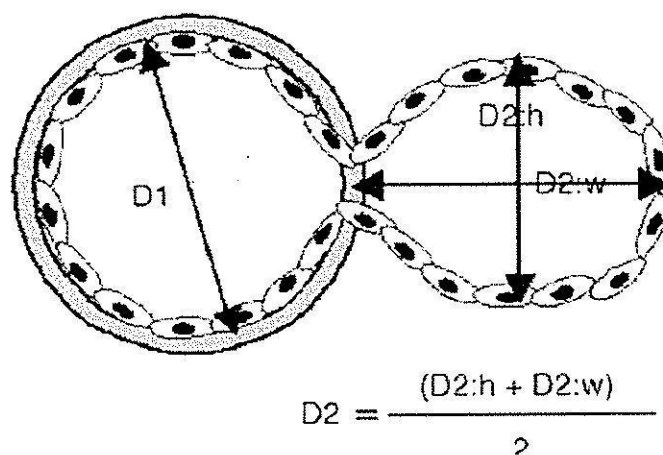
การละลายตัวอ่อนทำโดยนำหยคน้ำยาที่มีตัวอ่อนออกจากไนโตรเจนเหลว จากนั้นย้ายไปใส่ไว้ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS ที่มี 0.3M Trehalose นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิ 39 °C จากนั้นนำตัวอ่อนไปล้าง 5 ครั้งในน้ำยา TCM 199 + 20% FCS แล้วนำตัวอ่อนที่ได้ไปเลี้ยงต่อในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อประเมินอัตราการรอดชีวิตต่อไป โดยสังเกตการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในหลอดแก้ว หากตัวอ่อนหลังการแช่แข็งและละลายสามารถเจริญเติบโตต่อสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้จะประเมินว่าตัวอ่อนดังกล่าวมีชีวิตรอด

### 2.7.2 การแช่แข็งและละลายตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

การทดลองนี้ต้องการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋องปลั เพื่อศึกษาว่าตัวอ่อนระยะใดที่มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากที่สุด การแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งจะใช้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์อายุ 6.5 วันมาแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop เป็นอุปกรณ์ในการแช่แข็ง ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จะถูกแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ early-hatching stage, middle-hatching stage และ late-hatching stage การแบ่งกลุ่มตัวอ่อนทำดังภาพ 1 โดยทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในตัวอ่อน ที่ยังคงอยู่ในเปลือกไข่ (D1) และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางนอกตัวอ่อนที่เคลื่อนที่ออกมาอยู่นอกเปลือกไข่ โดยจะวัดสองทิศทางคือ แนวตั้ง (D2:h) และแนวนอน (D2:w) จากนั้นนำค่าที่ได้รวมกันแล้วหารด้วยสองก็จะได้ค่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของตัวอ่อน ที่เคลื่อนที่



ออกมาอยู่นอกเปลือกไข่ (D2) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณโดยใช้สูตร D2 หากผลลัพธ์ที่ได้้อยู่ระหว่าง 0.01-0.70 จะจัดตัวอ่อนให้อยู่ในกลุ่ม early-hatching stage หากผลลัพธ์ที่ได้้อยู่ระหว่าง 0.71-1.00 จะจัดตัวอ่อนให้อยู่ในกลุ่ม middle-hatching stage และหากผลลัพธ์ที่ได้้อยู่ระหว่าง 1.01-1.70 จะจัดตัวอ่อนให้อยู่ในกลุ่ม late-hatching stage ตัวอ่อนในกลุ่มเดียวกันจำนวน 1-3 ตัวอ่อนจะถูกล้างในน้ำยา TCM199-HEPES + 20% FBS จากนั้นนำไปใส่ไว้ในน้ำยา equilibration solution ที่ประกอบด้วย TCM199-HEPES + 20% FBS ที่มี 10% (v/v) EG + 10% (v/v) DMSO นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 22-24 °C จากนั้นนำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยาแช่แข็ง ที่ประกอบด้วย 20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5M Sucrose นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 22-24 °C จากนั้นนำตัวอ่อนไปวางไว้บนปลายพลาสติกของ Cryotop และดูดน้ำยาที่เกินออกมาแล้วจึงแช่ Cryotop ลงในไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 1 แสดงการวัดขนาดตัวอ่อนเพื่อแยกเป็น early-hatching stage, middle-hatching stage และ late-hatching stage

การละลายตัวอ่อนทำโดยแช่ปลาย Cryotop ในน้ำยา 0.5M Sucrose ที่ละลายในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20%FBS นาน 5 นาที ย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FBS ที่มี 0.4, 0.3, 0.2, 0.1M Sucrose ตามลำดับ น้ำยาละ 5 นาที จากนั้นทำการบันทึกลักษณะภายนอกของตัวอ่อนว่ามีชีวิตรอดหรือตายหลังการแช่แข็งและละลาย แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนนาน 24 ชั่วโมง เพื่อคัดอัตราการรอดของตัวอ่อนต่อไป

## 2.8 การย้ายตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Inner Cells Mass และ Trophectoderm cells

นำตัวอ่อนระยะblastocystic stage มาเลี้ยงในวันที่ 7 ของการเลี้ยง มาย่อย zona pellucida ด้วย 0.5% Protease (Sigma, P-8811) จากนั้นล้างตัวอ่อนในน้ำยา mSOF medium แล้วนำตัวอ่อนแต่ละใบเลี้ยงในน้ำยาที่มี 10% Rabbit Anti Bovine Spleenocyte ที่ละลายด้วย mSOF medium ที่อุณหภูมิ 38.5° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO<sub>2</sub> in air เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเลี้ยงต่อในน้ำยาที่มี 10% Guinea pig complement (Sigma, S-1639) ที่มีการเติม 75 µg/ml propidium iodide (Sigma, P-4170) และ 100

$\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33258 (Sigma, B-2883) ที่อุณหภูมิ  $38.5^{\circ}\text{C}$  ภายใต้บรรยากาศที่มี  $5\% \text{CO}_2$  in air เป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงผนึกตัวอ่อนบนสไลด์แก้วด้วย glycerol จากนั้นจึงส่องนับจำนวนเซลล์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต โดยที่เซลล์ Trophectoderm จะติดสีน้ำเงินของ Hoechst 33258 และ Inner Cells Mass จะติดสีแดงของ propidium Iodide

## 2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การคิดค่าสถิติของข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน และจำนวนเซลล์ตัวอ่อนทำโดยวิธี ANOVA แบบ General linear model procedure in statistical analysis systems (SAS) โดยคิดที่ค่าความแตกต่างทางสถิติที่  $P < 0.05$



### บทที่ 3

#### ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

##### 3.1 ผลการแช่แข็งโอโอไซท์กระปือปลักเพื่อทำโคลนนิ่ง

ผลการทดลองดังกล่าวได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วในวารสาร *Theriogenology*

Muenthaisong S, Laowtammathron C, Ketudat-Cairns M, Pampai R, 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.

จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า เมื่อนำโอโอไซท์กระปือปลักที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว มาทำการแช่แข็งทั้งก่อนและหลังการกำจัดสารพันธุกรรม (MII oocyte และ Enucleated oocytes ตามลำดับ) ด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop โดยนำโอโอไซท์แช่ในน้ำยาที่มี 7.5% DMSO และ 7.5% ethylene glycol (EG) นาน 4, 7 และ 10 นาที จากนั้นนำไปไว้ในน้ำยา Vitrification ที่มี 15% DMSO, 15% EG และ 0.5 M sucrose นาน 1 นาที แล้วจึงนำไปแช่แข็ง พบว่าอัตราของโอโอไซท์ที่มี vitelline membrane ปกติหลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่า 18–20% ของโอโอไซท์ที่ปกติหลังละลายในกลุ่ม MII ไม่พบ 1<sup>st</sup> polar body ภายใน perivitelline space เมื่อนำโอโอไซท์ระยะ MII ไปกระตุ้นให้แบ่งตัวโดยใช้สารเคมี พบว่าตัวอ่อนเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ 10–13% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (24%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามคุณภาพของตัวอ่อนในแง่ปริมาณเซลล์ตัวอ่อนทั้งหมด และ สัดส่วนเซลล์ของ TE:ICM ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เมื่อนำโอโอไซท์แช่แข็งมาทำการโคลนนิ่ง พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง แต่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จากกลุ่มโอโอไซท์แช่แข็งระยะ MII และกลุ่ม Enucleation (80-90 และ 82-101 เซลล์) มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (135 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการโคลนนิ่งกระปือปลักโดยใช้โอโอไซท์ที่ถูกแช่แข็งโดยวิธี vitrification ทั้งจากกลุ่ม MII และ Enucleation ส่งผลให้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์มีปริมาณเซลล์ที่ลดลงเล็กน้อย

##### 3.2 ผลการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระปือปลัก

ส่วนหนึ่งของผลการทดลองดังกล่าวได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วในวารสาร *Theriogenology*

Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Pampai 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

จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า เมื่อนำตัวอ่อนกระปือปลักโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์ที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี linoleic acid-albumin (LAA) มาแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop จากนั้นทำการละลายและเลี้ยงต่อในน้ำยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนแช่แข็งที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีและไม่มี linoleic acid-albumin (LAA) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งยังพบว่าตัวอ่อนกระปือปลักโคลนนิ่งมีความทนทานต่อการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification มากกว่าตัวอ่อนโค โคลนนิ่ง

### 3.2.1 อัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอูลูลาที่แช่แข็งและละลายโดยวิธี SSV

ผลการแช่แข็งและละลายตัวอ่อนกระปือปลักโคลนนิ่งระยะมอูลูลาแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งจากการทดลองพบว่าหลังจากการนำตัวอ่อนกระปือปลักโคลนนิ่งระยะมอูลูลาจำนวน 58 ตัวอ่อนมาแช่แข็งโดยวิธี SSV พบว่าหลังการละลาย ตัวอ่อนมีความปกติทั้งสิ้น 49 ตัวอ่อน (84.5%) และตัวอ่อน 9 ตัวอ่อน มีความผิดปกติ (15.5%) จากนั้นนำตัวอ่อนที่ละลายแล้วมาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 3 วัน พบว่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนสู่ระยะ hatching blastocyst ของตัวอ่อนแช่แข็งและตัวอ่อนสด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (39/49; 79.6% vs 42/50; 84.0%) ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระปือปลักระยะมอูลูลาโดยวิธี SSV สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระปือปลักได้

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการรอดของตัวอ่อนกระปือปลักระยะมอูลูลาหลังจากแช่แข็งและละลาย

Embryos	No. Culture	Normal Morphology (%)	Hatching Blastocyst (%)
Fresh	50	ND	42 (84.0)
SSV	58	49 (84.5)	39 (79.6)

### 3.2.2 อัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์ที่แช่แข็งและละลายโดยใช้ Cryotop

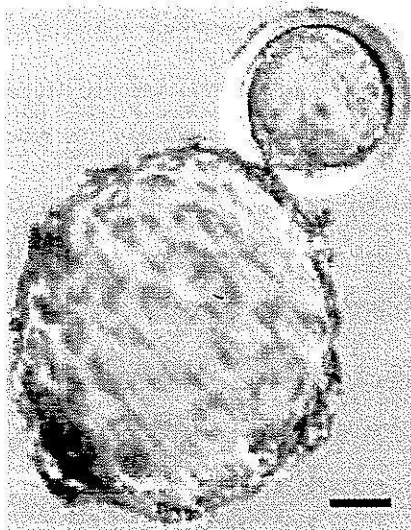
เนื่องจากการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จะมีความทนทานต่อการแช่แข็งมากกว่าระยะอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทำโคลนนิ่งจำเป็นต้องสร้างรูที่เปลือกโอโอไซท์ เพื่อนำสารพันธุกรรมภายในออก ดังนั้นการซึมผ่านของ cryoprotectant อาจเข้าได้เร็วกว่าโอโอไซท์ที่มีเปลือกสมบูรณ์ ประกอบกับโอโอไซท์ของกระปือมีปริมาณ lipid droplet สูงกว่าในโค ซึ่งอาจเป็นการช่วยให้ตัวอ่อนโคลนนิ่งมีอัตราการรอดที่น้อยลงได้หลังการแช่แข็ง การทดลองนี้ทำการแยกกลุ่มตัวอ่อนโคลนนิ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามขนาดของเซลล์ตัวอ่อนที่เคลื่อนที่ออกจากเปลือก คือ early-hatching

stage, middle-hatching stage และ late-hatching stage แล้วนำไปแช่แข็ง พบว่าอัตราการรอดของตัวอ่อน กระบือปลักโคลนนิ่งมีอัตราการรอดที่ค่อนข้างสูงหลังการแช่แข็งและละลายตัวอ่อน ดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนกลุ่ม middle-hatching stage เป็นตัวอ่อนกลุ่มที่มีความอ่อนไหวต่อการแช่แข็งและละลายมากที่สุด เนื่องจากมีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด (75%) แต่ตัวอ่อนในกลุ่ม early-hatching stage มีอัตราการรอดภายหลังการแช่แข็งในระดับที่สูงกว่า middle-hatching stage คือตัวอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตหลังการแช่แข็งและละลายเป็น 75% ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนกลุ่ม late-hatching stage มีอัตราการรอดที่สูงที่สุด (100%) แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตราการรอดโดยรวมของตัวอ่อนทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ามีอัตราการรอดหลังการแช่แข็งที่ 87% อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตหลังการแช่แข็งและละลายพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนโคลนนิ่งกระบือปลักสามารถเจริญเติบโตภายหลังการแช่แข็งและละลายได้อย่างรวดเร็ว และตัวอ่อนที่ได้ยังคงเจริญเติบโตต่อไปได้ ดังภาพที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการรอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งกระบือปลักระยะบลาสโตซิสต์ที่ 6.5 วัน หลังจากเลี้ยงในตู้อบนาน 24 ชั่วโมง

	No. Survived/No.examined (%)			
	Hatching stage			
	Early	Middle	Late	Overall
Buff SCNT	10/12 (83)	6/8 (75)	10/10 (100)	26/30 (87)

หมายเหตุ ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการสร้างธนาคารเซลล์ร่างกายของกระบือทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากเซลล์ร่างกายส่วนต่างๆ ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ลูกอ่อน เซลล์ไขกระดูก เซลล์ไขกระดูก เซลล์ไขกระดูก เซลล์ไขกระดูก มีการสร้างธนาคารโอโอไซท์แช่แข็ง ซึ่งโอโอไซท์นี้ได้มาจากรังไข่กระบือปลักเพศเมียหลายตัว อีกทั้งยังมีการสร้างธนาคารตัวอ่อนกระบือที่ได้จากการทำ IVF และการโคลนนิ่ง



ภาพที่ 2 ภาพแสดงตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋องระยะบลาสโตซิสต์ที่ 24 ชั่วโมงหลังการแช่แข็งและละลาย ซึ่งพบว่าตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งจะสามารถกลับมาเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว Scale bar = 50  $\mu$ m

