



รายงานการวิจัย

การอนุรักษ์แมวลายหินอ่อน (*Pardofelis marmorata*)

โดยการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์

(Conservation of marbled cat (*Pardofelis marmorata*)

by interspecies cloning)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัสสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

นายสัตวแพทย์ อนวัช แสงมาลี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2553

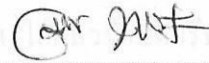
กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้กรุณาจัดสรรงบประมาณสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ กรุณาตรวจสอบ ให้ข้อเสนอแนะ ปรับปรุงแก้ไข รายงานวิจัยนี้ ทำให้รายงานวิจัยนี้ถูกต้องและครบถ้วนสมบูรณ์

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ประจำสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ที่กรุณาเก็บชิ้นเนื้อเยื่อของแมวลายหินอ่อน ทำให้การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการไปได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ นายสุเมธ อัมสุนทรรักษา นางสาวกนกวรรณ ศรีรัตนานางสาวนุชจรินทร์ ศรีปัญญา นางสาววันวิสาข์ ผิวสร้อย และนางสาวขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ผู้ช่วยนักวิจัย ประจำศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาเตรียมตัวอย่าง และสรุปผลการวิจัย ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของผู้วิจัยดำเนินการไปได้เป็นอย่างดีและสำเร็จลุล่วง



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

กันยายน 2553

บทคัดย่อ

ปัจจุบันสัตว์ตระกูลแมวป่ากำลังอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งเทคโนโลยีการช่วยการเจริญพันธุ์พื้นฐาน ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ในกลุ่มใกล้สูญพันธุ์ได้ เนื่องจากขาดแคลนตัวสัตว์ที่จะใช้ นำมาเข้ากระบวนการผสมพันธุ์ ดังนั้นเทคโนโลยีการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรก เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งในหลอดแก้ว และอัตราการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับ จากผลการทดลองพบว่า น้ำยาที่นำมาใช้เลี้ยงไข่ระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง โดยไข่ที่เลี้ยงในน้ำยา EHM ให้อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่าไข่ที่เลี้ยงในน้ำยา 199H อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (33.3% และ 18.1% ตามลำดับ) การเลี้ยงตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งแบบไม่เลี้ยงร่วม หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของแมวบ้านให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนไม่แตกต่างกันทางสถิติ (44.4% และ 38.0% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งด้วยไข่แมวบ้านหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา ทั้งการเลี้ยงแบบไม่เลี้ยงร่วม หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของแมวบ้าน (28.6% และ 32.6% ตามลำดับ) จากการใช้ไข่ของแมวบ้านและโค เป็นไซโตพลาสต์ผู้รับสำหรับการทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ในสัตว์ตระกูลแมวพบว่าตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งและตัวอ่อนโค โคลนนิ่ง มีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งด้วยไข่โค (34.4% กับ 29.6% และ 8.6% ตามลำดับ) และยังพบว่าตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งด้วยไข่โคหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา (15.2%) เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งให้กับแมวบ้านตัวรับ ได้แมวบ้านตัวรับตั้งท้อง 2 ตัว (16.7%) โดยตัวแรกได้ทำการผ่าคลอดในวันที่ 69 ของการตั้งท้อง พบลูกแมวเสียชีวิตในครรภ์ โดยลูกแมวมีอวัยวะครบสมบูรณ์ แต่อวัยวะภายในช่องท้องอยู่นอกร่างกาย และแมวบ้านตัวรับตัวที่สองคลอดตามธรรมชาติในวันที่ 56 ของการตั้งท้อง ได้ลูกแมวเกิดมาทั้งหมด 6 ตัว มีเพียง 2 ตัวที่มีการพัฒนาที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 ตัวเสียชีวิตหลังคลอดที่ 24 ชั่วโมง และ 5 วันตามลำดับ ส่วนแมวบ้านตัวรับที่ถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งด้วยไข่แมวบ้าน ไม่พบการแมวบ้านตัวรับตั้งท้อง การทดลองที่สองเป็นศึกษาการแสดงออกของยีนที่เชื่อว่ามีส่วนต่อกระบวนการ reprogramming (*Oct4 DNMT1 DNMT3a DNMT3b HAT1 และ HDAC1*) ในตัวอ่อนแมวบ้านตัวอ่อนแมวขาว และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งด้วยไข่แมวบ้าน จากผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน *Oct4* และ *HAT1* ในตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวขาว โคลนนิ่ง มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายกับตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (IVF) โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีการแสดงออกของ *Oct4* และ *HAT1* mRNA ต่ำ จนกระทั่งถึงระยะ 8 เซลล์ และค่อยๆแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งแสดงออกสูงที่สุดในระยะบลาสโตซิสต์ ในทางตรงกันข้ามพบว่าตัวอ่อน

แมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งข้ามสปีชีส์มีการแสดงออกของยีน *Oct4* และ *HAT1* ต่ำตลอดระยะเวลาของการเจริญเติบโตจนถึงระยะมอรูลา และไม่พบการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ในตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ การศึกษาการแสดงออกของยีน *HDAC1* ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งพบว่ามีความแปรปรวนสูง และมีรูปแบบการแสดงที่ต่างไปกับตัวอ่อน IVF ส่วนระดับการแสดงออกของยีน *DNMT1* มีรูปแบบการแสดงออกที่ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะ 2 เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่สูงกว่าตัวอ่อน IVF ตั้งแต่ระยะมอรูลาจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ จากการศึกษายังพบว่าตัวอ่อน IVF มีการแสดงออกของ *DNMT3a* ต่ำที่สุดที่ระยะ 4 เซลล์ แล้วค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งต่างกับตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งที่ในระยะ 4 เซลล์ ยังมีการแสดงออกสูงกว่าตัวอ่อน IVF จากนั้นค่อยๆ ลดลงจนถึงระยะมอรูลา และแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะบลาสโตซิสต์ รูปแบบการแสดงออกของยีน *DNMT3b* ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวทั้ง IVF และโคลนนิ่งมีความคล้ายคลึงกัน โดยมีการแสดงออกต่ำมากในระยะ 2 เซลล์จนถึงระยะมอรูลา จากนั้นมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะบลาสโตซิสต์ จากผลการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า น้ำยาที่ใช้เลี้ยงไขระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งมีผลต่อการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เชื่อบุที่นำไขไปไม่สามารถช่วยสนับสนุนให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อีกทั้งยังพบว่าไขของแมวบ้านและโคสามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ได้ถึงในระยะแรกของการพัฒนาตัวอ่อนเท่านั้น และนอกจากนี้ยังพบว่า แสดงออกของยีน *Oct4* ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ และตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) และการเติมหมู่อะซิติลบนโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจเกิดกระบวนการ reprogramming ที่ไม่สมบูรณ์ของเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่งในสัตว์ตระกูลแมว จากการศึกษาทำให้เข้าใจถึงรูปแบบของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ reprogramming ในสัตว์ตระกูลแมว ซึ่งจะสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุง และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์

Abstract

The species of felid family classified as being threatened or endangered. The conventional assisted reproduction technique (ART) is inappropriate for producing endangered felid species, due to the lack of animals for breeding program. Interspecies cloning is a novel technology that may serve as a valuable model for study *in vitro* and *in vivo* development of cloned felid embryos. Two experiments were carried out in this research. The first experiment aimed to investigate the *in vitro* and *in vivo* development of cloned felid embryos. The results of this experiment indicated that the manipulation medium had an effect on the developmental rate of cloned domestic cat embryos. The EHM gave significantly greater blastocyst formation than that of 199H (37.3 vs 21.9%, respectively). There was no significant difference between the developments to blastocyst stage of non co-culture (44.4%) and co-culture (38.0%) of the cloned domestic cat embryos with domestic cat oviductal epithelial cells. Moreover, the non co-culture and co-culture systems could not support the development of interspecies cloned marbled cat embryo beyond morula stage (28.6 vs 32.6%, respectively). The development to blastocyst stage of intraspecies cloned domestic cat (39.8%) and bovine (30.9%) embryos was higher than that of interspecies cloned marbled cat with bovine oocytes (9.2%). The interspecies cloned domestic cat with bovine oocytes arrested development at morula stage (16.6%). The reconstructed cloned domestic cat embryos were transferred to recipients and 2 pregnancies were detected (16.7%). The first pregnant recipient delivered 1 still born kitten by C-section at 69 days of pregnancy. The kitten developed to term but had abdominal wall defect and evisceration of abdominal organs. Another recipient was naturally delivered 6 kittens at 56 days of pregnancy but only 2 had fully development. Both cloned kittens died 24 hours and 5 days post natal, respectively. However, the reconstructed cloned marbled cat embryos were transferred to recipients and the pregnancy was not detected. The second experiment, the transcription levels of genes believed to be crucial for reprogramming (*Oct4*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HAT1* and *HDAC1*) were investigated in cloned felid species, domestic, leopard and marbled cats. The results showed that transcription levels of *Oct4* and *HAT1* were low at an early development stage and dramatically increased at 8-cell to blastocyst stage in cloned domestic and leopard cats and IVF derived embryos. In contrast, transcription levels of *Oct4* and *HAT1* in interspecies cloned marbled cat embryos were low throughout the development up to the morula stage. Moreover, the interspecies cloned marbled cat embryos with low transcription level

of *Oct4* and *HAT1* could not develop into blastocyst. The development was arrested at the morula stage. The transcription levels of *HDAC1* of cloned felid embryos had altered an expression pattern compared to IVF derived embryos. The *DNMT1* transcript levels dramatically decreased throughout development of felid embryos. Cloned felid embryos showed higher transcript of the *DNMT1* gene than IVF derived embryos. For mRNA level of *DNMT3a*, it was found that IVF derived embryos rarely had any transcript at 4- to 8-cell stages and increased at morula up to blastocyst stage whereas the transcription levels decreased in an early development and increased again at the blastocyst stage of cloned felid embryos. The level of *DNMT3b* mRNA decreased from 2-cell to morula stages but became remarkably high at blastocyst stage. The results of this study demonstrated that the manipulation medium during the cloning process involved in the increased development to blastocyst stage of cloned felid embryos. However, the co-culture system of cloned felid embryos was not beneficial to the development. The domestic cat and bovine oocytes could support mitotic cleavage of felid nuclei only in the early stage of development. Then, the results of the second experiment clearly demonstrated that *Oct4* mRNA transcription levels in felid embryos had some effect on the *in vitro* development efficiency particularly at the blastocyst stage. The cloned felid embryos showed aberrant level of genes involved in DNA methylation and histone hypoacetylation and suggested that incomplete reprogramming of felid donor nuclei occur in cloned felid embryos. This research indicated that genome reprogramming in the felid species was abnormal which may not be enough for the establishment of embryonic totipotency. The improvement of nuclear transfer technique of felid species is needed, especially in the genome reprogramming to improve the efficiency of cloned felid embryos for the conservation of endangered felid species.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม	2
1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 สัตว์ทดลอง.....	6
2.2 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ	6
2.3 การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ การฉีดเซลล์ต้นแบบ และเชื่อมเซลล์.....	6
2.3.1 ไข่แมวบ้าน	6
2.3.2 ไข่โค	7
2.4 การผลิตตัวอ่อนแมวบ้านที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว	8
2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว.....	8
2.5.1 ตัวอ่อนแมว	8
2.5.2 ตัวอ่อนโค	8
2.6 การนับจำนวนเซลล์.....	9
2.6.1 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด	9
2.6.2 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน trophectoderm และ inner cell mass ..	9
2.7 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแมวตัวรับ และการย้ายฝากตัวอ่อน.....	9
2.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.9 การวางแผนแบบการทดลอง	11
2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ	12
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์	
3.1 การสร้างธนาคารเซลล์แมวลายหินอ่อน.....	13
3.2 ผลกระทบของน้ำยา manipulation medium ต่ออัตราการเจริญเติบโตของ ตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่ง	13
3.3 ผลกระทบของการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มท่อไข่แมวบ้าน (DOEC) ต่ออัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหิน อ่อน โคลนนิ่ง ที่ใช้ไข่แมวบ้าน	14
3.4 อัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่โคเป็นไข่โคพลาสติกซึมผู้รับ.....	16
3.5 อัตราการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับหลังจากถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง	20
3.6 การแสดงออกของยีนที่สะท้อนถึงกระบวนการ reprogramming ของตัวอ่อน สัตว์ตระกูลแมว	23
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก: การเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับชาติและนานาชาติ.....	36
ประวัติผู้วิจัย	38

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 ไพรเมอร์ของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Real time PCR	10
3.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่ง เมื่อใช้น้ำยา manipulation 2 ชนิด	14
3.2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมว ลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้าน	16
3.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านและไข่โค	18
3.4 การย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหิน โคลนนิ่งให้กับแมวบ้านตัวรับ.....	22
3.5 การเจริญเติบโตในหลอดแก้วของสัตว์ตระกูลแมวที่เกิดจากการปฏิสนธิใน หลอดแก้ว และการโคลนนิ่งโดยใช้ไข่แมวบ้าน	24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และภาพย้อมด้วยสารเรืองแสงเพื่อนับจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่ง	19
3.2 Blastocyst-like embryo และภาพย้อมด้วยสารเรืองแสงเพื่อนับจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่โค	19
3.3 ลูกแมวบ้าน โคลนนิ่งที่เกิดจากการย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับ	21
3.4 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และภาพย้อมด้วยสารเรืองแสงเพื่อนับจำนวน trophoctoderm และ inner cell mass ของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมว	25
3.5 Relative expression ของยีน <i>Oct4</i> <i>HAT1</i> และ <i>HDAC</i>	28
3.6 Relative expression ของยีน <i>DNMT1</i> <i>DNMT3a</i> และ <i>DNMT3b</i>	29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

สัตว์ป่าหลายชนิดมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์มากขึ้นทุกวันสาเหตุจากการถูกล่า ถิ่นที่อยู่ และแหล่งหากินถูกทำลาย หรือแม้แต่สัตว์ในสวนสัตว์ยังไม่ผสมพันธุ์กันเนื่องจากสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม สัตว์บางชนิดกลายเป็นสัตว์หายากใกล้สูญพันธุ์ และสัตว์หลายชนิดสูญพันธุ์ไปในที่สุด ในอดีตที่ผ่านมามีการใช้เทคโนโลยีต่างๆ เพื่อเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ เช่น การผสมเทียม การปฏิสนธิในหลอดแก้ว การย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ร่างกายของสัตว์ที่อาจไม่เหมาะสมต่อการตั้งท้อง ระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีปัญหาทำให้ผสมติดยาก อัตราการตั้งท้องต่ำ การขาดแคลนแม่ตัวรับที่เหมาะสมสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น จึงทำให้วิธีการเหล่านี้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร นับตั้งแต่ “คอลลี” และโคลนนิงจากเซลล์ร่างกายเกิดมาในปี ค.ศ.1997 ได้มีการประยุกต์ใช้การโคลนนิงเพื่อเพิ่มจำนวนสัตว์เสี่ยงสูญพันธุ์ด้วยนมอีกหลายชนิดและประสบความสำเร็จในเวลาต่อมา

ปัจจุบันประชากรแมวลายหินอ่อน (*Pardofelis marmorata*) มีน้อยมากและกำลังลดลงอย่างต่อเนื่องซึ่งอาจสูญพันธุ์ได้ในไม่ช้า ถึงแม้ว่าจะมีเทคโนโลยีโคลนนิง แต่ก็ไม่สามารถทำโคลนนิงสปีชีส์เดียวกันในแมวลายหินอ่อน เนื่องจากมีความต้องการไซโตพลาสซึมผู้รับจากสัตว์ตัวเมียเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีวิธีเดียวเท่านั้นคือ การโคลนนิงข้ามสปีชีส์ แมวลายหินอ่อนมีขนาดลำตัวและระยะเวลาตั้งท้องใกล้เคียงกับแมวบ้าน หากเราสามารถสร้างเทคโนโลยีการโคลนนิงข้ามสปีชีส์ โดยใช้เซลล์ร่างกายแมวลายหินอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ และใช้โอโอไซท์แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับแล้วนำเอาตัวอ่อนโคลนนิงแมวลายหินอ่อนไปย้ายฝากในมดลูกแมวบ้าน ซึ่งเมื่อตั้งท้องแล้วจะคลอดลูกออกมาเป็นแมวลายหินอ่อน การทำโคลนนิงข้ามสปีชีส์นี้จะสามารถนำไปสู่การอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนแมวลายหินอ่อนได้ นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้วิธีการโคลนนิงแมวลายหินอ่อนไปทำการโคลนนิงสัตว์ประเภทเดียวกับแมวชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น เสือลายเมฆ เสือชีตาห์ เสือพูมา เสือจากัวร์ เป็นต้น อันจะนำไปสู่ความเป็นผู้นำเทคโนโลยีในภูมิภาคนี้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นศูนย์กลางถ่ายทอดเทคโนโลยีในระดับประเทศและระดับเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ศูนย์กลางผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอกทางด้านนี้ซึ่งยังขาดแคลนและไม่มีผู้ผลิตโดยตรง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อสร้างธนาคารเซลล์แมวลายหินอ่อน

- 1.2.2 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวหลายหินอ่อนที่ผลิตจากการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์
- 1.2.3 เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์แมวหลายหินอ่อน
- 1.2.4 เพื่อผลิตลูกแมวหลายหินอ่อนจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์
- 1.2.5 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนด้วยวิธี Real-time PCR

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

นำไข่แมวบ้านมากำจัดสารพันธุกรรมออก จากนั้นฉีดเซลล์แมวหลายหินอ่อนเข้าไปในไข่แมวบ้าน จากนั้นเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนนาน 7 วันจึงย้ายฝากสู่แม่ตัวรับ การพัฒนาของตัวอ่อนสู่ระยะต่างๆ อัตราการตั้งท้องจะถูกบันทึกผล และทำการศึกษาวิจัยการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมว ซึ่งจะใช้ตัวอ่อนที่เกิดจากการทำโคลนนิ่ง และใช้ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิตามธรรมชาติจากแมวบ้านเป็นกลุ่มควบคุมเพื่อศึกษารูปแบบของการแสดงออกของยีนเทียบกับตัวอ่อนที่ได้จากสัตว์ตระกูลแมวป่า ควบคู่กับการทำโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบสัตว์ตระกูลแมวป่า เพื่อสร้างธนาคารตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวป่าไว้ใช้ผลิตแมวป่าในอนาคต ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงในการสูญเสยพันธุ์ของสัตว์ตระกูลนี้ในอนาคต

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการทำโคลนนิ่งแมวหลายหินอ่อนโดยใช้โอโอไซท์แมวบ้าน ประกอบกับปริมาณแมวหลายหินอ่อนในประเทศไทยอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ ดังนั้นเพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการทำโคลนนิ่งจนกระทั่งวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนแมวหลายหินอ่อนที่ผลิตด้วยวิธีโคลนนิ่งจนได้ลูกแมวหลายหินอ่อนเกิดขึ้นมา และช่วยให้ปริมาณแมวหลายหินอ่อนเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้น

1.5 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ (Interspecies Cloning) เป็นการทำให้สัตว์ต่างชนิดกัน สัตว์มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน โดยเซลล์ต้นแบบเป็นของสัตว์ชนิดหนึ่ง และไซโทพลาสต์เป็นของสัตว์อีกชนิดหนึ่งเช่นทำในกระต๊าก-โค บันเต็ง-โค ล่อ-ม้า (Lanza และคณะ, 2000; Woods และคณะ, 2003)

ในอดีตการเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์นิยมใช้วิธีการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน (Fujihara และ Xi, 2000) แต่ในปัจจุบันการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เข้ามามีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ให้มีจำนวนมากในระยะเวลาสั้นๆเป็นอย่างมาก นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 เป็นต้นมาได้มีการเก็บข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการโคลนนิ่งสัตว์ใกล้สูญพันธุ์หลายๆ ชนิด เช่นการ

ทดสอบหาไซโตพลาสซึมผู้รับที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ พบว่ามีโอโอไซท์จากสัตว์หลายชนิดที่นิยมนำมาใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ เช่น โอโอไซท์ของแมว โคกระต่าย เป็นต้น แต่โอโอไซท์ของโคจะเป็นที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากให้อัตราการเจริญและการแบ่งตัวของตัวอ่อนได้ดีกว่าชนิดอื่นๆ จากการทดลองของ Dominko และคณะ (2000) พบว่าโอโอไซท์ของโคสามารถนำมาใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมต่างชนิดเช่น เสือเกาหลี (Hwang และคณะ, 2000) ได้ และจากการทดลองที่สอดคล้องกันของ Mitalipova และคณะ (2000) รายงานว่าโอโอไซท์ของโคสามารถใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสำหรับสัตว์ต่างชนิดได้ หรือเรียกว่าเป็น universal recipient cytoplasm นอกจากนี้ Nguyen และคณะ (2000) พบว่าโอโอไซท์ของกระบือสามารถนำมาใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสำหรับโคได้ แต่ประสิทธิภาพการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อนจะต่ำกว่าการใช้โอโอไซท์ของโคเล็กน้อย

นอกจากโอโอไซท์ของสัตว์ชนิดต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วยังมีโอโอไซท์ของสัตว์ที่อยู่ในตระกูลเดียวกับสัตว์ต้นแบบที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไซโตพลาสซึมผู้รับได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างเช่น การทดลองโคลนนิ่งเสือเกาหลี (Hwang และคณะ, 2000) ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโอโอไซท์ที่เป็น universal recipient cytoplasm กับโอโอไซท์ของแมวที่เป็นสัตว์ตระกูลเดียวกัน จากผลการทดลองสรุปได้ว่าโอโอไซท์ของสัตว์ตระกูลแมวสามารถใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสำหรับเสือเกาหลีได้ดีกว่าโอโอไซท์ของโค ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจากการทดลองของ Chen และคณะ (2002) ที่พบว่าดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) ที่ทำหน้าที่สร้างพลังงานให้กับตัวอ่อนมีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ เนื่องจากพลังงานที่สร้างได้อาจเพียงพอและเหมาะสมสำหรับสัตว์ชนิดเดียวกัน แต่อาจไม่เพียงพอและไม่เหมาะสมสำหรับสัตว์ต่างชนิดก็ได้

เซลล์ที่นำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการโคลนนิ่งเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเพราะเป็นแหล่งของสารพันธุกรรมที่ต้องการ เนื้อเยื่อของสัตว์ใกล้สูญพันธุ์หรือแม้กระทั่งเสียชีวิตไปแล้วสามารถนำมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบได้ทั้งสิ้นถ้ามีการเก็บรักษาไว้ในรูปเซลล์แช่แข็ง การทดลองเกี่ยวกับการอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์โดยวิธีโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์มีหลายการทดลองซึ่งได้ตัวอ่อนในระยะมอรูลา-บลาสโตซิส การทดลองที่ได้ตัวอ่อนจนถึงระยะ มอรูลา-บลาสโตซิสที่สำเร็จ ได้แก่การโคลนนิ่งหมีแพนด้า (Chen และคณะ, 2002) โดยใช้โอโอไซท์ของกระต่ายเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและใช้เซลล์จากท่อหน้าไข่ ค่อมน้ำนม และเซลล์กล้ามเนื้อของหมีแพนด้าเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ ผลการทดลองพบว่าเซลล์จากค่อมน้ำนมสามารถใช้เป็นเซลล์ต้นแบบได้ดีที่สุดคือได้ตัวอ่อนเจริญได้จนถึงระยะบลาสโตซิส

สำหรับการทดลองที่ปฏิวัติวงการอนุรักษ์สัตว์ใกล้สูญพันธุ์ที่สุด คือการโคลนนิ่งกระทิงที่เป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ของหลายประเทศในเอเชียได้สำเร็จ (Lanza และคณะ, 2000) การทดลองนี้ใช้

เซลล์ผิวหนังของกระต๊อเป็นเซลล์ต้นแบบและใช้ไอ โอ ไซท์ของโคเนื้อเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ จากนั้นย้ายฝากตัวอ่อนไว้ในมดลูกของโคเนื้อเพื่อให้ตัวอ่อนของกระต๊อฝังตัวและพัฒนาต่อไปจนได้ ลูกกระต๊อเกิดมา แต่ลูกกระต๊อโคลนนิ่งเสียชีวิตหลังคลอดได้ 2 วัน นับจากนั้นมาจึงไม่มี รายงานความสำเร็จการโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ในกระต๊ออีก ความสำเร็จในการโคลนนิ่งกระต๊อนับว่า เป็นก้าวที่สำคัญมากเพราะสามารถพิสูจน์ให้เห็นว่าการโคลนนิ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ จากการทดลองนี้กระตุ้นให้นักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มหันมา ให้ความสนใจกับการโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์สัตว์ใกล้สูญพันธุ์มากขึ้น และได้ลูกสัตว์โคลนนิ่งข้าม สปีชีส์เกิดมาอีกได้แก่ ล่อ (Wood และคณะ, 2003) แมวป่าแอฟริกา (Gomez และคณะ, 2004)

การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์แมวลายหินอ่อนมีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากแมวบ้านที่เกิดจากการ โคลนนิ่งตัวแรกของโลกได้คลอดออกมาเมื่อต้นปี 2002 โดยการใส่เซลล์นิวเคลียสเป็นเซลล์ต้นแบบ (Shin และคณะ, 2002) แสดงว่าการโคลนนิ่งแมวบ้านมีเทคนิคที่เป็นมาตรฐานในระดับหนึ่งแล้ว สำหรับในประเทศไทย การโคลนนิ่งแมวข้ามสปีชีส์มีความเป็นไปได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากการ ทดลองโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวบ้านของห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าตัวอ่อนแมวบ้านสามารถเจริญได้ดีในหลอดแก้ว (จันทร์เจ้า และ คณะ, 2545) นอกจากนี้ยังทดลองทำการโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวดาว (*Felis bengalensis*) ข้าม สปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับก็ได้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ (จันทร์เจ้า และ คณะ, 2545, 2547; Lorthongpanich และคณะ, 2004) จากข้อมูลของการทดลองที่ได้ สามารถใช้เป็น ข้อมูลพื้นฐานในการทำโคลนนิ่งแมวลายหินอ่อน โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับได้ อย่างดี เนื่องจากห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มีเทคโนโลยีการโคลนนิ่ง โคที่พิสูจน์แล้วว่าได้ผลดีและทำซ้ำได้ (รังสรรค์ และ คณะ, 2547; ชูติ และ คณะ, 2546, 2547; Laowthammathron และ คณะ, 2004)

นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้วิธีการโคลนนิ่งแมวป่าขนาดเล็กไปทำการโคลนนิ่งสัตว์ ประเภทเดียวกับแมวชนิดอื่นๆ ได้อีกเช่น เสือลายเมฆ เสือชีตาห์ เสือพูมา เสือจากัวร์ เป็นต้น แต่อย่างไร ก็ตาม ความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะบลาสโตซิสต์ซึ่งเป็นระยะพร้อมย้ายฝากให้กับ แม่ตัวรับของสัตว์ตระกูลแมวมีความสำเร็จอยู่ที่ 3-28 เปอร์เซ็นต์ (Gomez และคณะ, 2006) จึงส่งผล ให้ความสำเร็จในการผลิตสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งต่ำ และได้มีรายงานในสัตว์ชนิดอื่นว่าการ แสดงออกของยีนต่างๆ ในระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัวมีผลต่อการฝังตัวของ ตัวอ่อนโดยเฉพาะสัตว์ที่เกิดจากการทำโคลนนิ่ง (Hall และคณะ, 2005; Vassena และคณะ, 2005; Telford และคณะ, 1999) โดยในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนในสัตว์ ตระกูลแมว ทำให้ยังขาดข้อมูลพื้นฐานทางด้านนี้ ซึ่งอาจเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมการพัฒนาของ ตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมว ดังนั้นเพื่อเป็นการอนุรักษ์และรักษาพันธุกรรมสัตว์ตระกูลแมวป่าที่มีอยู่ใน

ประเทศไทยไม่ให้สูญเสียพันธุ์และสามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ จึงควรมีการเก็บเซลล์ร่างกายของสัตว์ตระกูลแมวป่าไว้ในรูปธนาคารเซลล์แช่แข็งเพื่อนำไปศึกษาวิจัยด้านการโคลนนิ่ง เพื่อผลิตตัวอ่อนในระยะพร้อมย้ายฝากให้กับแม่ตัวรับ

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การโคลนนิ่งจะช่วยเพิ่มจำนวนแมวลายหินอ่อนให้มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งแมวลายหินอ่อนที่ผลิตได้จากการโคลนนิ่งจะถูกนำไปเลี้ยงในสวนสัตว์จังหวัดนครราชสีมาและสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี เพื่อใช้ประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนแมวลายหินอ่อนให้มีปริมาณมากขึ้น และเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อใช้เพิ่มจำนวนลูกแมวลายหินอ่อนให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อสามารถเพิ่มจำนวนลูกแมวลายหินอ่อนให้มีปริมาณมากขึ้น และปล่อยแมวลายหินอ่อนที่ผลิตได้สู่ป่าธรรมชาติต่อไป

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สัตว์ทดลอง

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

2.2 การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างเซลล์ผิวหนังสัตว์ตระกูลแมว และโค ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1×1 มม. ก่อนนำมาเลี้ยงในน้ำยา α minimum essential medium (α MEM, Sigma, M-7145) + 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air เซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4–5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีจำนวนมากขึ้น นำเซลล์ที่ passage 3 มาแช่แข็งในน้ำยาเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนใช้น้ำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FBS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย 0.25% Trypsin /EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกัน เป็นเซลล์เดี่ยว ใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

2.3 การเตรียมไฮโปทาลามิซึมผู้รับ การฉีดเซลล์ต้นแบบและ เชื่อมเซลล์

2.3.1 ไข่แมวบ้าน

กระตุ้นให้รังไข่แมวบ้านมีถุงไข่ (follicle) เจริญขึ้นจำนวนมาก ด้วยการฉีดฮอร์โมน equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon, Intervet) ปริมาณ 200 iu. จากนั้น 5 วันทำการเก็บรังไข่โดยผ่าตัดผ่านทางผนังหน้าท้อง และนำรังไข่ที่ได้ไปกรีดด้วยเข็มฉีดยาขนาด 21G เพื่อแยกไข่ออกจากรังไข่ นำไข่ที่ได้ไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) โดยเลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ l ที่อุณหภูมิ 38°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ นาน 24 ชั่วโมง น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วยน้ำยา TCM 199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 0.36 mM Na Pyruvate, 2.2 mM Calcium-lactate, 2.0 mM L-glutamine, 1.13 mM cystein, 0.3% BSA (fatty acid free), 0.5 iu./ml eCG, 1 iu./ml human chorionic gonadotrophin (hCG, Chlorulon, Intervet) หลังจากเลี้ยงไข่ครบ 24

ชั่วโมงแล้ว นำมาย่อยเซลล์คิวมูล์สออกด้วย 0.1% hyaluronidase (Sigma, S-3506) แล้วจึงคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว (มี first polar body) มาดูคินิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ในน้ำยาที่มี 5 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ทำการตรวจสอบผลสำเร็จการดูคินิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูออกมาข้อมด้วย 5 mg/ml Hoechst 33342 แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอุลตราไวโอเล็ต นำเฉพาะไข่ที่ดูคินิวเคลียสออกสำเร็จมาทำการฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์เข้าไปในบริเวณ perivitelline space ของไข่ จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบ ไปวางไว้ระหว่างปลายทั้งสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา 0.3 M manitol ที่เติมด้วย 0.1 mM MgCl_2 เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Electro Cell Fusion (Voltrain EP-1, Cryologic, Australia) ความแรงไฟฟ้า 30 volt นาน 30 μsec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emcare holding 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมงจึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 10 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide และ 1.25 $\mu\text{g/ml}$ cytochalasin D ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.3.2 ไข่โค

ทำการเก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 มล. ดูไข่จากถุงไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูล์สห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้น ไปเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG, 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1 $\mu\text{g/ml}$ 17 β -estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 21 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงไข่ 21 ชั่วโมง จะนำมาย่อยเซลล์คิวมูล์สออกด้วย 0.1% hyaluronidase แล้วคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว ไปดูคินิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5 $\mu\text{g/ml}$ CB ตรวจสอบผลสำเร็จการดูคินิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูได้ไปข้อมด้วย 5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 แล้วส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอุลตราไวโอเล็ต นำเฉพาะไข่ที่ดูคินิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์เข้าไปในบริเวณ perivitelline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบ ไปวางไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmerman fusion medium เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 Volt นาน 15 μsec ทำ 2 ครั้ง ต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emcare holding 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมง จึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ จากนั้นคัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไป

กระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 $\mu\text{g/ml}$ CD และ 10 $\mu\text{g/ml}$ CHX ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.4 การผลิตตัวอ่อนแมวบ้านที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำท่อนำเชื้ออสุจิ (epididymises) ที่ได้จากการทำหมันแมวเพศผู้ มาทำการคัดแยกตัวอสุจิ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 21G กรีดท่อนำเชื้ออสุจิในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำยา mDPBS จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,100 rpm นาน 7 นาที จากนั้นดูดส่วนใส่ออก แล้วค่อยๆเติมน้ำยา Tyrode's medium ที่เติมด้วย 0.6 mg/ml BSA, 15 mM NaHCO_3 , 0.36 mM sodium pyruvate, 2.2 mM calcium lactate และ 2 mM L-glutamine จำนวน 1 ml และบ่มที่อุณหภูมิ 38°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการคัดน้ำยาส่วนบนซึ่งจะมีตัวอสุจิที่มีชีวิตมาทำการนับจำนวนตัวอสุจิ ซึ่งการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วจะนำไข่แมวบ้านที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว (ตามข้อ 2.3.2) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการเลี้ยงร่วมกับตัวอสุจิจำนวน 4×10^5 cells/ml ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38°C, 5% CO_2 in air เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

2.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

2.5.1 ตัวอ่อนแมว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้น และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว มาเลี้ยงในน้ำยา Tyrode's medium I + 0.3% BSA ในอัตราส่วนไข่ 10 ใบ/น้ำยา 50 μl ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 48 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจสอบอัตราการเจริญสู่ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ของไข่ทั้งสองกลุ่มแล้วนำเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเข้าเลี้ยงต่อในน้ำยา Tyrode's medium II + 10% FBS ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 6 วัน ในระหว่างการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วจะทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนออกครั้งหนึ่งทุกๆ วัน และบันทึกอัตราการเจริญเติบโต

2.5.2 ตัวอ่อนโค

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa medium ในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 in air เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์เยื่อท่อนำไข่โค ในน้ำยา mSOF medium ในสัดส่วน 10 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 6 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาออกครั้งหนึ่งทุกๆวัน และบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนขณะทำการเปลี่ยนน้ำยา

2.6 การนับจำนวนเซลล์

2.6.1 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสคุณภาพดีในวันที่ 8 ของการเลี้ยง มาล้างใน phosphate buffer saline (PBS) 3-5 ครั้ง แล้วจึงนำตัวอ่อนไปย้อมด้วย 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma, B-2883) นาน 5 นาที จากนั้นล้างตัวอ่อนในน้ำยา PBS 3-5 ครั้ง แล้วจึงพ่นกตัวอ่อนบนสไลด์แก้วด้วย glycerol (Merck, 4094) ปิดทับด้วยแผ่น cover slip แล้วจึงนำไปส่องนับจำนวนเซลล์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

2.6.2 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน trophectoderm และ inner cell mass

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสคุณภาพดีในวันที่ 8 ของการเลี้ยง นำมาย้อมเพื่อนับจำนวน trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) โดยย่อยเปลือกตัวอ่อนออกโดยบ่มใน 0.5% protease (Sigma, P-8811) จากนั้นนำตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือก (Zona-free blastocyst) มาบ่มใน 10% rabbit anti-domestic cat fibroblast เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement (Sigma, S-1639) 10 µg/ml propidium iodide (Sigma, P-4170) และ 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma, B-2883) นาน 30 นาที แล้วจึงพ่นกตัวอ่อนบนสไลด์แก้วด้วย glycerol ปิดทับด้วยแผ่น cover slip แล้วจึงนำไปส่องนับจำนวนเซลล์ TE (ติดสีแดง) และ ICM (ติดสีน้ำเงิน) ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

2.7 การเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแมวตัวรับ และการย้ายฝากตัวอ่อน

นำแมวบ้าน เพศเมีย อายุ 10-12 เดือน มาทำเป็นตัวรับ โดยเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยการฉีดฮอร์โมน eCG ปริมาณ 200 iu พร้อมกับแมวตัวให้ไข่ จากนั้น 5 วัน จึงฉีดฮอร์โมน hCG ปริมาณ 200 iu ก่อนนำตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งไปย้ายฝากให้กับตัวรับภายหลังจากที่ฉีด hCG ไปแล้ว 48 ชั่วโมง การย้ายฝากตัวอ่อน วางยาสลบแมวตัวรับโดย Atropine-Xylazine-Ketamine ตามขนาดมาตรฐานในแมว และผ่าตัดเปิดช่องท้อง นำตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง ระยะ 1 เซลล์ ถึง 8 เซลล์ ไปล้างในน้ำยา Emcare holding 6 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน ในท่อย้ายฝาก (Intratubal Transfer Catheter, COOK) ก่อนนำปลายท่อย้ายฝากสอดผ่านปากแตรเข้าไปในท่อนำไข่ของตัวรับ แล้วจึงปล่อยตัวอ่อนที่ท่อนำไข่ของข้างที่มีไข่ตก จำนวน 14-33 ตัวอ่อน หลังย้ายฝากตัวอ่อน 30 วันทำการตรวจการตั้งท้องด้วยการคลำผ่านหน้าท้อง ร่วมกับการอัลตราซาวด์

2.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

นำตัวอ่อนเดี่ยวในระยะ 1 เซลล์, 2 เซลล์, 4 เซลล์, 8 เซลล์, มอรูลา และ บลาสโตซิส ที่ได้รับการโคลนนิ่ง หรือปฏิสนธิในหลอดแก้ว (ประมาณ 12, 24, 36, 48, 120, 192 ชั่วโมง หลังจากการเลี้ยงตามลำดับ) มาทำการสกัด mRNA โดยใช้ Oligo(dT) 25 นิวคลีโอไทด์ที่ติดอยู่กับเม็ดแม่เหล็ก (Dynabeads mRNA purification kit, Dynal) แล้วนำ mRNA ที่ได้มาทำการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) โดยป้อน mRNA ที่สกัดได้ในอุณหภูมิ 55°C นาน 1 ชั่วโมง ในสารละลายที่มี 1x first stand buffer, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM of each dNTP, 40U RNasin ribonuclease inhibitor (Invitrogen) และ 200U Superscript III RNase H-RT (Invitrogen) นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนต่างๆ (ตารางที่ 2.1) ในเชิงปริมาณ โดยใช้ LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, IN, USA) ด้วยเครื่อง LightCycler instrument (Roche) นำข้อมูลที่ได้มาทำการแปลผลในรูปของ Relative Abundance (RA) เทียบกับ Housekeeping gene β -actin ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ตารางที่ 2.1 ไพรเมอร์ของยีนต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย Real time PCR

Gene	Accession number	Primer sequences 5'-3'	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>Oct4</i>	DQ486513	F-ATCCTGGGGTTCATTTGG R- CTGGTTCGCTTCTCTTTTCG	200	56	-
<i>DNMT1</i>	AY173048	F- GAGGGCTACCTGGCTAAAGTC R- CATTTCGCTTCCCGACTGAAA	88	60	Suteevun และคณะ, 2006
<i>DNMT3a</i>	AY271299	F- CGAGGTGTGTGAGGACTCCAT R- ACGTCCCCGACGTACATGA	93	62	Suteevun และคณะ, 2006
<i>DNMT3b</i>	AY244713	F- AGCATGAGGGCAACATCAAAT R- CACCAATCACCAAGTCAAATG	98	62	Suteevun และคณะ, 2006
<i>HAT1</i>	BT021536	F- CTTCAGACCTTTTTGATGTGGTTTATT R- GCGTAGCTCCATCCTTATTATACTTCTC	112	58	Suteevun และคณะ, 2006
<i>HDAC1</i>	AY504948	F- GCACTGGGCTGGAACATCTC R- GGGATTGACGACGAGICCTATG	98	58	Suteevun และคณะ, 2006
<i>β-actin</i>	NM001101	F-GGACTTCGAGCAAGAGATGG R-AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234	60	-

2.9 การวางแผนการทดลอง

2.9.1 ศึกษาผลกระทบของน้ำยาที่ใช้เลี้ยงไขแมวบ้านนอกคู้อบ (manipulation medium) ในระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำยา 2 ชนิด คือ HEPES-buffer TCM199 ที่เติม 10% FBS (199H) กับ Emcare holding medium (EHM, ICPbio) ซึ่งน้ำยาที่ให้อัตรา การเชื่อมติด (fusion) การแบ่งตัว (cleavage) และเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ที่สุด จะถูกเลือกเพื่อใช้ในการทำโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวต่อไป

2.9.2 ศึกษาผลกระทบของการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของแมวบ้าน (DOEC) ต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไขแมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ โดยหลังจากเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในน้ำยา Tyrode's medium I + 0.3% BSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตัวอ่อนที่แบ่งตัวในระยะ 8 เซลล์ จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 จะถูกเลี้ยงในน้ำยา Tyrode's medium II + 10% FBS ร่วมกับ DOEC (co-culture) และกลุ่มที่ 2 ถูกเลี้ยงในน้ำยา Tyrode's medium II + 10% FBS ที่ไม่มี DOEC (non co-culture) จากนั้นทำการบันทึกอัตราการเจริญของตัวอ่อนทั้ง 2 กลุ่ม

2.9.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำไขโคมาใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ สำหรับการทำให้โคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแมวบ้าน (DCF) หรือ แมวลายหินอ่อน (MCF) จะถูกฉีดเข้าไปในไขแมวบ้าน (DCo) และไขโค (Bo) ที่ถูกกำจัดสารพันธุกรรมตามลำดับ และเชื่อมติดเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำไข่ที่เชื่อมติดสำเร็จมากระตุ้นการแบ่งตัวด้วยสารเคมี และนำมาเลี้ยงต่อในหลอดแก้วตามชนิดของไซโตพลาสซึมผู้รับ ทำการบันทึกอัตราการเจริญเติบโต และทำการเปรียบเทียบอัตราการเชื่อมติด การแบ่งตัว การเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ โดยเปรียบเทียบระหว่าง

- ตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งที่ใช้ไขแมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ (DCf+DCo)
- ตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไขแมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ (MCF+DCo)
- ตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งที่ใช้ไขโคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ (DCf+Bo)
- ตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไขโคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ (MCF+Bo)
- ตัวอ่อนโค โคลนนิ่งที่ใช้ไขโคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ (Bf+Bo)

2.9.4 ศึกษาอัตราการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับหลังจากถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง โดยตัวอ่อน DCf+DCo หรือ MCF+DCo ในระยะ 1 ถึง 8 เซลล์ จะถูกย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับ โดยวิธีการผ่าตัด และสอดท่อย้ายฝากที่บรรจุตัวอ่อนเข้าไปในท่อนำไข่ของแมวบ้านตัวรับ หลังจากนั้นทำการบันทึกการตั้งท้อง

2.9.5 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สะท้อนถึงกระบวนการ reprogramming ของตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และตัวอ่อนแมวบ้าน แมวดาว แมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ โดยตัวอ่อน (1 ตัวอ่อน) ในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต (1 เซลล์ 2 เซลล์ 4 เซลล์ 8 เซลล์ มอรูลา และบลาสโตซิสต์) ของแต่ละชนิดตัวอ่อน จะถูกนำมาสกัด mRNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ (ตารางที่ 2.1) ด้วยเครื่อง Real-time PCR โดยจะวิเคราะห์ทั้งหมด 5 ซ้ำ และนำค่าการแสดงออกที่ได้มาเปรียบเทียบกับตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองนี้ใช้การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

3.1 การสร้างธนาคารเซลล์แมวลายหินอ่อน

ปัจจุบันแมวลายหินอ่อนที่เลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์ภายในประเทศไทย ได้เสียชีวิตหมดแล้ว โดยคณะผู้วิจัยสามารถทำการเก็บตัวอย่างจากแมวลายหินอ่อนเพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว ที่เสียชีวิตภายในสวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยเนื้อเยื่อดังกล่าวหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-5 วัน จะมีเซลล์รูปร่างกระสวย หรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนโดยการเปลี่ยนถ่ายภาชนะ เมื่อได้จำนวนมากพอแล้วจึงทำการเก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่งต่อไป

3.2 ผลกระทบของน้ำยา manipulation medium ต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้าน

โคลนนิ่ง

จากตารางที่ 3.1 พบว่าตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งที่ใช้ น้ำยา EHM ที่ใช้เลี้ยงไข่แมวบ้านนอกตู้อบในระหว่างกระบวนการโคลนนิ่ง มีอัตราการเชื่อมติดเซลล์สูงกว่าตัวอ่อนที่ใช้ น้ำยา 199H อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (73.3% กับ 63.7%) และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำยา EHM สามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งสูงกว่า น้ำยา 199H อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (33.3% กับ 18.1%) แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการแบ่งตัว อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ มอรูลา และจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งในระยะบลาสโตซิสต์ ที่ได้จากน้ำยาทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3.1)

การทำโคลนนิ่งแมวบ้านถือว่าเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สามารถทำให้เข้าใจ และสามารถผลิตตัวอ่อนในระยะพร้อมย้ายฝากให้กับตัวรับ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ต่อไป ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยมีการศึกษาผลของชนิดเซลล์ต้นแบบที่ใช้ในการทำโคลนนิ่ง (Skrzyszowaka และคณะ, 2003; Kitiyanant และคณะ, 2003; Gomez และคณะ, 2003 Yin และคณะ, 2005 และ 2007) ตลอดจนศึกษาวิธีการทำโคลนนิ่ง (Gomez และคณะ, 2003; Wen และคณะ, 2003) เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของน้ำยาที่ใช้เลี้ยงไข่แมวบ้านนอกตู้อบในระหว่างกระบวนการโคลนนิ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำยาที่ใช้เลี้ยงไข่แมวบ้านนอกตู้อบในระหว่างกระบวนการโคลนนิ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง ตามปกติกระบวนการทำโคลนนิ่งไข่จะถูกเลี้ยงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ zwitterionic buffer และ HEPES (N-2-

Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ zwitterionic buffer ที่นิยมใช้ควบคุม pH ในน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ โดยจะถูกผสมกับน้ำยาหลายชนิดเช่น TCM199 Ham's F-10 หรือ Tyrode เพื่อให้เป็นน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่นอกตัวอ่อนในระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่ง ส่วนน้ำยา EHM เป็นน้ำยาอีกตัวที่ใช้ในอุตสาหกรรมการย้ายฝากตัวอ่อนโค และองค์ประกอบของน้ำยานี้ถูกเก็บไว้เป็นความลับเชิงการค้า แต่อย่างไรก็ตามผู้ผลิตได้เสนอว่าน้ำยานี้มีองค์ประกอบของสารที่มีความสามารถในการช่วยสนับสนุนการพัฒนาของตัวอ่อน และสาร morpholonopropane sulfonic acid (MOPS) ที่เป็น inert zwitterions buffer ถูกนำมาใช้น้ำยานี้เพื่อช่วยควบคุมระดับ pH ให้มีความเสถียร ซึ่งการที่น้ำยา EHM มีความสามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง อาจจะเป็นเพราะน้ำยาชนิดนี้มี pH คงที่มากกว่าน้ำยา 199H จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำยาที่ใช้เลี้ยงไข่นอกตัวอ่อนในระหว่างกระบวนการโคลนนิ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง ดังนั้นน้ำยา EHM จะถูกเลือกเพื่อใช้เป็นน้ำยาเลี้ยงไข่นอกตัวอ่อนในการทดลองลำดับถัดไป

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง เมื่อใช้น้ำยา

manipulation 2 ชนิด*

Source of embryos**	Manipulation Medium***	No. (%) of embryos		No. (%) of embryos developed to			Mean cell (no. ± S.E.M.) of blastocyst
		fusion	cleavage	8-cell	morula	blastocyst	
DCf + DCo	199H	88/138 ^a (63.7)	73/88 ^a (82.9)	64/88 ^a (72.7)	32/88 ^b (36.40)	16/88 ^b (18.1)	521 ± 9.2
	EHM	84/114 ^b (73.7)	75/84 ^a (89.2)	56/84 ^a (66.7)	42/84 ^b (50.0)	28/84 ^a (33.3)	537 ± 7.6

*Data were from four trials

**DCf + DCo = Domestic cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte

***199H = HEPES-buffer TCM-199 supplemented with 10%FBS, EHM = Emcare holding medium

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

3.3 ผลกระทบของการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มนำไข่แมวบ้าน (DOEC) ต่ออัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่ง ที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ

จากตารางที่ 3.2 พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแมวลายหินอ่อนมีความสามารถในการเชื่อมติดกับไซโตพลาสซึมของไข่แมวบ้านไม่แตกต่างกัน กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแมวบ้าน (75.1% กับ

82.4%) อัตราการแบ่งตัว และเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ ไม่แตกต่างกันระหว่างตัวอ่อนทั้ง 2 ชนิด (84.9% กับ 89.3% และ 60.5% กับ 53.3% ตามลำดับ) เมื่อนำตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งระยะ 8 เซลล์ มาเลี้ยงร่วมกับ DOEC (co-culture) โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับ DOEC (non co-culture) พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะมอรูลา บลาสโตซิส และจำนวนเซลล์ทั้งหมดในระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งที่เลี้ยงแบบ co-culture ไม่แตกต่างกับการเลี้ยงแบบ non co-culture และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งพบว่ามีความสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา (ตารางที่ 3.2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งแบบ co-culture ไม่สามารถช่วยสนับสนุนอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสได้ และตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ไม่สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสได้ถึงแม้จะเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มไข่แมวบ้าน

จากการศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านี้ พบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา ดังนั้นคณะผู้วิจัย ได้ค้นคว้าเพิ่มเติม พบว่ามีรายงานหลายฉบับ เสนอว่าการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์ร่างกายชนิดต่างๆ จะสามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในหลอดแก้ว (Tervit และคณะ, 1994; Donnay 1997; Lee และคณะ, 1997) เซลล์ที่นิยมใช้เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนเช่น เซลล์ vero (Menezes และคณะ, 1990; Pegoraro และคณะ, 1998) เซลล์ buffalo rat liver (Donnay และคณะ, 1997) และเซลล์ที่อยู่บริเวณระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมียจะมีความสามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ดี (Xu และคณะ, 2001) ซึ่งเซลล์ที่นำมาเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน จะหลังสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (Bavister, 1992) และอาจจะเป็นการจำลอง หรือเลียนแบบสภาวะแวดล้อมให้เหมือนกับสิ่งแวดล้อมจริงภายในตัวสัตว์ (Joo และคณะ, 2001) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ พบว่าการนำเซลล์ DOEC มาเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ไม่สามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโต และจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนได้ อีกทั้งยังไม่สามารถช่วยให้ตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสได้ โดยอาจจะเป็นเพราะเซลล์ DOEC หลังจากคัดแยกจากท่อไข่แมวบ้านแล้วจะถูกเลี้ยงในน้ำยา TCM199 ที่มี 10% FBS ที่อุณหภูมิ 38°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air ซึ่งเซลล์ที่มีคุณภาพดีจะเคลื่อนไหว และฟองตัว จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งระยะ 8 เซลล์ ในน้ำยา Tyrode ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂, 5% O₂, 90%N₂ in air ในระหว่างการเลี้ยงดังกล่าว เซลล์ DOEC หยุดการเคลื่อนไหว และยุบตัว อาจจะทำให้รูปร่างของน้ำยา และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ DOEC ร่วมกับตัวอ่อน ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ DOEC จึงทำให้เซลล์ DOEC ไม่สามารถหลังสารที่เป็นประโยชน์ออกมาภายนอกเซลล์ได้

ตารางที่ 3.2 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลาย หินอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่ของแมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ในสถานะที่ไม่เลี้ยง และเลี้ยงร่วมเซลล์เชื้อท่อนำไข่ของแมวบ้าน*

Source of embryos**	No. (%) of embryos			Treatment	No. (%) of embryos		Mean cell (no.± S.E.M.) of blastocyst
	fused	cleaved	developed to 8-cell		morula	blastocyst	
DCf+ DCo	172/208 ^a (82.7)	146/172 ^a (84.9)	104/172 ^a (60.5)	Non co-culture	32/54 ^a (59.3)	24/54 ^a (44.4)	519 ± 7.6
				Co-culture	24/50 ^a (48.0)	19/50 ^a (38.0)	518 ± 30.4
Mcf+ DCo	178/237 ^a (75.1)	159/178 ^a (89.3)	95/178 ^a (53.3)	Non co-culture	14/49 ^b (28.6)	0/49 ^b	NA
				Co-culture	15/46 ^b (32.6)	0/46 ^b	NA

*Data were from four trials

**DCf + DCo = Domestic cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte, Mcf + DCo = Marbled cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte

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

NA is not available.

3.4 อัตราการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่โค เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ

จากตารางที่ 3.3 เมื่อเปรียบเทียบตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่ชนิดเดียวกัน พบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ต้นแบบแต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามไข่โค (Bo) ให้ค่าการเชื่อมติดสูงกว่าไข่แมวบ้าน (DCo) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (81.7-84.6% กับ 74.2-76.8% ตามลำดับ) โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแมวบ้าน (DCf) แมวลายหินอ่อน (Mcf) และ โค (Bf) เป็นเซลล์ต้นแบบ อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน DCf+DCo และ Mcf+DCo (86.5% กับ 86.3%) ไม่แตกต่างกับตัวอ่อน DCf+Bo และ Mcf+Bo (90.9% กับ 93.5%) อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อน DCf+DCo และ Mcf+DCo (67.7% กับ 61.1%) ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับตัวอ่อน DCf+Bo และ Mcf+Bo (76.8% กับ 81.7%) และอัตราการเจริญสู่ระยะมอรูลาของตัวอ่อน Mcf+DCo DCf+Bo และ Mcf+Bo ไม่แตกต่างกัน (21.1% 15.3% และ 11.8% ตามลำดับ) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อน

DCf+DCo และ Bf+Bo พบว่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (52.1% และ 44.9% ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามตัวอ่อน DCf+DCo และ Bf+Bo (ภาพที่ 3.1) มีอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่าตัวอ่อน MCF+Bo (ภาพที่ 3.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (34.4% 29.6% และ 8.6% ตามลำดับ) ในทางตรงกันข้ามตัวอ่อน MCF+MCo และ DCf+Bo ไม่สามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสต์ เมื่อคำนวณจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ (ภาพที่ 3.1) พบว่าตัวอ่อน DCf+DCo มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดสูงกว่าตัวอ่อน Bf+Bo (530 ± 13.9 เซลล์ กับ 127 ± 1.8 เซลล์) และตัวอ่อน MCF+Bo มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 16 ± 0.4 เซลล์

จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Thongphakdee และคณะ, 2006) พบว่าตัวอ่อนแมวหลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ คณะผู้วิจัยจึงได้พยายามหาไข่ชนิดอื่นเพื่อนำมาใช้ในการทำโคลนนิ่งแมวหลายหินอ่อน และได้พบว่าไข่โคเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีรายงานว่าสามารถใช้เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับกับเซลล์ต้นแบบต่างชนิดกันได้ (Dominko และคณะ, 1999) จากผลการทดลองพบว่า ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของ MCF+Bo มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของ MCF+MCo และ DCf+Bo คณะผู้วิจัยจึงเรียกตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของ MCF+Bo ว่า blastocyst like embryos แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของแมวบ้านโคลนนิ่งที่มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดประมาณ 20 เซลล์ สามารถตั้งท้องได้เมื่อย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับ (Yin และคณะ, 2005) จึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อนำตัวอ่อน MCF+Bo ย้ายฝากให้แมวบ้านตัวรับ อาจจะพบการตั้งท้อง แต่จะต้องมีการศึกษาและวิจัยเพิ่มเติมอย่างละเอียด

ตารางที่ 3.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่
ใช้ไข่แมวบ้านและไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ*

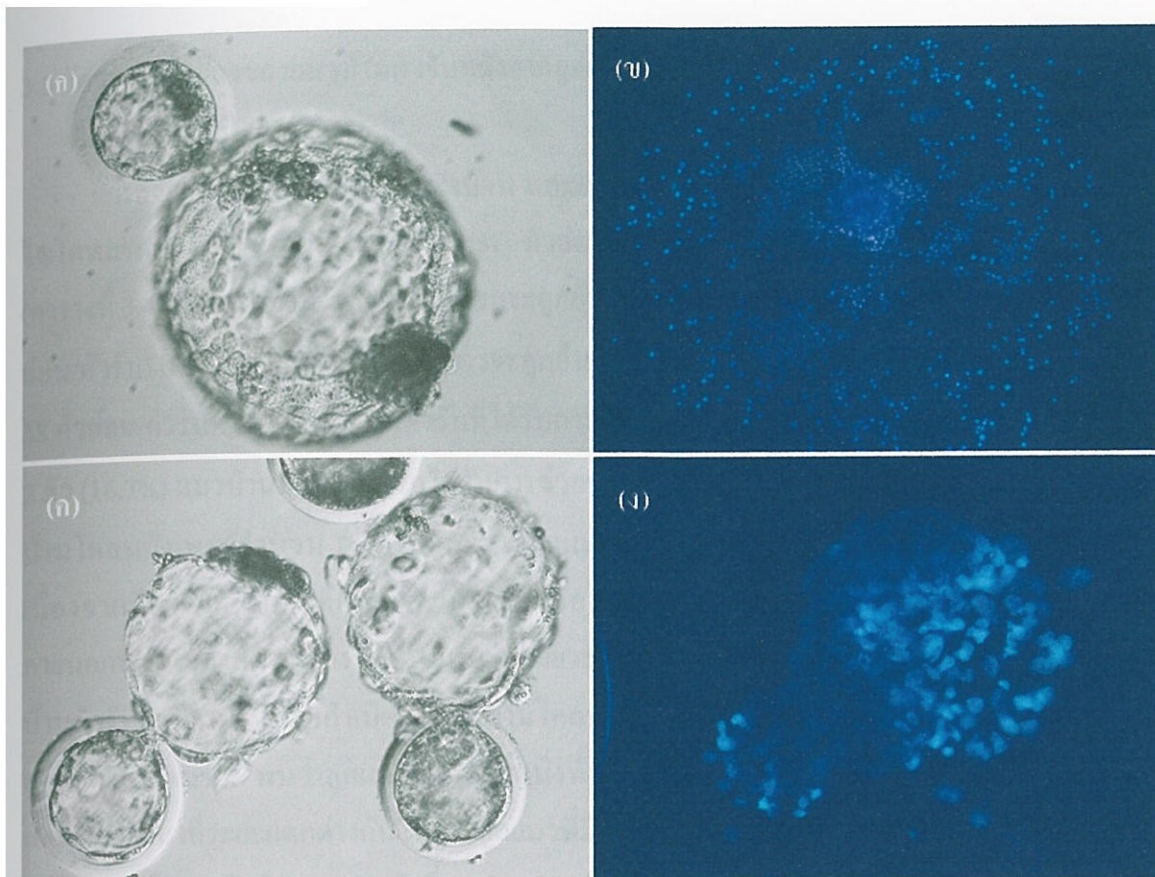
Source of embryos**	No. (%) of embryos		No. (%) of embryos developed to			Mean cell (no.± S.E.M.) of blastocyst
	fused	cleaved	8-cell	morula	blastocyst	
DCf + DCo	96/125 ^b (76.8)	83/96 ^b (86.5)	65/96 ^b (67.7)	50/96 ^a (52.1)	33/96 ^a (34.4)	536 ± 13.9
MCf + DCo	95/128 ^b (74.2)	82/95 ^b (86.3)	58/95 ^b (61.1)	21/95 ^c (22.1)	0/95 ^b	NA
Bf + Bo	98/120 ^a (81.7)	94/98 ^a (95.9)	76/98 ^a (77.6)	44/98 ^b (44.9)	29/98 ^a (29.6)	127 ± 1.8
DCf + Bo	99/117 ^a (84.6)	90/99 ^{a,b} (90.9)	76/99 ^a (76.8)	15/99 ^c (15.2)	0/99 ^b	NA
MCf + Bo	93/113 ^a (82.3)	87/93 ^{a,b} (93.5)	76/93 ^a (81.7)	11/93 ^c (11.8)	8/93 ^b (8.6)	16 ± 0.4

*Data were from four trials

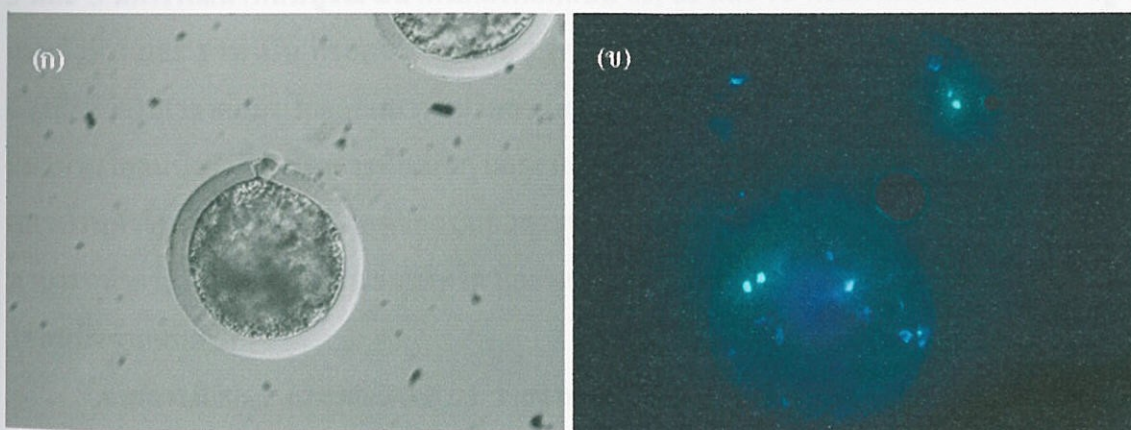
**DCf + DCo = Domestic cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte, MCf + DCo = Marbled cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte, Bf + Bo = Bovine fibroblast reconstructed with bovine oocyte, DCf + Bo = Domestic cat fibroblast reconstructed with bovine oocyte, MCf + Bo = Marbled cat fibroblast reconstructed with bovine oocyte.