### 3.2.3 ข้อวิจารณ์

การทดลองนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋อง ระยะบลาสโตซิสต์ด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop ซึ่งการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification มีรายงานการใช้วัสดุ/เทคนิคต่างๆ ในการแช่แข็งเพื่อช่วยให้การลดอุณหภูมิเกิดได้อย่างรวดเร็ว อาทิเช่น Electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) Open pulled straw (OPS; Vajta และคณะ, 1998) Nylon loop (Lane และคณะ, 1999) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ทำให้ปริมาณน้ำยาแช่แข็งมีปริมาณน้อยกว่า 1  $\mu$ l ซึ่งจะช่วยให้การลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยวิธีดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการเก็บรักษาโอโอไซท์และตัวอ่อน จากรายงานก่อนหน้านี้มีการศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งโดยใช้ OPS และ Cryotop ในตัวอ่อนโคและแกะ ตั้งแต่ระยะมอตุลาจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ (Kelly และคณะ, 2004) ระยะ pronuclear ของกระต่าย (Hochi และคณะ, 2004) โอโอไซท์ปลาวาฬ ระยะ GV (Iwayama และคณะ, 2004) ซึ่งการทดลองดังกล่าวทั้งหมดกล่าวว่า การแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ช่วยให้อัตรารอดหลังการละลายที่ดีกว่าการใช้ OPS นอกจากนี้มีรายงานการแช่แข็งตัวอ่อนสุกระยะบลาสโตซิสต์ก่อนที่ตัวอ่อนจะเจริญเติบโตออกจากเปลือกโดยใช้ Cryotop (Esaki และคณะ, 2004; Ushijima และคณะ, 2004) นอกจากนี้มีรายงานการนำ Cryotop ไปใช้สำหรับแช่แข็งในโอโอไซท์และตัวอ่อนมนุษย์ (Katayama และคณะ, 2003; Hiraoka และคณะ, 2004) อีกทั้งยังมีการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องปลักโดยแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII และหลังกำจัดพันธุกรรมในโอโอไซท์แล้ว (Parnpai และคณะ, 2004) การทดลองก่อนหน้านี้โดย Kuwayama และ Kato (2000) ได้กล่าวว่า ข้อดีของการใช้ Cryotop เมื่อเปรียบเทียบกับ OPS คือความเข้มข้นของ cryoprotectant ใน

น้ำยาแช่แข็งของกลุ่ม Cryotop มีเพียง 30% ซึ่งต่ำกว่า OPS มีถึง 40% (Kuwayama และ Kato, 2000, Vajta และคณะ, 1998) แต่อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่ 40% เช่นเดียวกับวิธี OPS แต่พบว่าไม่มีผลกระทบต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งกระปือปลัก

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนกระปือปลักน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ การแช่แข็งตัวอ่อนโค อย่างไรก็ตามมีรายงานการแช่แข็งตัวอ่อนกระปือแม่น้ำระยะมอูลูตาที่ผลิตโดยการ ทำปฏิสนธิในหลอดแก้วในปี 2009 (Manjunatha และคณะ, 2009<sup>a</sup>) โดยศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโดยใช้ น้ำยาที่มีและไม่มี cytoskeletal stabilization (Cytochalasin B) ในน้ำยาแช่แข็ง พบว่าตัวอ่อน สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้ 30.4% และ 19.3% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อน จากทั้งสองกลุ่มนี้ มีความสามารถในการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ต่ำกว่าตัวอ่อน กลุ่มควบคุม (46.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การแช่แข็งตัวอ่อนกระปือแม่น้ำระยะมอูลูตาและบลาสโตซิสต์ด้วยน้ำยาแช่แข็งสูตรต่างๆ ได้แก่ 40% EG หรือ 25% Glycerol + 35% EG หรือ 25% EG + 25% DMSO โดยแช่ตัวอ่อนในน้ำยาแช่แข็งนาน 2, 4 และ 6 นาที พบว่าหลังการทำละลาย ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ได้ (Manjunatha และคณะ, 2009<sup>b</sup>) ซึ่งผลการทดลองทั้งสองมีความสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้คือ ตัวอ่อนกระปือระยะมอูลูตาทั้งที่ผลิตโดยวิธี ปฏิสนธิในหลอดแก้วและโคลนนิ่งมีความทนทานต่อการแช่แข็งสูง แต่อย่างไรก็ตามอัตราการรอดของ ตัวอ่อนระยะมอูลูตามีค่าน้อยกว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

เนื่องจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ผลิตจากการทำโคลนนิ่ง จะมีรูที่เปลือกอันเกิดจากการ กำจัดสารพันธุกรรมในโอโอไซท์ออก ดังนั้นการเคลื่อนตัวของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์จึง จะเคลื่อนออกจากเปลือกได้เร็วกว่าตัวอ่อนที่ผลิตจาก IVF ที่มีเปลือกที่ปิดสนิท นอกจากนี้ตัวอ่อนโค ที่มีการฉีด DNA เข้าไปที่ pronucleus ก็จะทำให้เกิดการเคลื่อนตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ออก จากเปลือกได้เร็วเช่นเดียวกันโดยไม่มีการบางลงของเปลือกเหมือนตัวอ่อน IVF ซึ่งตัวอ่อน IVF หรือ ตัวอ่อนตามธรรมชาติ ตัวอ่อนจะต้องขยายตัวเพื่อดันเปลือกให้ขยายออกจนบางและขาดในที่สุด และ พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่อายุ 7 วันจะมีความทนทานต่อการแช่แข็งได้ดีที่สุด (Ito และคณะ, 1998) มีการศึกษาพบว่าตัวอ่อน IVF ระยะบลาสโตซิสต์ในโค อายุ 6 วัน จะมีความทนทาน ต่อการแช่แข็งน้อยกว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่อายุ 7 วัน นอกจากนี้เมื่อทำการแช่แข็งตัวอ่อน ระยะบลาสโตซิสต์อายุ 7-8 วัน ที่มีการเก็บเซลล์ออกไปตรวจ พบว่าตัวอ่อนมีอัตราการรอดที่สูงหลังการแช่ แข็งและละลาย (78%, Ito และคณะ, 1999; 86%, Vajta และคณะ, 1997 ตามลำดับ) มีการศึกษา เปรียบเทียบตัวอ่อนที่ผลิตจาก *in vivo* และ *in vitro* ในตัวอ่อนโค พบว่าตัวอ่อนจากทั้งสองกลุ่มใน ระยะ expanded blastocyst มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากกว่าระยะอื่นๆ (Massip, 2001) อีกทั้ง Amarnath และคณะ (2004) รายงานว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งโคอายุ 8 วัน ที่มีการเคลื่อนตัวของ ตัวอ่อนออกจากเปลือกมากจะมีอัตราการรอดที่สูงกว่า (86%) ตัวอ่อนที่มีการเคลื่อนตัวของตัวอ่อนออก



จากเปลือกน้อยกว่า (14%) นอกจากนี้การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วยังทำให้เกิดการสะสมของ lipid droplets ภายในตัวอ่อนมากขึ้นและโอโอไซท์กระปือก็มียปริมาณ lipid droplets ที่มาก ส่งผลให้ตัวอ่อนกระปือปลักมีความต้านทานต่อกระบวนการแช่แข็งน้อย ซึ่งคล้ายกับในตัวอ่อนสุกรที่มีความต้านทานต่อการแช่แข็งได้ต่ำ เนื่องจากมียปริมาณ lipid droplets จำนวนมาก (Nagashima และคณะ, 1995) แต่อย่างไรก็ตามการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรระยะ expanded และ hatched blastocyst ด้วยวิธี conventional freezing พบว่าหลังการทำละลาย ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตต่อได้ และเมื่อนำตัวอ่อนไปย้ายฝาก พบว่าตัวรับสามารถตั้งท้องและตัวอ่อนสามารถพัฒนาจนครบกำหนดคลอดได้ (Hayashi และคณะ, 1989) มีการศึกษาพบว่าปริมาณ lipid droplets ของตัวอ่อนโคลนนิ่งจะมีมากในตัวอ่อนระยะ 1-8 เซลล์ และปริมาณ lipid droplets จะลดลงเมื่อตัวอ่อนเจริญเข้าสู่ระยะที่เริ่มจะเคลื่อนตัวออกจากเปลือก (expanded blastocyst) ดังนั้นการแช่แข็งตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst ทำให้ตัวอ่อนทนทานต่อการแช่แข็งมากกว่าระยะอื่นๆ (Li และคณะ, 2006) สอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนกระปือปลักแช่แข็งระยะ late-hatching stage มีค่าสูงกว่ากลุ่ม early- และ middle-hatching stage จากรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งตัวอ่อนที่ผลิตโดยใช้ตัวอ่อนการโคลนนิ่ง, ตัวอ่อนที่ได้จากตัวสัตว์ (*in vivo*) และตัวอ่อน IVF พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งทำยากกว่าตัวอ่อนของอีกทั้งสองกลุ่ม ซึ่งอาจเกิดจากการที่เปลือกโอโอไซท์ถูกทำให้เกิดรูในขบวนการกำจัดสารพันธุกรรมออก อีกทั้งยังพบว่าตัวอ่อนโคลนนิ่งมีความผิดปกติของตำแหน่งเซลล์ ICM และ TE ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดหลังการแช่แข็ง (Koo และคณะ, 2002) นอกจากนี้มีรายงานว่า การแช่แข็งตัวอ่อน IVF ของกระปือแม่น้ำที่ระยะมอดูลาจนถึงระยะ expanded blastocyst ด้วยวิธี vitrification โดยใช้ไนโตรเจนเหลว EFS40 ตัวอ่อนมีอัตราการรอด 90% และเมื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่แช่แข็งจำนวน 71 ตัวอ่อน ให้ตัวรับ พบว่าได้ลูกกระปือแม่น้ำคลอดมาทั้งสิ้น 6 ตัว (Duran และคณะ, 2004) นอกจากนี้มีรายงานการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระปือแม่น้ำเทศเมีย (Water buffalo; *Bubalus bubalis*) ที่ใช้ไซโตพลาสซึมผู้รับเป็นกระปือปลัก (Swamp buffalo; *Bubalus bubalis*) เมื่อนำตัวอ่อนจำนวน 122 ตัวอ่อนไปแช่แข็ง และทำละลายพบว่ามีตัวอ่อนรอดชีวิตเพียง 37 ตัวอ่อน (30.3%) และเมื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อนจำนวน 37 ตัวอ่อน ให้กระปือตัวรับจำนวน 15 ตัว (2-3 ตัวอ่อน/ตัวรับ) พบว่ามีตัวรับตั้งท้องทั้งสิ้น 5 ตัว (33.3%) หลังจากนั้นตัวรับเกิดการแท้งจำนวน 4 ตัว ในวันที่ 53, 59, 145 และ 179 ของการตั้งท้อง และมีตัวรับเพียงหนึ่งตัวเท่านั้นที่สามารถตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดได้ และตัวรับได้คลอดลูกกระปือโดยธรรมชาติ ซึ่งมีน้ำหนักแรกคลอด 40.5 กิโลกรัม ในวันที่ 320 ของการตั้งท้อง (Yang และคณะ, 2009) จากผลการทดลองครั้งนี้ (ตารางที่ 1) พบว่า late hatching blastocyst มีอัตราการรอดที่สูงกว่าทุกกลุ่ม (10/10, 100%) อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาอัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนกระปือปลักแช่แข็งจนกระทั่งครบกำหนดต่อไปในอนาคต

## บทที่ 4

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ การแช่แข็งโอโอไซท์กระป๋องปลักด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop เพื่อนำมาใช้ในการทำโคลนนิ่ง และการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งกระป๋องปลักด้วยวิธี vitrification ด้วยวิธี SSV และ Cryotop เพื่อศึกษาอัตราการรอดของตัวอ่อนระยะมอูลาและบลาสโตซิสต์

การแช่แข็งโอโอไซท์กระป๋องปลักด้วยวิธี vitrification เพื่อนำมาใช้ในการทำโคลนนิ่ง จะแบ่งโอโอไซท์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ การแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII ที่ยังไม่กำจัดการพันธุกรรม และการแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII ที่ได้กำจัดการพันธุกรรมแล้ว โดยบ่มโอโอไซท์ในน้ำยาแช่แข็งที่ระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 4, 7 และ 10 นาที เมื่อนำโอโอไซท์ทั้งสองกลุ่มที่บ่มในน้ำยาแช่แข็งที่ระยะเวลาแตกต่างกันมาทำโคลนนิ่ง พบว่าสามารถผลิตตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งจากโอโอไซท์แช่แข็งได้ นอกจากนี้การบ่มโอโอไซท์ในน้ำยาแช่แข็งนาน 4 นาที มีผลกระทบต่อจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนน้อยกว่าการบ่มโอโอไซท์ในน้ำยาแช่แข็งนาน 7 และ 10 นาที จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่าสามารถแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อผลิตเป็นธนาคารโอโอไซท์ได้ และโอโอไซท์ดังกล่าวมีศักยภาพในการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ได้ ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีความพร้อมที่จะฝังตัวในมดลูกหลังการย้ายฝาก การศึกษาในอนาคตคือการนำตัวอ่อนโคลนนิ่งจากโอโอไซท์แช่แข็งที่ผลิตได้ไปทำการย้ายฝากเพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้อง แท้ง และคลอด โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนกระป๋องปลักที่ได้จากการทำโคลนนิ่งที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง

การศึกษ้อัตรารอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอูลาและบลาสโตซิสต์ หลังการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ด้วยวิธี SSV และ Cryotop จากการทดลองแช่แข็งตัวอ่อนระยะมอูลาด้วยวิธี SSV พบว่าตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งสามารถทนต่อการแช่แข็งได้ และสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ต่อไปได้ การแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งระยะบลาสโตซิสต์ด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop พบว่าตัวอ่อนมีอัตราการรอดสูงถึง 87% จากการศึกษาพบว่าตัวอ่อนระยะ late hatching blastocyst มีความทนทานต่อการแช่แข็งมากกว่าตัวอ่อนกลุ่ม early และ middle hatching blastocyst จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่า สามารถแช่แข็งตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งระยะมอูลาและบลาสโตซิสต์ เพื่อเก็บไว้เป็นธนาคารตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งได้ อย่างไรก็ตามการแช่แข็งตัวอ่อนระยะ late hatching blastocyst มีอัตราการรอดสูงหลังการละลายเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนระยะ early- และ middle-hatching blastocyst สำหรับการศึกษในอนาคตคือ การนำตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งมาทำการย้ายฝากเพื่อคู่อัตราการตั้งท้อง แท้ง และคลอด โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ถูกแช่แข็ง

จากผลการศึกษา เราสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งโอโอไซท์และตัวอ่อนเพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในอนาคต และใช้สำหรับการขนส่งโอโอไซท์หรือตัวอ่อนกระบอกไปในพื้นที่ต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศในปริมาณมาก โดยที่โอโอไซท์และตัวอ่อนยังมีศักยภาพในการเจริญเติบโตหลังการละลายได้



## บรรณานุกรม

- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543a. ความเป็นไปได้ในการผลิต โคพันธุส์ด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไขเป็นเซลล์ต้นแบบการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543b. การโคลนนิ่งตัวอ่อน กระบือปลัดโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ์ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 133-158.
- รังสรรค์ พาลพ่าย ชูดี เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า สือทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สุรียา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาสัตว์
- อัญชลี ณ เชียงใหม่, เอก วิฑูรพงศ์ และ วัชระ ศิริตันดี. 2545. การประเมินพ่อพันธุ์โคเนื้อและกระบือ ของกรมปศุสัตว์ ประจำปี 2545. รายงานโครงการปรับปรุงพันธุกรรมโคเนื้อและกระบือ. กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 85 หน้า.
- Amarnath D, Kato Y, Tsunoda Y. 2004. Cryopreservation of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts: effect of developmental stage. **J Reprod Dev** 50:593-598.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L. Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hates, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echeland, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnology** 17: 456-461.
- 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.
- 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 nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** 280: 1256-1258.