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

NA is not available.



ภาพที่ 3.1 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และภาพเชื่อมด้วยสารเรืองแสงเพื่อนับจำนวนเซลล์ของตัวอ่อน
แมวบ้าน (ก-ข) และโค (ค-ง) โคลนนิ่ง



ภาพที่ 3.2 Blastocyst-like embryo (ก) และภาพเชื่อมด้วยสารเรืองแสงเพื่อนับจำนวนเซลล์ (ข) ของ
ตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งที่ใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ

3.5 อัตราการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับหลังจากถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลาย หินอ่อนโคลนนิ่ง

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ จำนวน 247 และ 461 ตัวอ่อน ตามลำดับ ให้กับแมวบ้านตัวรับจำนวน 24 ตัว (ตารางที่ 3.4) โดยแมวบ้านตัวรับ 12 ตัวแรกจะถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง (เฉลี่ย 21 ตัวอ่อน/ตัวรับ) และแมวบ้านตัวรับอีก 12 ตัวจะถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่ง (เฉลี่ย 38 ตัวอ่อน/ตัวรับ) พบว่าแมวบ้านตัวรับที่ได้รับการย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง ตั้งท้องจำนวน 2 ตัว (16.7%) แมวบ้านตัวรับตัวแรกได้รับการช่วยคลอดโดยวิธีผ่าตัดที่การตั้งท้อง 64 วัน ได้ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเพศผู้จำนวน 1 ตัวเกิดมา แต่ลูกแมวดังกล่าวเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในท้องของแม่ตัวรับ เนื่องจากมีความผิดปกติ คือมีภาวะผนังน้ำท้องปิดไม่สนิท และพบอวัยวะภายในช่องท้องอยู่ภายนอกร่างกายทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบว่า อวัยวะภายนอกอื่นๆมีการพัฒนาครบสมบูรณ์ ส่วนแมวบ้านตัวรับตัวที่สอง ได้ให้กำเนิดลูกแมวบ้านโคลนนิ่งทั้งหมด 6 ตัว ที่การตั้งท้อง 56 วัน โดยการคลอดตามธรรมชาติ พบว่าลูกแมวบ้านโคลนนิ่งทั้งหมด มีอวัยวะภายนอก และภายในปกติสมบูรณ์ แต่มีการพัฒนาที่ระยะแตกต่างกันไป พบลูกแมวที่มีการพัฒนาครบสมบูรณ์ทั้งสิ้น 3 ตัว และรอดชีวิตหลังคลอดเพียง 2 ตัว โดยลูกแมวตัวที่ 1, 4 และ 6 มีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ โดยมีน้ำหนักแรกคลอดเป็น 30, 10 และ 21 กรัม ตามลำดับ ซึ่งลูกแมวบ้านโคลนนิ่งที่เสียชีวิตนั้นมีอวัยวะภายนอก และภายในปกติสมบูรณ์ (ภาพที่ 3.1ก และข) แต่มีการพัฒนาที่แตกต่างกันไป ส่วนลูกแมวบ้านโคลนนิ่งตัวที่ 2, 3 และ 5 มีการพัฒนาที่สมบูรณ์ มีน้ำหนักแรกเกิดเป็น 60, 60 และ 70 กรัมตามลำดับ โดยมีเพียงลูกแมวตัวที่ 3 และ 5 เท่านั้น ที่รอดชีวิต (ภาพที่ 3.1ค) แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าลูกแมวบ้านโคลนนิ่งทั้ง 2 ตัว เสียชีวิตในเวลาต่อมา โดยลูกแมวบ้านโคลนนิ่งตัวที่ 3 เสียชีวิตหลังจากคลอด 24 ชั่วโมง ส่วนลูกแมวบ้านโคลนนิ่งตัวที่ 5 มีอาการท้องเสียรุนแรง และเสียชีวิตหลังจากคลอด 5 วัน ในทางตรงกันข้ามแมวบ้านตัวรับที่ถูกย้ายฝากด้วยตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งไม่พบการตั้งท้อง จึงทำให้ไม่สามารถทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโต และพฤติกรรมของลูกแมวลายหินอ่อนที่เกิดจากการการโคลนนิ่งข้ามชนิดได้

จากการที่ Shin และคณะ (2002) รายงานความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแมวโคลนนิ่งจากเซลล์ควมูลัส นับเป็นการบุกเบิกให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการศึกษาการทำโคลนนิ่งในแมว เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ การค้า หรือ การอนุรักษ์แมวป่าใกล้สูญพันธุ์ (Gómez และคณะ, 2006) จากผลการศึกษาพบว่า อัตราการตั้งท้องของตัวรับ (16.7%) มีค่าใกล้เคียงกับที่รายงานมาก่อน ถึงแม้ว่าจำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับจะมีจำนวนเฉลี่ยเพียง 21 ตัวอ่อน/ตัวรับ ซึ่งแตกต่างกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า จำนวนตัวอ่อนที่เหมาะสมสำหรับการย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับแล้วจะประสบผลสำเร็จในการตั้งท้องควรมีจำนวนมากกว่า 30 ตัว/

ตัวรับขึ้นไป อีกทั้งระยะเวลาที่แมวบ้านตัวรับตั้งท้อง (56 และ 69 วัน) มีทั้งสั้นกว่าและใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ (มากกว่า 65 วัน) (Shin และคณะ, 2002; Gomez และคณะ, 2004; Yin และคณะ, 2005, 2007) ส่วนน้ำหนักแรกคลอดของลูกแมวบ้านโคลนนิ่งที่เกิดจากการทดลองนี้ (10-70 กรัม) มีค่าต่ำกว่าที่มีรายงานมาก่อน (84-124 กรัม; Gomez และคณะ, 2004; Yin และคณะ, 2007) แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้พบความผิดปกติของลูกสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อาทิ เช่น แท้งคลอดก่อนกำหนด เสียชีวิตในระหว่างตั้งท้อง คลอดแล้วมีพัฒนาการไม่สมบูรณ์ หรือคลอดแล้วเสียชีวิต เป็นต้น (Gomez และคณะ, 2004; Yin และคณะ, 2005) การโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวในปัจจุบันยังมีรายงานความสำเร็จต่ำ เนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งหนึ่งในนั้นที่สำคัญก็คือ การ reprogramming ของเซลล์ร่างกาย เมื่อนำเข้าไปหลอมรวมกับไซโตพลาสซึมของไข่ โดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าหรือสารเคมี เพื่อให้เกิดกระบวนการ dedifferentiation ใหม่ ถึงแม้ว่าองค์ความรู้ในด้านนี้จนถึงปัจจุบันจะยังมีข้อมูลอยู่น้อยและไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นข้อจำกัดของการทำโคลนนิ่งในแมวตระกูลแมว ซึ่งก็สอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ที่พบว่าแมวบ้านตัวรับไม่สามารถตั้งท้อง หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง แต่อย่างไรก็ตาม เป็นที่เชื่อกันว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมว (Yin และคณะ, 2007) จากความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแมวบ้านโคลนนิ่งครั้งนี้ ถือได้เป็นรายงานแรกของประเทศไทย ซึ่งแม้ว่าลูกแมวบ้านโคลนนิ่งที่คลอดจะมีสุขภาพไม่แข็งแรง และเสียชีวิตในเวลาต่อมา แต่ผลจากงานวิจัยนี้ สามารถนำมารวบรวมให้เกิดเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนาและการศึกษาในขั้นต่อไป รวมถึงในอนาคตจะสามารถนำความรู้ที่ได้มาช่วยในการอนุรักษ์สัตว์ป่าหายากตระกูลเดียวกับแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ได้อีกเช่นกัน



ภาพที่ 3.3 ลูกแมวบ้าน โคลนนิ่งที่เกิดจากการย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับ A10 โดย (ก) และ (ข) เป็นลูกแมวบ้าน โคลนนิ่งที่คลอดและเสียชีวิต และ (ค) ลูกแมวบ้าน โคลนนิ่งขณะที่ยังมีชีวิตกับแม่ตัวรับ

ตารางที่ 3.4 การย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งให้กับแมวบ้านตัวรับ

Source of embryos*	Recipient	No. of transferred embryos (cell stage)	Delivery	No. of kittens
DCf+DCo	A1	22 (1-, 2-cell)	NO	-
	A2	15 (4-, 8-cell)	YES	1
	A3	14 (1-, 2-, 8-cell)	NO	-
	A4	17 (1-, 2-, 8-cell)	NO	-
	A5	14 (1-, 2-, 8-cell)	NO	-
	A6	33 (2-, 4-, 8-cell)	NO	-
	A7	22 (1-, 2-, 4-, 8-cell)	NO	-
	A8	20 (1-cell)	NO	-
	A9	19 (1-cell)	NO	-
	A10	20 (1-, 2-, 4-, 8-cell)	YES	6
	A11	28 (1-cell)	NO	-
	A12	23 (1-, 2-, 4-, 8-cell)	NO	-
Mcf+DCo	M1	21 (1-, 2-cell)	NO	-
	M2	37 (1-cell)	NO	-
	M3	36 (1-, 2-cell)	NO	-
	M4	60 (1-cell)	NO	-
	M5	47 (1-, 2-cell)	NO	-
	M6	35 (1-, 2-cell)	NO	-
	M7	35 (1-, 2-, 8-cell)	NO	-
	M8	35 (1-, 2-, 8-cell)	NO	-
	M9	43 (1-, 2-cell)	NO	-
	M10	33 (1-, 2-cell)	NO	-
	M11	39 (1-, 2-cell)	NO	-
	M12	40 (1-, 2-cell)	NO	-

*DCf + DCo = Domestic cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte, Mcf + DCo = Marbled cat fibroblast reconstructed with domestic cat oocyte

3.6 การแสดงออกของยีนที่สะท้อนถึงกระบวนการ reprogramming ของตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (IVF) และตัวอ่อนแมวบ้าน แมวดาว แมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ

จากตารางที่ 3.5 พบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแมวบ้าน แมวดาว และแมวลายหินอ่อน กับไซโตพลาสซึมของไข่แมวบ้านไม่มีความแตกต่างกัน (74.4% 74.9% และ 73.1% ตามลำดับ) อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน IVF มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่เกิดจากการโคลนนิ่ง อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนแมวดาว โคลนนิ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อน IVF แมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน อัตราการเจริญสู่ระยะมอรูลาของตัวอ่อนแมวบ้าน โคลนนิ่ง มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อน IVF แมวดาว และแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง และอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของแมวบ้าน โคลนนิ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อน IVF และแมวดาว โคลนนิ่ง แต่อย่างไรก็ตามตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูลา (ภาพที่ 3.4ข) เมื่อย้ายเซลล์เพื่อนับจำนวนเซลล์ (ภาพที่ 3.4) พบว่า ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของแมวดาวมีจำนวนเซลล์ trophoctoderm (TE) ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ ตัวอ่อน IVF และแมวบ้าน โคลนนิ่ง อีกทั้งจำนวนเซลล์ inner cell mass (ICM) ของตัวอ่อน IVF มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวดาว โคลนนิ่ง

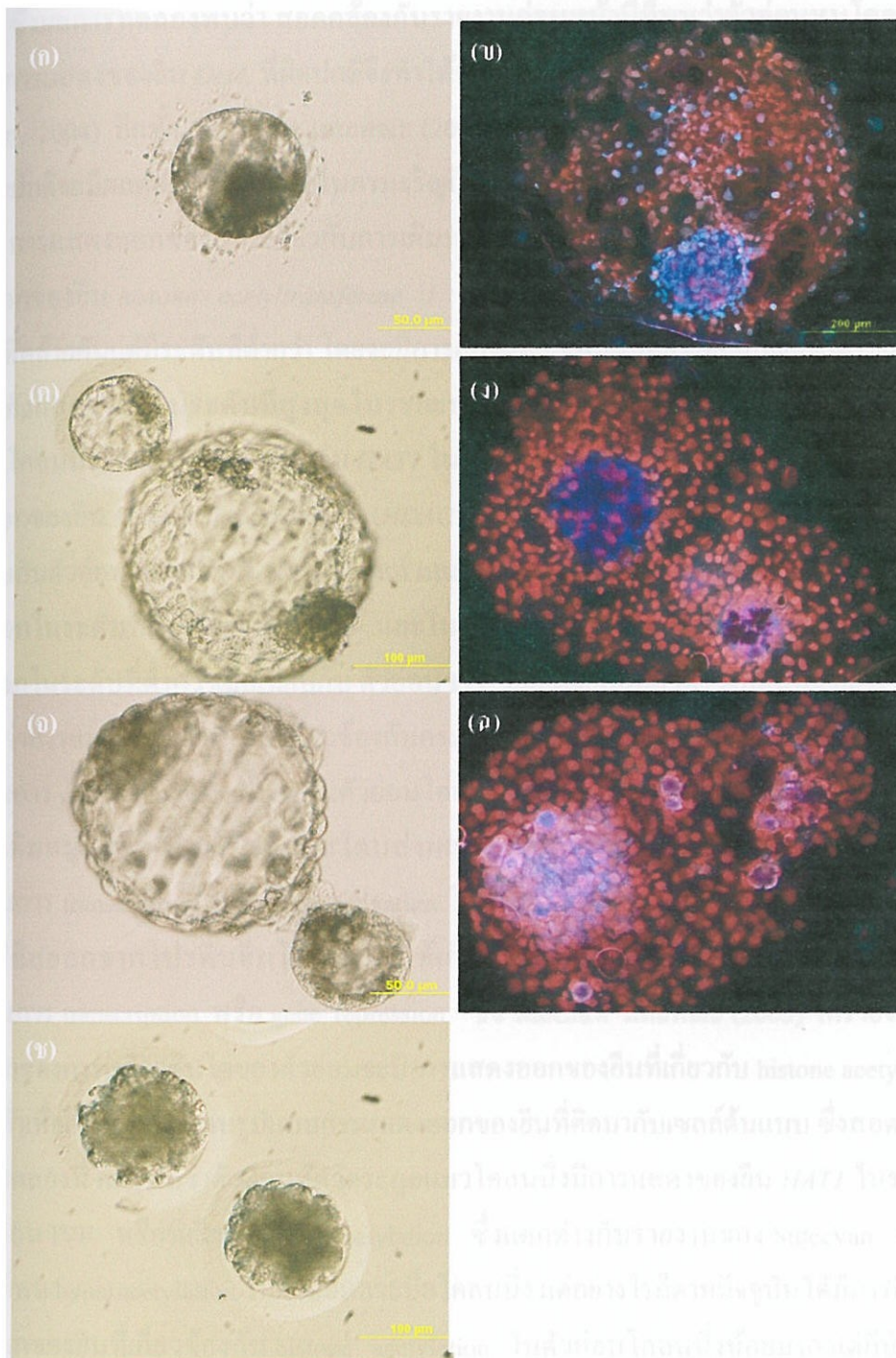
จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง ไม่สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ และหลังจากนำตัวอ่อนดังกล่าวในระยะ 1 เซลล์ จนถึง 8 เซลล์ ย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับก็ไม่พบการตั้งท้องของแมวตัวรับ ซึ่งคณะผู้วิจัยเห็นว่าความไม่สำเร็จดังกล่าวอาจจะเกิดเนื่องจากการบวนการ reprogramming ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของแมวลายหินอ่อนที่ใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่ง โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming และพบว่าการแสดงออกของยีน *Oct4* (ภาพที่ 3.5) ในตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวดาว โคลนนิ่งมีรูปแบบของการแสดงออกคล้ายกับตัวอ่อน IVF โดยจะมีการแสดงออกในระดับที่ต่ำในช่วงแรกของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะ 1 เซลล์ จนถึง 8 เซลล์ และมีการแสดงออกในระดับที่สูงในระยะมอรูลา และบลาสโตซิสต์ ซึ่งแตกต่างกับตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งจะมีการแสดงออกของยีนนี้ในระดับที่ต่ำตั้งแต่ระยะ 1 เซลล์ จนถึงมอรูลา แต่อย่างไรก็ตามตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งไม่สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่ง *Oct4* เป็น transcription factor ที่มีรายงานว่ามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน และเกี่ยวข้องกับสภาวะ pluripotency (Bortvin และคณะ, 2003)

ตารางที่ 3.5 การเจริญเติบโตในหลอดแก้วของสัตว์ตระกูลแมวที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการโคลนนิ่งโดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโทพลาสต์ตัวรับ*

Type of embryos	No. (%) of embryos		No. (%) of embryos developed to***				No. of cell in blastocyst (mean ± S.E.M.)		
	fused	Cleavage**	8-cell	morula	blastocyst	ICM	TE	% ICM	
IVF	N/A	134/193 ^b (69.4)	113/193 ^b (58.5)	53/193 ^b (27.5)	37/193 ^b (19.1)	159.3 ± 12.5 ^a	462.1 ± 25.5 ^a	34.5 ^a	
Cloned domestic cat	122/164 ^a (74.4)	108/122 ^a (88.5)	83/122 ^{ab} (68.0)	68/122 ^a (55.7)	43/122 ^a (35.2)	126.2 ± 6.0 ^b	425.1 ± 14.9 ^a	29.6 ^b	
Cloned leopard cat	146/195 ^a (74.9)	137/146 ^a (93.8)	119/146 ^a (81.5)	44/146 ^b (30.1)	31/146 ^b (21.2)	121.6 ± 7.0 ^b	338.4 ± 26.9 ^b	35.9 ^a	
Cloned marbled cat	117/160 ^a (73.1)	101/117 ^a (86.3)	68/117 ^b (58.1)	28/117 ^b (23.9)	0/117 ^c	N/A	N/A	N/A	

*Data were from four trials and observations of the development at 48 h (cleavage and 8-cell), 120 h (morula) and 192 h (blastocyst) after IVF/activation.

Cleavage rate of IVF embryos was calculated as a proportion of all oocytes co-incubated with sperm, and the cloned embryos were calculated as a proportion of IVF embryos. *Rates of development to the 8-cell, morula and blastocyst of IVF embryos calculated as a proportion of all oocytes co-incubated with sperm, and the cloned embryos calculated as a proportion of fused embryos. Within a column, values with the different superscripts (a, b) are significantly different (P<0.05). N/A is not available.



ภาพที่ 3.4 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และภาพซ้อนด้วยสารเรืองแสงเพื่อนับจำนวน trophoblast และ inner cell mass ของตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (ก-ข) ตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิง (ค-ง) ตัวอ่อนแมวดาวโคลนนิง (จ-ฉ) และตัวอ่อนระยะมอรูลาของตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิง (ช) สีแดงแสดงเซลล์ trophoblast และสีน้ำเงินแสดง inner cell mass

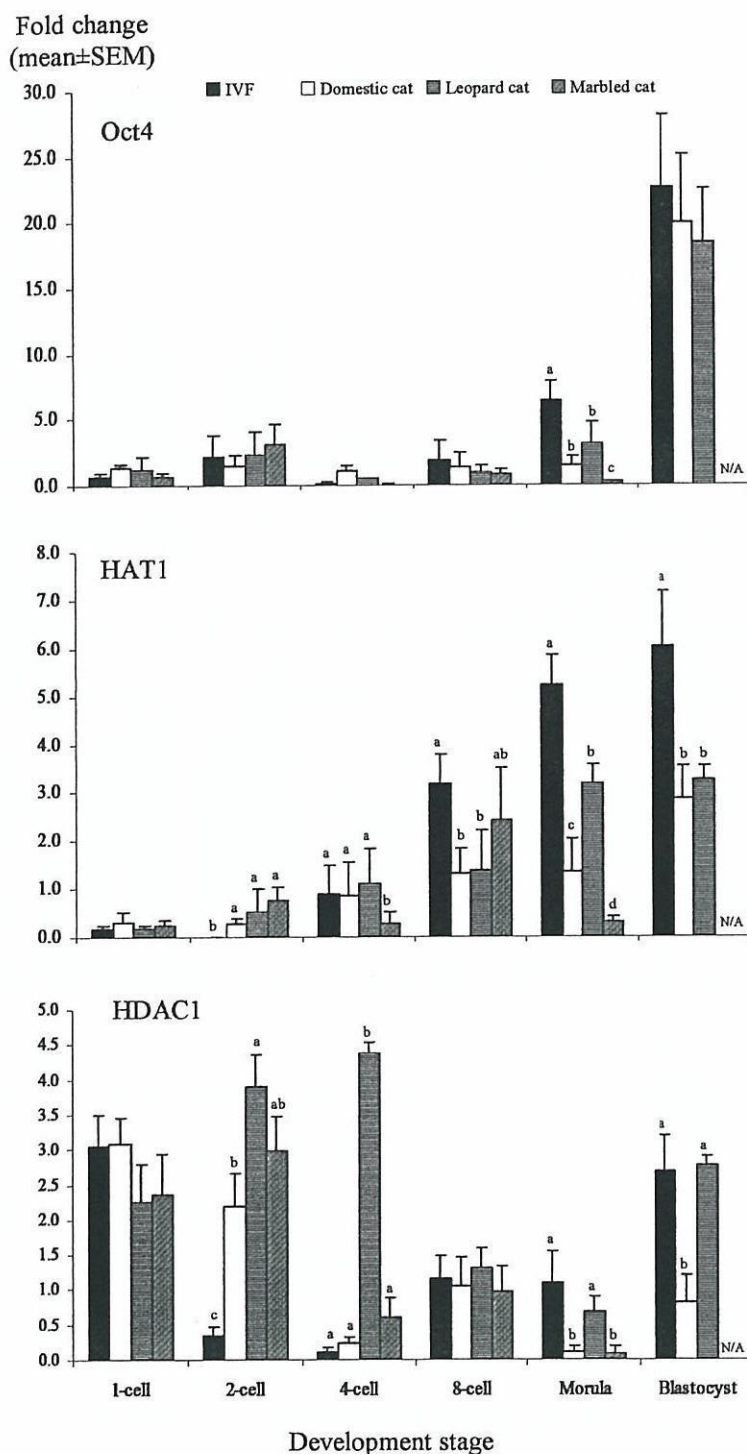
ซึ่งผลการทดลองพบว่า สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าตัวอ่อนหนูโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์มีการแสดงของยีน *Oct4* ที่ผิดปกติจึงทำให้ตัวอ่อนหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะ 8 เซลล์ (Park และคณะ, 2004) อีกทั้ง Mitalipov และคณะ (2003) ยังรายงานว่าตัวอ่อนที่มีการแสดงออกของยีน *Oct4* ผิดปกติจะมีผลต่อความสามารถในการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่ acetyl ให้แก่ histone (ภาพที่ 3.5) พบว่าการแสดงออกของยีน *histone acetyltransferase 1 (HATI)* ในตัวอ่อน IVF และตัวอ่อนโคลนนิ่งมีรูปแบบที่คล้ายกันแต่มีระดับที่ต่ำกว่า โดยจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วัย 2 เซลล์ จนกระทั่งแสดงออกในระดับที่สูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์ ในทางตรงกันข้ามตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งมีการแสดงออกของยีน *HATI* ในระดับที่ต่ำที่สุดในระยะมอรูลา และจากศึกษาการแสดงออกของยีน *histone deacetylase 1 (HDAC1)* พบว่าตัวอ่อน IVF มีการแสดงออกในระดับต่ำเมื่อเทียบกับตัวอ่อนโคลนนิ่ง ในระยะ 2 เซลล์ และ 4 เซลล์ แต่ในระยะมอรูลาตัวอ่อนโคลนนิ่งมีการแสดงออกในระดับที่ต่ำกว่าตัวอ่อน IVF และในระยะบลาสโตซิสต์ตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งมีการแสดงออกในระดับที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ ตัวอ่อน IVF และตัวอ่อนแมวดาวโคลนนิ่ง อย่างไรก็ตามก็ได้มีรายงานว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ histone acetylation มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ chromatin remodeling ในตัวอ่อนโคลนนิ่ง (Kim และคณะ, 2003) โดย *HATI* เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่อะซิติกบนโปรตีนฮิสโตนส่งผลให้เกิดการคลายตัวของสาย DNA ทำให้เกิดกระบวนการ transcription หรือ gene activation ในทางตรงกันข้าม *HDAC1* จะเกี่ยวข้องกับการย้ายหมู่อะซิติกออกจากโปรตีนฮิสโตนส่งผลให้เกิดการรัดตัวของสาย DNA ทำให้ยับยั้งการเกิดกระบวนการ transcription หรือ gene repression ซึ่ง McGraw และคณะ (2003) ได้รายงานว่าช่วงแรกของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ histone acetylation ในระดับที่ต่ำเพื่อเป็นการที่จะลบรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ติดมากับเซลล์ต้นแบบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ และพบว่าตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งมีการแสดงของยีน *HATI* ในระดับที่ต่ำกว่าตัวอ่อน IVF หรือที่เรียกว่า hypoacetylation ซึ่งแตกต่างกับรายงานของ Suteevun และคณะ (2006) ที่พบ hyperacetylation ในตัวอ่อนกระปือโคลนนิ่ง แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ histone acetylation ในตัวอ่อนโคลนนิ่งน้อยมาก แต่ก็มีพบความผิดปกติในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ histone acetylation (Santos และคณะ, 2003; Enright และคณะ, 2005; Suteevun และคณะ, 2006).