- 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.
- Duran DH, Pedro PB, Venturina HV, Hufana RD, Salazar AL, Duran PG, Cruz LC. 2004. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Theriogenology** 61:1429–39.
- Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M, Nagashima H. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. **Biol Reprod** 71:432–437.
- Farin P.W., and C.E. Farin.,(1995) Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. **Biol. Reprod.** 52 : 676-682.
- Gardner, D.K., Lane, M. and Batt, P. 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.
- Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. **Vet Rec** 125:43–44.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. 2004. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. **Hum Reprod** 19:2884–2888.
- Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M, Hirao M. 2004. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. **Theriogenology** 61:267–275.
- Illmensee, K. and Hoppe, P.C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell** 23: 9-18.
- Ito K, Otake S, Hirabayashi M, Hochi S, Ueda M. 1998. Cryopreservation of in vitro-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. **Theriogenology** 50:1093–1100.
- Ito K, Sekimoto A, Hirabayashi M, Hochi S, Kimura K, Ueda M, Nagao Y. 1999. Effect of time interval between biopsy and vitrification on survival of in vitro-produced bovine blastocysts. **J Reprod Dev** 45:351–355.

- Iwayama H, Hochi S, Kato M, Hirabayashi M, Kuwayama M, Ishikawa H, Ohsumi S, Fukui Y. 2004. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle-stage. **Zygote** 12:333–338.
- Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Osamu K, Stehlik E. 2003. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. **Fertil Steril** 80:223–224.
- Kelly JM, Kleemann DO, Kuwayama M, Walker SK. 2004. Vitrification of in vitro-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. **Reprod Fertil Dev** 16:172–173 (abstract).
- 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.
- 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.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM. 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biol Reprod** 67:487–492.
- Kuwayama M, and Kato O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J Assist Reprod Genet** 17:477 (abstract).
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nat Biotechnol** 17:1234–1236.
- Lanza R.P., Cibelli, J.B., Daiz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin C.E., Hammer C.J., Weat, M.D., and P. Damiani.,(2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning** 2 :79-90.
- Li R, Lai L, Wax D, Hao Y, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Turk JR, Kang JX, Witt WT, Dai Y, Prather RS. 2006. Cloned transgenic swine via in vitro production and cryopreservation. **Biol Reprod** 75: 226–230.
- Manjunatha BM, Ravindra JP, Gupta PS, Devaraj M, Honnappa TG, Krishnaswamy A. 2009<sup>a</sup>. Post-thaw development of in vitro produced buffalo embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **J Vet Sci** 10:153-156.

- Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. 2009<sup>b</sup>. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced *in vitro*. **Vet J.** 179:287-291.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. **Biol Reprod** 54:1059–1069.
- Massip A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod Dom Anim** 36:49–55.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle M. 1995. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature** 374:416.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., 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 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction**. Stockholm, July 2-6, 2000. Abstract Vol. 2: 241.
- 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.Agric.Sci.** 34: 187-194.
- 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.
- Parnpai, R. and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. **Theriogenology** 59: 279.
- Parnpai R, Laowtammathron C, Terao T, Lorthongpanich C, Muenthaisong S, Vetchayan T, Hochi S. 2004. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. **Reprod Fertil Dev** 16:180–1 (abstract).

- 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 hormones-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. **Biol.Reprod.** 65: 1528-1533.
- 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, pp. 147-154.
- Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1993. Multiple generation bovine embryo cloning. **Biol.Reprod.** 48: 715-719.
- Shin, T., S., Kraemer, D., Pryor, J., Lui, I., Rugila, j., Howe, L., Buck, S., Murphy, K. Lyons, L. and Westhusin, M.W. 2002. Nature published online. 14 February 2002. **Nature** 723.
- Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, Nagashima H. 2004. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. **J Reprod Dev** 50:481-486.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev** 51:53-58.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. **Theriogenology** 47:501-9.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Yang BZ, Yang CY, Li RC, Qin GS, Zhang XF, Pang CY, Chen MT, Huang FX, Li Z, Zheng HY, Huang YJ, Liang XW. 2009. An Inter-Subspecies Cloned Buffalo (*Bubalus bubalis*) Obtained by Transferring of Cryopreserved Embryos via Somatic Cell Nuclear Transfer. *Reprod Domest Anim*. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01510.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prella, 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.

## ภาคผนวก ก

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับชาติ และนานาชาติ

1. Muenthaisong S, Laowtammathron C, Ketudat-Cairns M, Pampai R, 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.
2. Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Pampai 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

## ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Pampai

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชานเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

4. ประวัติการศึกษา

- |   |   |
|---|---|
| 4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา  | ปีที่จบ 2523                            |
| สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา   | ประเทศไทย                               |
| 4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา  | ปีที่จบ 2525                            |
| สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์   | ประเทศไทย                               |
| Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy<br>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 <i>in vitro</i> fertilization in farm animals.                 |   |
| เงินทุน 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. ศีพิมพีในวารสารระดับชาติ

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

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

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิตติยา ศรีศักดิ์วิมานะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒนนคร พลฤทธิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ต้นตระกูล. 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 6<sup>th</sup> 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 7<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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 5<sup>th</sup> 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 2<sup>nd</sup> 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 2<sup>nd</sup> 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 2<sup>nd</sup> 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 2<sup>nd</sup> Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand.* p 97-99.
- Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayan, 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 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> 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 12<sup>th</sup> 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 1<sup>st</sup> 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 cytoplasm. *Proceeding of the 1<sup>st</sup> 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., Patitong, S. and **Parnpai, R.** 2003. Production of dairy and beef cattle by cloning technology. *Proceeding of the 10<sup>th</sup> 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*, Maastricht, 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 14<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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,  $17\beta$ -estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum. *Proceeding of the 5<sup>th</sup> 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 4<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress*, Hamilton, New Zealand, 1-6 February, 1987, p. 261.

**Parnpai, R.**, Intarachote, P., Sophon, S., Wattanodorn, P., Kurdchuchum, 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, 20-23 October, 1986.

**Parnpai, R.** and Kamonpatana, K. 1989. Optimization of culture media supplement with FSH,  $17\beta$ -estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum in vitro oocyte maturation of swamp buffaloes. *Proceeding of the 1<sup>st</sup> Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 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 1<sup>st</sup> 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 1<sup>st</sup> 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., Sriyunya 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 47<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand*. 10-16.

Laowtammathron C., Srirattana K., Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Sriyunya 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 47<sup>th</sup> 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 47<sup>th</sup> 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 47<sup>th</sup> 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 20<sup>th</sup> 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 20<sup>th</sup> 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 20<sup>th</sup> Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 184.
- ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กนกวรรณ ศรีรัตน สุมธ อิมสุนทรรักษา ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย อนวัช แสงมาลี ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี รุ่ง จันทาบุญ มาริษา เกตุทัต-คาร์เนิส และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2551. การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำให้โคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 25-30.*
- นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตน ชูติ เหล่าธรรมธร วันวิสาข์ ผิวสร้อย ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มาริษา เกตุทัต-คาร์เนิส วันชัย ต้นวัฒนะ ธรรมบุญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล และ รั้งสรรค พาลพ่าย.

2551. การผลิตกระทิงโคลนนิ่งโดยเทคนิคการโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46*. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 78-84.

วันวิสาข์ ผิวสร้อย นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2551. ลูกแพะเกิดจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบร بلاสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46*. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 19-24.

อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2551. ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46*. สาขาสัตว. 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 4<sup>th</sup> Symposium 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 4<sup>th</sup> Symposium 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 4<sup>th</sup> Symposium 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 4<sup>th</sup> Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 332-335.

Srirattana, K., Imsoontronruksa 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 4<sup>th</sup> Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 336-339.

ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนานา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ธรรมบุญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2550. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและอัตราการพัฒนาในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคนมโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็งจากพ่อโค 5 ตัว. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45*. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 245-250.

สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนานา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา อนวัช แสงมาลี รุ่ง จันดาบุญ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2550. อัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคบราห์มันแช่แข็งแบบย้ายฝากโดยตรงหรือการล้างตัวอ่อนแบบ 3 ขั้นตอนก่อนนำไปย้ายฝาก. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45*. สาขาสัตว. 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 ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ปิยะมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เฟลีน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อัมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ธวัชชัย เวชยันต์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิจิ โฮชิ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระป๋องปลัก Parthenogenetic activation จากโอโอไซท์ที่สดและโอโอไซท์แช่แข็งโดยวิธี Vitrification. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านการพัฒนาทีมงานวิจัยในเครือข่ายอุดมศึกษานครราชสีมา, ประจำปี 2548. หน้า 37-39.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อัมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ทัสสุมา เทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิจิ โฮชิ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 59-66.*

สุเมธ อัมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม วันชัย ดันวัฒนะ สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญของตัวอ่อนกระทั่งโคลนนิ่งโดยใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 73-77.*

จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ชินิจิ โฮชิ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2547. การเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของตัวอ่อนควายโคลนนิ่งหลังจากการแช่แข็งไข่โดยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 83-87.*

จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ วัชระ วงศ์วิริยะ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ บัญชร ถิจิตเดชาโรจน์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2547. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังแมวควายเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตวแพทย์. กรุงเทพฯ, หน้า 351-355.*



ชุตติ เหล่าธรรมธร ทศสุมา เทราโอ จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไรสง รัชชชัย เวชยันต์ ชินิ จิ โฮชิ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่อ อัตราการรอดหลังจาก vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.*

รั้งสรรค์ พาลพ่าย ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไรสง รัชชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ์. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.*

รั้งสรรค์ พาลพ่าย รัชชชัย เวชยันต์ ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไรสง ปิยามาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *บทความย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่อง กลุ่มงานวิจัยในภาคี อุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547. หน้า 29.*

สุจิตรา หมั่นไรสง ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ทศสุมา เทราโอ รัชชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2547. การเจริญเติบโตของระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนกระบือ ปลัดโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *บทความย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่องกลุ่มงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547. หน้า 26.*

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุตติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไรสง วัชระ วงษ์วิริยะ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวควา (*Felis bengalensis*) ข้ามชนิดโดยใช้ไข่แมวบ้าน (*Felis catus*) เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน. พิษณุโลก, หน้า 112-115.*

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุตติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไรสง และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมว โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาวิทยาศาสตร์ กรุงเทพฯ, หน้า 84-88.*

ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไรสง รัชชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2546 การทดสอบการผลิตโคนม และโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษา นครราชสีมา ประจำปี 2546. หน้า 54-55.*

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนา. 2543. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระป๋อง ปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว.* กรุงเทพฯ, หน้า 86-89.

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนา. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิต โคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาสัตว.* กรุงเทพฯ, หน้า 79-85.

### 8.5. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

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

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ์ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนา กำธร มีบำรุง กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ รัชชัช สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒนนคร พฤติ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนา (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. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบความสำเร็จ ได้ถูกแปลโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 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 ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอาอินะโมะโตะ 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. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการศึกษา ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเคอะเนชั่น

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

## 10. การจดสิทธิบัตร

13.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชั้น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายเดช แสงเพชร งอนชัยภูมิ ป่องภัยรี มีสมบัติ สมิง เดิมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือนเมษายน 2550

13.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชั้น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายเดช แสงเพชร งอนชัยภูมิ ป่องภัยรี มีสมบัติ สมิง เดิมพรมราช ชูดี เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรกันย์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

ผศ.ดร. มารินา เกตุทัต คาร์นส์

1. ชื่อ (ไทย) ผศ.ดร. มารินา เกตุทัต คาร์นส์  
(อังกฤษ) Assistant Professor Dr. Mariena Ketudat Cairns
2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี) 38-40-0999  
บัตรประจำตัวประชาชนเลขที่ 3 1014 01120 08 7
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. สถานที่ติดต่อ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์.044-224-355  
โทรสาร 044-224-150  
E-mail: ketudat@ccs.sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา  
พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biological chemistry)  
University of California, San Diego, USA
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ/สนใจพิเศษ  
Molecular Biology, Molecular Genetics, Recombinant Protein production
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ  
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย  
ในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
  - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -
  - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย:
    - 7.2.1 Production of Tilapia Transglutaminase, หัวหน้าโครงการ
    - 7.2.2 Expression of  $\beta$ -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, หัวหน้าโครงการ

### 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

- 7.3.1 Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2, ผู้ร่วมวิจัย NIH, USA  
แล้วเสร็จ 1994
- 7.3.2 Purification of the Enzyme Taq DNA Polymerase หัวหน้าโครงการ NSTDA แล้ว  
เสร็จ 1998
- 7.3.3 Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA Probe, หัวหน้าโครงการ  
NSTDA แล้วเสร็จ 2000
- 7.3.4 Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, ผู้ร่วมวิจัย  
แล้วเสร็จ 2002
- 7.3.5 Molecular identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm, หัวหน้า  
โครงการ NRCT แล้วเสร็จ 2003
- 7.3.6 Genetic, Morphology and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, หัวหน้า  
โครงการ CP 2004

### ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

- Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsatellite Polymorphism in Thai Native  
Fowl (*Gallus gallus domesticus*) Proceeding of the 10<sup>th</sup> Tri-University  
International Joint Seminar & Symposium 2003, Role of Asia in the World, Oct.  
18-21 Mie Univ., Tsu, Mie, Japan
- Chumnarnsilpa, S., Boonkerd, N. and Ketudat-Cairns, M. (2003) (in preparation) Growth  
Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and Killer toxin production in  
Winemaking
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2003) (in preparation) Genetic relationship and  
molecular marker identification of *Dendrocalamus asper* in Thailand
- Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns (2003) Influence of pH on Recombinant  $\beta$ -glucosidase  
Production by *Pichia pastoris* Poster presentation BioThailand 2003 Technology  
for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

- Loonchanta, A. and Ketudat-Cairns (2003) Primer Design for Amplification of Transglutaminase Gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsarellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*).. Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Loonchanta, A., Chumnarnsilpa S., and Ketudat-Cairns, M. (2002) Comparison of recombinant  $\beta$ -glucosidase production by *Pichia pastoris* in stirred and air-lift bioreactor. Proceeding the 14<sup>th</sup> annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2002) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Proceeding the 14<sup>th</sup> annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (poster presentation)
- Manatrinon S., Na Lampang P., Likitdecharote B., Phalaraksh K., Ketudat-Cairns M. and Duangjinda M. The Association of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 (BoLA-DRB3.2) Alleles with Occurrence of Clinical Mastitis in Dairy Cattle Proceeding the 14<sup>th</sup> annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)
- Chumnarnsilpa, S., Ketudat-Cairns, M. and Boonkerd, N. (2001) Growth kinetic of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and killer toxin production in wine making Poster presentation, Biothailand, , 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Poster presentation, Biothailand, 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Srilunchang, K., Khumlert, R. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper*. Poster presentation, Second Graduate conference, Mahidol University, Bangkok

- Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. *Thai J. of Biot* 2 (1): 55-62
- Ngamjun, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Ketudat-Cairns, M. (2000). Tilapia sex chromosome identification DNA probe. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P206-211.
- Carlini, L.E., M. Ketudat, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). *Plant Molec. Biol.*41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)
- Ngamjan, P., Boonanantanasarn, S. and Ketudat-Cairns, M. (1999) Tilapia Sex Chromosome Identification using DNA Probe. Poster presentation, The 5<sup>th</sup> Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, Phuket, Thailand
- Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. *Suranaree J. Sci Technol* 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and Ketudat-Cairns M. (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. *Suranaree J. Sci Technol* 5:95-100
- Ketudat-Cairns, M. Boonanantanasarn, S. and Ngamjan, P. (1998) Paper presentation The Development of Tilapia Sex chromosome Identification System, Biotech forum, Biotechnology for Aquaculture National Science and Technology Development Agency, Bangkok Thailand.
- Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. *Suranaree J. Sci Technol* 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and Ketudat-Cairns M. (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. *Suranaree J. Sci Technol* 5:95-100
- Schmidt, R. J., Pysh, L. D., Ketudat, M., Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings

Schmidt, R. J., Ketudat, M., Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:701-709

#### 7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ:

7.4.1 Production of Tilapia Transglutaminase, หัวหน้าโครงการ

7.4.2 Expression of beta-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, หัวหน้าโครงการ

อัญชลี ณ เชียงใหม่

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางอัญชลี ณ เชียงใหม่  
(ภาษาอังกฤษ) Mrs.Ancharlie Na-Chiangmai

2. รหัสประจำตัว

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชาการสัตวบาล 8 ว.