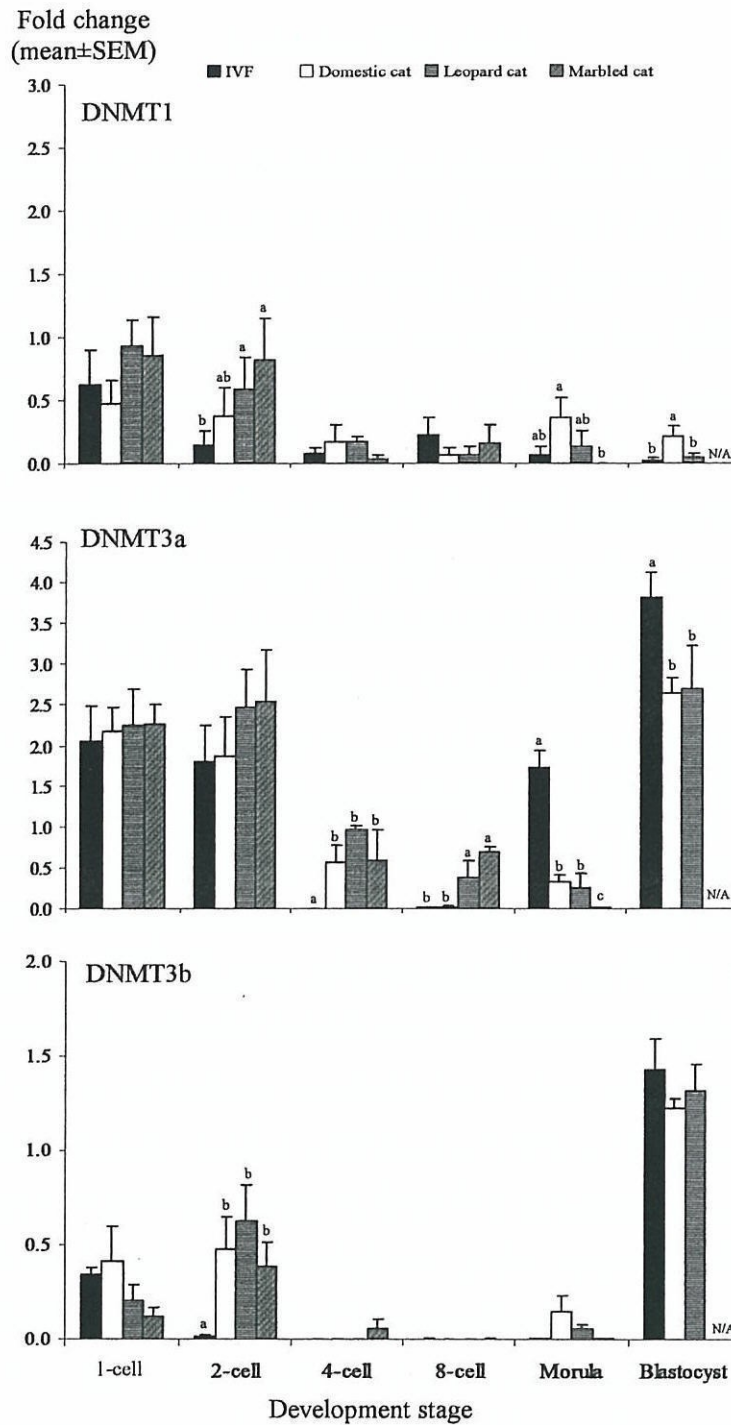
จากนั้นได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation (ภาพที่ 3.6) พบว่าตัวอ่อน IVF มีการแสดงออกของยีน *DNA methyltransferase 1 (DNMT1)* ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วัย 2 เซลล์ จนกระทั่งมีการแสดงออกต่ำที่สุดในระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งต่างจากตัวอ่อนโคลนนิ่งยังคงมีการแสดงออกของ *DNMT1* ในระดับที่สูงในวัย 2 เซลล์ จากนั้นจึง

แสดงออกลดลงจนถึงระยะ 8 เซลล์ และมีการแสดงออกที่สูงกว่าตัวอ่อน IVF ในระยะมอรูลาและ บลาสโตซิสต์ อีกทั้งตัวอ่อนแมวหลายชนิดโคลนนิ่งไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในระยะมอรูลา และ พบว่าการแสดงออกของยีน *DNA methyltransferase 3a (DNMT3a)* ในตัวอ่อน IVF มีการแสดงออก ในระดับที่สูงในระยะ 1 เซลล์ และ 2 เซลล์ จากนั้นไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในระยะ 4 เซลล์ และ 8 เซลล์ และกลับมามีการแสดงออกในระดับที่สูงในระยะมอรูลา และ บลาสโตซิสต์ ต่างจาก ตัวอ่อนโคลนนิ่งซึ่งยังคงมีการแสดงออกที่สูงในระยะ 4 เซลล์ และ 8 เซลล์ และมีการแสดงออกใน ระดับที่ต่ำกว่าตัวอ่อน IVF ในระยะมอรูลา และบลาสโตซิสต์ ส่วนการแสดงออกของยีน *DNA methyltransferase 3b (DNMT3b)* พบว่าตัวอ่อน IVF มีการแสดงออกระดับต่ำที่สุดในระยะ 2 เซลล์ จนกระทั่งไม่พบการแสดงออกในระยะ 4 เซลล์ 8 เซลล์ และมอรูลา จากนั้นพบการแสดงออกที่สูงใน ระยะบลาสโตซิสต์ แต่อย่างไรก็ตามตัวอ่อนโคลนนิ่งมีรูปแบบของการแสดงออกของยีน *DNMT 3b* ต่างไปจากตัวอ่อน IVF โดยยังคงมีการแสดงออกในระดับที่สูงในระยะ 2 เซลล์ และมอรูลา จากนั้น ในระยะบลาสโตซิสต์พบว่าตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวควาโคลนนิ่งมีระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่าง ไปจากตัวอ่อน IVF จากทดลองพบตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งมีการแสดงออกของยีนที่ เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation ที่ผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอ่อนแมวหลายชนิดโคลน นิ่งไม่สามารถพบการแสดงออกของยีน *DNA methyltransferase* ทั้ง 3 ชนิด จึงอาจส่งผลต่อการ เจริญเติบโตของตัวอ่อนดังกล่าว ซึ่งมีรายงานว่าตัวอ่อนที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งจะมีความพยายามที่ จะรักษารูปแบบ DNA methylation ของเซลล์ต้นแบบดังนั้นก็ทำให้เกิดกระบวนการ reprogramming ที่ไม่สมบูรณ์ (Bourc'his และคณะ, 2001; Dean และคณะ, 2001) สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่ พบว่าตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งมีการแสดงออกของยีน *DNA methyltransferase* ที่สูง หรือที่ เรียกว่า hypermethylation เมื่อเทียบกับตัวอ่อน IVF ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับกล่าวว่า ตัวอ่อนที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งจะเกิด hypermethylation (Kang และคณะ, 2001; Dean และคณะ, 2001; Bourc'his และคณะ, 2001)

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน *Oct4* ในตัวอ่อนสัตว์ ตระกูลแมวมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน ที่เกี่ยวกับการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) และการเติมหมู่อะซิติลบนโปรตีน ฮิสโตน (histone acetylation) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจเกิดกระบวนการ nuclear reprogramming ที่ไม่ สมบูรณ์ ของเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่งในสัตว์ตระกูลแมว จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจถึง รูปแบบของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ reprogramming ในสัตว์ตระกูลแมว ซึ่งจะสามารถนำ ความรู้ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุง และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้ สูญพันธุ์



ภาพที่ 3.5 Relative expression ของยีน Oct4 HAT1 และ HDAC1 ระหว่างตัวอ่อน IVF (■) ตัวอ่อนแมวบ้าน (□) ตัวอ่อนแมวคาว (▨) และตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่ง (▩) สัญลักษณ์ตัวอักษรบนแท่งกราฟในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนบ่งบอกถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$). N/A คือ ไม่มีการพัฒนา (ไม่มีข้อมูล)



ภาพที่ 3.6 Relative expression ของยีน DNMT1 DNMT3a และ DNMT3b ระหว่างตัวอ่อน IVF (■) ตัวอ่อนแมวบ้าน (□) ตัวอ่อนแมวดาว (▨) และตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่ง (▩) สัตว์ลักษณะตัวอักษรบนแท่งกราฟในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนบ่งบอกถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$). N/A คือ ไม่มีการพัฒนา (ไม่มีข้อมูล)

บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การโคลนนิ่งแมวบ้านเป็นการศึกษาเพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานไว้สำหรับการประยุกต์ในการอนุรักษ์สัตว์ตระกูลแมวป่าใกล้สูญพันธุ์ โดยงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าน้ำยาที่ใช้ในการเลี้ยงไข่แมวบ้านนอกตู้อบในระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งแมวบ้านมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง และยังพบว่าแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ไม่สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ ถึงแม้ว่าจะมีการเลี้ยงตัวอ่อนดังกล่าวร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่แมวบ้าน เพื่อหวังว่าจะช่วยให้เกิดการหลังสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตในหลอดแก้ว อีกทั้งได้มีการประยุกต์ใช้โคมาไข่เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับในการทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อน เพื่อหวังจะให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาถึงระยะบลาสโตซิสต์ แต่ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งที่ใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ ไม่สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ ส่วนตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับสามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้แต่มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดน้อยมาก จึงเรียกตัวอ่อนชนิดนี้ว่า “Blastocyst like embryo” ทั้งนี้ได้มีการศึกษาอัตราการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้าน และแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่ง พบว่าแมวบ้านตัวรับ 2 ตัวตั้งท้องหลังจากได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง แต่ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งที่คลอดเสียชีวิตในเวลาต่อมา ส่วนแมวบ้านตัวรับที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่ง ไม่พบการตั้งท้อง จากความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแมวบ้านโคลนนิ่งครั้งนี้ ถือได้เป็นรายงานแรกของประเทศไทย ซึ่งแม้ว่าลูกแมวบ้านโคลนนิ่งที่คลอดจะมีสุขภาพไม่แข็งแรง และเสียชีวิตในเวลาต่อมา แต่ผลจากงานวิจัยนี้ สามารถนำมารวบรวมให้เกิดเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญสำหรับใช้ในการพัฒนาและการศึกษาในขั้นต่อไป จากการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ reprogramming ของตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่ง เปรียบเทียบกับตัวอ่อนแมวบ้าน แมวขาวโคลนนิ่งที่ใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ และตัวอ่อนแมวบ้านที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าการที่ตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งมีการแสดงของยีนที่ผิดปกติ จึงอาจจะส่งผลให้ไม่สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ และเมื่อนำไปย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับจึงไม่พบการตั้งท้อง ดังนั้นเพื่อเป็นการต่อยอดงานวิจัยนี้จึงอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอิทธิพลของไข่ที่สุกภายในร่างกายและสุกภายนอกในร่างกายในการใช้เป็นแหล่งไซโตพลาสซึมผู้รับและการนำสารเคมีต่างๆ ที่มีรายงานว่าช่วยให้เกิดกระบวนการ reprogramming สมบูรณ์มาใช้กับตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน เพื่อหวังว่าจะช่วยให้ตัวอ่อนดังกล่าว สามารถเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ และสามารถเกิดการฝังตัวของตัวอ่อนหลังจากนำไปย้ายฝากให้กับแมวบ้านตัวรับ

บรรณานุกรม

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2545. การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไขกระดูกเป็นเซลล์ต้นแบบ. *การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. หน้า 84-88.

จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ วัชรระ วงศ์วิริยะ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังแมวคาบเป็นเซลล์ต้นแบบ. *การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตวแพทย์*. หน้า 351-355.

ชูติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การทดสอบการผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง. *เอกสารประกอบการสัมมนาวิจัยของคณาจารย์ มทส และความร่วมมือด้านงานวิจัยในภาคอุดมศึกษา นครราชสีมา ประจำปี 2546*. หน้า 54-55.

ชูติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ จินิณี โยชิ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก vitrification. *การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว*. หน้า 88-93.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชูติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สุรียา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ. (2547). การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว*. หน้า 94-98.

Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D.L., Yanagimachi, R., Page, D.C. and Jaenisch, R. 2003. Incomplete reactivation of *Oct4*-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130: 1673-1680.

Bavister, B.D. 1992. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Human Reprod.* 10: 1339-1341.

- Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D. Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J. and Viegas-Pequignot, E. 2001. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11: 1542-1546.
- Chen, D.Y., Sun, Q.Y. and Liu, J.L. 1999. The giant panda (*Ailuropoda malanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Sci. Chin. Ser. C.* 42:346.
- Chen, D.Y., Wen, D.C., Zhang, Y.P., Sun, Q.Y., Han, Z.M., Liu, Z.H., Shi, P., Li, J.S., Xiangyu, J.G., Lian, L., Kou, Z.H., Wu, Y.Q., Chen, Y.C., Wang, P.Y. and Zhang, H.M. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol.Reprod.* 67:637-642.
- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E. and Reik, W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13734-13738.
- Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., Mckusick, B. and First, N.L. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* 60: 1496-1502.
- Donnay, I., Van Langendonckt, A., Auquier, P., Grisart, B., Vansteenbrugge, A., Massip, A. and Dessy, F. 1997. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 47: 1549-1561.
- Fugihara, N. and Xi, Y.M. 2000. Possible application of animal reproductive researches to the restoration of endangered and/or extinct wild animals, Review. *Asian-Australasian Anim. Sci.* 7: 1026-1034.
- Enright, B.P., Sung, L.Y., Chang, C.C., Yang, X. and Tian, X.C. 2005. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 72: 944-948.
- Gomez, M.C., Jenkins, J.A., Giraldo, A., Harris, R.F., King, A., Dresser, B.L. and Pope, C.E. 2003. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol. Reprod.* 69: 1032-1041.

- Gomez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, A., Godke, R.A. and Dresser, B.L. 2004. Birth of African wild cat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6: 247-258.
- Gomez, M.C., Pope, C.E. and Dresser, B.L. 2006. Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology* 66: 72-81.
- Hall, V.J., Ruddock, N. and French, A.J. 2005. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro* and nuclear transfer blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 72: 16-24.
- Hwang, W., Kim, K., Kim, G., Jin, Y., Kim, Y., Chung, H., Yoon, T., Han, C., Eo, Y. and Lee, B. 2000. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the reproduction of endangered Korean tiger (*Panthera tigris altaica*). *Theriogenology* 53: 271.
- Joo, B.S., Kim, M.K., Na, Y.J., Moon, H.S., Lee, K.S. and Kim, H.D. 2001. The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil. Steril.* 75: 193-199.
- Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K. and Han, Y.M. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.* 28: 173-177.
- Kim, J.M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M. and Aoki, F. 2003. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J. Cell Biol.* 162: 37-46.
- Kitiyant, Y., Saikhun, J. and Pavasuthipaisit, K. 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. *Theriogenology* 59: 1775-1786.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Daiz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin C.E., Hammer C.J., Weat, M.D. and Damiani, P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79-90.
- Lee, W.K., Han, Y.M., Shin, S.T., Lee, D.H., Yoo, O.J. and Lee, K.K. 1997. *In vitro* development of DNA-injected embryos co-cultured with goat oviduct epithelial cells in Korean native goats (*Capra hircus aegagrus*). *Theriogenology* 47: 1115-1123.
- 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. *Reprod. Fert. Dev.* 16: 149.

- McGraw, S., Robert, C., Massicotte, L. and Sirard, M.A. 2003. Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 68: 383-389.
- Menezes, Y., Guerin, J.F. and Czyba, J.C. 1990. Improvement of human early embryo development *in vitro* by co-culture on monolayers of vero cells. *Biol. Reprod.* 42: 301-306.
- Mitalipov, S.M., Kuo, H.C., Hennebold, J.D. and Wolf, D.P. 2003. *Oct-4* expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol. Reprod.* 69: 1785-1792.
- Mitalipova, M., Dominko, T., Haley, B., Beyman, Z., Memili, E. and First, N. 1998. Bovine oocyte cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species. *Theriogenology* 49: 389.
- Nguyen, B.X., Ty, L.V., Chi, B.L., Duc, N.H. and Uoc, N.Y. 2000. Comparison between the efficiencies as host ooplasm embryo production by adult cell nuclear transfer. *Theriogenology* 53: 235.
- Park, S.H., Shin, M.R. and Kim, N.H. 2004. Bovine oocyte cytoplasm supports nuclear remodeling but not reprogramming of murine fibroblast cells. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 25-34.
- Pegoraro, L.M.C., Thuard, J.M., Delalleau, N., Guefin, B., Deschamps, J.C., Marquant - Le Guienne, B. and Humblot, P. 1998. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or vero cells. *Theriogenology* 49: 1579-1590.
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W. and Dean, W. 2003. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 13: 1116-1121.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
- Skrzyszowska, M., Katska, L., Ryńska, B., Kania, G., Smorag, Z. and Pieńkowski, M. 2002. *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* 58: 1615-1621.
- 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.

- Telford, N.A., Watson, A.J. and Schultz, G.A. 1999. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 90-100.
- Tervit, H. R., Pugh, P.A., McGowan, L.T., Bell, A.C.S. and Wells, R.W. 1994. The freezability of sheep embryos is affected by culture system and source (*in vivo* or *in vitro* derived). *Theriogenology* 41: 315.
- Thongphakdee, A., Numchaisrika, P., Omsongkram, S., Chatdarong, K., Kamolnorrath, S., Dumnuai, S. and Techakumphu, M. 2006. *In vitro* development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.* 41: 219-226.
- Vassena, R., Schremm, R.D. and Latham, K.E. 2005. Species dependant expression patterns of DNA methyltransferase gene in mammalian oocytes and preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 72: 430-436.
- Wen, D.C., Yang, C.X., Cheng, Y., Li, J.S., Liu, Z.H., Sun, Q.Y., Zhang, J.X., Lei, L., Wu, Y.Q., Kou, Z.H. and Chen, D.Y. 2003. Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloned cat (*Felis catus*) embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 38-45.
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N. and Pate, B.J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063.
- Xu, J.S., Cheung, T.M., Chan, S.T., Ho, P.C. and Yeung, W.S. 2001. Temporal effect of human oviductal cell and its derived embryotrophic factors on mouse embryo development. *Biol. Reprod.* 65: 1481-1488.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Lee, Y.H., Seo, Y.I., Jeon, S.J., Choi, E.G., Cho, S.J., Cho, S.G., Min, W., Kang, S.K., Hwang, W.S. and Kong, I.K. 2005. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129: 245-249.
- Yin, X.J., Lee, H.S., Kim, L.H., Shin, H.D., Kim, N.H. and Kong, I.K. 2007. Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology* 67: 816-823.

ภาคผนวก ก

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับชาติ และนานาชาติ

- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2010. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 22: 613-624.
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2008. *Oct4* expression in cloned embryo of endangered feline family. *Proceeding of the 4th symposium on thermotolerance in domestic animals*, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. 344-348.
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2008. Expression of nuclear reprogramming genes in cloned endangered felid embryos. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology*, 14-17 October 2008. Mahasarakhum, Thailand. 292-297.
- Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Laowtammathron, C., Davahudee, R., Ketudat-Cairns, M. and Parnpai, R. 2008. Birth of cloned domestic cat by somatic cell nuclear transfer. *Proceeding of the 46th Kasetsart University Annual Conference*, 29 January-1 February 2008, Bangkok, Thailand. 85-90.
- 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, p. 141.
- 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.

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

Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos

S. Imsoonthornruksa^A, C. Lorthongpanich^A, A. Sangmalee^A, K. Srirattana^A,
C. Laowtammathron^A, W. Tunwattana^B, W. Somsa^C, M. Ketudat-Cairns^A
and R. Parnpai^{A,D}

^AEmbryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology,
Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

^BChiangmai Zoo, Chiangmai 50200, Thailand.

^CNakhon Ratchasima Zoo, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

^DCorresponding author. Email: rangsun@g.sut.ac.th

Abstract. The present study examined transcription levels of the *Oct4*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HAT1* and *HDAC1* genes in cloned felid embryos developing from single one-cell to blastocyst stages. IVF, cloned domestic and leopard cat embryos had low *Oct4* and *HAT1* levels during the early stages, but transcript expression increased at the eight-cell and blastocyst stages. In contrast, expression in the cloned marbled cat embryos was low at all stages. Transcription patterns of *HDAC1* were altered in cloned embryos compared with IVF embryos. Transcription levels of *DNMT1* decreased markedly throughout development of both IVF and cloned embryos. In IVF embryos, *DNMT3a* transcripts rarely appeared in the four- to eight-cell stages, but levels increased in the morula to blastocyst stages. In contrast, in cloned embryos, *DNMT3a* transcript levels were high at the one- to two-cell stages, decreased during subsequent cell division and then increased again at the blastocyst stage. The IVF and cloned embryos showed similar *DNMT3b* transcription patterns, starting with low levels at the two-cell to morula stages and reaching a maximum at the blastocyst stage. These results suggest that the low level of *Oct4* transcripts may be responsible, in part, for the failure of blastocyst production in the cloned marbled cat. However, higher transcription of the DNA methylation genes and lower transcription of the histone acetylation genes were observed in cloned compared with IVF embryos, suggesting that the felids' donor nucleus could not completely reprogramme the nuclear genome and so the re-establishment of embryonic totipotency was not achieved.

Additional keyword: nuclear transfer.

Introduction

The successful birth of Dolly the cloned sheep astonished scientists (Wilmut *et al.* 1997). It demonstrated that nuclear programming is a process that can turn differentiated somatic nuclei back to a totipotent stage. Animal cloning has now been performed in many different animal species. The successful production of a gaur (Lanza *et al.* 2000) and mouflon (Loi *et al.* 2001) demonstrated that interspecies cloning may help in maintaining the genetic diversity of a population. Interspecies cloning involves the transfer of a cell nucleus of one species into an enucleated oocyte of another species. Interspecies cloning could be an alternative method of producing cloned embryos, especially for species in which oocytes are difficult to obtain. Using interspecies cloning has been reported to result in blastocyst formation (Kitiyant *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2003; Lorthongpanich *et al.* 2004; Sansinena *et al.* 2005; Thongphakdee *et al.* 2006; Yin *et al.* 2006) and the production

of offspring (Gómez *et al.* 2004, 2008; Oh *et al.* 2008) and so may be a powerful technique for the preservation of endangered animals.

However, until now the rate of successful production of cloned animals from somatic cells of several mammalian species has been quite low. Less than 1% of embryos develop into live offspring (Han *et al.* 2003). After cloning, donor nuclei require epigenetic reprogramming to a totipotent stage (Humpherys *et al.* 2002) and they must undergo several changes to establish an embryonic gene expression profile for proper development. Abnormal gene expression is frequently observed in cloned embryos, which probably explains the abnormal development and early fetal loss (Daniels *et al.* 2000; Rideout *et al.* 2001; Boiani *et al.* 2002). Nuclear reprogramming is brought about by epigenetic mechanisms (e.g. DNA methylation and histone acetylation) that control gene expression, specifically transcription. Epigenetic mechanisms are not dependent on changes in the

DNA base sequence (Surani 2001). In mammals, DNA methylation involves the addition of a methyl group to the cytosine residues within the cytosine-phosphorous-guanine (CpG) dinucleotide by DNA methyltransferases (DNMTs), which plays a role in controlling the imprinted gene expression and X chromosome silencing (Bestor 2000). Recent findings indicate that aberrant DNA methylation occurs in bovine and sheep cloned embryos (Kang *et al.* 2001; Beaujean *et al.* 2004). Histone modifications also play certain key roles in the regulation of the gene expression through modulation of the chromatin structure by histone acetyltransferases (HATs). This causes the acetylation and neutralisation of the positive charges on the N-terminus of the histones, leading to chromatin decondensation and activation of gene transcription. Conversely, histones can be deacetylated by histone deacetylases (HDACs), which cause chromatin condensation and gene repression (Bird 2002). Hyperacetylation in cloned cattle embryos has been observed (Santos *et al.* 2003; Enright *et al.* 2005). Both *HDAC1* and *HAT1* genes have been detected during the *in vitro* production of bovine embryos at the eight-cell stage, with highest expression seen at the blastocyst stage (McGraw *et al.* 2003). In addition, octamer-binding transcription factor (Oct) 4, a transcription factor essential for preimplantation development, has been reported to play an essential role in the establishment and maintenance of pluripotent cell (Nichols *et al.* 1998). The aberrant expression of *Oct4* in cloned embryos suggests that this crucial development gene is not appropriately reprogrammed in these embryos and that it may serve as a marker of nuclear reprogramming (Mitalipov *et al.* 2003).

In the felid family, 36 of 37 species are classified as threatened or endangered. In Thailand, the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) and marbled cat (*Pardofelis marmorata*) are wildcats that are considered at risk of extinction. How many cats remain in the wild is not known. There have been several reports describing research focused on the interspecies cloning of endangered felids (Gómez *et al.* 2003, 2004, 2008; Lorthongpanich *et al.* 2004; Thongphakdee *et al.* 2006; Yin *et al.* 2006). However, felid cloning is difficult and, so far, low numbers of live cloned offspring have been reported (Shin *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2004, 2008; Yin *et al.* 2005, 2007, 2008a, 2008b). This low efficiency may be directly related to abnormal reprogramming of the donor nuclei after transplantation into enucleated oocytes. The transcription level of genes involved in nuclear reprogramming in felid embryos at different embryonic stages remains unknown. The present study is the first to analyse the transcription of specific genes involved in some of the epigenetic events that take place during nuclear reprogramming in IVF domestic cat (*Felis catus*) embryos and cloned domestic, leopard (*P. bengalensis*) and marbled (*P. marmorata*) cat embryos. The results provide an initial understanding of the molecular mechanisms involved in epigenetic reprogramming events that occur in cloned endangered felid embryos.

To understand the nuclear reprogramming of felid embryos, the transcription patterns of the *Oct4*, *HAT1*, *HDAC1*, *DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b* genes were investigated in IVF and cloned felid embryos that received nuclei from either domestic, leopard or marbled cat fibroblast cells. Transcription levels of each gene at different preimplantation embryonic stages

(one-, two-, four- and eight-cell, morula and blastocyst) were determined.

Materials and methods

All animal experiments were approved by and performed according to the guidelines of the Ethics Committee of the Laboratory Animal Care of Suranaree University of Technology. All chemicals used in the present study were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

Oocyte preparation

Healthy mature female domestic cats ($n=68$) were superstimulated with a single injection of 200 IU, i.m., equine chorionic gonadotropin (eCG; Intervet, Boxmeer, The Netherlands). Cats were ovariectomised 5 days after treatment. To collect cumulus-oocyte complexes (COCs), the ovaries were repeatedly sliced with a 21-gauge needle in modified Dulbecco's phosphate-buffered saline (mDPBS) supplemented with 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP). The COCs collected ($n=1290$) were cultured *in vitro* for further maturation using the method described by Pope (2004). Briefly, after collection the COCs were cultured in IVM medium at 38.0°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for 24 h. The IVM medium consisted of TCM199 supplemented with 0.36 mM sodium pyruvate, 2.2 mM calcium lactate, 2 mM L-glutamine, 1.13 mM cysteine, 0.3% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), 0.5 IU mL⁻¹ eCG and 1 IU mL⁻¹ human chorionic gonadotropin (hCG; Intervet).

Donor cell preparation

Fibroblast cells were generated from the ear skin of a single domestic cat, the abdominal skin of a single leopard cat after anaesthesia and the ear skin of a single marbled cat within 24 h after natural death. The tissues were cut into small pieces, then placed in 60-mm culture dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) and covered with glass coverslips. The tissues were cultured in alpha-modified minimum essential medium (α MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. After 8–10 days of culture, the monolayers with fibroblast-like cell morphology were passaged one to two times to increase cell numbers. The fibroblast cells were frozen at -70°C in α MEM+10% FBS supplemented with 10% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) for 24 h before storage in liquid nitrogen for further use as donor cells.

Passage 3 cells were used for nuclear transfer. Prior to the nuclear transfer, the frozen fibroblasts were thawed and cultured in α MEM+10% FBS at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ for 2–3 days. No serum starvation was performed and, at subconfluence, the fibroblasts were trypsinised to separate them into single cells before use as donor cells.

Nuclear transfer and activation

Cumulus cells were removed from the COCs after 24 h culture by gentle pipetting in 0.2% hyaluronidase. The MII oocytes ($n=630$) were placed into Emlcare holding medium (ICP Bio, Auckland, New Zealand) supplemented with 5 μ g mL⁻¹ cytochalasin B. The zona pellucida above the first polar body

was cut using a sharp cutting micropipette, then the first polar body and metaphase plate were removed together with a small volume of the surrounding cytoplasm. Successful enucleation was confirmed by $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst 33342 staining of the removed cytoplasm observed under ultraviolet light using a fluorescence microscope. A single domestic, leopard or marbled cat fibroblast was inserted into the perivitelline space of the enucleated oocyte. For fusion, the cytoplasm-cell couplets were equilibrated in fusion medium containing 0.3 M mannitol and 0.1 mM magnesium chloride. The resulting couplet was then placed between both tips of the fusion electrode. Cell fusion was induced with double direct current (DC) pulses of 30 V for 30 μs delivered by an electrofusion machine (Voltrain EP-1; Cryologic, Mulgrave, Vic., Australia). After 45 min, the fused oocytes were evaluated visually by confirming the presence (non-fused) or absence (fused) of the donor cell in the perivitelline space. The fused oocytes were activated with 7% ethanol for 5 min, followed by incubation in Emcare holding medium supplemented with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cycloheximide and $1.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ cytochalasin D at 38°C in an atmosphere of 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 for 5 h.

In vitro fertilisation

Testes were collected from adult male cats following castration and were kept in mDPBS and maintained at room temperature before collection of the spermatozoa. The epididymides were removed from the testes and repeatedly sliced with a 21-gauge needle to release the spermatozoa into a 90-mm Petri dish containing mDPBS. The released spermatozoa were centrifuged at 600g for 7 min. After removal of the supernatant, sperm preparation was performed as described previously (Pope 2004). Briefly, the sperm pellet was overlaid with 1 mL Tyrode's medium containing 0.6 mg mL^{-1} BSA and supplemented with 15 mM NaHCO_3 , 0.36 mM sodium pyruvate, 2.2 mM calcium lactate and 2 mM L-glutamine (IVF medium). The spermatozoa were allowed to swim up for 30 min at 38°C in an atmosphere of 5% CO_2 . The swim-up layer was carefully recovered and small aliquots were used to determine sperm concentration and percentage motility. For IVF, COCs (24 h after IVM) were co-incubated at 38°C in an atmosphere of 5% CO_2 with 4×10^5 motile spermatozoa mL^{-1} in 50- μL droplets of IVF medium.

In vitro embryo culture

The reconstructed embryos and 20 h post-insemination oocytes were cultured as described previously (Pope 2004). Briefly, embryos were cultured in Tyrode's medium supplemented with 1% MEM non-essential amino acids, 0.3 mg mL^{-1} BSA, 0.36 mM sodium pyruvate, 2.2 mM calcium lactate and 2 mM L-glutamine (Ty I-medium) at 38°C in 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 for 2 days. Eight-cell stage embryos were then selected and cultured in Ty I-medium without BSA supplemented with 2% MEM essential amino acids and 10% FBS (Ty II-medium) at 38°C in an atmosphere of 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 for 6 days. Half the medium was changed and embryo development was assessed daily. For quantification of gene transcripts, different types of embryos at various developmental stages were

washed three times in RNase-free water and collected individually into a 2- μL drop of RNase-free water, followed immediately by mRNA extraction.

Embryo staining and cell count

The zonae pellucidae of Day 8 blastocyst stage embryos were removed by exposure to 0.5% protease for 3–5 min, followed by washing in mDPBS+PVP. The zona-free embryos were incubated for 45 min in 100 μL of a 1:2 dilution of rabbit anti-domestic cat fibroblast cell antibodies generated in our laboratory using a protocol described previously (Iwasaki *et al.* 1990). Excess antibodies were washed out several times with mDPBS+PVP before embryos were incubated for 45 min in 100 μL of a 1:10 dilution of guinea-pig complement containing $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ propidium iodide (PI) and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Hoechst 33258. Embryos were mounted on glass slides and covered with glycerol. The mounted embryos were then examined under a fluorescence microscope to determine the number of trophectoderm (TE) cells (coloured red by the PI) and inner cell mass (ICM) cells (coloured blue by the Hoechst 33258).

Messenger RNA extraction and cDNA synthesis

The mRNA was extracted from individual cloned and IVF embryos at the one-cell (12 h), two-cell (24 h), four-cell (36 h), eight-cell (48 h), morula (120 h) and blastocyst (192 h) stages and from domestic cat oocytes at the MII phase (24 h after IVM). Oligo(dT)₂₅ nucleotides attached to magnetic beads (Dynabeads mRNA purification kit; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) were used to isolate the polyA RNA according to the manufacturer's instructions. Briefly, an embryo was resuspended in 100 μL lysis/binding buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% lithium dodecyl sulphate (LiDS) and 5 mM dithiothreitol (DTT)) and vortexed at room temperature for 5 min. Prewashed Dynabeads oligo(dT)₂₅ (20 μL) were then mixed with the lysate and annealed by rotating for 5 min at room temperature. The Dynal MPC magnetic particle concentrator was used to remove the supernatant. The hybridised mRNA and oligo(dT)₂₅ magnetic beads were washed twice with 100 μL washing buffer A (10 mM Tris-HCl, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA and 1% LiDS) and twice with 100 μL washing buffer B (10 mM Tris-HCl, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA). To denature and remove the secondary structures, the mRNA bound to magnetic beads was resuspended with 10 μL RNase-free water and heated at 65°C for 5 min, then quenched rapidly on ice for 3 min. First-strand cDNA synthesis was performed at 55°C for 1 h in a final volume of 20 μL consisting of 1 \times first-stand buffer, 5 mM DTT, 0.5 mM of each dNTP, 40 U RNasin ribonuclease inhibitor (Invitrogen) and 200 U Superscript III RNase H-RT (Invitrogen). The reactions were terminated by incubation at 70°C for 15 min. The final volume was increased to 30 μL with water and all cDNA samples were stored at -20°C until further use.

Real-time polymerase chain reaction quantification

Four replicates of cDNA obtained from single MII oocytes and from embryos at each stage of preimplantation development (IVF and cloned) were quantified by real-time polymerase chain reaction (PCR). The primers for the β -actin and Oct4

Table 1. Primer sequences for real-time polymerase chain reaction

Gene	Accession no.	Primer sequences (5'-3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>Oct4</i>	DQ486513	Forward: ATCCTGGGGGTTCTATTGG Reverse: CTGGTTCGCTTTCTCTTTTCG	200	56	Present study
<i>DNMT1</i>	AY173048	Forward: GAGGGCTACCTGGCTAAAGTC Reverse: CATTCGCTTCCCGACTGAAA	88	60	Suteevun <i>et al.</i> (2006)
<i>DNMT3a</i>	AY271299	Forward: CGAGGTGTGTGAGGACTCCAT Reverse: ACGTCCCCGACGTACATGA	93	62	Suteevun <i>et al.</i> (2006)
<i>DNMT3b</i>	AY244713	Forward: AGCATGAGGGCAACATCAAAT Reverse: CACCAATCACCAAGTCAAATG	98	62	Suteevun <i>et al.</i> (2006)
<i>HAT1</i>	BT021536	Forward: CTTTCAGACCTTTTTGATGTGGTTTATT Reverse: GCGTAGCTCCATCCTTATTATACTTCTC	112	58	Suteevun <i>et al.</i> (2006)
<i>HDAC1</i>	AY504948	Forward: GCACTGGGCTGGAACATCTC Reverse: GGGATTGACGACGAGTCCTATG	98	58	Suteevun <i>et al.</i> (2006)
<i>β-Actin</i>	NM_001101	Forward: GGAATTCGAGCAAGAGATGG Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234	60	Present study

genes were designed from conserved sequences of human genes obtained from GenBank. The primer sequences for *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HAT1* and *HDAC1* were as described previously (Suteevun *et al.* 2006). All primer sequences are listed in Table 1. Real-time PCR was performed using a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada) with SYBR green incorporation. The reaction was performed in capillaries in a final volume of 20 μ L. Each capillary contained 3 μ L cDNA from either a single oocyte or a cloned or IVF embryo from each stage of preimplantation development. The reaction mixture consisted of 5 μ M of each of the sequence-specific primers, 1.25 mM MgCl₂ and 2 μ L SYBR green mix containing dNTPs (FastStart DNA master SYBR green I; LightCycler). The reaction conditions were template denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C denaturation for 10 s, annealing (temperatures given in Table 1) for 10 s and extension at 72°C for 15 s. At the end of the PCR, a melting curve analysis was performed for each sample to verify that only a single specific product was generated. The melting cycle consisted of 95°C for 3 s, 65°C for 5 s and a step cycle starting at 65°C and increasing to 95°C in increments of 0.2°C.

To compare the relative level of gene expression in the cloned and IVF embryos, real-time data were analysed using the comparative cycle threshold (C_T) method ($\Delta\Delta C_T$; Livak and Schmittgen 2001). This method calculates the quantity of the starting material (DNA or cDNA) and the fold change relative to a calibrator sample, with the change given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ target : sample}} - C_{T \text{ reference : sample}}) - (C_{T \text{ target : calibrator}} - C_{T \text{ reference : calibrator}})$$

The C_T represents the PCR cycle at which an increase in the fluorescence signal above baseline is detected. In our experiments, there were six genes of interest (*Oct4*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HAT1* and *HDAC1*), with β -actin was used as the reference gene. The 'sample' consisted of cDNA derived from cloned or IVF embryos, whereas the 'calibrator' consists of cDNA derived from MII oocytes. Values of $1/C_T$ were used

to examine the temporal pattern of gene expression throughout preimplantation development.

Statistical analysis

Rates of fusion, embryo cleavage and development, as well as cell number, for the different embryo types were analysed by ANOVA using SAS version 9.0 (SAS Inc., Cary, NC, USA). To evaluate the significance of differences in the relative transcription levels of each gene, two-way ANOVA was used with embryo type and development stage as the main effects and embryos type \times development stage as the interaction term. Relative transcription levels in the cloned and IVF embryos were $\log_{10}(X + 1)$ transformed and the least squares method in the generalised linear model (GLM) was used for multiple comparisons within developmental stages between each embryo type. Relative quantification of target gene expression levels is presented as the fold difference. Data are presented as the mean \pm s.e.m., with $P < 0.05$ considered significant.

Results

Development of reconstructed embryos

The development rates of IVF and cloned felid embryos are given in Table 2. There were no significant differences ($P > 0.05$) in the fusion rate of domestic, leopard and marbled cat fibroblasts with enucleated domestic cat oocytes. The cleavage rate of IVF embryos was significantly lower ($P < 0.05$) than that of cloned embryos. Development to the eight-cell stage of cloned leopard cat embryos was significantly higher ($P < 0.05$) than that of the IVF and cloned marbled cat embryos, but there were no significant differences ($P > 0.05$) compared with cloned domestic cat embryos. Development to the morula stage of cloned domestic cat embryos was significantly higher ($P < 0.05$) than that of IVF, cloned leopard and marbled cat embryos. The percentage of cloned domestic embryos that developed to the blastocyst stage was significantly higher in cloned domestic cat embryos ($P < 0.05$) than that of IVF and cloned leopard cat embryos.

Table 2. Preimplantation development of IVF and cloned felid species embryos after reconstruction with domestic cat cytoplasts

Data were obtained from four trials and observations of the development at 48 h (cleavage and eight-cell), 120 h (morula) and 192 h (blastocyst) after IVF or activation. The cleavage rate of IVF embryos was calculated as a proportion of all oocytes coincubated with spermatozoa, whereas that of cloned embryos was calculated as a proportion of fused embryos. The rates of development to the eight-cell, morula and blastocyst stages of IVF embryos were calculated as a proportion of all oocytes coincubated with spermatozoa, whereas that of cloned embryos was calculated as a proportion of fused embryos. Where appropriate, data are given as the mean \pm s.e.m. Within a column, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$). N/A, not available; ICM, inner cell mass; TE, trophoctoderm

Type of embryo	No. (%) oocytes or embryos			No. (%) embryos developing to:			No. cells in the blastocyst ($n = 10$)		
	Total	Fused	Cleaved	Eight-cell stage	Morula	Blastocyst	ICM	TE	% ICM
IVF	193	N/A	134 (69.4) ^b	113 (58.5) ^b	53 (27.5) ^b	37 (19.1) ^b	159.3 \pm 12.5 ^a	462.1 \pm 25.5 ^a	34.5 ^a
Cloned domestic cat	164	122 (74.4)	108 (88.5) ^a	83 (68.0) ^{ab}	68 (55.7) ^a	43 (35.2) ^a	126.2 \pm 6.0 ^b	425.1 \pm 14.9 ^a	24.0 ^b
Cloned leopard cat	195	146 (74.9)	137 (93.8) ^a	119 (81.5) ^a	44 (30.1) ^b	31 (21.2) ^b	121.6 \pm 7.0 ^b	338.4 \pm 26.9 ^b	35.9 ^a
Cloned marbled cat	160	117 (73.1)	101 (86.3) ^a	68 (58.1) ^b	28 (23.9) ^b	0 ^c	N/A	N/A	N/A

However, no blastocyst formation was observed in cloned marbled cat embryos. All cloned marbled cat embryos were arrested at the morula stage. The number of TE cells in cloned leopard cat blastocysts was significantly lower ($P < 0.05$) than that in IVF and cloned domestic cat embryos. The number of ICM cells in IVF blastocysts was significantly higher ($P < 0.05$) than that in cloned domestic and leopard cat blastocysts and the percentage of ICM cells in cloned domestic cat blastocysts was significantly lower ($P < 0.05$) than that in IVF and clone leopard cat blastocysts (Fig. 1).

Transcription nuclear reprogramming genes in preimplantation felid embryos

The relative transcription level of the pluripotent gene *Oct4* exhibited a similar pattern in both IVF and cloned embryos. Low levels (0.2–1.9-fold; $P > 0.05$) of this gene were observed at the one- to eight-cell stages in IVF, cloned domestic and leopard cat embryos, with transcription increasing from the morula stage ($P > 0.05$) and being highest at the blastocyst stage (18.4–22.6-fold; $P < 0.05$). In cloned marbled cat embryos, *Oct4* transcription levels were low ($P > 0.05$) throughout preimplantation development. Cloned marbled cat embryos did not develop to the blastocyst stage; thus, the level of *Oct4* transcription was not determined at that stage (Fig. 2).

Transcription levels of the histone modification genes *HAT1* and *HDAC1* are shown in Fig. 2. Transcription of the *HAT1* gene was low at the one-cell stage of IVF and cloned felid embryos (0.2–0.3-fold; $P > 0.05$) and remained low (0–1.1-fold; $P > 0.05$) until the eight-cell stage (0.4–1.9-fold; $P > 0.05$). However, in IVF embryos, increase were observed in *HAT1* transcription from the eight-cell stage, reaching maximum levels at the blastocyst stage (6.0-fold; $P > 0.05$). In contrast, in eight-cell embryos of the cloned marbled cat, high transcription levels of *HAT1* were observed (2.5-fold; $P > 0.05$) that decreased at the morula stage (0.3-fold; $P > 0.05$). Cloned domestic and leopard cat embryos had lower *HAT1* transcription ($P > 0.05$) at the eight-cell to blastocyst stages compared with levels in IVF embryos. There were no significant differences in transcription levels of *HDAC1* at the one-cell stage between IVF and cloned felid embryos ($P > 0.05$). At the two-cell stage, IVF embryos

exhibited significantly lower transcription of *HDAC1* (0.3-fold) compared with cloned felid embryos (2.2–3.9-fold; $P < 0.05$). Thereafter, highest transcription levels were observed at the four-cell stage of cloned leopard cat embryos (4.4-fold; $P < 0.05$) compared with levels in IVF, cloned domestic and marbled cat embryos (0.1-, 0.2- and 0.6-fold, respectively). Transcription levels of *HDAC1* were similar between the IVF and cloned felid embryos at the eight-cell stage. At the morula stage, cloned domestic and marbled cat embryos showed significantly lower transcription of *HDAC1* ($P < 0.05$) than did IVF and cloned leopard cat embryos. In addition, *HDAC1* transcription levels in IVF and cloned leopard cat blastocysts were significantly higher (2.7- and 2.8-fold, respectively; $P < 0.05$) than those in cloned domestic cat blastocysts (0.8-fold).

Figure 3 shows the relative transcription level of the maintenance DNA methylation gene *DNMT1*, which was similar at the one-cell stage in IVF and cloned felid embryos. After the first cleavage, IVF embryos tended to have lower transcription of *DNMT1* (0.4-fold) than cloned felid embryos (0.4–0.8-fold; $P > 0.05$). *DNMT1* transcription seemed to decrease after the two-cell stage in all four embryo types, especially at the morula stage in cloned marbled cat, in which almost no transcription of *DNMT1* was detected. The morulae and blastocysts of the cloned domestic cat tended to have higher *DNMT1* transcription than IVF and cloned leopard cat embryos ($P > 0.05$). In contrast, the transcription of the *de novo* DNA methylation genes *DNMT3a* and *DNMT3b* was relatively higher (Fig. 3). There was no significant difference in the transcription of *DNMT3a* at the one- and two-cell stages between the IVF and cloned felid embryos ($P > 0.05$). No *DNMT3a* transcripts were detected in IVF embryos at the four-cell stage. In addition, at eight-cell stage of both IVF and cloned domestic cat embryos, significantly lower transcription of *DNMT3a* was evident (0.01- and 0.02-fold, respectively; $P < 0.05$) compared with that in cloned leopard and marbled cat embryos (0.4- and 0.7-fold, respectively). At the morula stage, cloned marbled cat embryos had significantly lower transcript levels of *DNMT3a* (0.01-fold) compared with cloned domestic and leopard cats (0.3-fold; $P < 0.05$), *DNMT3a* transcription was highest in IVF embryos (3.8-fold; $P < 0.05$) compared that in other cloned felid embryos. Similarly, transcription of *DNMT3a* in IVF blastocysts tended to be higher

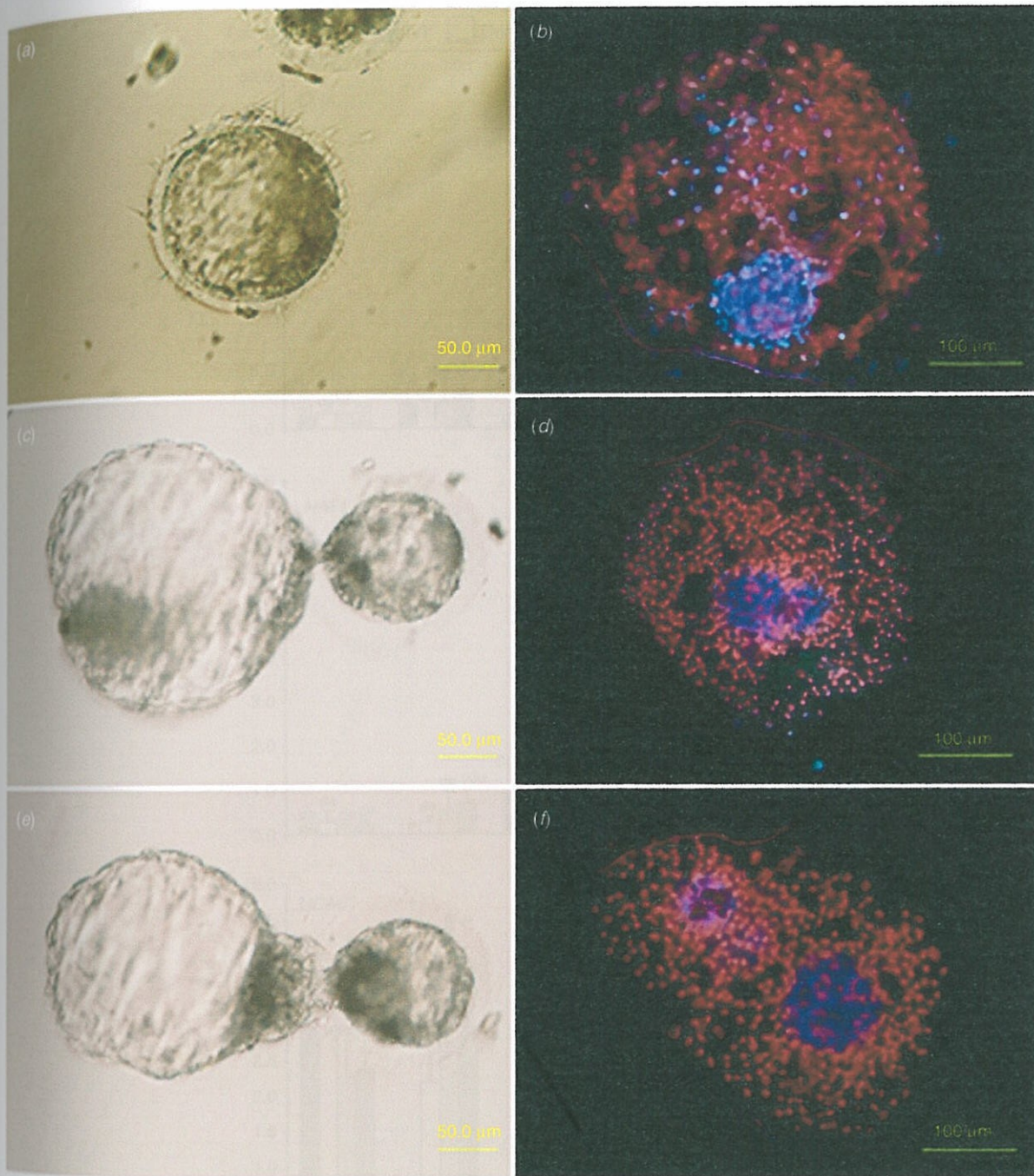


Fig. 1. (a, c, e) Morphology and (b, d, f) differential staining of blastocysts derived from IVF (a, b), cloned domestic cat (c, d) and cloned leopard cat (e, f) on Day 8 of *in vitro* culture. Blue and red indicate inner cell mass and trophectoderm cells, respectively.

than that in cloned domestic and leopard cats (Fig. 3; $P > 0.05$). Transcription of *DNMT3b* at the one-cell stage of IVF and cloned felid embryos did not differ significantly ($P > 0.05$). After the first cleavage, IVF embryos exhibited significantly

lower transcription levels of *DNMT3b* (0.01-fold) than cloned felid embryos (0.4–0.6-fold; $P < 0.05$). In IVF embryos, transcription of *DNMT3b* was not detected at the four-cell to morula stages. However, *DNMT3b* transcripts were detected at the

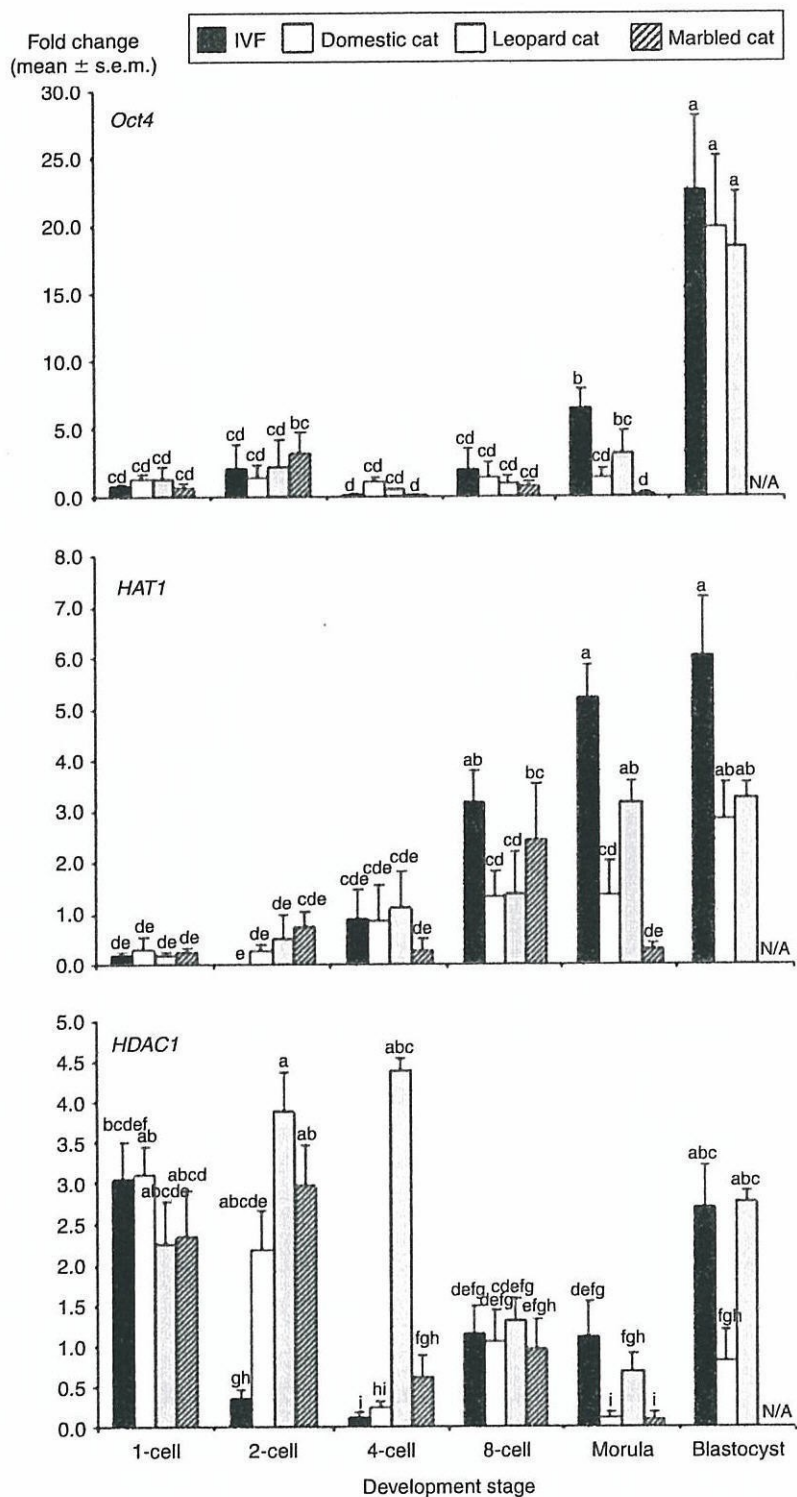


Fig. 2. Comparison of the relative expression of pluripotent and histone acetylation genes between IVF (black bars), cloned domestic cat (white bars), cloned leopard cat (grey bars) and cloned marbled cat (hatched bars) embryos at different stages of development ($n = 4$). The fold change indicates the difference between the embryos and the calibrator, where gene transcription levels of mature oocytes were used as the calibrator. Bars with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). N/A, not available.

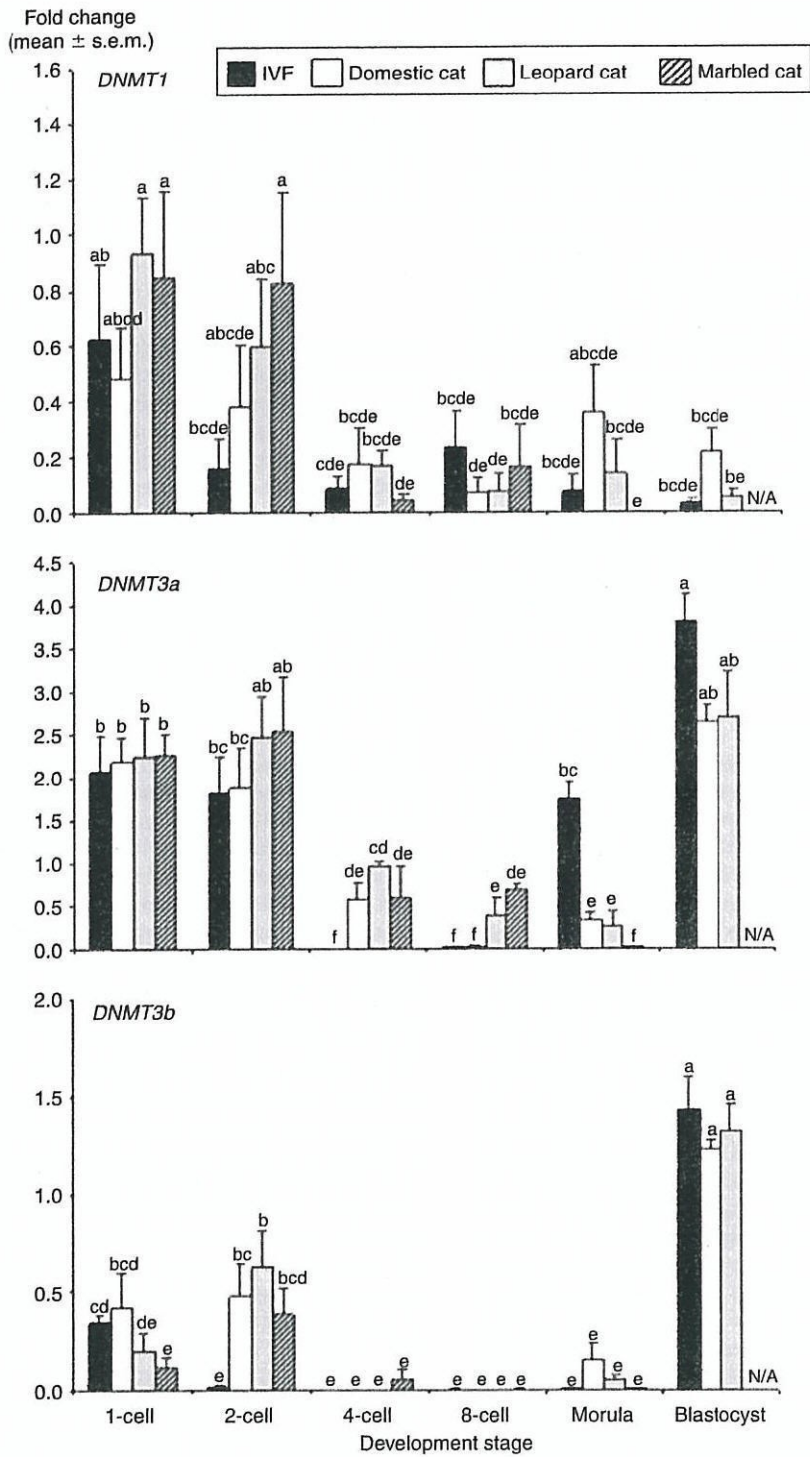


Fig. 3. Comparison of the relative expression levels of DNA methyltransferase genes between IVF (black bars), cloned domestic cat (white bars), cloned leopard cat (grey bars) and cloned marbled cat (hatched bars) embryos at different stages of development ($n=4$). The fold change indicates the difference between the embryos and the calibrator, where gene transcription levels of mature oocytes were used as the calibrator. Bars with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). N/A, not available.

four-cell stage of cloned marbled cats (0.04-fold; $P > 0.05$). At the four- to eight-cell stages of cloned domestic and leopard cat embryos, no *DNMT3b* was detected. In contrast, the morula stage of cloned domestic and leopard cat embryos showed low transcription levels of *DNMT3b*, but this did not reach statistical significance compared with IVF and cloned marbled cat embryos in which the transcript was not detected. However, a high level of the *DNMT3b* transcript was found in blastocysts of IVF and cloned domestic and leopard cats.

Discussion

The results of the present study show that the development rate and cell number of cloned felid embryos generated from domestic, leopard and marbled cat somatic cells reconstructed with domestic cat cytoplasts are comparable to those of domestic cat embryos derived by IVF. In the present study, the fusion and cleavage rates of cloned felid embryos were similar to those reported in earlier studies (Skrzyszowska *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2003; Kitiyanant *et al.* 2003). However, the development rates of cloned domestic cats and leopard cat embryos and the cell number of felid embryos in the present study were higher than those reported previously (Skrzyszowska *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2003; Kitiyanant *et al.* 2003; Yin *et al.* 2005, 2006). The possible reasons for the higher embryo development rate and cell number may be include differences in the type of donor cells used, the nuclear transfer procedures, modifications to the Tyrode's medium and the *in vitro* culture system used. However, no blastocyst formation was observed in cloned marbled cat. All cloned marbled cat embryos were arrested at the morula stage, which is similar to the situation reported in earlier studies (Thongphakdee *et al.* 2006). Comparisons of the *in vitro* development between IVF and cloned felid embryos have not been reported previously. However, the mean proportion of IVF embryo development to the blastocyst stage in the present study was lower than that reported by Gómez *et al.* (2003). Although it is difficult to compare different studies, the difference in the frequency of development to the blastocyst stage may be attributed to the different genetic backgrounds of the donor cats (spermatozoa and oocytes). In the present study, the *in vitro* development of cloned felid embryos was compared with that of IVF-derived domestic cats, used as a control to enable comparisons of development rate and cell number, indicating successful reprogramming in cloned embryos. The results demonstrate that development to the blastocyst stage was similar for IVF and leopard cat cloned embryos, but was lower for IVF compared with domestic cat cloned embryos. The number of ICM cells was higher in domestic cat IVF embryos than in cloned felid embryos, whereas the number of TE cells in IVF embryos was similar to that in domestic cat cloned embryos, but higher than in leopard cat cloned embryos. This may indicate the successful reprogramming of the differentiated nuclei of somatic cell and that domestic cat oocytes could support early development and thus be used as recipient cytoplasts in which to produce interspecies cloned embryos for the conservation of endangered felid species. However, cloned marbled cat embryos did not develop to the blastocyst stage and a possible explanation for this failure may be the poor development competence

of these embryos caused by incomplete reprogramming of the donor nuclei.

Thus, analysing gene expression during cloned felids embryogenesis is a valuable tool with which to investigate the interaction between donor nuclei and the recipient cytoplasm, as well as the molecular mechanisms underlying nuclear reprogramming. This is the first study to investigate the transcription levels of specific genes involved in nuclear reprogramming in felid embryos.

Quantitative analysis of gene expression often uses housekeeping genes as an endogenous control against which the transcription level of target genes can be normalised. In the present study, we used β -actin as a reference gene, as in earlier reports (Steuerwald *et al.* 2000; Li *et al.* 2005; Boonkusol *et al.* 2006). Transcription β -actin was shown to be constant during all development stages in felid embryos (data not shown); as the number of cells from the oocyte to blastocyst stage increased by 300–500 cells, the transcription level of β -actin did not increase proportionally. This is true even after the timing of the maternal–zygotic transition (MZT). Once the embryonic genome is activated, the transcript level would reflect the number of cells, whereas before the MZT, the maternal RNA pools are the only source of transcripts. Thus, levels of the housekeeping mRNA should be higher in the oocyte and then gradually decline as embryonic development progresses towards the MZT (McGraw *et al.* 2003).

The *Oct4* gene has been suggested to play an important role in controlling the development of pluripotency events during embryogenesis (Bortvin *et al.* 2003). Our results indicate that *Oct4* transcription levels were low from the one-cell stage, but higher at the morula and blastocyst stages in IVF and cloned domestic and leopard cats. However, *Oct4* transcription levels in cloned marbled cat embryos were low at the one-cell to morula stages and these cloned embryos did not develop to the blastocyst stage. This observation is consistent with the report of Kurosaka *et al.* (2004), who found that, during embryogenesis development, levels of the *Oct4* transcript in bovine and mouse embryos were low at early development stages, followed by increases in transcription at the morula and blastocyst stages. However, a lack of *Oct4* transcription found after interspecies cloning of mice led to a failure of further development (Park *et al.* 2004). In the present study, cloned felid embryos showed low transcription levels of *Oct4* mRNA compared with IVF-derived embryos at every stage of development. Abnormalities in the expression of *Oct4* and *Oct4*-related genes have been observed in cloned mouse embryos (Humpherys *et al.* 2002; Bortvin *et al.* 2003). In addition, Gómez *et al.* (2008) found that cloned sand cat embryos were aborted and this may be associated with abnormal *Oct4* expression. However, previous studies have suggested that a lack of *Oct4* expression influences low blastocyst development in cloned embryos: it was suggested that the aberrant pluripotency marker gene was not appropriately reprogrammed (Mitalipov *et al.* 2003; Lorthongpanich *et al.* 2008). Thus, *Oct4* expression may serve as a marker of nuclear reprogramming (Mitalipov *et al.* 2003; Lorthongpanich *et al.* 2008).