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ การศึก ษา	ระดับ ปริญญาตรี/ โท/เอก	อักษรย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน การศึกษา	ประเทศ
2514	ปริญญาตรี	วท.บ. วิทยาศาสตร์ บัณฑิต	เกษตรศาสตร์	สัตวบาล	มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์	ไทย
2535	ปริญญาโท	M.S.Master Degree	Agricultural Science	Animal Breeding	Massey University	New Zealand
2539	ประกาศนียบัตร ชั้นสูง	Postgraduate Cert. in Rural Sci.	Animal Breeding And Genetics	Animal Breeding	University of New England	Australia

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา -

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในกาทำวิจัยว่าเป็นหัวหน้าในโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละเรื่อง

6.1	งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สถานภาพในการทำวิจัย
1	Increasing productivity through genetic evaluation of swamp buffaloes in developing countries	2002	หัวหน้าโครงการวิจัย
2	Population structure of Thai indigenous cattle for national breeding improvement strategy	2002	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
3	Current Situation and Development Trend of Beef Production in Thailand	2002	หัวหน้าโครงการวิจัย
4	การวิเคราะห์ และประเมินผลระบบการบันทึกข้อมูล โครงสร้างแผนการปรับปรุงพันธุ์ของปศุ	2545	ผู้ร่วมโครงการวิจัย

## สัตว์พื้นเมือง : ศึกษาศรีโคพื้นเมือง

5	การประมาณค่าทางพันธุกรรมของลักษณะการเจริญเติบโตและสัดส่วนร่างกายของกระบือพื้นเมืองโดย Animal Model	2545	ที่ปรึกษาโครงการ
6	The Development of Swamp Buffalo in Thailand	2001	หัวหน้าโครงการวิจัย
7	การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บไอไอไซด์ โดยใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วย คลื่นเสียงความถี่สูงในกระบือปลักสาว	2543	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
8	Genetic improvement of swamp buffalo in Thailand	2000	หัวหน้าโครงการวิจัย
9	Estimates of genetic parameters for growth and skeletal measurements in Thai swamp buffalo	2000	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
10	การปรับปรุงพันธุกรรมของสัตว์ในเขตร้อน	2542	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
11	Performance and cytogenetic aspects of swamp x river crossbred buffaloes	1998	หัวหน้าโครงการ
12	The environmental effects on growth traits of swamp buffaloes	1998	หัวหน้าโครงการ
13	ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจจากการขุนอู โคพันธุ์บราห์มัน กระบือพื้นเมือง และ กระบือลูกผสมมูร่าห์-พื้นเมือง ที่เลี้ยงในแปลงหญ้าที่ปรับปรุงคุณภาพแล้ว	2541	ที่ปรึกษาโครงการ
14	ค่าทางพันธุกรรมและผลตอบแทนจากการคัดเลือกจากลักษณะการเจริญเติบโตของกระบือปลัก	2540	หัวหน้าโครงการวิจัย
15	Different karyotypes in crossbred buffaloes (swamp X river)	1994	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
16	Growth performance of various crossbred buffaloes raised under pasture condition	1994	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
17	Predictions of genetic gain of swamp buffalo in	1994	ผู้ร่วมโครงการวิจัย



Thailand			
18	Management for reducing calving interval of swamp buffalo	1989-1991	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
19	Fattening potential and carcass characteristics of swamp buffaloes and the crossbreds using palm kernel cake as energy source	1989-1991	หัวหน้าโครงการวิจัย
20	ปริมาณน้ำนมและส่วนประกอบน้ำนมของกระบือมูราห์และลูกผสม 50%มูราห์	1987-88	หัวหน้าโครงการวิจัย
21	การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับปริมาณการให้นม และ ส่วนประกอบของน้ำนมในแม่กระบือปลัก	1987-88	ผู้ร่วมโครงการวิจัย

## 6.2 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อเรื่อง และสถานภาพในการทำวิจัย

ที่	งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อเรื่อง	สถานภาพในการทำวิจัย
1	โครงการทดสอบพันธุ์และกระจายพันธุ์กระบือในระดับเกษตรกรรายย่อย	หัวหน้าโครงการวิจัย
2	การเจริญเติบโตและความสมบูรณ์พันธุ์กระบือพื้นเมืองที่มี การจัดการแบบเลี้ยงปล่อยในแปลงหญ้า	ที่ปรึกษาโครงการวิจัย
3	อิทธิพลจากพันธุกรรมโดยตรง อิทธิพลจากพันธุกรรมของ แม่และอิทธิพลของลักษณะปรากฏของแม่ต่อน้ำหนักเกิด และน้ำหนักหย่านมของกระบือพื้นเมือง	หัวหน้าโครงการวิจัย
4	ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของน้ำหนักหย่านมของ กระบือปลัก เมื่อใช้ระบบการผสมพันธุ์แบบเปิดฝูง	หัวหน้าโครงการวิจัย
5	การประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะการ เจริญเติบโตของพ่อพันธุ์กระบือปลัก ของกรมปศุสัตว์โดย การใช้พ่อพันธุ์ร่วม	หัวหน้าโครงการวิจัย
6	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการตรวจหา เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่จำเพาะต่อความสมบูรณ์พันธุ์ ในกระบือพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	หัวหน้าโครงการ

นายนิกร สางห้วยไพโร

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายนิกร สางห้วยไพโร

(ภาษาอังกฤษ) (Mr. Nikorn Sanghuayphrai)

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชาการสัตวบาล 6 ว.

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูนกลาง ต.หนองรี อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี 15190

โทรศัพท์/โทรสาร 0-3646-1600

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาตรี/โท/เอก	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2528	ปริญญาตรี	วท.บ. วิทยาศาสตร์ บัณฑิต	เกษตรศาสตร์	สัตวศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

6. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อแผนงานและหรือโครงการวิจัยเรื่อง : ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำการวิจัย

ที่	ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สถานภาพในการวิจัย
1	การเลี้ยงกระบือของเกษตรกรในหมู่บ้านอนุรักษ์และพัฒนากระบือปลักไทยของจังหวัดชัยภูมิ	2545	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
2	การประมาณค่าอัตราพันธุกรรมและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อลักษณะน้ำนมแรกเกิดและน้ำนมหย่านมของกระบือไทย	2544	หัวหน้าโครงการวิจัย
3	อายุเฉลี่ยของพ่อแม่พันธุ์เมื่อให้ลูกและจำนวนสัตว์ทดแทนที่มีผลต่อการปรับปรุงพันธุ์กระบือกรมปศุสัตว์	2544	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
4	สมการทำนายน้ำหนักกระบือพื้นเมืองเพื่อใช้ในฟาร์มเกษตรกร	2544	ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ที่	ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง	ปีที่พิมพ์	สถานภาพในการวิจัย
5	ปัจจัยที่มีผลต่อระยะขู่มท้องในแม่กระบือปลักโดยการผสมเทียม	2543	หัวหน้าโครงการวิจัย
6	การเลี้ยงกระบือของเกษตรกรรายย่อยบางหมู่บ้านในจังหวัดสุรินทร์	2542	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
7	Growth Performance of Various Crossbred Buffaloes Raised under Pasture Condition	1994	หัวหน้าโครงการวิจัย
8	Phenotypes of F <sub>2</sub> Crossbreds between riverine and Thai swamp buffaloes	1994	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
9	อายุเมื่อให้ลูกตัวแรกของแม่กระบือปลักโดยการเลี้ยงด้วยใบกระถินแห้งและมันสำปะหลังเส้นเป็นอาหารข้นเสริม	2534	ผู้ร่วมโครงการวิจัย

## 7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อเรื่อง และสถานภาพในการวิจัย

ที่	ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง	สถานภาพในการวิจัย
1	ผลของความผิดปกติของโครโมโซมต่อการผลิตโค กระบือ	หัวหน้าโครงการวิจัย
2	การประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์กระบือปลักเพศเมียเพื่อคัดเลือกเป็นกระบือทดแทนในฝูงของสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์ศรีสะเกษ	หัวหน้าโครงการวิจัย
3	การขายโคเนื้อคัดออกพันธุ์อเมริกันบราห์มัน โดยวิธีการประมูลราคาของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูนกลาง ปี 2545-2546	หัวหน้าโครงการวิจัย
4	ปัจจัยที่ไม่ใช่พันธุกรรมที่มีอิทธิพลต่อระยะห่างการให้ลูกของแม่กระบือปลักไทย	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
5	ความก้าวหน้าโครงการวิจัยอูฐในประเทศไทย : ผลผลิตน้ำนม การเจริญเติบโตและความสมบูรณ์พันธุ์ของอูฐพันธุ์ตะโหนดเดียว	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
6	ปริมาณผลผลิตน้ำนมและความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมไฮลอสไต้น์ฟรีเซียน 75 %(TMZ)ภายใต้สภาพการเลี้ยงของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูนกลาง	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
7	ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของน้ำหนักหย่านมของกระบือปลักเมื่อใช้ระบบการผสมพันธุ์แบบเปิดฝูง	ผู้ร่วมโครงการวิจัย



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Theriogenology

Theriogenology 64 (2005) 1185–1196

[www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the)

## Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution

Chuti Laowtammathron<sup>a</sup>, Chanchao Lorthongpanich<sup>a</sup>,  
Mariena Ketudat-Cairns<sup>a</sup>, Shinichi Hochi<sup>b,\*</sup>, Rangsun Parnpai<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology,  
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>b</sup> Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

Received 24 November 2004; accepted 6 February 2005

### Abstract

The objective was to determine whether the hatching stage of cattle and swamp buffalo somatic cell nuclear-transferred (SCNT) blastocysts affected cryosurvival after vitrification, and whether addition of linoleic acid–albumin (LAA) to the IVC medium and Ficoll to the vitrification solution improves cryosurvival. Fused couplets were activated with ethanol and cycloheximide–cytochalasin D (day 0), and were allowed to develop in the presence of 0.3% BSA or 0.1% LAA + 0.2% BSA. Hatching blastocysts were harvested at day 7.0 (cattle) or day 6.5 (buffalo), and classified into one of three categories, according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona to embryonic diameter inside the zona. The blastocysts were vitrified in 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 0.5 M sucrose, with or without 10% Ficoll in TCM199 + 20% FBS, using Cryotop as a cryodevice. The post-thaw survival of the blastocysts was assessed by *in vitro* culture for 24 h. In cattle, when the LAA-supplemented IVC medium and the Ficoll-free vitrification solution were used, cryosurvival of the early-hatching blastocysts (77%) was not different from those of middle- and late-hatching blastocysts (74 and 80%, respectively). Inclusion of Ficoll in the vitrification solution did

\* Corresponding authors. Tel.: +66 44224244 (R. Parnpai)/+81 268215350 (S. Hochi);  
fax: +66 44224150 (R. Parnpai)/81 268215830 (S. Hochi)  
E-mail addresses: [shochi@shinshu-u.ac.jp](mailto:shochi@shinshu-u.ac.jp) (S. Hochi), [rangsun@ccs.sut.ac.th](mailto:rangsun@ccs.sut.ac.th) (R. Parnpai).

not improve the cryosurvival of SCNT blastocysts (54 to 68%). Early-hatching SCNT blastocysts produced in the absence of LAA were sensitive to the vitrification procedure (cryosurvival 56%;  $P < 0.05$  versus 80% in the late-hatching blastocysts). The full-term developmental potential of SCNT blastocysts was proven only in the non-vitrified control group. In buffalo, the mean cryosurvival of hatching SCNT blastocysts produced with LAA (89%) was not different from that of those produced without LAA (87%). In conclusion, bovine SCNT blastocysts, regardless of their hatching stage, were relatively resistant to vitrification by the ultra-rapid cooling procedure when the blastocysts were produced in the presence of LAA. Furthermore, swamp buffalo SCNT blastocysts were more tolerant of vitrification than bovine SCNT blastocysts.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Cryotop; Ficoll; Hatching; LAA; Nuclear transfer

## 1. Introduction

Recent advances in embryo cryopreservation in bovine species include high survival rates after vitrification by ultra-rapid cooling procedures. With IVF-derived bovine embryos, ultra-rapid cooling in cryodevices such as open-pulled straws (OPS) [1] and gel-loading tips [2] has made it possible to cryopreserve embryos at various developmental stages ranging from 1-cell zygotes to expanded blastocysts. Embryos produced by nuclear transplantation have mechanical slits in their zonae pellucidae, and therefore initiate hatching earlier than non-manipulated embryos. Nguyen et al. [3] were the first to achieve high in vitro survival of bovine somatic cell nuclear-transferred (SCNT) blastocysts cryopreserved by a combination of partial dehydration and vitrification. They used conventional 0.25-mL French straws as embryo containers and a vitrification solution consisting of 40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3 M sucrose (EFS40), originally reported by Kasai et al. [4]. Gong et al. [5] used the same EFS40 solution for vitrification of SCNT embryos and successfully produced a cloned calf following transfer of nine vitrified-warmed embryos. Another cloned calf has been delivered from a SCNT blastocyst vitrified in a solution consisting of 20% EG + 20% DMSO + 0.6 M sucrose, using the OPS system [6].

Removal of serum from the IVC medium for culturing presumptive zygotes improved the resistance of blastocysts to cryopreservation [7–9]. Abe et al. [9] reported that cytoplasmic lipid droplets were highly accumulated in the bovine morulae and blastocysts when the IVF zygotes were cultured in IVC medium that contained serum. Supplementation with the unsaturated fatty acid-conjugated BSA (linoleic acid-albumin, LAA), to the IVM and IVF media [10] and IVC medium [11–13] produced bovine zygotes and embryos resistant to the conventional two-step freezing procedure.

In contrast to the highly reproducible SCNT procedure in cattle, efficiency in producing SCNT buffalo embryos is not satisfactory [14,15], despite an increased demand for cloned buffaloes. We have previously reported that efficiency in producing SCNT blastocysts in swamp buffalo (19–22%) was approximately half of that in cattle (39–41%) [15]. On the other hand, both bovine- and buffalo-enucleated oocytes receiving buffalo fibroblasts equally developed into blastocysts (33 and 39%, respectively) [16]. There have been only a few reports on the cryopreservation of buffalo embryos [17–21], including the birth of calves after transfer of vitrified-warmed water buffalo IVF-derived embryos [21].