DNA methylation represents a major epigenetic modification of the genome. In the present study, the transcription of DNMTs was analysed and aberrant expression was found. In the

cloned marbled cat embryo, no DNMTs transcriptional activity was detected at the morula stage, which may have contributed to the development failure. At the morula and blastocyst stages of the cloned domestic and leopard cat embryos, higher transcription of *DNMT1* was observed. These embryos showed a lower transcription of *de novo* DNMT genes compared with IVF embryos. In the bovine, somatic nuclei are resistant to the erasure of DNA methylation in early embryogenesis and cloned bovine embryos have a tendency to preserve the DNA methylation patterns inherited from donor cells (Bourc'his *et al.* 2001; Dean *et al.* 2001). Re-establishment of DNA methylation was also potentially deregulated by precocious *de novo* methylation in cloned embryos (Dean *et al.* 2001). Because the donor nucleus comes from a somatic cell, it is likely that the misexpression is due to improper reprogramming or the improper regulation of the DNMT function, causing abnormal patterns of genomic methylation and the inability of cloned embryos to properly recapitulate embryonic transcription. This abnormal methylation transition in cloned embryos could be due to the specific features of the somatic chromatin structure and/or defective regulation of the DNMTs. Kang *et al.* (2001) also demonstrated that the methylation pattern observed in cloned bovine embryos differs markedly from that exhibited in both *in vitro*- and *in vivo*-produced control embryos. They also found that the DNA methylation level in clones can be higher or lower than in control embryos depending on the donor cell type, targeted DNA sequences, embryonic stages examined and detection methods used. In addition, abnormalities in DNA methylation levels are quite variable among individual clones (Kang *et al.* 2001). It is clear that embryos produced by cloning exhibit a state of hypermethylation, because this phenomenon has been found in both cattle and mice (Bourc'his *et al.* 2001; Dean *et al.* 2001; Kang *et al.* 2001). Many studies have reported that the aberrant levels of DNMTs mRNA in cloned embryos may contribute to the abnormalities seen in embryos and fetal development (Dean *et al.* 2001; Young and Beaujean 2004; Yang *et al.* 2007). In particular, Cho *et al.* (2007) found that hypermethylation in the placenta of a cloned cat may be responsible for the low success rate in cloned felid species.

Changes in histone acetylation are also an important aspect of chromatin remodelling in cloning. The present study is the first investigation of the transcription of *HAT1* and *HDAC1*, which are involved in histone acetylation, in IVF and cloned embryos in felid species. In bovine oocytes, early embryos express several HATs and HDACs, with some variability in transcription levels depending on the development stage (McGraw *et al.* 2003). In mouse oocytes, histone H3 and H4 are globally deacetylated at several lysines at MII of the second meiosis, which was reproduced in somatic nuclei transferred into the same stage of oocyte (Kim *et al.* 2003). This genome-wide decrease in histone acetylation may contribute to the erasure of the previous gene expression patterns specific for the differentiation of the donor cell. In the present study, *HAT1* mRNA transcription was low in cloned felid embryos at the eight-cell to blastocyst stages compared with that in IVF-derived embryos and mRNA levels of *HDAC1* were aberrant at early development stages (i.e. the one- to four-cell stages). The former observation is inconsistent with the findings of Suteevun *et al.* (2006), who measured the transcription of histone

acetylation in cloned buffalo embryos and found that hyperacetylation occurred in these embryos. Previous studies have demonstrated that the HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) can improve the development and global histone acetylation patterns for nuclear reprogramming (Kishigami *et al.* 2006; Rybouchkin *et al.* 2006; Shi *et al.* 2008). Therefore, in-depth investigation of the effect of TSA treatment on the nuclear reprogramming will further clarify our findings in cloned felid species. To date there have been several studies that have focused on the acetylation of histone in cloned embryos that have reported inconsistent findings (Santos *et al.* 2003; Enright *et al.* 2005; Suteevun *et al.* 2006). Our results indicate variable levels of HDACs and HATs throughout embryonic development and may indicate those that are involved in somatic reprogramming.

Overall, the development of cloned marbled cat embryos was arrested at the morula stage and no blastocyst formation was observed. The transcription levels of *Oct4*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*, *HAT1* and *HDAC1* were found to be aberrant in cloned marbled cat embryos, which may have led to the incomplete reprogramming of marbled cat nuclei in the domestic cat cytoplasm and finally failure of further development. The cloned domestic and leopard cats, after their reconstruction with domestic cat cytoplasts, were able to develop to the blastocyst stage and their development rates and cell numbers were similar to those in IVF-derived embryos. The cloned domestic and leopard cat embryos had a normal development rate and demonstrated transcription patterns of the pluripotent genes similar to those seen in IVF embryos; however, the cloned embryos had a higher level of DNA passive methylation and *de novo* methylation and lower levels of histone acetylation transcripts. These studies provide a new understanding of the transcription pattern of specific genes that are crucial for the nuclear reprogramming of cloned felid embryos. Further investigations of abnormal nuclear and epigenetic reprogramming are needed to determine whether nuclear transfer can lead to development failure, implantation failure, fetal abnormality and poor postnatal health.

Acknowledgements

The authors thank Nucharin Sripunya, Kwanrudee Keawmungkun and Wanwisa Phewsai from the Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology, for their technical assistance. This study was funded by the Suranaree University of Technology and Thailand Research Fund-Master Research Grants (grant no. MRG-WII495S021).

References

- Beaujean, N., Hartshorne, G., Cavilla, J., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., and Young, L. (2004). Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr. Biol.* **14**, R266–R267. doi:10.1016/J.CUB.2004.03.019
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2395–2402. doi:10.1093/HMG/9.16.2395
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21. doi:10.1101/GAD.947102
- Boiani, M., Eckardt, S., Scholer, H. R., and McLaughlin, K. J. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* **16**, 1209–1219. doi:10.1101/GAD.966002
- Boonkusol, D., Gal, A. B., Bodo, S., Gorhony, B., Kitiyanant, Y., and Dinnyes, A. (2006). Gene expression profiles and *in vitro* development following

- vitrication of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 700–708. doi:10.1002/MRD.20450
- Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D. L., Yanagimachi, R., Page, D. C., and Jaenisch, R. (2003). Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* **130**, 1673–1680. doi:10.1242/DEV.00366
- Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J. P., and Viegas-Pequignot, E. (2001). Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* **11**, 1542–1546. doi:10.1016/S0960-9822(01)00480-8
- Chen, D. Y., Wen, D. C., Zhang, Y. P., Sun, Q. Y., Han, Z. M., et al. (2002). Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol. Reprod.* **67**, 637–642. doi:10.1095/BIOLREPROD67.2.637
- Cho, S. J., Yin, X. J., Choi, E., Lee, H. S., Bae, I., Han, H. S., Yee, S. T., Kim, N. H., and Kong, I. K. (2007). DNA methylation status in somatic and placenta cells of cloned cats. *Cloning Stem Cells* **9**, 477–484. doi:10.1089/CLO.2007.0003
- Daniels, R., Hall, V., and Trounson, A. O. (2000). Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.* **63**, 1034–1040. doi:10.1095/BIOLREPROD63.4.1034
- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., and Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13 734–13 738. doi:10.1073/PNAS.241522698
- Enright, B. P., Sung, L. Y., Chang, C. C., Yang, X., and Tian, X. C. (2005). Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* **72**, 944–948. doi:10.1095/BIOLREPROD.104.033225
- Gómez, M. C., Jenkins, J. A., Giraldo, A., Harris, R. F., King, A., Dresser, B. L., and Pope, C. E. (2003). Nuclear transfer of synchronized african wildcat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol. Reprod.* **69**, 1032–1041. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.014449
- Gómez, M. C., Pope, C. E., Giraldo, A., Lyons, L. A., Harris, R. F., King, A. L., Cole, A., Godke, R. A., and Dresser, B. L. (2004). Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* **6**, 247–258.
- Gómez, M. C., Pope, C. E., Kutner, R. H., Ricks, D. M., Lyons, L. A., et al. (2008). Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells* **10**, 469–484. doi:10.1089/CLO.2008.0021
- Han, Y. M., Kang, Y. K., Koo, D. B., and Lee, K. K. (2003). Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* **59**, 33–44. doi:10.1016/S0093-691X(02)01271-2
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E. S., Golub, T. R., and Jaenisch, R. (2002). Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 12 889–12 894. doi:10.1073/PNAS.192433399
- Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S., and Nakahara, T. (1990). Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fertil.* **90**, 279–284. doi:10.1530/JRF.0.0900279
- Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y. H., Chung, A. S., Lee, K. K., and Han, Y. M. (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.* **28**, 173–177. doi:10.1038/88903
- Kim, J. M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2003). Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J. Cell Biol.* **162**, 37–46. doi:10.1083/JCB.200303047
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N. V., Wakayama, S., Bui, H. T., and Wakayama, T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 183–189. doi:10.1016/J.BBRC.2005.11.164
- Kitiyanant, Y., Saikhun, J., Chaisalee, B., White, K. L., and Pavasuthipaisit, K. (2001). Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* **3**, 97–104. doi:10.1089/153623001753205052
- Kitiyanant, Y., Saikhun, J., and Pavasuthipaisit, K. (2003). Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. *Theriogenology* **59**, 1775–1786. doi:10.1016/S0093-691X(02)01235-9
- Kurosaka, S., Eckardt, S., and McLaughlin, K. J. (2004). Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biol. Reprod.* **71**, 1578–1582. doi:10.1095/BIOLREPROD.104.029322
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Diaz, F., Moraes, C. T., Farin, P. W., Farin, C. E., Hammer, C. J., West, M. D., and Damiani, P. (2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* **2**, 79–90. doi:10.1089/152045500436104
- Li, S., Li, Y., Du, W., Zhang, L., Yu, S., Dai, Y., Zhao, C., and Li, N. (2005). Aberrant gene expression in organs of bovine clones that die within two days after birth. *Biol. Reprod.* **72**, 258–265. doi:10.1095/BIOLREPROD.104.029462
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408. doi:10.1006/METH.2001.1262
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Jr, Cappai, P., and Clinton, M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 962–964. doi:10.1038/NBT1001-962
- 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. *Reprod. Fertil. Dev.* **16**, 149–150. doi:10.1071/RDV16N1AB55
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W., Ketudat-Cairns, M., and Parnpai, R. (2008). Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocytes. *J. Reprod. Dev.* **54**, 306–313. doi:10.1262/JRD.20049
- McGraw, S., Robert, C., Massicotte, L., and Sirard, M. A. (2003). Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol. Reprod.* **68**, 383–389. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.005991
- Mitalipov, S. M., Kuo, H. C., Hennebold, J. D., and Wolf, D. P. (2003). Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol. Reprod.* **69**, 1785–1792. doi:10.1095/BIOLREPROD.103.019455
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379–391. doi:10.1016/S0092-8674(00)81769-9
- Oh, H. J., Kim, M. K., Jang, G., Kim, H. J., Hong, S. G., et al. (2008). Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology* **70**, 638–647. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.04.032
- Park, S. H., Shin, M. R., and Kim, N. H. (2004). Bovine oocyte cytoplasm supports nuclear remodeling but not reprogramming of murine fibroblast cells. *Mol. Reprod. Dev.* **68**, 25–34. doi:10.1002/MRD.20050
- Pope, C. E. (2004). *In vitro* fertilization and embryo transfer in felids. *Methods Mol. Biol.* **254**, 227–244.
- Rideout, W. M., 3rd, Eggan, K., and Jaenisch, R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* **293**, 1093–1098. doi:10.1126/SCIENCE.1063206

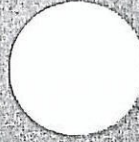
- Rybouchkin, A., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* **74**, 1083–1089. doi:10.1095/BIOLREPROD.105.047456
- Sansinena, M. J., Hylan, D., Hebert, K., Denniston, R. S., and Godke, R. A. (2005). Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology* **63**, 1081–1091. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.05.025
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W., and Dean, W. (2003). Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.* **13**, 1116–1121. doi:10.1016/S0960-9822(03)00419-6
- Shi, L. H., Miao, Y. L., Ouyang, Y. C., Huang, J. C., Lei, Z. L., Yang, J. W., Han, Z. M., Song, X. F., Sun, Q. Y., and Chen, D. Y. (2008). Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit–rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit–human interspecies cloned embryos. *Dev. Dyn.* **237**, 640–648. doi:10.1002/DVDY.21450
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., and Westhusin, M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415**, 859. doi:10.1038/NATURE723
- Skrzyszowska, M., Katska, L., Rynska, B., Kania, G., Smorag, Z., and Pienkowski, M. (2002). *In vitro* developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* **58**, 1615–1621. doi:10.1016/S0093-691X(02)01047-6
- Steuerwald, N., Cohen, J., Herrera, R. J., and Brenner, C. A. (2000). Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol. Hum. Reprod.* **6**, 448–453. doi:10.1093/MOLEHR/6.5.448
- Surani, M. A. (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* **414**, 122–128. doi:10.1038/35102186
- 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. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.015
- Thongphakdee, A., Numchaisrika, P., Omsongkram, S., Chatdarong, K., Kamolnorrath, S., Dumnu, S., and Techakumphu, M. (2006). *In vitro* development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.* **41**, 219–226. doi:10.1111/J.1439-0531.2005.00655.X
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810–813. doi:10.1038/385810A0
- Yang, J., Yang, S., Beaujean, N., Niu, Y., He, X., Xie, Y., Tang, X., Wang, L., Zhou, Q., and Ji, W. (2007). Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced *in vitro*. *Biol. Reprod.* **76**, 36–42. doi:10.1095/BIOLREPROD.106.051383
- Yin, X. J., Lee, H. S., Lee, Y. H., Seo, Y. I., Jeon, S. J., *et al.* (2005). Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* **129**, 245–249. doi:10.1530/REP.1.00403
- Yin, X. J., Lee, Y., Lee, H., Kim, N., Kim, L., Shin, H., and Kong, I. (2006). *In vitro* production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silverstris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology* **66**, 275–282. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.11.016
- Yin, X. J., Lee, H. S., Kim, L. H., Shin, H. D., Kim, N. H., and Kong, I. K. (2007). Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology* **67**, 816–823. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.10.010
- Yin, X. J., Lee, H. S., Yu, X. F., Choi, E., Koo, B. C., *et al.* (2008a). Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein. *Biol. Reprod.* **78**, 425–431. doi:10.1095/BIOLREPROD.107.065185
- Yin, X. J., Lee, H. S., Yu, X. F., Kim, L. H., Shin, H. D., Cho, S. J., Choi, E. G., and Kong, I. K. (2008b). Production of second-generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* **69**, 1001–1006. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.01.017
- Young, L. E., and Beaujean, N. (2004). DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **82–83**, 61–78. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.05.020

Manuscript received 27 April 2009, accepted 2 October 2009

การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4

 Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals

การรुकึบของการผลิตพลังงานทดแทน ต่อการผลิตปศุสัตว์



ศาสตราจารย์ ดร. ศนุช ฤกษ์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
สมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย



- P16 การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์เทโลเมอเรสในตัวอย่างเนื้อเยื่อโคลนนิ่ง
ข้ามสายพันธุ์
กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิมสุนทรรักษา วันชัย ตันวัฒนะ จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์
ชุตติ เหล่าธรรมธร นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ วันวิสาข์ ผิวสร้อย
Mariena Ketudat-Cairns และรังสรรค์ พาลพ่าย
- P17 การทดสอบสารเคมีที่มีผลต่ออัตราการความสำเร็จของการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอย่างจาก
เซลล์ตัวอย่างก่อนฝังตัว
จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ Shang-Hsun Yang, Karolina Piotrowska-Nitsche,
Anthony W.S. Chan และรังสรรค์ พาลพ่าย”
- P18 การแสดงออกของยีน Oct4 ในตัวอย่างโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์
สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา
นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ วันวิสาข์ ผิวสร้อย ชุตติ เหล่าธรรมธร วันชัย
ตันวัฒนะ วชิรวิทย์ สมสา วิชิต กองคำ Mariena Ketudat-Cairns และ รังสรรค์ พาลพ่าย
- P19 ผลของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของตัวอย่างโคที่ผลิตโดยวิธีอีกที
ชุตติ เหล่าธรรมธร กนกวรรณ ศรีรัตนา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา
นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิ์วิวัฒน์ เทวาคูดี
อนวัช แสงมาลี มาริณา เกตุทัต-คาร์นส์ รังสรรค์ พาลพ่าย
- P20 ผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อความสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิในระดับนิวเคลียส
นอกร่างกายของโอโอไซต์แมวบ้าน
ชาตรี ชำนาญดี และศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร
- P21 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องมือวัดน้ำหนักในฟาร์มโคนม
ธันวา ไวยบพ และสมเจตน์ เพ็ญวิจิตร
- P22 การประเมินมาตรฐานการปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิต และจุลชีววิทยา
ของศูนย์รวบรวมนํ้านมดิบสหกรณ์โคนมจังหวัดชุมพร จำกัด
เทียมพบ ก้านเหลือง วรัญญา พริ้มจรัส สมพงษ์ สมเสร็จ วราลี คงกระพันธ์
และสมศรี ภูเลี้ยง
- P23 ศึกษาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในนํ้านมดิบรายฟาร์มในจังหวัดชุมพร
เทียมพบ ก้านเหลือง สมพงษ์ สมเสร็จ วราลี คงกระพันธ์ พรพรรณ พุ่มพวง
วรัญญา พริ้มจรัส สมศรี ภูเลี้ยง
- P24 องค์ประกอบและสหสัมพันธ์ของนํ้านมดิบรวมถึงในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชุมพร
วราลี คงกระพันธ์ เทียมพบ ก้านเหลือง ชยุด คงกระพันธ์ และสมศรี ภูเลี้ยง
- P25 สมรรถภาพการเจริญเติบโตของลูกโคนมเพศผู้วัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยนมคุณภาพต่ำเติม
กรดอะซิติกและนมเทียม
เทียมพบ ก้านเหลือง วรชาติ ปิ่นเกตุ ชยุด คงกระพันธ์ สมพงษ์ สมเสร็จ และ
สมศรี ภูเลี้ยง
- P26 การศึกษาลักษณะซากของลูกโควัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยนํ้านมคุณภาพต่ำเติมกรดอะซิติก
และนมเทียม
ชยุด คงกระพันธ์ เทียมพบ ก้านเหลือง วรชาติ ปิ่นเกตุ สมพงษ์ สมเสร็จ
และสมศรี ภูเลี้ยง
- P27 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีค่าความเป็นกรด - ด่าง ไฮโดรไลซยาบิกและอัตราส่วนที่
เหมาะสมของไขมันสำปะหลังหมักร่วมกับเปลือกสับปรดที่ระยะเวลา 15, 21 และ
30 วัน
เทียมพบ ก้านเหลือง ปริศนา เนตตกุล วราลี คงกระพันธ์ พรพรรณ พุ่มพวง และ
สมศรี ภูเลี้ยง

Oct4 Expression in Cloned Embryo of Endangered Feline Family

การแสดงออกของยีน Oct4 ในตัวอ่อนโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์

Sumeth Imsoonthornruksa¹, Chanchao Lorthongpanich¹, Anawat Sangmalee¹, Kanokwan Srirattana¹, Nucharin Sripunya¹, Kwanrudee Keawmungkun¹, Wanwisa Phewsoi¹, Chuti Laowtammathron¹, Wanchai Tunwattana², Wachiravit Somsa³, Wichit Kongkham³, Mariena Ketudat-Caima¹, and Rangsun Parnpai¹

สุเมธ อิมสุนทรรักษา¹ จันทร์เจ้า ลือทองพานิชย์¹ อนวัช แสงมาลี¹ กนกวรรณ ศรีรัตน¹ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา¹ ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ¹ วันวิสาข์ ผิวสร้อย¹ ชุติ เหล่าธรรมธร¹ วันชัย ต้นวัฒน² วชิรวิทย์ สมสา³

วิจิต กองคำ³ Mariena Ketudat-Caima¹ และรังสรรค์ พาลพ่าย¹

¹Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000

²Khao Kaew Open Zoo, Chonburi 20110

³Nakhon Ratchasima Zoo, Nakhon Ratchasima 30000

¹ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ²สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ³สวนสัตว์นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

Corresponding author: rangsun@g.sut.ac.th

Abstract

In this work, the expression profile of Oct4 mRNA at 1-, 2-, 4-, 8-cells, morula and blastocyst stages of individual cloned domestic cat embryos were compared with the profiles of leopard and marbled cat embryos which have been cloned using domestic cat oocytes as recipient cytoplasm. The profile of Oct4 mRNA was analyzed by quantitative real time PCR. The IVF-derived domestic cat embryos were used as control group. In every stage of development, IVF-derived domestic cat and cloned leopard cat embryos showed similar expression profiles of Oct4. The expression level of Oct4 increased during development and was highest at blastocyst stage. The result also showed that cloned domestic cat and marbled cat embryos had altered expression patterns comparing to the IVF-derived embryos. The level of Oct4 was reduced in cloned domestic cat blastocyst and reduced in cloned marbled cat morulae. These results demonstrated that the expression patterns of Oct4 in cloned felid embryos might have some effects on the *in vitro* developmental efficiency particularly at blastocyst stage. From the result we can concluded that the differences expression pattern of Oct4 during embryo development could characterized the developmental efficiency of cloned felid embryo.

Keywords: Oct4, cloning, endangered species, gene expression

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน Oct4 ในตัวอ่อนระยะ 1- 2- 4- 8- เซลล์ มอรูล่า และ บลาสโตซิสต์ ในตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งเทียบกับ ตัวอ่อนแมวขาวและแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ และตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วของแมวบ้าน (IVF) จะใช้เป็นกลุ่มควบคุม โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี quantitative real time PCR จากการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน Oct4 ในตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง และแมวขาวโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายกับตัวอ่อน IVF โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีการแสดงของ Oct4 mRNA ต่ำ จนกระทั่งถึงระยะ 8 เซลล์ และค่อยๆแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งแสดงออกสูงที่สุดในระยะบลาสโตซิสต์ ในทางตรงกันข้ามพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อน โคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์มีการแสดงออกของยีน Oct4 ต่ำตลอดระยะเวลาของการเจริญเติบโตจนถึงระยะมอรูล่าและไม่พบการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ในตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ ซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออก

ของยีน Oct4 ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญสู่ระยะ
บลาสโตซิสต์

คำสำคัญ: Oct4 โคลนนิ่ง สัตว์ใกล้สูญพันธุ์ การแสดงออกของยีน

Introduction

The survival of most species in the felid family was considered to be under threatened or endangered. In fact, 36 of 37 species of this family are risk of extinction (convention on international trade in endangered species, CITES). In Thailand, marbled cat (*Pardofelis marmorata*) and leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) are the wild cat that also in the high risk of extinction categories. The real population has not yet been reported but they are both considered to be endangered. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) can be used for conserve and increase number of endangered species. Current evidence suggests that reprogramming of somatic cell nuclei in cat embryos produced by nuclear transfer is incomplete. To date there are several reports describing the application of nuclear transfer techniques in cats (Gomez et al., 2003; Kitiyanant et al., 2003; Wen et al., 2003), and several groups have successfully cloned kittens (Shin et al., 2002; Gomez et al., 2004; Yin et al., 2005). The Oct4 (Pou5f1) gene encodes POU-domain DNA-binding protein and is expressed in pluripotent embryonic cells and germ cells. Most POU proteins are expressed during embryogenesis, suggesting that they may play a crucial role in development and cell differentiation (Pesce and Scholer, 2001). Our previous studies have showed that domestic cat oocytes were able to be used as recipient cytoplasm for leopard cat and marbled cat cloning with some limitation. The previous results showed that leopard cat cloned embryos could develop to blastocyst stage while marbled cat cloned embryos could not develop beyond morula stage. The expression level of Oct4 has been suggested as one of many important factors that necessary for survival and development of the embryo.

We examined Oct4 transcript distribution in clone domestic cat pre-implantation stage embryos comparing with leopard and marbled cat of the same stage of development. The expression level of Oct4 mRNA was analyzed by quantitative real time PCR. The IVF-derived domestic cat embryos were used as control.

Materials and methods

Ovary recovery and in vitro maturation

Healthy mature female cats were selected for superovulation by injected 200 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) five days apart. The superovulated cats were anesthetized. Then, ovaries were removed from the reproductive trace. The ovaries were sliced with a 26 gauge needle to release cumulus oocyte complexes (COCs). The collected oocytes were matured in TCM 199 supplemented with 0.36 mM Na Pyruvate, 2.2 mM Ca Lactate, 2mM L-glutamine, 1.13 mM Cystein, 0.3% Bovine Serum Albumin, BSA-fatty acid free. 0.5 iu/ml eCG, 1 iu/ml Human Chlorionic Gonadotropin, hCG for 24 h under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in air.

Preparation of donor cell

Fibroblast cells were generated form ear or abdominal skin of domestic, leopard and marbled cat after anesthesia or within 24 hours of natural death. Tissues were cut into small pieces then placed into culture dishes and cover with glass slide. Then alpha-Modified Minimum Essential Medium (α MEM) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) culture medium was added and cultured at 37°C under 5% CO₂ in air. After 8-10 days of culture, monolayer was outgrown with fibroblastic like morphology. The fibroblasts were passaged for 1 to 2 times to increase cell number. The fibroblast cells were frozen in culture medium supplemented with 10% (v/v) dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen for further used as donor cells.

The fibroblasts cell were thawed and culture at 37°C under 5% CO₂ in air for 2 to 3 days prior to nuclear transfer. At subconfluence the fibroblasts were trypsinized using trypsin / EDTA to separate into single cell and used as donor cells.

Nuclear transfer

Oocytes with extruded a first polar body (MII oocyte) were selected for nuclear transfer. The MII oocytes were placed into 5 µg/ml cytochalasin B. The nucleus was removed (enucleated) by using sharp micropipette to cut the zona pellucida above the first polar body, then squeezed out the first polar body and metaphase plate in a small volume of surrounding cytoplasm. A single domestic cat, leopard cat or marbled cat fibroblast was inserted into the perivitelline space of the enucleated oocyte. For fusion, the cytoplasm/cell couplet were equilibrated in 0.3 M Mannitol containing 0.1 mM MgCl₂·6H₂O and transferred to fusion chamber. Cell fusion was induced with double DC pulse of 30 V for 30 µsec delivered by electro fusion machine (Voltrain EP-1, Cryologic). The fused oocytes were visually evaluated by confirming the presence or absence of donor cell in the perivitelline space 45 min after fusion. Fused couplets were activated with 7% ethanol for 5 minutes followed by incubation in Emcare holding medium supplemented with 10 µg/ml cycloheximide and 1.25 µg/ml cytochalasin D for 5 h at 38°C under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in air.

In vitro fertilization (IVF)

The epididymides were separated, removed from testes and sliced repeatedly to release spermatozoa. The released sperm were centrifugation at 2,100 rpm for 7 min. After supernatant removal, the sperm pellet were overlaid with 1 ml of Tyrode's medium containing 0.6 mg/ml BSA (IVF medium). Then the sperm were allowed to swim up for 30 min at 38°C under 5% CO₂ in air. The swim up layer was carefully recovered and small aliquots were used to evaluate sperm concentration and sperm percentage motility. For IVF, oocytes were co-incubated in 5% CO₂ in air at 38°C with 4×10⁵ motile sperm/ml in 50 µl droplets of IVF medium.

In vitro embryos culture

The reconstructed embryos and 20 h post insemination oocytes were cultured in Tyrode's medium supplemented with 1% MEM non-essential amino acids, 0.3 mg/ml BSA, 0.36 mM Na Pyruvate, 2.2 mM Ca Lactate and 2mM L-glutamine (Ty I-medium) at 38°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for 2 days. The 8-cell stage embryos were selected and cultured in Ty I- medium without BSA but supplemented with 2% MEM essential amino acid and 10% FBS (Ty II- medium) at 38°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ for 5 days. Half of the medium were changed daily. The zygote, 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, blastocyst stage and MII oocyte were collected for gene expression analysis at approximately 12, 24, 36, 48, 120, 192 h after culture and 24 h after *in vitro* maturation, respectively.

mRNA isolation and cDNA synthesis

The oligo (dT)₂₅ nucleotide attached to magnetic beads were used (Dynabeads mRNA purification kit, DYNAL) following the manufacturer's instructions to purify poly A RNA. Briefly, an embryo was resuspended in 100 µl lysis/binding buffer and vortexed at room temperature for 5 min. Then, 20 µl pre-washed Dynabeads oligo (dT)₂₅ was mixed with the lysate and annealed by rotation for 5 min at room temperature. The DYNAL MPC magnetic particle concentrator was used to help removed the supernatant. The hybridized mRNA and oligo (dT)₂₅ magnetic beads were washed twice with 100 µl washing buffer A and wash twice with 100 µl washing buffer B. To denature and remove secondary structures, the mRNA bound to magnetic beads were resuspended with 10 µl RNase-free water. Then, heat at 65°C for 5 min and quenched rapidly on ice for 3 min. The first stand synthesis of cDNA was performed at 55°C for 1 h in a final volume of 20 µl consist of 1× first stand buffer, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM of each dNTP, 40U RNasin ribonuclease inhibitor (Invitrogen) and 200U Superscript III RNase H-RT (Invitrogen). Reactions were terminated by incubation at 70°C for 15 min. The final volume was increased to 30 µl with distilled water and all cDNA samples were stored at -20°C until further use.

Real-time PCR analysis of gene expression

The quantification of all gene transcripts was done by real-time PCR. The primer for β-actin(Forward;5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', Reverse;5'-AGCACTGTGTTGGCGTAC

AG-3') and Oct4 (Forward; 5'ATCCTGGGGGTTCTATTTGG-3', Reverse; 5'-CTGGTTCGC TTTCTCTTCG-3') genes were design from conserved sequences of human, bovine and mouse found in GenBank. The reaction was performed in capillaries with the final volume of 20 μ l with 3 μ l of cDNA corresponding to a single oocyte, cloned or IVF embryo in each stage of pre-implantation development and a reaction mixture consisting of 5 μ M each of sequence-specific primer, 1.25 mM MgCl₂ and 2 μ l of the SYBR green mix containing dNTPs (FastStart DNA master SYBR green I, LightCycler). To compare the relative level of gene expression in cloned and IVF embryos, real-time data were analyzed by using the comparative CT method, $\Delta\Delta$ CT.

Statistic analysis

Statistically significant difference in relative expression level of target genes between each development stage were calculated by two ways ANOVA, proportional data were log₁₀ (X+1) transformed before analysis. Relative quantification of target genes expression level is presented as fold-difference. Data are presented as mean \pm SEM. P value of less than 0.05 was considered significant.