The present study was undertaken to determine whether the hatching stage of bovine SCNT blastocysts affects cryosurvival after vitrification by the minimum volume cooling (MVC) procedure, and whether addition of LAA to the IVC medium and of Ficoll to an BG + DMSO-based vitrification solution improves cryosurvival (experiment 1). An additional vitrification study was conducted for swamp buffalo SCNT hatching blastocysts produced by IVC, with or without LAA (experiment 2).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and media

All chemicals were purchased from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise. For culturing donor cells, alpha minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), defined hereafter as  $\alpha$ -MEM/FBS, was used. For cryopreserving the cultured donor cells, 10% DMSO was added to the tissue culture medium 199 (TCM199) supplemented with 25 mM HEPES and 20% FBS, defined hereafter as HEPES-buffered M199/FBS. The IVM medium for oocyte maturation was TCM199 supplemented with 10% FBS, 50 IU/mL hCG (Chorulon; Intervet, Boxmeer, Netherlands), 0.02 AU/mL FSH (Antrin; Denka Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) and 1  $\mu$ g/mL estradiol 17 $\beta$ . The Emcare holding medium (ICP Bio, Auckland, New Zealand) was used as the basal medium throughout the process of enucleation to ethanol activation, except during electrofusion, when the Zimmermann medium [22] was used. The IVC medium for culturing SCNT embryos was modified synthetic oviduct fluid with amino acids (mSOFaa) [23] supplemented with 0.3% fatty acid-free BSA (Sigma, A6003) or 0.1% LAA (Sigma, L8384) + 0.2% fatty acid-free BSA.

### 2.2. Production of SCNT blastocysts

#### 2.2.1. Preparation of donor cells

The ear skin of adult Holstein cow and swamp buffalo ( $n = 1$  each) was biopsied and transported to the laboratory. Skin tissues were removed from cartilage and cut into small pieces before being placed in 60-mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and covered with a sterile glass slide. An amount of 5 mL of  $\alpha$ -MEM/FBS was added into the dishes and the tissue was cultured for 8–10 days in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37 °C. The fibroblasts outgrowing from ear skin tissues were harvested using 0.25% Trypsin-EDTA and seeded in 5 mL of  $\alpha$ -MEM/FBS in a 25-cm<sup>2</sup> culture flask (Nunc). At sub-confluence, fibroblasts were harvested by standard trypsinization and subjected to passages. The fibroblasts were frozen at the third cell culture passage and stored in liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>). The post-thaw fibroblasts were cultured in  $\alpha$ -MEM/FBS and used for nuclear transfer between passages 3 and 8 of culture. A few minutes before donor cell injection, a single cell suspension of the fibroblasts was prepared in an Emcare holding medium.

### 2.2.2. Preparation of recipient cytoplasm

Abattoir-derived bovine (Holstein) and buffalo ovaries were transported to the laboratory within 4 h of slaughter. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by aspiration from follicles 3–6 mm in diameter using an 18-gauge needle attached to a 10 mL syringe, and washed four times with PBS supplemented with 0.1% polyvinyl pyrrolidone (PVP). Each of 20 COCs was cultured in 100  $\mu$ L droplets of IVM medium covered with mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 21 h.

At 21 h of IVM culture, the cumulus cells were mechanically removed by repeated pipetting using a fine-tip pipette in 0.2% hyaluronidase and washed five times in the Emcare holding medium. Oocytes with an extruding first polar body were placed in 5  $\mu$ g/mL cytochalasin B for 15 min, and enucleated by a micromanipulator under an inverted microscope (200 $\times$  magnification). Briefly, the zona pellucida close to the first polar body was dissected with a glass needle and a small volume ( $\sim$ 10%) of cytoplasm lying beneath the first polar body was squeezed out of the opening of zona pellucida. The enucleated oocytes were washed five times in the Emcare holding medium and kept in the same medium until donor cell injection. The successful enucleation of each oocyte was confirmed by Hoechst 33342 fluorescent staining of the corresponding karyoplast that was squeezed out.

### 2.2.3. Reconstruction and IVC

An individual donor cell, 14 to 16  $\mu$ m in diameter [14], was inserted into the perivitelline space of the cytoplasm, using a slit in the zona pellucida dissected at enucleation. The donor cell-cytoplasm couplets were fused in the Zimmermann medium by two direct currents (2.4 kV/cm for 15  $\mu$ s in cattle, and 2.6 kV/cm for 17  $\mu$ s in buffalo; the distance between electrodes was about 110  $\mu$ m) generated by a hand-made fusion machine (SUT F-1, Suranaree University of Technology). The number of couplets successfully fused was recorded 1 h after electro-stimulation. The fused couplets (reconstructed embryos) were activated by a combined treatment of 7% ethanol in the Emcare holding medium for 5 min and 10  $\mu$ g/mL cycloheximide + 1.25  $\mu$ g/mL cytochalasin D in mSOFaa medium + 10% FBS in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 5 h.

The reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium supplemented with 0.3% BSA or 0.1% LAA + 0.2% BSA in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> at 38.5 °C for 2 days (20 embryos per 100  $\mu$ L droplet). Thereafter, SCNT embryos at the 8-cell stage were selected and co-cultured with bovine oviductal epithelial cells (BOEC) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 5 days (10 embryos per 100  $\mu$ L droplet), as described previously [14]. Half of the volume of culture medium was replaced every day.

### 2.2.4. Classification of hatching blastocysts

The blastocysts at the hatching stage were harvested at day 7 (in the case of cattle) or day 6.5 (in the case of buffalo) and photographs were taken. As shown in Fig. 1, three hatching stages were identified according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona (D2) to embryonic diameter inside the zona (D1); early-hatching stage: D2/D1 = 0.01–0.70, middle-hatching stage: D2/D1 = 0.71–1.00 and late-hatching stage: D2/D1 = 1.01–1.70. Hatching blastocysts that developed beyond the D2/D1 ratio of 1.71 (mostly or



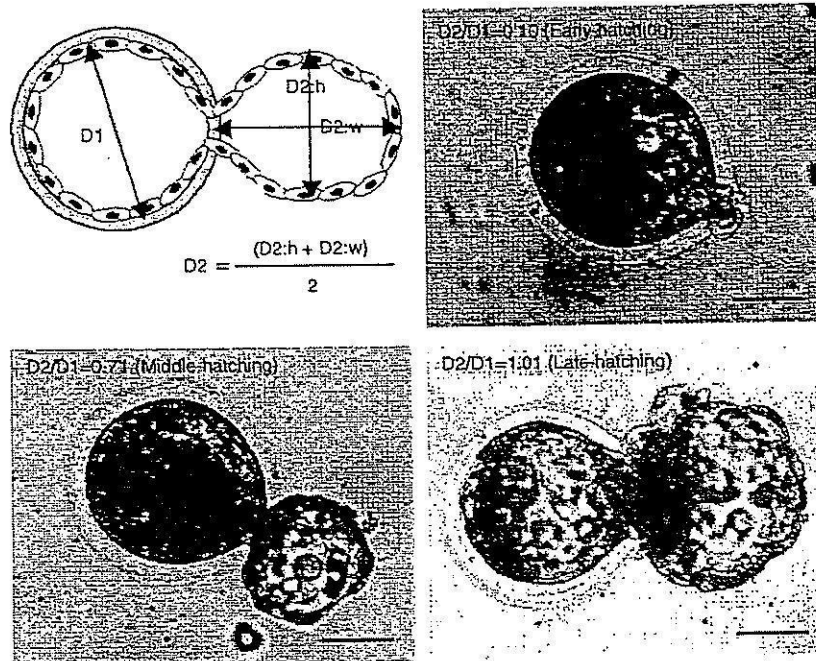


Fig. 1. Classification of hatching stage of bovine and swamp buffalo SCNT blastocysts. Hatching blastocysts were classified into one of three groups according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona (D2) to embryonic diameter inside the zona (D1); Early-hatching stage:  $D2/D1 = 0.01\text{--}0.70$ , Middle-hatching stage:  $D2/D1 = 0.71\text{--}1.00$ , late-hatching stage:  $D2/D1 = 1.01\text{--}1.70$ . Some representative photographs of hatching bovine SCNT blastocysts are shown. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

completely hatched) or those with extremely low morphological quality were not used in the present study.

### 2.3. Vitrification and cryosurvival assay

#### 2.3.1. Vitrification by MVC procedure

Embryos were exposed to 10% (v/v) EG + 10% (v/v) DMSO in HEPES-buffered M199/FBS for 2 min at 22 °C, and then transferred into a vitrification solution consisting of 20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose with and without 10% (w/v) Ficoll in HEPES-buffered M199/FBS. In the buffalo series, Ficoll was not added to the vitrification solution. One to three embryos were placed on a sheet of each Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) in a small volume of the vitrification solution (<1  $\mu\text{L}$ ). The Cryotop device was plunged into  $\text{LN}_2$  after the embryos were exposed to the vitrification solution for 30 s at 22 °C.

#### 2.3.2. Warming and culture for survival assay

After storage in  $\text{LN}_2$ , the embryos were thawed by immersing the Cryotop into 0.5 M sucrose in HEPES-buffered M199/FBS for 5 min at 22 °C. Finally, the embryos were



placed into HEPES-buffered M199/FBS following a stepwise dilution with 0.4, 0.3, 0.2, and 0.1 M sucrose solutions at 5 min intervals. The post-warm embryos were washed three times with mSOFaa containing BSA or LAA + BSA (in which the tested embryos were produced), and co-cultured with BOEC in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 24 h (1–5 embryos per 100 µL droplet). The embryos developing to a more advanced hatching stage, with a clearly visible inner cell mass, were considered to be surviving.

### 2.3.3. Embryo transfer to recipients

Some bovine SCNT blastocysts were transferred to recipients after vitrification, warming, and in vitro culture for 24 h. One or two embryos were transferred into the uterine horn (ipsilateral to ovulation) of a recipient Holstein cow or heifer that had been synchronized naturally or by treatment with 500 µg of a PGF<sub>2α</sub> analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia). Fresh control day-7 SCNT blastocysts were transferred to synchronous recipients. Pregnancy was diagnosed on day 40 by ultrasonography and on days 60 and 120 by transrectal palpation.

### 2.4. Statistical analysis

Experiments were replicated at least three times in each treatment group. The post-warm survival rates of SCNT blastocysts were compared by chi-square test and pregnancy rates of recipients by Fisher's exact probability test, using the StatView program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A value of  $P < 0.05$  was chosen as an indication of statistical significance.

## 3. Results

### 3.1. Cryosurvival of bovine SCNT blastocysts (experiment 1)

The overall successful enucleation rate of bovine IVM oocytes was 86.4% (1614/1868) and the fusion rate of donor fibroblasts with the recipient cytoplasts was 85.4% (1196/1401). Efficiency in producing SCNT blastocysts on day 7 in the LAA-containing IVC medium (40.7%, 246/604) was higher ( $P = 0.005$ ) than that in the LAA-free medium (32.3%, 144/446).

The in vitro survival rates of day-7 SCNT bovine blastocysts after the MVC-cryotop vitrification are summarized in Table 1 and the photograph of a blastocyst surviving 24 h after warming is shown in Fig. 2A. All vitrified bovine blastocysts were recovered. When the LAA-supplemented IVC medium and the Ficoll-free vitrification solution were used, cryosurvival of the early-hatching blastocysts (77%) was not different from those of middle- and late-hatching blastocysts (74 and 80%, respectively). Inclusion of Ficoll in the vitrification solution did not improve the cryosurvival of SCNT blastocysts (54 to 68%). The early-hatching SCNT blastocysts produced in the absence of LAA were sensitive to the vitrification procedure.

The in vivo developmental potential of vitrified-warmed and 1-day-cultured SCNT blastocysts as well as fresh day 7 SCNT blastocysts is shown in Table 2. Seven of 14

Table 1  
Cryosurvival of bovine SCNT blastocysts harvested on day 7: effects of hatching stage, LAA in IVC medium, and Ficoll in vitrification solution (VS)

LAA during IVC	Ficoll in VS	No. survived/no. examined (%)			
		Hatching stage			
		Early	Middle	Late	Overall
+	–	23/30 (77)	20/27 (74)	24/30 (80)	67/87 (77) <sup>a</sup>
+	+	23/34 (68)	15/28 (54)	19/32 (59)	57/94 (61) <sup>b</sup>
–	–	15/27 (56) <sup>x</sup>	20/30(67) <sup>x,y</sup>	28/35 (80) <sup>y</sup>	63/92 (68) <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Within a column, ratios with a different superscript were different ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Within a column, ratios with a different superscript were different ( $P < 0.05$ ).

<sup>x</sup> Within a row, ratios with a different superscript were different ( $P < 0.05$ ).

<sup>y</sup> Within a row, ratios with a different superscript were different ( $P < 0.05$ ).

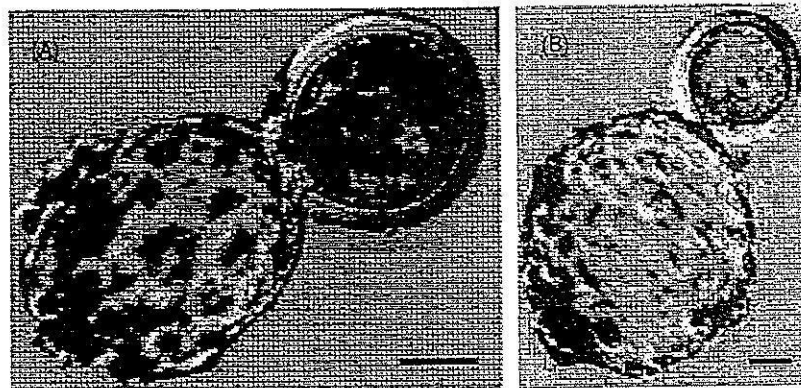


Fig. 2. Photographs of the SCNT blastocysts surviving 24 h after vitrification and warming: (A) bovine and (B) buffalo. During post-warm culture, buffalo embryos appeared to develop slightly faster than bovine embryos. Scale bar = 50  $\mu$ m.

recipients (50%) receiving a total of 25 post-warm surviving SCNT blastocysts were pregnant at day 40 while 11 of 27 recipients (41%) receiving a total of 37 fresh SCNT blastocysts were pregnant. Although four recipients that had received post-warm embryos

Table 2  
In vivo survival of bovine SCNT blastocysts after vitrification and warming

Groups	No. embryos transferred/recipient females	No. (%) pregnant recipients <sup>a</sup>			
		Day 40	Day 60	Day 120	Full-term
Vitrified	25/14	7 (50)	4 (29)	0 (0) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>b</sup>
Fresh control	37/27	11 (41)	7 (26)	5 (19) <sup>c</sup>	3 <sup>d</sup> (11) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> All pregnant recipients had a single conceptus.

<sup>b</sup> Within a column, ratios with a different superscript were different ( $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Within a column, ratios with a different superscript were different ( $P < 0.05$ ).

<sup>d</sup> Two calves died soon after birth, while one calf survived.

Table 3  
Cryosurvival of swamp buffalo SCNT blastocysts harvested on day 6.5: effects of hatching stage and LAA in IVC medium

LAA during IVC	No. survived/no. examined (%)			
	Hatching stage			Overall
	Early	Middle	Late	
+	4/5 (80)	5/5 (100)	8/9 (89)	17/19 (89)
-	10/12 (83)	6/8 (75)	10/10 (100)	26/30 (87)

Ficoll was not added to the vitrification solution.

(29%) and seven that had received fresh embryos (26%) maintained their pregnancies until day 60, only three cloned calves (11%) were delivered from three recipients in the fresh embryo group. Two calves died soon after birth and one calf survived.

### 3.2. Cryosurvival of buffalo SCNT blastocysts (experiment 2)

The overall successful enucleation rate of buffalo IVM oocytes was 85.8% (1011/1179) and the fusion rate of donor fibroblasts with the recipient cytoplasts was 86.3% (676/783). Between the LAA-containing medium and the LAA-free medium, efficiency in producing SCNT blastocysts on day 6.5 (20.7%, 39/188 and 18.9%, 63/332, respectively) was similar.

All vitrified buffalo blastocysts were recovered. The mean cryosurvival of hatching SCNT blastocysts produced with LAA (89%) was not different from that of those produced without LAA (87%), as shown in Table 3. Although the number of blastocysts classified into each of three hatching stages was small, cryosurvival of buffalo SCNT blastocysts tended ( $P = 0.06$ ) to be higher than that of bovine blastocysts without LAA. The photograph of a buffalo blastocyst surviving 24 h after warming is shown in Fig. 2B.

## 4. Discussion

In the present study, relatively high survival rates of bovine and buffalo SCNT blastocysts after vitrification and warming were obtained using the cryotop as a cryodevice. A variety of containers or devices, including an electron microscope grid [24], OPS [1], nylon loop [25] and cryotop [26], all of which can minimize the volume of vitrification solution for the ultra-rapid cooling rate, have been used for vitrification of mammalian embryos and oocytes. Comparative studies between OPS and cryotop in bovine and ovine morulae to blastocysts [27], pronuclear-stage rabbit zygotes [28] and germinal vesicle-stage whale oocytes [29] suggest that cryotop is a better alternative cryodevice than OPS. Recently, MVC-cryotop vitrification has been successfully applied to pre-hatching embryos in pigs [30,31], oocytes and blastocysts in humans [32,33], and IVM oocytes or enucleated cytoplasts in buffalo [34]. A possible advantage of the MVC-cryotop vitrification procedure originally reported by Kuwayama and Kato [26] may be due to the use of a lower concentration of permeating cryoprotective agents (CPA) in the vitrification solution (30%), but the composition of the vitrification solution employed in the present study was the same as that reported for the OPS system (CPA concentration 40%) [1].

Blastocysts produced by nuclear transplantation have mechanical slits in their zonae pellucidae, and therefore initiate hatching earlier than their non-manipulated counterparts. Bovine blastocysts microinjected with exogenous DNA at the pronuclear stage also initiated hatching earlier without thinning their zonae pellucidae, and survived cryopreservation by conventional freezing and vitrification as far as the blastocysts were harvested on day 7 [35]. However, day 6 blastocysts were sensitive to vitrification. Cryosurvival of IVF-derived bovine blastocysts biopsied on days 7 to 8 was relatively high (78% [36], 86% [37]). Among *in vivo* and IVF-derived bovine embryos, the expanded blastocyst seems to be the stage most tolerant to cryopreservation (see review by Massip [38]). Kelly et al. [27] reported that post-warm hatching rates of IVF-derived bovine and ovine embryos were improved by the progression of embryo development when days 5–7 embryos were vitrified using cryotop or OPS. Amarnath et al. [39] recently reported that bovine SCNT day 8 blastocysts at the advanced hatching stage survived conventional freezing better than the early stage blastocysts (86% versus 14%). In the present study, the cryosurvival of early hatching bovine SCNT blastocysts produced with LAA-free medium was significantly lower than that of advanced embryos (56% versus 80%, Table 1), probably due to their lower cell numbers.

There have been reports describing a positive effect of LAA in IVC medium for IVF-derived bovine zygotes on improvement in their survival rate after conventional freezing [11–13]. In the present study, the higher sensitivity of early-hatching bovine blastocysts to vitrification may be reduced by culturing SCNT embryos in the presence of LAA (Table 1). A suboptimal IVC condition for IVF-derived bovine embryos induces accumulation of intracellular lipid droplets [8,9]; these droplets are responsible for the high sensitivity of pig [40] and cattle [41] embryos to cryopreservation. The quality of blastocysts is often judged based on developmental kinetics and total cell numbers. Although these parameters were not examined in the present study, the morphological appearance (grade or cellular darkness; data not shown) seemed to be similar in blastocysts produced with LAA-containing medium and LAA-free medium. A possible contribution of LAA to improving cryotolerance may be modification of membrane lipid composition, facilitating water loss from the cell.

Composition of the vitrification solution (permeating CPAs and non-permeating macromolecules or saccharides) is among the factors influencing cryosurvival of embryos. A vitrification solution named EFS40 has been widely used for embryo cryopreservation in mice, rabbits, horses, cattle and marsupials, and in pigs and humans after replacing sucrose with trehalose (see review by Kasai [42]). Possible cryoprotective roles of macromolecules (e.g., polyethylene glycol, polyvinyl pyrrolidone, Percoll, Ficoll, and BSA) added to the vitrification solution are promoting solidification of the solution and reducing the chemical toxicity of the permeating agents. The Ficoll-70 was less toxic than polyethylene glycol when it was mixed with 40% EG [43]. In the present study, addition of 10% Ficoll-70 to a vitrification solution containing 20% EG, 20% DMSO and 0.5 M sucrose had no impact on cryosurvival of SCNT bovine blastocysts. When either two different permeating CPAs are used as a mixture, or when DMSO is included in the vitrification solution, further addition of Ficoll may have a negligible or even adverse effect on improving cryosurvival. To date, positive effects of Ficoll have been derived only in solutions containing 30 to 40% EG or 40 to 50% glycerol [42].

The full-term developmental potential of bovine SCNT blastocysts after vitrification and warming was not proven in the present study. Pregnancies of recipient cows or heifers

receiving vitrified-warmed SCNT blastocysts were maintained for no longer than 60 days. The reason for the pregnancy loss was unknown and requires further investigation. The statistical significance between fresh and vitrified embryos should not be over-emphasized due to the small number of embryos transferred. The first live calves derived from vitrified SCNT blastocysts have been reported in 2003–2004 from two independent laboratories [5,6]. Gong et al. [5] reported that transfer of nine vitrified SCNT blastocysts into nine recipients resulted in three pregnancies at day 60 and birth of a cloned calf, while transfer of eight fresh SCNT blastocysts into eight recipients resulted in two pregnancies at day 60 and two newborn calves. Tecirlioglu et al. [6] reported that transfer of 53 vitrified SCNT blastocysts into 14 recipients resulted in six pregnancies at day 40 and the birth of a cloned calf. In the latter study, none of the seven fresh SCNT blastocysts transferred into two recipients resulted in the birth of cloned calves (a larger scale experiment is on-going; personal communication, Dr. Tecirlioglu). The high frequency of embryonic loss during the first and the second trimesters of the gestation period, as well as perinatal deaths, is still an obstacle for somatic cell nuclear transfer in cattle.

Buffalo SCNT embryos appeared darker and developed a half-day earlier than bovine SCNT embryos [14]. However, buffalo SCNT blastocysts are more likely to survive vitrification than bovine SCNT blastocysts (Tables 1 and 3). The high content of intracellular lipid droplets in porcine embryos at early stages is still considered as the major cause of their high sensitivity to low temperature [40]. Nevertheless, Hayashi et al. [44] reported that expanded and hatched porcine blastocysts were capable of developing full-term after conventional freezing. Duran et al. [21] recently reported that approximately 90% of IVF-derived water buffalo embryos survived vitrification in EFS40 solution when the embryos were vitrified at the morula to expanded blastocyst stages, followed by birth of six calves after transfer of 71 post-warm embryos. In the present study (Table 3), the late-stage hatching blastocysts had a high cryotolerance (95%, 18/19), but their true survival *in vivo* remains to be clarified.

In conclusion, bovine SCNT blastocysts regardless of their hatching stage were relatively resistant to the MVC-cryotop vitrification procedure when the blastocysts were produced in the presence of LAA, and swamp buffalo SCNT blastocysts were more tolerant of vitrification than bovine SCNT blastocysts.

### Acknowledgements

The authors thank T. Terao (Shinshu University, Japan), S. Muenthaisong, T. Vetchayun, P. Karnsomdee, C. Saengngam and S. Imsunthronruksa (Suranaree University of Technology, Thailand) for their technical assistance. This work was supported by Thailand Research Fund and R&D Fund of Suranaree University of Technology (to R.P.).

### References

- [1] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53–8.

- [2] Tominaga K, Hamada Y. Gel-loading tip as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *J Reprod Dev* 2001;47:267–73.
- [3] Nguyen BX, Sotomaru Y, Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Efficient cryopreservation of bovine blastocysts derived from nuclear transfer with somatic cells using partial dehydration and vitrification. *Theriogenology* 2000;53:1439–48.
- [4] Kasai M, Komi JH, Takakamo H, Tsudera T, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990;89:91–7.
- [5] Gong G, Dai Y, Fan B, Zhu H, Zhu S, Wang H, et al. Birth of calves expressing the enhanced green fluorescent protein after transfer of fresh or vitrified/thawed blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 2004;69:278–88.
- [6] Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VI, et al. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev* 2003;15:361–6.
- [7] Massip A, Merrimod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum Reprod* 1995;10:3004–11.
- [8] Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts and their improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 1999;31:1–9.
- [9] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57–66.
- [10] Hochi S, Kanamori A, Sugisawa K, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid–albumin in the IVM and IVF media on survival of frozen-thawed pronuclear bovine zygotes. *J Mamm Ova Res* 1999;16:19–22.
- [11] Tominaga K, Hamada Y, Yabuue T, Ariyoshi T. Effect of linoleic acid–albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. *J Vet Med Sci* 2000;62:465–7.
- [12] Hochi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid–albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology* 1999;52:497–504.
- [13] Imai K, Kobayashi S, Goto Y, Dochi O, Shimohira I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. *Theriogenology* 1997;47:347 (abstract).
- [14] Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: Comparison in vitro cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. *Buffalo J* 1999;15:371–84.
- [15] Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts, ear fibroblasts, and granulosa cells. *Theriogenology* 2002;57:443 (abstract).
- [16] Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 2001;3:97–104.
- [17] Techakumphu C, Lohachit P, Chantaraprateep P, Prateep P, Kobayashi G. Preliminary report on cryopreservation of Thai swamp buffalo embryos: manual and automatic methods. *Buffalo Bull* 1989;8:29–36.
- [18] Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Wright Jr RW. Embryos quality of frozen-thawed water buffalo embryos by slow cooling and two step freezing procedures. *Buffalo J* 1992;8:131–8.
- [19] Kasiraj R, Misra AK, Mutha Rao M, Jaiswal RS, Rangareddi NS. Successful culmination of pregnancy and live birth following the transfer of frozen-thawed buffalo embryos. *Theriogenology* 1993;39:1187–92.
- [20] Apimeteetumrong M, Songsasen N, Yiengvisavakul V, Sukwongs Y, Techakumphu M. Cryopreservation of embryos collected from elite swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Thai J Vet Med* 1998;28:39–48.
- [21] Duran DH, Pedro PB, Venturina HV, Hufana RD, Salazar AL, Duran PG, et al. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 2004;61:1429–39.
- [22] Zimmermann U, Vienken J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. *J Membrane Biol* 1982;67:165–82.
- [23] Gardner DK, Lane M, Batt P. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 1994;50:390–400.



- [24] Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;54:1059–69.
- [25] Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999;17:1234–6.
- [26] Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:477 (abstract).
- [27] Kelly JM, Kleemann DO, Kuwayama M, Walker SK. Vitrification of in vitro-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:172–3 (abstract).
- [28] Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 2004;61:267–75.
- [29] Iwayama H, Hochi S, Kato M, Hirabayashi M, Kuwayama M, Ishikawa H, et al. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle-stage. *Zygote* 2004;12:333–8.
- [30] Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, et al. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *J Reprod Dev* 2004;50:481–6.
- [31] Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* 2004;71:432–7.
- [32] Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004;19:2884–8.
- [33] Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Osamu K, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223–4.
- [34] Parupai R, Laowtammathron C, Terao T, Lorthongpanich C, Muenthaisong S, Vetchayan T, et al. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:180–1 (abstract).
- [35] Ito K, Otake S, Hirabayashi M, Hochi S, Ueda M. Cryopreservation of in vitro-derived bovine blastocysts microinjected with foreign DNA at the pronuclear stage. *Theriogenology* 1998;50:1093–100.
- [36] Ito K, Sekimoto A, Hirabayashi M, Hochi S, Kimura K, Ueda M, et al. Effect of time interval between biopsy and vitrification on survival of in vitro-produced bovine blastocysts. *J Reprod Dev* 1999;45:351–5.
- [37] Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 1997;47:501–9.
- [38] Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim* 2001;36:49–55.
- [39] Amarnath D, Kato Y, Tsunoda Y. Cryopreservation of bovine somatic cell nuclear-transferred blastocysts: effect of developmental stage. *J Reprod Dev* 2004;50:593–8.
- [40] Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995;374:416.
- [41] Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* 1999;60:535–9.
- [42] Kasai M. Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. *J Mamm Ova Res* 1997;14:17–28.
- [43] Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. In: Mori T, Aono T, Tomimaga T, Hiroi M, editors. *Perspectives on assisted reproduction frontiers in endocrinology*, 4. Roma, Italy: Ares-Serono Symposia Publications; 1994. p. 481–7.
- [44] Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet Rec* 1989;125:43–4.



## Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei

S. Muenthaisong<sup>a</sup>, C. Laowtammathron<sup>a</sup>, M. Ketudat-Cairns<sup>a</sup>,  
R. Parnpai<sup>a,\*</sup>, S. Hochi<sup>b,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>b</sup>Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

Received 25 July 2006; accepted 9 November 2006

### Abstract

We investigated the potential of vitrified-warmed buffalo oocytes to develop to blastocysts after parthenogenetic activation (PA) and somatic cell nuclear transfer (SCNT). *In vitro*-matured oocytes before and after enucleation (M-II oocytes and enucleated oocytes, respectively) were put in 7.5% DMSO and 7.5% ethylene glycol (EG) for 4, 7 and 10 min, and then vitrified (Cryotop device) after 1-min equilibration in 15% DMSO, 15% EG and 0.5 M sucrose. Following 4-, 7- and 10-min exposure, proportions of the post-warm oocytes with a normal vitelline membrane were similar (66–71% in M-II oocytes and 69–71% in enucleated oocytes). However, 18–20% of the normal M-II oocytes had no detectable first polar body in their perivitelline space (no potential for subsequent enucleation). When the post-warm M-II oocytes were treated for PA by 7% ethanol, 10 µg/mL cycloheximide and 1.25 µg/mL cytochalasin-D, parthenogenetic development into Day-7 blastocysts occurred in 10–13% of cultured oocytes, lower ( $P < 0.05$ ) than fresh (control) oocytes (24%). In the absence of the cooling and warming, blastocyst rates in the 4-min exposure group (22%), but not in the 7-min and 10-min exposure groups (14–15%), were similar to that in the fresh group (23%). The total cell number (group average 117–132 cells) and the ICM ratio (22–24%) of the PA blastocysts derived from vitrified M-II oocytes were comparable with fresh oocytes (127 cells and 25%). After SCNT (with fibroblast cells and vitrified-warmed oocytes), blastocyst rates were similar for the three exposure periods for M-II oocytes (8–10%) and enucleated oocytes (7–9%), but were lower ( $P < 0.05$ ) than in the fresh group (15%). The total cell number of the SCNT blastocysts derived from vitrified M-II and enucleated oocytes (80–90 and 82–101 cells) was smaller ( $P < 0.05$ ) than from fresh oocytes (135 cells); the ICM ratio of blastocysts derived from the M-II and enucleated oocytes after vitrification in 7- or 10-min exposure groups (20–22%) was not different ( $P > 0.05$ ) from fresh control oocytes (24%) or those in 4-min exposure group (M-II 23%, enucleated 24%). Thus, SCNT of swamp buffalo oocytes following vitrification before or after enucleation resulted in blastocysts with a slightly decreased cell number.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Cryotop vitrification; Differential staining; Enucleation; Somatic cell nuclear transfer; Swamp buffalo oocytes

### 1. Introduction

Swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) are multi-purpose animals, important for meat, milk and labor; using SCNT, buffalo blastocysts have been cloned from

\* Corresponding author. Tel.: +66 44224244; fax: +66 44224150.