Results and discussion

Expression of Oct4 mRNA were low at the zygote to 8-cell stage embryos of IVF, cloned domestic and leopard cats and increased at the morula and blastocyst stages. The morula stage embryos derived from IVF showed significantly higher Oct4 transcript (6.4-fold; $P < 0.05$) than cloned domestic (1.5-fold) and leopard cats (3.2-fold). Surprisingly, no significant differences in transcript level at blastocyst stage of cloned domestic and leopard cats. Morula stage cloned marbled cat showed significantly lower expression (0.2-fold; $P < 0.05$) than morula stage IVF, cloned domestic and leopard cats. Unfortunately, the cloned marbled cat could not develop further, thus the expression level of Oct4 transcript was not determined in the blastocyst stage. Lorthongpanich et al. (2004) have demonstrated that the domestic cat oocyte could support the cloned leopard cat to the blastocyst stage. In contract, the cloned marbled cat could not development to the balstocyst stage (Thongphakdee et al., 2006).

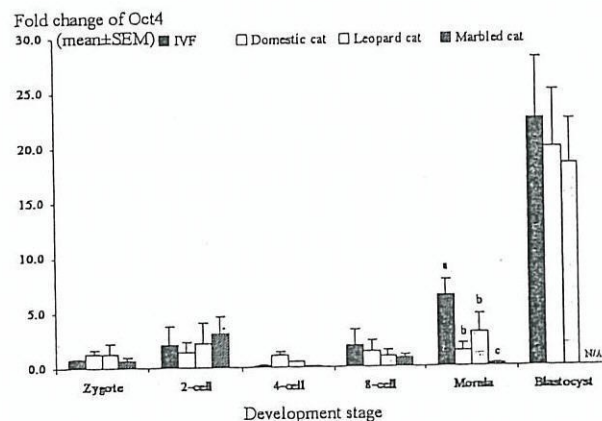


Fig. 1 Comparison of the relative expression levels of mRNA for the Oct4 gene between IVF (black bars), cloned domestic cat (white bars), cloned leopard cat (gray bars) and cloned marbled cat (diagonal bars) embryos at different stages of embryo development. N/A is not available.

The problem of cloned marbled cat development was hypothesized that it was due to incomplete nuclear reprogramming, the process of reversing a differentiated somatic nucleus to a totipotent embryonic stage after SCNT. This experiment was indicated that the clone domestic and leopard cat embryos have similar pattern of Oct4 expression with the IVF embryos. However, the cloned marbled cat shown very low expression level of Oct4 at morula stage. The Oct4 expression play an essential role in control of development pluripotency, develop to the blastocyst stage.

Therefore, the lack of Oct4 expression in the cloned marbled cat in morula stage may play an essential role in the lack of development due to the lack of pluripotent embryonic cells (Bortvin et al., 2003). Oct4 expression is considered to be a key marker for the identification of pluripotent cells in the mouse and potentially, in other mammalian species, because orthologues of Oct4 with high homology of protein sequence, genomic organization and chromosomal localization of the POU gene are highly conserved in several mammalian species (Eijk et al., 1999). Finally, lack of Oct4 expression associated with low blastocyst development in SCNT embryos suggests that this crucial developmental gene is not appropriately reprogrammed and that it may serve as a marker for nuclear reprogramming (Mitalipov et al., 2003).

Conclusion

The differences expression pattern of Oct4 during embryo development could characterize the developmental efficiency of cloned felid embryo. The observed lack or abnormal expression of Oct4 in marbled cat SCNT embryos suggests inadequate nuclear reprogramming and success in SCNT.

Acknowledgments

This study was supported by Suranaree University of Technology and Thailand Research Found (MRG-WII495S021).

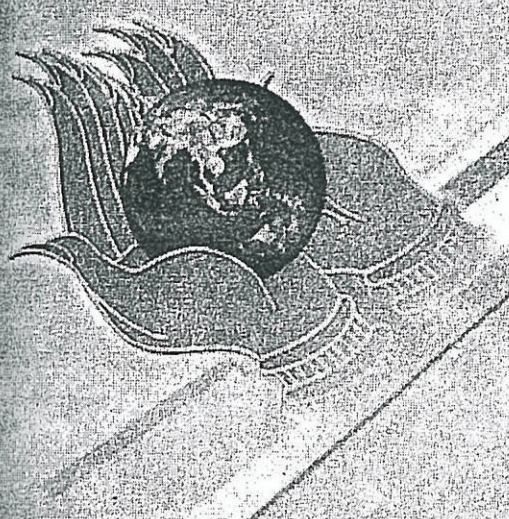
References

- Bortvin, A., K. Eggan, H. Skaletsky, H. Akutsu, D.L. Berry, R. Yanagimachi, D.C. Page and R. Jaenisch. 2003. Incomplete reactivation of Oct-4-related gene in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130: 1673-1680.
- Eijk V.M.J., M.A. van Rooijen, S. Modina, L. Scesi, G. Folkers, H.T. van Tol, M.M. Bevers, S.R. Fisher, H.A. Lewin, D. Rakacolli, i C. Gall, C. de Vaureix, A.O. Trounson, C.L. Mummery and F. Gandolfi. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod.* 60: 1093-1103.
- Gomez, M.C., C.E. Pope, A. Giraldo, L.A. Lyons, R.F. Harris, A.L. King, A. Cole, R.A. Godke and B.L. Dresser. 2004. Birth of African wild cat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells.* 6: 247-258.
- Gomez M.C., J.A. Jenkins, A. Giraldo, R.F. Harris, A. King, B.L. Dresser and C.E. Pope. 2003. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod.* 69: 1032-1041.
- Mitalipov, S.M, H.C. Kuo, J.D. Hennebold and D.P. Wolf. 2003. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol Reprod.* 69: 1785-1792.
- Kitiyant, Y., J. Saikhun and K. Pavasuthipaisit. 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology* 59: 1775-86.
- Lorthongpanich, C., C. Laowtammathron, S. Muenthaisong and R. Parnpai. 2004. *In vitro* development of enucleated domestic cat oocyte reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod Fertil Dev.* 149.
- Pesce, M. and H.R. Schöler. 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 19(4): 271-8.
- Shin, T.Y., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons and M. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
- Thongphagdee, A., P. Numchaisrikha, S. Omsongkram, K. Chatdarong, S. Kamolnarranath, S. Dumnui and M. Techakumphu. 2006. In vitro development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod Dom Anim.* 1-8.
- Wen, D., C. Yang, Y. Cheng, J.S. Li, Z. Liu, Q. Sun, J. Zang, L. Lei, Y. Wu, Z. Kou and D. Chen. 2003. Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloning cat (*Felis catus*) embryos. *Mol Reprod Dev* 66: 38-45.
- Yin, X.J., Y.H. Lee, Y.I. Seo, S.J. Jeon, E.G. Choi, S.J. Cho, S.G. Cho, W. Min, S.K. Kang, W.S. Hwang and I.K. Kong. 2005. Cat cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129: 245-249.



The 20th Annual Meeting and International Conference
of the Thai Society for Biotechnology

"Biotechnology for Global Care"



October 14-17th, 2008

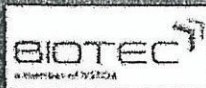
Taksila Hotel,
Maha Sarakham,
Thailand

Department of Biotechnology,
Faculty of Technology,
Mahasarakham University

Organized by:



Partnering:





T604	Study on the effectiveness of entomopathogenic fungus "Metarhizium anisopliae" on armyworm Tin MyatS we, Weine Nway Nway Oo, Moe Kyaw Thu, and Thazin Han	269
T605	Hydrophobicity in the core of receptor-binding domain critical for toxicity of the <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry4Ba TPXIN Benyapat Puripunpinyo, Somphob Leetachewa, Chanan Angsuthanasombat	275
T606	Construction of genetic linkage maps of cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) S Poopear, S Tangphatsornruang, O Boonseng , DR Smith and K Triwitayakorn	279
T607	Zinc cluster transcriptional factors play a key role in reprogramming of gene expression during diauxic shift Nitnipa Soontorngun, François Robert, Bernard Turcotte	285
T608	Expression of nuclear reprogramming genes in cloned endangered felid embryos Sumeth Imsoonthornruksa, Chanchao Lorthongpanich, Anawat Sangmalee, Kanokwan Srirattana, Chuti Laowtammathron, Mariena Ketudat-Cairns and Rangsun Parnpai	292
T6010	Study of feeding management on reproductive performance of heifers Nu Nu Tin, Mar Too Nyi Bu	298
AUTHOR INDEX		304



T608

Expression of nuclear reprogramming genes in cloned endangered felid embryos

Sumeth Imsoonthornruksa, Chanchao Lorthongpanich, Anawat Sangmalee, K. Anokwan Srirattana, Chuti Laowtammathron, Mariena Ketudat-Cairns and Rangsun Parnpai*

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

Abstract

Aberrant gene expression in cloned embryos due to abnormal epigenetic modifications of the donor nuclei after transfer into enucleated oocytes was hypothesized to be crucial to the re-establishment of embryonic totipotency. In this study, we focused on the expression profile of Oct4, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HAT1 and HDAC1 mRNA at 1-, 2-, 4-, 8-cells, morula and blastocyst stages of individual cloned domestic leopard and marbled cat embryos which have been cloned using domestic cat oocytes as recipient cytoplasm. The results showed low levels of Oct4 and HAT1 at early development stage and dramatically increased at 8-cell to blastocyst stages in cloned domestic and leopard cats and IVF derived embryos. However, the cloned marbled cat showed low Oct4 and HAT1 transcript levels throughout development until morula stage and no blastocyst formation was observed in these embryos. The transcription level of HDAC1 of cloned felid embryos had altered expression pattern compared to IVF derived embryos. The DNMT1 transcript levels were dramatically decreased throughout development of felid embryos. Cloned felid embryos showed higher transcript of DNMT1 than IVF derived embryos. The DNMT3a mRNA level of IVF derived embryos started very low at 2- to 4-cell stage embryos and dramatic increase at morula and blastocyst stages. In contrast, DNMT3a transcript level of cloned felid embryos showed dramatic decrease in early development stage and increase at blastocyst stage. The level of DNMT3b mRNA started to decrease until no transcript can be detected at 2-cell to morula stages and the high transcript at blastocyst stage. These studies indicated that the genome reprogramming in the felid species are not enough for the nuclear transfer technique. Improvement of the cloning technique is needed for the production efficiency of cloned embryos for the conservation of endangered felid species.

Keywords: nuclear transfer, reprogramming, gene expression

*Corresponding author: rangsun@g.sut.ac.th

1. Introduction

In Thailand, marbled cat (*Pardofelis marmorata*) and leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) are the wild cat that are in the high risk of extinction categories. The real population has not yet been reported but they are both considered to be endangered. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) can be used for

conserve and increase number of the endangered species. Current evidence suggests that reprogramming of somatic cell nuclei in cat embryos produced by nuclear transfer is incomplete. To date there are several reports describing the application of nuclear transfer techniques in cats [1, 2 and 3], and several groups have successfully produced cloned



kittens [4, 5 and 6]. Abnormal of nuclear and epigenetic reprogramming are usually founded in cloned embryos including felids species. However, genome reprogramming is still a mystery. This study was the first investigation on the transcription levels of Oct4, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HAT1 and HDAC1 genes that believed to be crucial for nuclear reprogramming in cloned felids species.

2. Materials and methods

2.1 Ovary recovery and *in vitro* maturation

Healthy mature female cats were selected for superovulation by injected 200 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) five days apart. The superovulated cats were anesthetized and the ovaries were removed from the reproductive tract. The ovaries were sliced with a 26 gauge needle to release cumulus oocyte complexes (COCs). The collected COCs were matured in TCM 199 supplemented with 0.36 mM Na Pyruvate, 2.2 mM Ca Lactate, 2mM L-glutamine, 1.13 mM Cystein, 0.3% bovine serum albumin (BSA-fatty acid free), 0.5 iu/ml eCG, 1 iu/ml human chorionic gonadotropin (hCG) at 38°C for 24 h under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in air.

2.2 Preparation of donor cells

Fibroblast cells were generated from ear or abdominal skin. Tissues were cut into small pieces then placed into culture dishes and cover with glass slide. Then alpha-Modified Minimum Essential Medium (α MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) was added and cultured at 37°C under 5% CO₂ in air. After 8-10 days of culture, the fibroblasts outgrown from skin were treated with Trypsin/EDTA and culture in 25 cm² culture flask. The fibroblasts were passaged for 1 to 2 times to increase cell number. The fibroblast cells were frozen in culture medium supplemented with 10% (v/v) dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen. The fibroblasts cells were thawed and cultured at

37°C under 5% CO₂ in air for 2 to 3 days prior to nuclear transfer. At subconfluence the fibroblasts were trypsinized using Trypsin/EDTA to separate into single cell and used as donor cells.

2.3 Nuclear transfer

Oocytes with the first polar body extruded (MII oocyte) were selected for nuclear transfer. The MII oocytes were placed into 5 μ g/ml cytochalasin B. The nucleus was removed (enucleated) by using sharp micropipette to cut the zona pellucida above the first polar body, then squeezed out the first polar body and metaphase plate in a small volume of surrounding cytoplasm. A single domestic cat, leopard cat or marbled cat fibroblast was inserted into the perivitelline space of the enucleated oocyte. For fusion, the cytoplasm/cell couplets were equilibrated in 0.3 M Mannitol containing 0.1 mM MgCl₂.6H₂O and placed between both tips of fusion electrode. Cell fusion was induced with double DC pulse of 30 V for 30 μ sec delivered by electro fusion machine (Voltrain EP-1, Cryologic). The fused oocytes were visually evaluated by confirming the presence or absence of donor cell in the perivitelline space 45 min after fusion. Fused couplets were activated with 7% ethanol for 5 minutes followed by incubation in Emlcare holding medium supplemented with 10 μ g/ml cycloheximide and 1.25 μ g/ml cytochalasin D for 5 h at 38°C under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in air.

2.4 *In vitro* fertilization (IVF)

The epididymides were separated from testes and repeatedly sliced in a 90 mm petri dish containing modified Dulbecco's phosphate buffer saline to release spermatozoa. The released sperm were centrifuge at 2,100 rpm for 7 min. After supernatant removal, the sperm pellets were



overlaid with 1 ml of Tyrode's medium containing 0.6 mg/ml BSA (IVF medium). Then the sperm were allowed to swim up for 30 min at 38°C under 5% CO₂ in air. The swim up layer was carefully recovered and small aliquots were used to evaluate sperm concentration and motility. For IVF, oocytes were co-incubated with 4×10⁵ motile sperm/ml in 50 µl droplets of IVF medium under 5% CO₂ in air at 38°C for 20 h.

2.5 *In vitro* embryos culture

The reconstructed embryos and 20 h post insemination oocytes were cultured in Tyrode's medium supplemented with 1% MEM non-essential amino acids, 0.3 mg/ml BSA, 0.36 mM Na Pyruvate, 2.2 mM Ca Lactate and 2mM L-glutamine (Ty I-medium) at 38°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for 2 days. The 8-cell stage embryos were selected and cultured in Ty I-medium without BSA but supplemented with 2% MEM essential amino acid and 10% FBS (Ty II- medium) at 38°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ for 5 days. Half of the medium were changed daily. The 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula, blastocyst stage and MII oocyte were collected for gene expression analysis at approximately 12, 24, 36, 48, 120, 192 h after culture and 24 h after *in vitro* maturation, respectively.

2.6 mRNA isolation and cDNA synthesis

The oligo (dT)₂₅ nucleotide attached to magnetic beads were used (Dynabeads mRNA purification kit, Dynal) following the manufacturer's instructions to purify polyA RNA. Then, to denature and remove secondary structures, the mRNA bound to magnetic beads were resuspended with 10 µl RNase-free

water. Then, heat at 65°C for 5 min and quenched rapidly on ice for 3 min. The first strand synthesis of cDNA was performed at 55°C for 1 h in a final volume of 20 µl consist of 1× first stand buffer, 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM of each dNTP, 40U RNasin ribonuclease inhibitor (Invitrogen) and 200U Superscript III RNase H-RT (Invitrogen). Reactions were terminated by incubation at 70°C for 15 min. The final volume was increased to 30 µl with distilled water and all cDNA samples were stored at -20°C until further use.

2.7 Real-time PCR analysis of gene expression

The quantification of all gene transcripts (Table 1) was done by real-time PCR. The reaction was performed in capillaries with the final volume of 20 µl with 3 µl of cDNA corresponding to a single oocyte, cloned or IVF embryo in each stage of pre-implantation development and a reaction mixture consisting of 5 µM each of sequence-specific primer, 1.25 mM MgCl₂ and 2 µl of the SYBR green mix containing dNTPs (FastStart DNA master SYBR green I, LightCycler). To compare the relative level of gene expression in cloned and IVF embryos, real-time data were analyzed by using the comparative CT method, ΔΔCT.

2.8 Statistic analysis

Statistically significant difference in relative expression level of target genes between each development stage were calculated by two ways ANOVA, proportional data were log₁₀ (X+1) transformed before analysis. P value of less than 0.05 was considered significant.



Table1. Primer sequences used for Real-time PCR

Gene	Accession number	Primer sequences 5'-3'	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
Oct4	DQ486513	Forward-ATCCTGGGGGTCTATTTGG Reverse- CTGGTTCGCTTCTCTTTTCG	200	56
DNMT1	AY173048	Forward- GAGGGCTACCTGGCTAAAGTC Reverse- CATTGCTTCCCGACTGAAA	88	60
DNMT3a	AY271299	Forward- CGAGGTGTGTGAGGACTCCAT Reverse- ACGTCCCCGACGTACATGA	93	62
DNMT3b	AY244713	Forward- AGCATGAGGGCAACATCAAAT Reverse- CACCAATCACCAAGTCAAATG	98	62
HAT1	BT021536	Forward- CTTGACACCTTTTGTGATGTGGTTTATT Reverse- GCGTAGCTCCATCCTTATTATACTTCTC	112	58
HDAC1	AY504948	Forward- GCACTGGGCTGGAACATCTC Reverse- GGGATTGACGACGAGTCCTATG	98	58
β-actin	NM001101	Forward-GGACTTCGAGCAAGAGATGG Reverse-AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234	60

3. Results and discussions

Expression of Oct4 mRNA were low at the 1-cell to 8-cell stage embryos of IVF, cloned domestic and leopard cats and increased in the morula and blastocyst stage. At morula stage, the IVF derived embryo showed significantly higher Oct4 transcript than cloned domestic cat and cloned leopard cat. Surprisingly, no significant differences transcript level at blastocyst stage embryos in cloned domestic and leopard cats were found. For cloned marbled cat embryos, the mRNA level of Oct4 showed low expression throughout pre-implantation development and had significantly lower transcript at morula stage when compare to the other embryos. Unfortunately, the cloned marbled cat embryos could not develop to blastocyst stage, thus the expression level of those was not determined. The Oct4 gene was suggested to play important role in controlling development of pluripotency events during embryogenesis [7]. This observation was consistent with the report of Kurosaka et al. [8], who found that during embryogenesis development the distribution of Oct4 transcript in bovine and mouse embryos was low at early development stage and this was followed by increase of transcript at morula and blastocyst stage. However, the lack of Oct4 mRNA founded in the interspecies cloning of mouse embryos that lead to failure of further development [9] and also in cloned

marbled cat that low level of Oct4 transcript were seen throughout the developmental stage and may lead to arrest develop to blastocyst stage, suggests insufficient reprogramming of donor nuclei.

The relative expression of DNMT1 was similar in 1-cell of all four type embryos. After the first cleavage, the cloned leopard and marbled cat embryos showed higher expression of DNMT1 when compare to IVF embryos but did not show any different expression when compare to cloned domestic cat embryos. DNMT1 expression seems to decrease after the 2-cell stage embryos, especially, the morulae of cloned marbled cat almost no transcript of DNMT1 was detected. The higher expression of DNMT1 was observed in cloned domestic cat morulae and blastocyst. In contrast, the de novo DNA methylation gene, DNMT3a and DNMT3b showed relatively higher expression level. DNMT3a showed no significant difference transcription level at 1-cell to 2-cell stage between IVF and cloned felid embryos. No transcription of DNMT3a was detected in embryo at 4-cell stage embryos derived from IVF. In addition, the 8-cell stage embryos of IVF and cloned domestic cat showed significantly lower expression of DNMT3a than cloned leopard and marbled cat embryos. The morula stage of cloned marbled cat had significantly lower expression of DNMT3a



compared to the cloned domestic and leopard cat and surprisingly, the embryos derived from IVF had significantly highest expression when compare to other cloned felid embryos. Similarly, level expression of DNMT3a in the IVF blastocyst was significantly higher from cloned domestic and leopard cat blastocysts. The DNMT3b expression level in 1-cell of IVF and cloned felid embryos showed to appeared at similar level and the difference was not statistically significant. After the first cleavage, the embryos derived from IVF have significantly lower expression of DNMT3b compared to the cloned felid embryos. The expression level of DNMT3b mRNA was not detected at 4-cell until morula stage in the derived embryos from IVF. However, in the 4-cell stage of cloned marbled cat was showed low expression level of DNMT3b was detected. In the 4- to 8-cell stage of clone domestic and leopard cats no DNMT3b was detected. In contrast, the morula stage of cloned domestic and leopard cat embryos showed low expression level of DNMT3b but no significant difference from those IVF and cloned marbled cat (not detected). However, the level of DNMT3b mRNA high expression was found in the blastocyst of derived embryos from IVF and cloned domestic and leopard cats. The abnormality of the DNA methylation level is also substantially variable among individual clones [10]. It is clear that embryos produced by cloning exhibit a state of hypermethylation and this phenomenon has been found in both cattle and mice [10, 11 and 12] and there have been many studies reported the aberrant of levels for the DNMTs mRNA in cloned embryos [11, 13 and 14].

The result demonstrated that HAT1 mRNA transcript was low in cloned felids embryos at 8-cell to blastocyst stage compare to IVF derived embryos and the level of HDAC1 mRNA was aberrant at early development stage, 1-cell to 4-cell stage. This study suggests that hypoacetylation found in cloned felids embryos which was inconsistent with the study of Suteevun et al. [14], who measured the transcription of histone acetylation in cloned buffalo embryos. They found that hyperacetylation occurred in these embryos. To date there are few studies that have focused on the acetylation of histone in

cloned embryos and also have found aberrancies [14, 15, and 16]. These results indicate variable levels of histone deacetylases and histone acetyltransferases throughout embryonic development and may indicate the ones that are involved in somatic reprogramming.

4. Conclusions

The transcription level of pluripotent, DNA methylation and histone acetylation genes were found to be aberrant in the cloned marbled cat embryos which may lead to the failure of future development and incomplete reprogramming of marbled cat nuclei in the domestic cat cytoplasm. However, the cloned domestic and leopard cat after reconstructed with domestic cat cytoplasm also showed aberrant DNA methylation and hypoacetylation. These data provide new understanding to the transcription pattern of specific genes that are crucial for nuclear reprogramming of cloned felid embryos.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Nucharin Sripunya, Ms. Kwanrudee Keawmungkun and Ms. Wanwisa Phewsoi from Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology for technical assistance. We would also like to express our gratitude to the Nakhon Ratchasima Zoo for providing the marble and leopard cat skin tissues that were used as donor cells in this experiment. This study was supported by Suranaree University of Technology and Thailand Research Fund (MRG-WII495S021)

References

- [1] Gomez, M.C., Jenkins, J.A., Giraldo, A., Harris, R.F., King, A., Dresser, B.L. and Pope, C.E., Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol. Reprod.* 69: 1032-1041, 2003.
- [2] Kitiyanant, Y., Saikhun, J. and Pavasuthipaisit, K., Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology* 59: 1775-86, 2003.



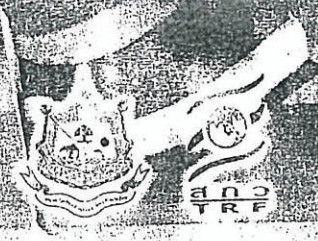
- [3] Wen, D., Yang, C., Cheng, Y., Li, J.S., Liu, Z., Sun, Q., Zang, J., Lei, L., Wu, Y., Kou, Z. and Chen, D., Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloning cat (*Felis catus*) embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 38-45, 2003.
- [4] Shin, T.Y., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L. and Westhusin, M. A., cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859, 2002.
- [5] Gomez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, A., Godke, R.A. and Dresser, B.L., Birth of African wild cat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6: 247-258, 2004.
- [6] Yin, X.J., Lee, Y.H., Seo, Y.I., Jeon, S.J., Choi, E.G., Cho, S.J., Cho, S.G., Min, W., Kang, S.K., Hwang, W.S. and Kong, I.K., Cat cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129: 245-249, 2005.
- [7] Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D.L., Yanagimachi, R., Page, D.C. and Jaenisch, R., Incomplete reactivation of Oct-4-related gene in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130: 1673-1680, 2003.
- [8] Kurosaka, S., Eckardt, S. and McLaughlin, K.J., Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biol. Reprod.* 71(5): 1578-1582, 2004.
- [9] Park, S.H., Shin, M.R. and Kim, N.H., Bovine oocyte cytoplasm supports nuclear remodeling but not reprogramming of murine fibroblast cells. *Mol. Reprod. Dev.* 68(1): 25-34, 2004.
- [10] Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K. and Han, Y.M., Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.* 28(2): 173-177, 2001.
- [11] Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E. and Reik, W., Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13734-13738, 2001.
- [12] Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J. and Viegas-Pequignot, E., Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11: 1542-1546, 2001.
- [13] Young, L.E. and Beaujean, N., DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 61-78, 2004.
- [14] Suteevun, T., Parnpai, R., Smith, S.L., Chang, C.C., Muenthaisong, S. and Tian, X.C., Epigenetic characteristics of cloned and *in vitro*-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *J. Anim. Sci.* 84: 2065-2071, 2006.
- [15] Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W. and Dean, W., Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 13: 1116-1121, 2003.
- [16] Enright, B.P., Sung, L.Y., Chang, C.C., Yang, X. and Tian, X.C. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 72: 944-948, 2005.



เพื่อฉลองโอกาสเฉลิมฉลองพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ
ที่พระชนมพรรษาครบ ๘๐ พรรษา

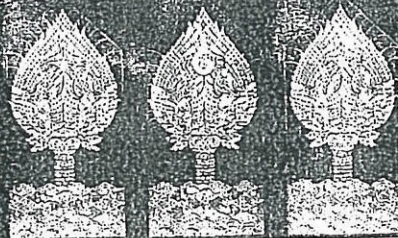
เรื่องเห็นการประชุมาภิชาการ ครั้งที่ ๔๖ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
The Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference

สาขาสัตว์
(Subject: Animals)
สาขาสัตวแพทยศาสตร์
(Subject: Veterinary Medicine)



“เกษตรศาสตร์เกิดพระเกียรติ ๘๐ พรรษา
เพื่อประเทศไทยอยู่เย็นเป็นสุข”

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





10.	สศ.11/O65	ผลของระยะเวลาการพักแปลงเพื่อปล่อยให้เมล็ดร่วงต่อผลผลิตและคุณภาพของถั่วคาวาลเคดในปีที่ 2.....71	71
		Effect of Closing Cut for Reseedling on Forage Yield and Quality of <i>Centrosema pascuorum</i> cv. Cavalcade at Second Year	
		โดย เพ็ญศรี ศรีประสิทธิ์ และเกียรติศักดิ์ กล้าเอม	
11.	สศ.12/O67	การผลิตกระทิงโคลนนิ่งโดยเทคนิคการโคลนนิ่งข้ามชนิด.....78	78
		Production of Cloned Gaur Using Interspecies Cloning Technique	
		โดย นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา ชูติ เหล่าธรรมธร วันวิสาข์ ผิวสร้อย ฤทธิวิวัฒน์ เทวาคูดี อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ วันชัย ต้นวัฒนนะ ธรรมบุญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล และรังสรรค์ พาลพ่าย	
12.	สศ.13/O70	ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย.....85	85
		Birth of Cloned Domestic Cat by Somatic Cell Nuclear Transfer	
		โดย อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชูติ เหล่าธรรมธร ฤทธิวิวัฒน์ เทวาคูดี มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ และรังสรรค์ พาลพ่าย	
13.	สศ.14/O98	ผลการตัดแบ่งและวิธีแช่แข็งต่อคุณภาพตัวอ่อนโคนม.....91	91
		Effect of Biopsy and Freezing Methods on Quality of Dairy Cattle Embryos	
		โดย ดำรงรักษ์ รัทวงศ์ฤทธิ เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข	
14.	สศ.16/O123	การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมและคุณค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะทางเศรษฐกิจบางลักษณะในโคกำแพงแสน.....99	99
		Estimation of Genetic Parameter and Breeding Value for Some Economic Traits in Kamphaeng Saen Beef Cattle	
		โดย กนก เชาวภาณี อมรรัตน์ โมพี และวาณี ชัยวัฒนสิน	
15.	สศ.17/O124	ลักษณะทางพันธุกรรมของสีแข้งในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์เหลืองหางขาว.....107	107
		Genetic of Shank Color in Thai Indigenous Chicken Leunghangkhae	
		โดย อาทิตย์ใหญ่ลา เนมิตร สุขมณี ธีรชัย ช่อไม้ และวรวิทย์ สิริพลวัฒน์	

ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย

Birth of cloned domestic cat by somatic cell nuclear transfer

อนวัช แสงมาลี¹ สุเมธ อิมสุนทรรักษา¹ จันทร์เจ้า ด้อยทองพานิชย์¹ กนกวรรณ ศรีรัตน¹ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา¹
วันวิสาข์ ผิวสร้อย¹ ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ¹ ชุตติ เหล่าธรรมธร¹ ฤทธิวิวัฒน์ เทวาทดี¹
มารีนา เกตุทัต-คาร์นส์¹ และ รังสรรค์ พาลพ่าย¹

Anawat Sangmalee¹, Sumeth Imsoonthornruksa¹, Chanchao Lorthongpanich¹, Kanokwan Srirattana¹,
Nucharin Sripunya¹, Wanwisa Phewsoi¹, Kwanrudee Keawmungkun¹, Chuti Laowtammathron¹,
Retvin Davahudee¹, Mariena Ketudat-Cairns¹, and Rangsun Pampai¹

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาการโคลนนิ่งแมวบ้านโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ โดยนำไข่ของแมวบ้านมาทำการดึงนิวเคลียสออก ด้วย micromanipulator ก่อนทำการฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าแทนที่บริเวณ perivitelline space และเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า จากการทดลองพบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ต้นแบบกับไซโตพลาสซึมของไข่ เท่ากับ 71.6% อัตราการแบ่งตัวและเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งถึงระยะมอรูลาไม่แตกต่างกับตัวอ่อนที่เกิดจาก parthenogenetic activation แต่อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนโคลนนิ่ง (39.2%) สูงกว่าตัวอ่อนที่เกิดจาก parthenogenetic activation (28.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง (286 ตัวอ่อน) ให้กับแมวดำรับ (17 ตัว) ได้แมวดำรับตั้งท้อง 2 ตัว (11.7%) โดยตัวแรกได้ทำการผ่าคลอดในวันที่ 64 ของการตั้งท้อง พบลูกแมวเสียชีวิตในครรภ์ โดยลูกแมวมีอวัยวะครบสมบูรณ์ แต่อวัยวะภายในช่องท้องอยู่นอกร่างกาย ส่วนแมวดำรับตัวที่สองคลอดตามธรรมชาติในวันที่ 56 ของการตั้งท้อง ได้ลูกแมวเกิดมาทั้งหมด 6 ตัว มีเพียง 2 ตัวที่มีการพัฒนาที่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 ตัวเสียชีวิตหลังคลอดที่ 24 ชั่วโมง และ 5 วันตามลำดับ

ABSTRACT

The purpose of this study was to produce cloned cat by somatic cell nuclear transfer using ear fibroblasts as donor cell. Cats oocytes were enucleated by micromanipulator and then inserted a single donor cell into perivitelline space of each oocyte. The inserted oocytes were then fused with electricity. The fusion rate of donor cell and recipient cytoplasm was 71.6%. The cleavage rate and *in vitro* development of reconstructed embryos comparing to embryos derived from parthenogenetic activation were not significantly different. However, the development to blastocyst stage of reconstructed embryos was significantly higher than that of parthenogenetic embryos (39.2% and 28.6%, respectively, $P < 0.05$). The total of 286 reconstructed embryos were transferred to 17 recipients and 2 pregnancies were detected (11.7%). The first pregnant recipient delivered 1 stillborn kitten by C-section at 64 days of pregnancy. The kitten was fully developed but had abdominal wall defect and evisceration of abdominal organs. Another recipient was naturally delivered 6 kittens at 56 days of pregnancy but only 2 had fully development. Both cloned kittens died 24 h and 5 days post natal, respectively.