\*\* Corresponding author. Tel.: +81 268215350; fax: +81 268215830.

E-mail addresses: rangsun@sut.ac.th (R. Parnpai),

shochi@shinshu-u.ac.jp (S. Hochi).



fetal fibroblasts, adult ear fibroblasts and granulosa cells [1–3]. The use of cryopreserved buffalo oocytes in SCNT protocol would alleviate logistical problems associated with matching the availability of donor cells. However, probably in part due to the lower number of ovarian follicles and the high percentage of atretic follicles in buffalo ovaries [4], there are few reports regarding the cryopreservation of buffalo oocytes [5,6]. Wani et al. [6] reported the first successful production of buffalo blastocysts derived from *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) of vitrified-warmed oocytes. During the last decade, a novel vitrification procedure characterized by an ultra-rapid cooling rate has shown promise for successful cryopreservation of bovine oocytes in IVF [7–10] and SCNT [11,12].

Since the conventional SCNT protocol in cattle and buffalo includes enucleation of recipient oocytes and PA of reconstructed zygotes, timing of oocyte cryopreservation may influence development of cloned embryos. Similar proportions in the production of embryonic blastomere-cloned bovine blastocysts have been reported for frozen–thawed M-II oocytes, frozen–thawed enucleated oocytes, and fresh control oocytes (16, 14, and 17% of fused couplets on Day 9, respectively) [13]. In contrast, Ito et al. [14] reported that 6% of enucleated and activated bovine oocytes which subsequently underwent two-step freezing and embryonic cell nuclear transfer developed into blastocysts on Day 7, whereas none of the frozen–thawed M-II oocytes which subsequently underwent enucleation, PA and nuclear transfer developed to that stage.

Successful vitrification for oocytes requires pretreatment with permeating cryoprotective agents (CPAs) at a relatively low concentration before the final equilibration, with the vitrification solution containing a high concentration of permeating and non-permeable CPAs. The low intracellular CPA level of the pretreated oocytes would be concentrated to a higher level by severe dehydration in the vitrification solution during the equilibration period, which is the key factor to avoid intracellular ice formation by the subsequent cooling into liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>). Hoshi et al. [15] have reported that rabbit one-cell zygotes at the pronuclear-stage were successfully cryopreserved by vitrification when the zygotes were exposed to 15% EG + DMSO solution for a prolonged period from 3 min (a standard period [10]) to 10 min, and then were equilibrated with a vitrification solution containing 30% EG + DMSO and 0.5 M sucrose for 1 min.

The present study was undertaken to investigate the potential of vitrified-warmed swamp buffalo oocytes to

participate in development to blastocysts after the PA and SCNT. A comparison was done of the suitability of matured oocytes and enucleated oocytes for vitrification and subsequent SCNT. Differential cell staining was applied to assess the qualitative aspects of the parthenogenetic and cloned blastocysts that were derived from fresh or vitrified-warmed oocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and media

Unless stated otherwise, all reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). The medium used for IVM was TCM199 supplemented with 25 mM HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 0.02 AU/mL FSH (Antrin, Denka Pharmaceutical, Tokyo, Japan), 50 iu/mL hCG (Chorulon, Intervet, Boxmeer, Netherlands) and 1 µg/mL estradiol-17β. For culturing donor cells, alpha minimal essential medium supplemented with 10% FBS (α-MEM + 10% FBS) was used. For cryopreserving the cultured donor cells, 10% DMSO was added to TCM199 supplemented with 25 mM HEPES and 20% FBS. The Emcare holding medium (ICP Bio, Auckland, New Zealand) was used as the basal medium throughout the process of enucleation to ethanol activation, except during electrofusion, when the Zimmermann fusion medium [16] was used. The medium for culturing parthenogenetic or nuclear-transferred embryos (IVC medium) was modified synthetic oviduct fluid with amino acids (mSOFaa) [17] supplemented with 0.3% fatty acid-free BSA.

### 2.2. Preparation of M-II and enucleated oocytes

Abattoir-derived buffalo ovaries were transported to the laboratory within 4 h of slaughter. The COCs were collected by aspiration from follicles 2–6 mm in diameter using a 21-gauge needle attached to a 10 mL syringe, and washed five times with PBS supplemented with 0.1% polyvinyl pyrrolidone, then three times with the IVM medium. Each of 20 COCs was cultured in 100 µL droplets of IVM medium covered with mineral oil under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 21 h.

At 21 h after IVM, the cumulus cells were mechanically removed by repeated pipetting using a fine-tip pipette in 0.2% hyaluronidase and were subsequently washed five times in the Emcare holding medium. Oocytes with an extruding first polar body were defined as M-II oocytes. Parts of the M-II oocytes

were placed in 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cytochalasin B for 15 min, and enucleated by a micromanipulator under an inverted microscope; these are defined as enucleated oocytes. Briefly, the zona pellucida close to the first polar body was dissected with a glass needle and about 10% of cytoplasm lying beneath the first polar body was squeezed out of an opening in the zona pellucida. The successful enucleation of each oocyte was confirmed by Hoechst 33342 fluorescent staining of the corresponding karyoplast that was squeezed out. The enucleated oocytes were washed five times in the Emcare holding medium and kept in the same medium until subsequent vitrification or nuclear transfer.

### 2.3. Vitrification and warming

The M-II oocytes and enucleated oocytes were vitrified-warmed by the minimum volume cooling procedure, originally reported by Kuwayama and Kato [10], with some modifications. The oocytes were first exposed to 7.5% (v/v) EG + 7.5% (v/v) DMSO in 25 mM HEPES-buffered TCM199 supplemented with 20% FBS (TCM199 + 20% FBS) for 4, 7 or 10 min at 22–24 °C, and then transferred into a vitrification solution consisting of 15% (v/v) EG + 15% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose in TCM199 + 20% FBS. Five oocytes were placed on a sheet of each Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) in a small volume of the vitrification solution (<1  $\mu\text{L}$ ). The Cryotop device was plunged into LN<sub>2</sub> after the oocytes were equilibrated in the vitrification solution for 1 min at 22–24 °C.

After storage in LN<sub>2</sub>, the oocytes were warmed by immersing the Cryotop into 3 mL of 0.5 M sucrose in the TCM199 + 20% FBS for 5 min at 22–24 °C, and then transferred to the TCM199 + 20% FBS for 5 min. The survival of the oocytes was judged under stereomicroscope by the single criterion of whether the plasma membrane appeared to be morphologically normal, and the number of surviving M-II oocytes with a detectable first polar body was recorded. A few hundred M-II oocytes not undergoing the cooling and warming process were treated as well, serving as “CPA-exposed” groups. The surviving M-II oocytes in the “CPA-exposed” and “vitrified” groups, regardless of the presence of the polar body, were kept in the TCM199 + 20% FBS under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C until use for the subsequent PA treatment. Enucleated oocytes that survived vitrification and M-II oocytes that survived with the polar body before being enucleated were kept under the same temporal culture condition until use for the subsequent SCNT.

### 2.4. Parthenogenetic activation (PA)

The M-II oocytes from CPA-exposed groups and vitrified groups, as well as two corresponding fresh control groups, were subjected to the PA treatment as described previously [18]. Briefly, the oocytes were first treated with 7% ethanol in the Emcare holding medium for 5 min, and then incubated with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cycloheximide (CHX) and 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cytochalasin D (CD) in mSOFaa medium + 10% FBS in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 5 h.

### 2.5. Somatic cell nuclear transfer (SCNT)

Donor cells were prepared as below. The ear skin of a swamp buffalo was biopsied and transported to the laboratory at 4 °C in PBS. Skin tissues were removed from cartilage and cut into small pieces before being placed in 60-mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and covered with a sterile glass slide. An amount of 5 mL of  $\alpha\text{MEM}$  + 10% FBS was added into the dishes and the tissue was cultured for 8–10 days under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37 °C. Fibroblasts were harvested using 0.25% trypsin/EDTA in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free PBS and seeded in 5 mL of  $\alpha\text{MEM}$  + 10% FBS in a 25-cm<sup>2</sup> culture flask (Nunc). The fibroblasts were frozen at the third cell culture passage and stored in LN<sub>2</sub>. The post-thaw fibroblasts were cultured in  $\alpha\text{-MEM}$  + 10% FBS for 2 or 3 days and used for SCNT.

Individual ear fibroblasts (14–16  $\mu\text{m}$  in diameter) were inserted into the perivitelline space of recipient cytoplasts that were derived from fresh or vitrified-warmed M-II oocytes and vitrified-warmed enucleated oocytes, using a slit in the zona pellucida dissected at enucleation. The donor-cytoplast couplets were fused in the Zimmermann fusion medium by two direct currents (2.6 kV/cm for 17  $\mu\text{s}$ ; the distance between electrodes was about 110  $\mu\text{m}$ ) generated by a fusion machine (SUT F-1, Suranaree University of Technology). The number of couplets successfully fused was recorded 1 h after the electro-stimulation. The fused couplets were activated by a combined treatment of ethanol, CHX and CD, as described above.

### 2.6. In vitro culture and differential cell staining

The PA and SCNT zygotes were cultured in the IVC medium under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> at 38.5 °C for 2 days (20 zygotes per 100  $\mu\text{L}$  microdrop). Thereafter, embryos at the 8-cell stage were selected and co-cultured with bovine

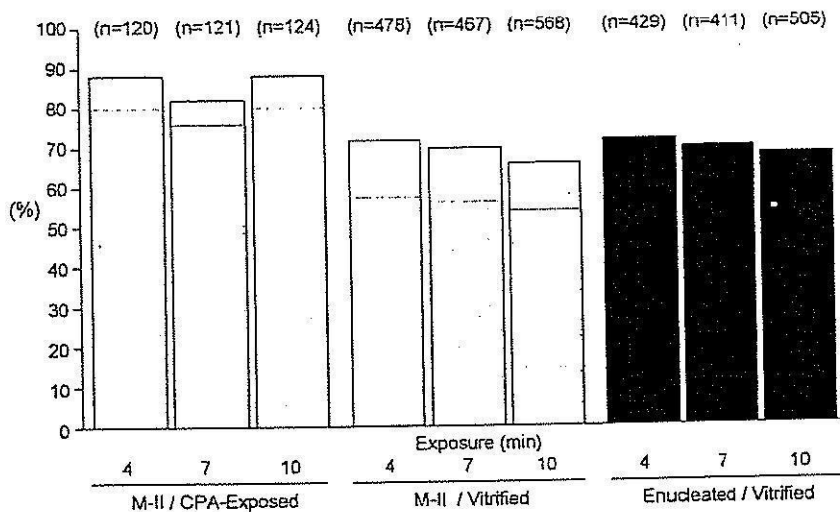


Fig. 1. Availability of vitrified-warmed buffalo oocytes for subsequent somatic cell nuclear transfer. Total columns (black, and gray + white) denote proportions of oocytes with morphologically normal oolemma. Grey and white columns indicate M-II oocytes with and without detectable first polar body, respectively.

oviductal epithelium cells (BOEC) under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5 °C for 5 days, as reported previously [1]. Half of the medium was changed every day, and development of embryos into the blastocyst stage was recorded on Days 6 and 7 (the day of PA treatment and SCNT was considered Day 0).

The PA and SCNT blastocysts harvested on Day 7 were counter-stained to distinguish cells of the inner cell mass (ICM) and trophoctoderm, as reported previously [19]. Briefly, zonae pellucidae of blastocysts at Day 7 were removed by 0.5% protease. After washing with mSOFaa medium, the zona-free blastocysts were incubated in 100 μL of 10% rabbit anti-buffalo spleenocyte antibodies for 45 min, and then transferred into 100 μL mixture of 10% guinea pig complement, 75 μg/mL propidium iodide (PI) and 100 μg/mL Hoechst 33258 for 45 min. The ICM cells and trophoctoderm cells were counted under a fluorescent microscope at 330–380 nm, allowing determination of the total number of cells for blastocysts and the percentage of ICM cells based on the total number of blastocyst cells.

### 2.7. Statistical analysis

Experiments were replicated at least five times in each treatment group. Data were analyzed by ANOVA using the general linear model procedure in statistical analysis systems (SAS). Frequency data were arcsine-transformed before being subjected to ANOVA. A probability value of  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Morphological survival of post-warm oocytes

Morphological survival rates of the buffalo M-II oocytes after CPA-exposure or vitrification, and of the enucleated oocytes after vitrification are summarized in Fig. 1. The survival rates of M-II oocytes receiving osmotic stress by the CPAs (82–88%; M-II/CPA-exposed groups) were higher than those of M-II oocytes that were additionally vitrified and warmed (66–71%; M-II/vitrified groups). Proportions of the surviving M-II oocytes with a detectable polar body in the M-II/CPA-exposed groups (90–92%) were also higher than those in the M-II/Vitrified groups (80–81%). In contrast, survival rates of enucleated oocytes after vitrification (69–71%; enucleated/vitrified groups) were comparable with those of M-II oocytes. The exposure time of M-II or enucleated oocytes to a mixture of two permeating CPAs (EG and DMSO, 15% in total concentration) had no significant influence on morphological survival and polar body maintenance, whereas the longer exposure time tended to cause decrease of survival in the M-II/vitrified and the enucleated/vitrified groups.

### 3.2. Parthenogenetic development of CPA-exposed and vitrified oocytes

In vitro development of buffalo M-II oocytes following the CPA exposure or vitrification, and the PA treatment is summarized in Table 1. There was no significant difference in the rates of cleavage among

Table 1  
In vitro development of buffalo M-II oocytes following vitrification and parthenogenetic activation, and quality analysis of the blastocysts

Group	Exposure (min)	No. (%) of oocytes				Mean ( $\pm$ S.D.) blastocyst quality (Day 7)		
		Cultured	Cleaved	Blastocysts (Day 6)	Blastocysts (Day 7)	Total cell number	% ICM	
CPA-exposed	4	105	91 (87)	17 (16) ab	23 (22) a	106 $\pm$ 16	23 $\pm$ 2	
	7	99	83 (84)	13 (13) bc	15 (15) ab	90 $\pm$ 10	22 $\pm$ 7	
	10	109	90 (83)	11 (10) c	15 (14) b	104 $\pm$ 28	24 $\pm$ 7	
Fresh control		118	102 (86)	22 (19) a	27 (23) a	126 $\pm$ 17	21 $\pm$ 3	
	Vitrified	4	119	91 (76) a	14 (12) b	16 (13) b	112 $\pm$ 38	23 $\pm$ 3
		7	124	79 (64) b	12 (10) b	13 (10) b	117 $\pm$ 32	22 $\pm$ 4
10		141	88 (62) b	13 (9) b	14 (10) b	132 $\pm$ 18	24 $\pm$ 6	
Fresh control		102	80 (78) a	19 (19) a	24 (24) a	127 $\pm$ 33	25 $\pm$ 2	

Blastocyst rates were calculated from the number of cultured oocytes. Within a column, values without common letters (a–c) differed ( $P < 0.05$ ).

three CPA-exposed groups and the control group (83–87%). However, development into the blastocyst stage on Day 7 was superior in the 4-min exposure and fresh control groups (22 and 23%, respectively) than in the 10-min exposure group (14%). Regarding the qualitative aspects of the harvested blastocysts, there was a propensity for blastocysts derived from the CPA-exposed oocytes to be constituted from smaller numbers of the cells. The percentage of ICM cells in total blastocyst cells was similar among the four groups.

The cleavage rate was influenced when the M-II oocytes were exposed to the 15% CPA solution longer than 7-min and then vitrified-warmed (64 and 62% in 7- and 10-min groups versus 76 and 78% in 4-min and fresh control groups, respectively). Differences in blastocysts rates on Day 7 between each of the vitrified groups (10–13%) and the fresh control group (24%) were significant. However, there were no apparent disadvantages for any of the treatments at least in the

quality of the blastocysts (both total cell numbers and percentage of ICM cells).

### 3.3. In vitro development following vitrification and SCNT of M-II or enucleated oocytes

Successful fusion rates for the buffalo donor-cytoplasmic couplets in the fresh control group (84%, 110/131) were not significantly different from those when M-II oocytes were used for SCNT after vitrification (4-min group, 78%, 124/159; 7-min group, 76%, 105/139; 10-min group, 77%, 119/154) and those when enucleated oocytes were used for SCNT after vitrification (4-min group, 82%, 120/146; 7-min group, 74%, 97/131; 10-min group, 77%, 131/171). The potential of these fused couplets to develop to the blastocyst stage and the quality analysis of the resultant blastocysts are summarized in Table 2. Cleavage rate of SCNT embryos derived from fresh control oocytes (78%) was not significantly different from those from

Table 2  
In vitro development of buffalo M-II or enucleated oocytes following vitrification and somatic cell nuclear transfer, and quality analysis of the blastocysts

Group	Exposure (min)	No. (%) of oocytes				Mean ( $\pm$ S.D.) blastocyst quality (Day 7)	
		Cultured	Cleaved	Blastocysts (Day 6)	Blastocysts (Day 7)	Total cell number	% ICM
MII/vitrified	4	113	81 (72)	9 (8) b	11 (10) b	80 $\pm$ 25	23 $\pm$ 5
	7	100	71 (71)	8 (8) b	9 (9) b	86 $\pm$ 7	21 $\pm$ 3
	10	119	88 (74)	7 (6) bc	9 (8) b	90 $\pm$ 19	21 $\pm$ 1
Enucleated/vitrified	4	102	70 (69)	8 (8) b	9 (9) b	82 $\pm$ 24	24 $\pm$ 4
	7	97	61 (63)	6 (6) bc	7 (7) b	101 $\pm$ 13	22 $\pm$ 4
	10	131	92 (70)	5 (4) c	9 (7) b	85 $\pm$ 17	20 $\pm$ 2
Fresh control		109	85 (78)	13 (12) a	16 (15) a	135 $\pm$ 29	24 $\pm$ 2

Blastocyst rates were calculated from the number of cultured oocytes. Within a column, values without common letters (a–c) differed ( $P < 0.05$ ).



vitrified oocytes (63–74%). When the M-II oocytes and enucleated oocytes were vitrified, the developmental potential of the SCNT embryos to the blastocyst stage (8–10% and 7–9%, respectively) was inferior to that of the fresh control group (15%).

Regarding blastocyst quality, there was an adverse effect from oocyte vitrification for the subsequent SCNT, as the mean total cell numbers of blastocysts derived from vitrified versus fresh control oocytes were 80–101 cells and 135 cells, respectively. Also, oocyte vitrification may have had some adverse effect in the percentage of ICM cells when the oocytes were exposed for a longer time to the permeating CPA solution (7-min groups, 21–22%; 10-min groups, 20–21% versus 24% in fresh control group).

#### 4. Discussion

Cryotop vitrification, which had been applied to pronuclear-stage rabbit zygotes [15], pre-hatching stage porcine embryos [20,21], germinal vesicle-stage whale COCs [22], denuded M-II bovine oocytes [23], SCNT-derived bovine and swamp buffalo blastocysts [18] and denuded M-II oocytes and IVF-derived blastocysts in humans [10,24,25], was successfully extended to both denuded M-II and enucleated swamp buffalo oocytes in the present study. Production efficiencies of SCNT buffalo blastocysts from vitrified-warmed M-II oocytes (8–10% of cultured oocytes) were not different from those from vitrified-warmed enucleated oocytes (7–9%). However, overall efficiency was influenced by the timing of oocyte vitrification; 18–20% of morphologically surviving M-II oocytes were not subjected to enucleation, due to the absence of the detectable first polar body. In our preliminary study [26], buffalo M-II oocytes after Cryotop vitrification were enucleated without a reduction in the success rate (96 versus 88% in fresh control). Therefore, the visualization of removable metaphase-plate by vital staining will contribute to subsequent enucleation for all the post-warm oocytes with intact oolemma.

Regarding the qualitative aspects of the SCNT blastocysts, the developmental rate and cell numbers of blastocysts have been used as practical alternatives to confirmation of pregnancy or birth of calves, although the birth of calves is undoubtedly the most rigorous criterion for determining the true viability of embryos. The production efficiency of SCNT blastocysts in the fresh control group (15%) was significantly higher than in all the vitrified groups (7–10%). In cattle, yields of Day 7 SCNT blastocysts from oocytes vitrified-warmed in the SSV procedure statistically comparable with

those in the fresh control group were reported by Dinnyes et al. [11] (17 and 22%, respectively) and Atabays et al. [27] (24 and 33%, respectively). Developmental kinetics up to blastocyst stage are used for analysis of qualitative aspects of in vitro-produced embryos. Buffalo SCNT embryos are known to develop a half-day earlier than bovine SCNT embryos [1]. Based on the observation of buffalo SCNT embryo development at Day 6, the initial timing of blastocyst appearance seemed to be similar between vitrified and non-vitrified groups.

In the present study, Day-7 SCNT buffalo blastocysts derived from both vitrified M-II oocytes and vitrified enucleated oocytes were composed from a smaller number of ICM and trophoctoderm cells than the fresh Day-7 blastocysts (80–101 cells and 135 cells, respectively), whereas the percentages of ICM cells, based on the total number of blastocyst cells, were comparable with the percentage of the fresh control blastocysts (20–24% and 24%, respectively). This was in agreement with previous reports in which the total cell number in bovine SCNT blastocysts derived from vitrified oocytes was smaller than that from fresh oocytes (72 versus 93 cells [12]; 117 versus 175 cells [27]). It was reported that the mean total cell number in buffalo PA blastocysts ranged from 44 to 47 cells at the early blastocyst-stage to 150–186 cells at the hatched blastocyst-stage [28]. The blastocyst cell number in CPA-exposed group was slightly lower than in vitrification group, but it may result from quality variation of oocytes obtained from abattoir ovaries in each experimental series. Abattoir-derived materials are very heterogeneous due to the variations of age, genetic background and health of donors.

Probably due to the higher content of cytoplasmic lipid droplets, buffalo SCNT embryos appeared darker than bovine SCNT embryos [1]. A high content of cytoplasmic lipid droplets in porcine embryos at early stages is considered the major cause of their high sensitivity to low temperature [29]. Cryosurvival of buffalo M-II and enucleated oocytes after Cryotop vitrification ranged from 66 to 71% in the present study. In contrast, 92% of bovine M-II oocytes morphologically survived Cryotop vitrification using the EG + DMSO solution, but the developmental rate of the vitrified-warmed oocytes to the blastocyst stage was only 1.7% 8 days after IVF [23]. The cytoplasmic lipid droplets were highly accumulated in the bovine morulae and blastocysts when the IVF zygotes were cultured in an IVC medium that contained serum [30]. We have recently reported that Cryotop vitrification for buffalo SCNT blastocysts, developed to the late hatching stage

in mSOFaa medium supplemented with BSA and/or folic acid-albumin resulted in higher cryosurvival than bovine SCNT blastocysts (95 versus 80%, respectively) [18].

Low fertilization rates of cryopreserved oocytes were associated with chilling and freezing injury, including spindle disorganization and loss or clumping of microtubules [31] and zona hardening due to premature release of cortical granules [32]. Although the rapid cooling process by vitrification did not allow time for spindle depolymerization, exposure of oocytes to CPA induced microtubular disorganization in mouse oocytes [33]. The fertilized oocytes in most mammalian species (except rodents) have two microtubule-containing structures, the meiotic spindles and the aster derived from spermatozoal centrosomes (a pair of centrioles and pericentriolar proteins such as  $\gamma$ -tubulin, centrin and pericentrin). The latter structure contributes to assembly of the microtubule network as a microtubule-organizing center (MTOC), bringing both male and female pronuclei to the center of the newly formed zygote [34]. In case of the SCNT bovine zygotes, not only the MTOC function (pronuclear movement) but also the proper alignment and separation of the chromosomes (first cell-cycle division) are derived from the centrosomes of donor cells [35]. Park et al. [36] reported that addition of Taxol, a microtubule stabilizer, into the vitrification solution significantly improved blastocyst development of cryopreserved mouse oocytes.

The efficiency of PA by ethanol + 6-dimethylaminopurine in buffalo oocytes was dependent on the IVM period; oocytes cultured for 24 h had a higher cleavage rate (71%) than those cultured for the shorter or longer periods [28]. The time period from initiation of IVM culture to parthenogenetic activation in the present study was about 23–26 h, including the processes of IVM (21 h), cumulus cell removal (<0.5 h), enucleation (<2 h), temporal incubation at ambient temperature after CPA-exposure or vitrification (1 h), and/or nuclear transfer + electrofusion (<2 h). When the parthenogenetic development of buffalo oocytes was induced by ethanol + CHX + CD, the cleavage rates of CPA-exposed, vitrified and fresh control oocytes ranged from 62 to 87%, suggesting that the PA treatment itself was not affected by the exposure of oocytes to permeating CPA solution for at least 4 min and vitrification solution for 1 min, with or without the subsequent cooling and warming process. However, based on significant reduction in blastocyst development in 7 and 10 min CPA-exposure groups and all vitrified groups, vitrification had long-term influences on the overall development of the embryos. Similarly

in the SCNT experiments, despite the relatively high fusion rates (both 77%) and cleavage rates (70–74%) of M-II and enucleated oocytes after vitrification, significant reduction in blastocyst development occurred in the 10-min exposure groups. An optimal duration of oocyte pretreatment with the permeating CPAs for successful vitrification depends on the animal species, the developmental stage of oocytes/embryos, the temperature and the composition of solutions for pretreatment/vitrification, and the cryo-device type.

In conclusion, somatic cell nuclear transfer of swamp buffalo oocytes following vitrification before or after enucleation resulted in the development into blastocysts with a slightly reduced cell number. To the best of our knowledge, this is the first report of successful production of cloned buffalo blastocysts derived from M-II or enucleated oocytes after cryopreservation.

#### Acknowledgements

The authors thank C. Lorthongpanich, S. Insunthronruksa, C. Tangthai and C. Sangngam (Suranaree of University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand) and T. Terao (Shinshu University, Nagano, Japan) for their technical assistance. The Cryotop device was kindly provided by Dr. M. Kuwayama (Kato Ladies Clinic, Tokyo, Japan). This work was supported by R&D funds of Suranaree University of Technology and the National Research Council of Thailand, and by Thailand Research Fund—Master Research Grants (TRF-MAG).

#### References

- [1] Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison in vitro cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. *Buffalo J* 1999;15:371–84.
- [2] Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts, ear fibroblasts and granulosa cells. *Theriogenology* 2002;57:443 (abstract).
- [3] Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 2001;3:97–104.
- [4] Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshé CH, Taiwer GP. In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fertil* 1992;95:597–607.
- [5] Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology* 2000;53:1295–303.

- [6] Wani NA, Maurya SN, Misra AK, Saxena VB, Lakhchaura BD. Effect of cryoprotectants and their concentration on *in vitro* development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 2004;61:831–42.
- [7] Marino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;24:1059–69.
- [8] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53–8.
- [9] Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos: adapting a proven method for flash-cooling protein crystals to the cryopreservation of live cells. *Nat Biotechnol* 1999;17:1234–6.
- [10] Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:477 (abstract).
- [11] Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2000;63:513–8.
- [12] Tomimaga K, Hamada Y, Hochi S. Gel-loading tip vitrification of *in vitro*-matured bovine oocytes and subsequent embryo production by IVF and nuclear transfer. *J Mamm Ova Res* 2005;22:178–84.
- [13] Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K, et al. *In vitro* and *in vivo* survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1998;51:281–6.
- [14] Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Nagao Y, Kimura K, Hanada A, et al. Effects of timing of oocyte cryopreservation on *in vitro* development of nuclear-transferred bovine zygotes. *Mol Reprod Dev* 1999;54:81–5.
- [15] Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 2004;61:267–75.
- [16] Zimmermann U, Vienken J. Electrical field-induced cell-to-cell fusion. *J Membr Biol* 1982;67:165–82.
- [17] Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 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* 1994;50:390–400.
- [18] Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R. 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* 2005;64:1185–96.
- [19] Suteevun T, Smith SL, Muenthaisong S, Yang X, Parnpai R, Tian XC. Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *Theriogenology* 2006;65:1704–15.
- [20] Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reprod* 2004;71:432–7.
- [21] Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, et al. Improved survival of vitrified *in vivo*-derived porcine embryos. *J Reprod Dev* 2004;50:481–6.
- [22] Iwayama H, Hochi S, Kato M, Hirabayashi M, Kuwayama M, Ishikawa H, et al. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle stage. *Zygote* 2004;12:333–8.
- [23] Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *J Reprod Dev* 2004;50:685–96.
- [24] Katayama KP, Stehlik I, Kuwayama M, Osamu K, Stehlik E. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril* 2003;80:223–4.
- [25] Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 2004;19:2884–8.
- [26] Parnpai R, Laowtammathron C, Terao T, Lorthongpanich C, Muenthaisong S, Vtchayan T, et al. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:180–1 (abstract).
- [27] Atabay EC, Takahashi Y, Katagiri S, Nagano M, Koga A, Kanai Y. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2004;61:15–23.
- [28] Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-parthenogenetic development. *Theriogenology* 2004;62:1627–37.
- [29] Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995;374:416.
- [30] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57–66.
- [31] Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;50:103–10.
- [32] Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547–53.
- [33] Johnson MH, Pickering SJ. Effects of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 1987;100:313–24.
- [34] Navara CS, First NL, Schatten G. Phenotypic variations among paternal centrosomes expressed within the zygote as disparate microtubule lengths and sperm aster organization: correlations between centrosome activity and developmental success. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5384–8.
- [35] Shin M, Park S, Shim H, Kim N. Nuclear and microtubule reorganization in nuclear-transferred bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 2002;62:74–82.
- [36] Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer. *Fertil Steril* 2001;75:1177–84.