Key Words: domestic cat, cloning

Anawat Sangmalee: art_vet@hotmail.com

¹ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, SUT

บทนำ

ปัจจุบันมีสัตว์หลายชนิดที่ประสบความสำเร็จในการทำโคลนนิ่ง เช่น แกะ (Wilmut *et al.*, 1997), โค (Cibelli *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1998), แพะ (Baguisi *et al.*, 1999), หนูญี่ปุ่น (Wakayama *et al.*, 1998), สุนัข (Folejaeva *et al.*, 2000; Onishi *et al.*, 2000), แมว (Shin *et al.*, 2002, Yin *et al.*, 2005), กระต่าย (Chesne *et al.*, 2002), ม้า (Gali *et al.*, 2003), หนูขาว (Zhou *et al.*, 2003) และสุนัข (Lee *et al.*, 2005) เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยการทำโคลนนิ่งแมวยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งแมวโคลนนิ่ง ดังนั้น การทดลองนี้จึงทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง และศึกษาการตั้งท้องของแมวบ้านตัวรับ หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างหนังใบหูของแมว ไว้ในน้ำเกลือขณะนำไปห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วนำหนังส่วนที่ลอกออกไปตัดให้มีขนาด 1 x 1 มม. ก่อนนำมาเลี้ยงในน้ำยา Alpha Minimum Essential Medium (α MEM, Sigma, M-7145) + 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air เซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4-5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีจำนวนมากขึ้น นำเซลล์ที่ passage 3 มาแช่แข็งในน้ำยาเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนใช้น้ำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย 0.25% Trypsin / EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

กระตุ้นให้รังไข่แมวบ้านมีไข่ถุงไข่ (follicle) เจริญขึ้นจำนวนมาก ด้วยการฉีดฮอร์โมน equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon, Intervet) ปริมาณ 200 IU. จากนั้น 5 วันทำการเก็บรังไข่ โดยผ่าตัดผ่านทางผนังหน้าท้อง และนำรังไข่ที่ได้ไปกรีดด้วยเข็มฉีดยาขนาด 21G เพื่อแยกไข่ออกจากรังไข่ นำไข่ที่ได้ไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil โดยเลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ l ที่อุณหภูมิ 38°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ นาน 24 ชั่วโมง น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วยน้ำยา TCM 199 ที่เติมด้วย 0.36mM Na Pyruvate, 2.2mM Ca-Lactate, 2.0mM L-Glutamine, 1.13mM Cystein, 0.3% BSA (fatty acid free), 0.5 iu./ml eCG, 1 iu./ml human chorionic gonadotrophin (hCG, Chorulon, Intervet) หลังจากเลี้ยงไข่ครบ 24 ชั่วโมงแล้ว นำมาย่อยเซลล์ด้วย 0.1% Hyaluronidase แล้วจึงคัดเลือกไข่ที่มี first polar body มาดิงนิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ในน้ำยาที่มี 5 μ g/ml cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ทำการตรวจสอบผลสำเร็จการดิงนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดิงออกมาล้อมด้วย 5 mg/ml Hoechst 33342 และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงฟลูออเรสเซนส์

การฉีดเซลล์ต้นแบบและ เซื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ตึงนิวเคลียสออกสำเร็จมาทำการฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ ต่อไข่ 1 ใบเข้าไปในบริเวณ perivitelline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบ ไปวางไว้ระหว่างปลายทั้งสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา 0.3M manitol ที่เติมด้วย 0.1mM MgCl₂ เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Electro Cell Fusion (Voltrain EP-1, Cryologic, Australia) ความแรงไฟฟ้า 30 volt นาน 30 μ sec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emicare holding 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมงจึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา ที่มี 10 μ g/ml cycloheximide และ 1.25 μ g/ml cytochalasin D (CHX+CD) ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

การทำ Parthenogenetic Activation (PA)

นำไข่ที่มี first polar body มากกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี CD+CHX ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา Tyrode's medium (Pope et al., 1999) ที่เติมด้วย 0.3% BSA ในสัดส่วน 10 - 20 ใบ/100 μ l ที่อุณหภูมิ 38°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 38°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเลี้ยงในน้ำยา Tyrode's medium ที่มีการเติม 10% FCS แทน BSA เป็นเวลา 5 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน และบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแม่วัวรับ และการย้ายฝากตัวอ่อน

ใช้แม่วัวพันธุ์เพศเมีย อายุ 10-12 เดือน มาทำเป็นตัวรับ เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยการฉีดฮอร์โมน eCG ปริมาณ 200 iu พร้อมกับแม่วัวให้ไข่ จากนั้น 5 วัน จึงฉีดฮอร์โมน hCG ปริมาณ 200 iu ก่อนนำตัวอ่อนแม่วัวโคลนนิ่งไปย้ายฝากให้กับตัวรับภายหลังจากที่ฉีด hCG ไปแล้ว 48 ชั่วโมง การย้ายฝากตัวอ่อน วางยาสลบแม่วัวรับโดย Atropine-Xylazine-Ketamine ตามขนาดยามาตรฐานในแม่วัว และผ่าตัดเปิดช่องท้อง นำตัวอ่อนแม่วัวโคลนนิ่ง ระยะ 1-8 เซลล์ ไปล้างในน้ำยา Emicare holding 6 ครั้ง แล้วบรรจุตัวอ่อน ในท่อย้ายฝาก (Intratubal Transfer Catheter, COOK) ก่อนนำปลายท่อย้ายฝากสอดผ่านปากแตรเข้าไปในท่อนำไข่ของตัวรับ แล้วจึงปล่อยตัวอ่อนที่ท่อนำไข่ของข้างที่มีไข่ตก จำนวน 14-33 ตัวอ่อน หลังย้ายฝากตัวอ่อน 30 วันทำการตรวจการตั้งท้องด้วยการคลำผ่านหน้าท้อง ร่วมกับการอัลตราซาวด์

การคำนวณค่าทางสถิติ

ในการทดลองนี้ใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่

P<0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์

Table 1 *In vitro* development of cloned domestic cat and parthenogenic activation (PA) embryos

Experiment	Fused (%)	Cleavage (%)	8C (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
Cloned domestic cat	53/81 (71.6)	51/58 (87.9)	41/58 (70.1)	32/51 (62.7)	20/51 ^a (39.2)
PA		70/76 (92.1)	63/76 (82.8)	47/70 (67.1)	20/70 ^b (28.6)

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

จาก Table 1 พบว่าหลังจากนำเซลล์ไฟโบรบลาสจากไขกระดูกของแมวบ้านไปเชื่อมติดกับไซโตพลาสของไข่แมวบ้านที่ดั่งนิวเคลียสออกแล้ว มีอัตราการเชื่อมติด เท่ากับ 71.6% และเมื่อนำอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งมาเทียบกับตัวอ่อนที่เกิดจากการทำ parthenogenic activation พบว่าอัตราการแบ่งตัว หลังจากกระตุ้นด้วยสารเคมี มีค่าไม่แตกต่างกัน (87.9% กับ 92.1% ตามลำดับ) ถึงแม้ว่าอัตราการแบ่งตัวสู่ระยะ 8 เซลล์ และมอรูล่า ของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งจะมีค่าน้อยกว่า ตัวอ่อนที่เกิดจากการทำ parthenogenic activation (70.1% กับ 82.8% และ 62.7% กับ 67.1% ตามลำดับ) แต่ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิส ของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง (39.2%) มีค่าสูงกว่าตัวอ่อนที่เกิดจากการทำ parthenogenic activation (28.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสของไขกระดูก จำนวน 286 ตัวอ่อนให้กับแมวดำรับจำนวน 17 ตัว (เฉลี่ย 17 ตัวอ่อน/ตัวรับ) พบว่าแมวดำรับที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง ตั้งท้องจำนวน 2 ตัว (11.7%) แมวดำรับตัวแรกได้รับการช่วยคลอดโดยวิธีผ่าตัดที่การตั้งท้อง 64 วัน ณ วันที่ 26 พฤศจิกายน 2549 ได้ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเพศผู้จำนวน 1 ตัวเกิดมา แต่ลูกแมวเสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในท้องของแม่ตัวรับ เนื่องจากมีความผิดปกติ คือมีภาวะผนังหน้าท้องปิดไม่สนิท และพบอวัยวะภายในช่องท้องอยู่ภายนอกร่างกายทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบว่า อวัยวะภายในอื่น ๆ มีการพัฒนาครบสมบูรณ์ ส่วนแมวดำรับตัวที่สอง ได้ให้กำเนิดลูกแมวโคลนนิ่งทั้งหมด 6 ตัว ที่การตั้งท้อง 56 วัน โดยการคลอดตามธรรมชาติ ณ วันที่ 21 ธันวาคม 2549 พบว่าลูกแมวทั้งหมด มีอวัยวะภายนอก และภายในปกติสมบูรณ์ แต่มีการพัฒนาที่ระยะแตกต่างกันไป พบลูกแมวที่มีการพัฒนาครบสมบูรณ์ทั้งสิ้น 3 ตัว และรอดชีวิตหลังคลอดเพียง 2 ตัว โดยลูกแมวตัวที่ 1, 4 และ 6 มีการพัฒนาที่ไม่สมบูรณ์ โดยมีน้ำหนักแรกคลอดเป็น 30, 10 และ 21 กรัม ตามลำดับ ซึ่งลูกแมวที่เสียชีวิตนั้นมีอวัยวะภายนอก และภายในปกติสมบูรณ์ (Fig. 1A-B) แต่มีการพัฒนาที่แตกต่างกันไป ส่วนลูกแมวตัวที่ 2, 3 และ 5 มีการพัฒนาที่สมบูรณ์ มีน้ำหนักแรกเกิดเป็น 60, 60 และ 70 กรัมตามลำดับ โดยมีเพียงลูกแมวตัวที่ 3 และ 5 เท่านั้น ที่รอดชีวิต (Fig. 1C) แต่เป็นที่น่าเสียดายว่าลูกแมวทั้ง 2 ตัว เสียชีวิตในเวลาต่อมา โดยลูกแมวตัวที่ 3 เสียชีวิตหลังจากคลอด 24 ชั่วโมง ส่วนลูกแมวตัวที่ 5 มีอาการท้องเสียรุนแรง และเสียชีวิตหลังจากคลอด 5 วัน

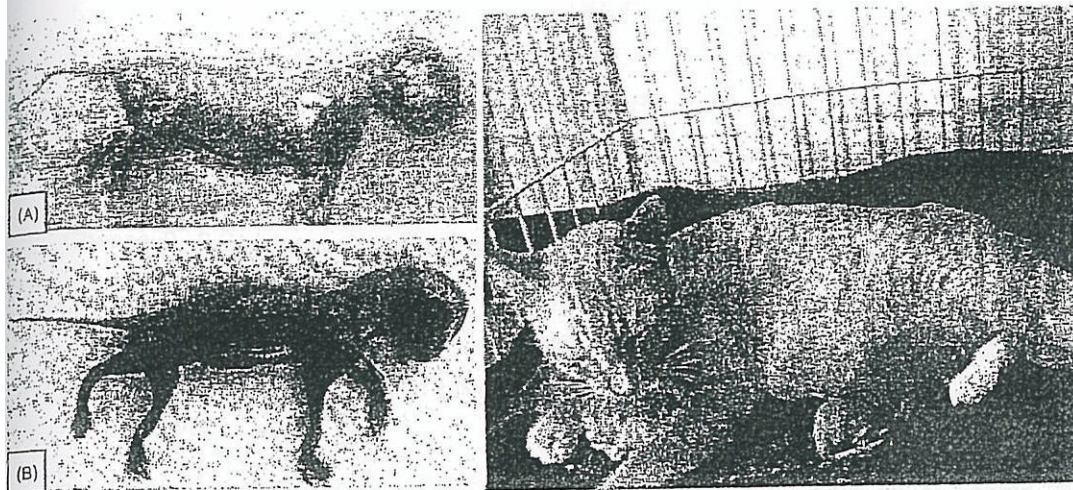


Figure 1 The cloned domestic kittens that died (A and B) and the recipient and both alive kittens (C)

จากการที่ Shin *et al.* (2002) รายงานความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแมวโคลนนิ่งจากเซลล์ตัวผู้สัตว์ นับเป็นการบุกเบิกให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการศึกษาการทำโคลนนิ่งในแมว เพื่อประโยชน์ทางด้านการแพทย์ การค้า หรือ การอนุรักษ์แมวป่าใกล้สูญพันธุ์ (Gómez *et al.*, 2006) จากผลการศึกษาพบว่า อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสของการทดลองนี้ (39.2%) มีค่าสูงกว่าที่เคยมีรายงานมาก่อน (28%; Gómez *et al.*, 2006) แต่อัตราการตั้งท้องของตัวรับ (11.7%) มีค่าใกล้เคียงกัน ระยะเวลาที่แม่ตัวรับตั้งท้อง (56 และ 69 วัน) มีทั้งสั้นกว่าและใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานไว้ (มากกว่า 65 วัน) (Shin *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005, 2007) ส่วนน้ำหนักแรกคลอดของลูกแมวโคลนนิ่งที่เกิดจากการทดลองนี้ (10-70 กรัม) มีค่าต่ำกว่าที่มีรายงานมาก่อน (84-124 กรัม; Yin *et al.*, 2007)

สรุป

การโคลนนิ่งแมวในปัจจุบันยังมีรายงานความสำเร็จต่ำ เนื่องมาจากปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งหนึ่งในนั้นที่สำคัญก็คือ การ reprogramming ของเซลล์ร่างกาย เมื่อนำเข้าไปหลอมรวมกับไซโตพลาสซึมของไข่ โดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าหรือสารเคมี เพื่อให้เกิดกระบวนการ dedifferentiation ใหม่ ถึงแม้ว่าองค์ความรู้ในด้านนี้จนถึงปัจจุบันจะยังมีข้อมูลอยู่น้อยและไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นข้อจำกัดของการทำโคลนนิ่งในแมว แต่อย่างไรก็ตาม เป็นที่เชื่อกันว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมว (Yin *et al.*, 2007) จากความสำเร็จในการให้กำเนิดลูกแมวโคลนนิ่งครั้งนี้ ถือได้เป็นรายงานแรกของประเทศไทย ซึ่งแม้ว่าลูกแมวที่คลอดจะมีสุขภาพไม่แข็งแรง และเสียชีวิตในเวลาต่อมา แต่ผลจากงานวิจัยนี้ สามารถนำมารวบรวมให้เกิดเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนาและการศึกษาในขั้นต่อไป รวมถึงในอนาคตจะสามารถนำความรู้ที่ได้มาช่วยในการอนุรักษ์สัตว์ป่าหายากตระกูลเดียวกับแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ได้อีกเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

- Baguisi, A., E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempes, C. Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom, and Y. Echelard. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17: 456-461.
- Chesne, P., P.G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger and J.P. Renard. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol.* 4:366-369.
- Cibelli, J.B., S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F.A. Ponce de Leon and J.M. Robl. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.
- Galli, C., I. Lagutina, G. Crotti, S. Colleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi and G. Lazzari. 2003. Pregnancy: A cloned foal born to its dam twin. *Nature* 424, 635.
- Gómez, M.C., C.E. Pope and B.L. Dresser. 2006. Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology* 66(1):72-81.
- Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue and Y. Tsunoda. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098.
- Lee, B.C., M.K. Kim, G. Jang, H.J. Oh, F. Yuda, H.J. Kim, M.H. Shamim, J.J. Kim, S.K. Kang, G. Schatten and W.S. Hwang. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436: 641.
- Onishi A, M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada and A.C. Perry. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289: 1188-1190.
- Polejaeva, I.A., S.H. Chen, T.D. Vaught, R.L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dai, J. Boone, S. Walker, D.L. Ayares, A. Colman and K.H. Campbell. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90.
- Pope, C.E., R. Schmid, and B.L. Dresser. 1999. In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition of cystein to the maturation medium and a reduced O₂ atmosphere. *The European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Newsletter.*
- Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons and M. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.
- Wakayama, T., A.C. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson and R. Yanagimachi. 1998. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Yin, X. J., H.S. Lee, Y.H. Lee, Y.I. Seo, S.J. Jeon, E.G. Choi, S.G. Cho, W. Min, S.K. Kang, W.S. Hwang and I.K. Kong. 2000. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129: 245-249.
- Yin, X.J., H.S. Lee, L.H. Kim, H.D. Shin, N.H. Kim and I.K. Kong. 2007. Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology* 67(4):816-23.
- Zhou, Q., J.P. Renard, G. Le Friec, V. Brochard, N. Beaujean, Y. Cherifi, A. Fraichard and J. Cozzi. 2003. Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation. *Science* 302. 1179.

Reproduction, Fertility and Development

Volume 19(1) 2007

Reproduction, Fertility and Development

- 32 Effects of fusion/activation methods on development of embryos produced by nuclear transfer of porcine fetal fibroblasts
P. Q. Cong, E. S. Song, E. S. Kim, Z. H. Li, Y. J. Yi, and C. S. Park 134
- 33 Enucleation of pre-activated mouse oocytes induced by demecolcine, nocodazole, and vinblastine
N. Costa-Borges, J. Santaló, and E. Ibáñez 135
- 34 Piglets born from handmade cloning
Y. Du, Y. Zhang, J. Li, P. M. Kragh, M. Schmidt, I. B. Bøgh, X. Zhang, S. Purup, A. L. Jørgensen, A. M. Pedersen, K. Villemoes, H. Yang, L. Bolund, and G. Vajta 135
- 35 Relationship between the onset of enucleation during meiotic maturation of recipient oocytes and developmental ability of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs
M. Fahrudin, K. Kikuchi, N. W. K. Karja, M. Ozawa, T. Somfai, M. Nakai, K. Ohnuma, J. Noguchi, H. Kaneko, and T. Nagai 136
- 36 Epigenetic modifications of cultured bovine fibroblasts for nuclear transfer
A. M. Giraldo, J. W. Lynn, M. N. Purpera, R. A. Godke, and K. R. Bondioli 136
- 37 Anatomical deviations in apparently healthy, weaned, cloned calves
M. P. Green, M. C. Berg, and R. S. F. Lee 137
- 38 Rabbit nuclear transfer and *in vivo*-fertilized embryos fail to express a mouse Oct-4 promoter-driven EGFP reporter gene
R. Hao, A. Wuensch, R. Klose, E. Wolf, and V. Zakhartchenko 137
- 39 Bovine somatic cell nuclear transfer using cumulus-oocyte complexes collected from the identical individual by ovum pickup
K. Hasegawa, S. Takahashi, S. Akagi, K. Takeda, K. Imai, M. Shimizu, T. Ōkazaki, S. Abe, and Y. Izaike 138
- 40 Treatment of donor cells and its effect on interspecies nuclear transfer
M. A. Hashem, D. P. Bhandari, S. K. Kang, and B. C. Lee 138
- 41 Transmission of a parasite-resistant phenotype from a donor ram to its cloned offspring
J. Hill, W. Chang, R. Davey, K. Hutton, and G. Riding 139
- 42 Prepartum hormonal changes in recipient cows for somatic cell cloned fetuses
H. Hirayama, K. Sawai, S. Moriyasu, S. Kageyama, S. Onoe, M. Hirayama, Y. Goto, E. Kaneko, A. Miyamoto, and A. Minamihashi 139
- 43 Influence of donor cell differentiation on cloning efficiency in pigs
N. Hornen, W. A. Kues, A. Lucas-Hahn, B. Petersen, P. Hassel, and H. Niemann 140
- 44 Nuclear transfer in cattle using somatic cells from frozen testicles without cryoprotectants
Y. Hoshino, N. Kobayashi, N. Hayashi, T. Matsushashi, K. Saeki, S. Ikeda, S. Taniguchi, A. Kasamatsu, D. Iwamoto, Y. Abe, K. Matsumoto, Y. Hosoi, and A. Iritani 140
- 45 Effect of osmolarity in culture medium on the pre-implantation development of porcine NT and IVF embryos
I. S. Hwang, H. J. Moon, J. H. Shim, M. R. Park, D. H. Kim, B. C. Yang, Y. G. Ko, B. S. Yang, H. T. Cheong, and G. S. Im 141
- 46 Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos
S. Imsoonthornruksa, C. Lorthongpanich, K. Srirattana, N. Sripunya, C. Laowtammathron, M. Ketudat-Cairns, and R. Parnpai 141
- 47 Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells
K. Inoue, N. Ogonuki, H. Miki, S. Noda, S. Inoue, K. Katayama, K. Mekada, H. Miyoshi, and A. Ogura 142

and ICM ratio (21.1% and 22.6%), respectively (ANOVA). These results suggest that somatic cells derived from bovine frozen testicles can be used for nuclear transfer. Further studies are needed to examine whether viable cells can be obtained from other frozen organs or tissues.

This study was partially supported by a grant from the Wakayama Prefecture Collaboration of Regional Entities for the Advancement of Technological Excellence, JST.

45 EFFECT OF OSMOLARITY IN CULTURE MEDIUM ON THE PRE-IMPLANTATION DEVELOPMENT OF PORCINE NT AND IVF EMBRYOS

I. S. Hwang^{A,B}, H. J. Moon^A, J. H. Shim^A, M. R. Park^A, D. H. Kim^A, B. C. Yang^A, Y. G. Ko^A, B. S. Yang^A, H. T. Cheong^B, and G. S. Im^A

^ANational Livestock Research Institute, RDA, Suwon, 441-706, Korea;

^BKangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

In vitro production of the pig embryo is very important as an initial step to improve its application in biotechnology. The *in vitro* production system for pig embryos, however, has been plagued by the high incidence of polyspermy and poor embryo quality. The present study was conducted to examine the relationship between apoptosis and osmolarity of culture medium in pre-implantation development of porcine NT and IVF embryos. Oocytes were aspirated from ovaries collected from a local abattoir, and then matured in TCM-199 for 40–44 h. Fresh semen was diluted and equilibrated at 16°C. The final concentration of motile spermatozoa was adjusted to 5×10^5 cells/mL in fertilization medium. Fetal fibroblasts were prepared from a 35-day-old porcine fetus for use as donor cells. The NT and IVF embryos were cultured in PZM-3 supplemented with 0.05 M sucrose or a final concentration of 138 mM NaCl (280–320 mOsmol) for the first 2 days, and then cultured in PZM-3 (250–270 mOsmol) for the remaining days. For the control, NT and IVF embryos were cultured in PZM-3 for whole culture period. After 6 days of culture, the developmental ability of embryos, total cell numbers, ratio of ICM/TE, and apoptosis of cells in blastocysts were examined. The developmental rate to the blastocyst stage of NT embryos was significantly higher ($P < 0.05$) in the sucrose and NaCl groups than in the control [14.7% (21/153) and 21.7% (34/154) vs. 11.5% (18/152), respectively]. Also, the developmental rate to the blastocyst stage after IVF was slightly higher in embryos cultured in the medium supplemented with NaCl than in the control group [21.8% (49/235) and 26.4% (61/237) vs. 18.9% (44/247)]. For apoptosis, both NT and IVF blastocysts produced in the sucrose and NaCl groups showed slightly lower frequency of apoptosis compared to that of the control (2.2% and 2.8% vs. 3.1% for NT; 0.9% and 0.7% vs. 1.1% for IVF). These studies suggest that the high osmolarity in the early embryo culture stage could enhance the *in vitro* development of both porcine NT and IVF embryos to the blastocyst stage and could reduce the apoptosis of cells.

46 EFFECT OF MANIPULATION MEDIUM ON THE DEVELOPMENT OF RECONSTRUCTED DOMESTIC CAT EMBRYOS

S. Imsoonthornruksa, C. Lorthongpanich, K. Srirattana, N. Sripunya, C. Laowtammathron, M. Ketudat-Cairns, and R. Parnpai

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

Domestic cat can serve as a valuable model for assisted reproductive techniques studies of endangered felid species. Therefore, this study was conducted to examine the effect of different manipulation medium on *in vitro* development of reconstructed domestic cat oocytes. The oocytes were recovered by slicing the ovaries of the cats that had been superstimulated with 200 IU eCG (Intervet, Boxmeer, The Netherlands). The procedures for SCNT were described previously (Lorthongpanich *et al.* 2004 Reprod. Fert. Dev. 16, 149 abstr). The manipulation medium for SCNT procedures was evaluated between HEPES-buffered TCM-199 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA) + 10% FBS (199H) and Emcare embryo holding solution (ICPbio, Ltd., Auckland, New Zealand) (Emcare) during the denuding, enucleation, injection, activation, and holding steps. Parthenogenetic activation (PA) embryos were used as a control for both media. There was no significant difference in fusion rate when either 199H (63%) or Emcare (76%) was used. The cleavage, 8-cell, and morulae development rates of SCNT and PA were not significantly different when using either 199H or Emcare (Table 1). However, the blastocyst formation rates of SCNT and PA in Emcare (44% and 29%, respectively) were significantly greater than those of 199H (14% and 18%, respectively; $P < 0.05$). These results indicated that the manipulation medium is important for SCNT blastocyst development.

Table 1. *In vitro* development of cloned domestic cat and parthenogenetic activation of embryos from different manipulation media

Manipulation medium	Experiment	Fused (%)	Cleaved (%)	8-cell (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
199H	SCNT	60/95 (63)	51/60 (85)	33/60 (55)	24/51 (47)	7/51 (14) ^a
	PA	–	61/69 (88)	48/69 (70)	35/61 (57)	11/61 (18) ^a
Emcare	SCNT	70/92 (76)	59/70 (84)	50/70 (71)	40/59 (68)	26/59 (44) ^b
	PA	–	70/76 (92)	63/76 (83)	47/70 (67)	20/70 (29) ^b

^{a,b}Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$; ANOVA).



Asian Reproductive Biotechnology Society



The 4th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society

"Reproductive Biotechnology, Stem Cells
and Regenerative Medicine"

Singapore, November 24-28, 2011



ARBS

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

P 18

EXPRESSION PROFILE OF OCT4 IN PRE-IMPLANTATION EMBRYO OF CLONED ENDANGERED FELID SPECIES

Sumeth IMSOONTHORNROKSA¹, Chanchao LORTHONGPANICH¹,
Anawat SANGMALEE¹, Kanokwan SRIRATTANA¹, Nucharin SRIPUNYA¹,
Kwanrudee KEAWMUNGKUN¹, Wanwisa PHEWSOI¹, Chuti
LAOWTAMMATHRON¹, Wanchai TUNWATTANA², Wachiravit SOMSA³,
Wichit KONGKHAM³, Mariena KETUDAT-CAIRNS¹,
and Rangsun PARNPAI^{1*}

¹Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. ²Khao Kaew Open Zoo, Chonburi 20110, Thailand. ³Nakhon Ratchasima Zoo, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

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

Leopard and marbled cat are members of the felid family and considered to have high risk of extinction. Our previous studies have showed that domestic cat oocytes were able to be used as recipient cytoplasm for leopard cat and marbled cat cloning. The previous results showed that leopard cat cloned embryos could develop to blastocyst stage while marbled cat cloned embryos could not develop beyond morula stage. The expression level of Oct-4 has been suggested as one of many important factors that necessary for survival and development of the embryo. Therefore, the aim of this study was to examine the expression profile of Oct-4 mRNA at 1-, 2-, 4-, 8-cells, morula and blastocyst stages of individual cloned domestic cat embryos comparing with the profiles of leopard and marbled cat embryos which have been cloned using domestic cat oocytes as recipient cytoplasm. The profile of Oct-4 mRNA was analyzed by quantitative real time PCR. The IVF-derived domestic cat embryos were used as control group. In every stage of development, IVF-derived domestic cat and cloned leopard cat embryos showed similar expression profiles of Oct-4. The expression level of Oct-4 increased during development and was highest at blastocyst stage. The result also showed that cloned domestic cat and marbled cat embryos had altered expression patterns comparing to the IVF-derived embryos. The level of Oct-4 was reduced in cloned domestic cat blastocyst and reduced in cloned marbled cat morulae. These results demonstrated that the expression patterns of Oct-4 in cloned felid embryos might have some effects on the *in vitro* developmental efficiency particularly at blastocyst stage. From the result we can concluded that the differences expression pattern of Oct-4 during embryo development could characterized the developmental efficiency of cloned felid embryo.

This study was supported by Suranaree University of Technology and Thailand Research Found (TRF-Master Research Window II Grant).

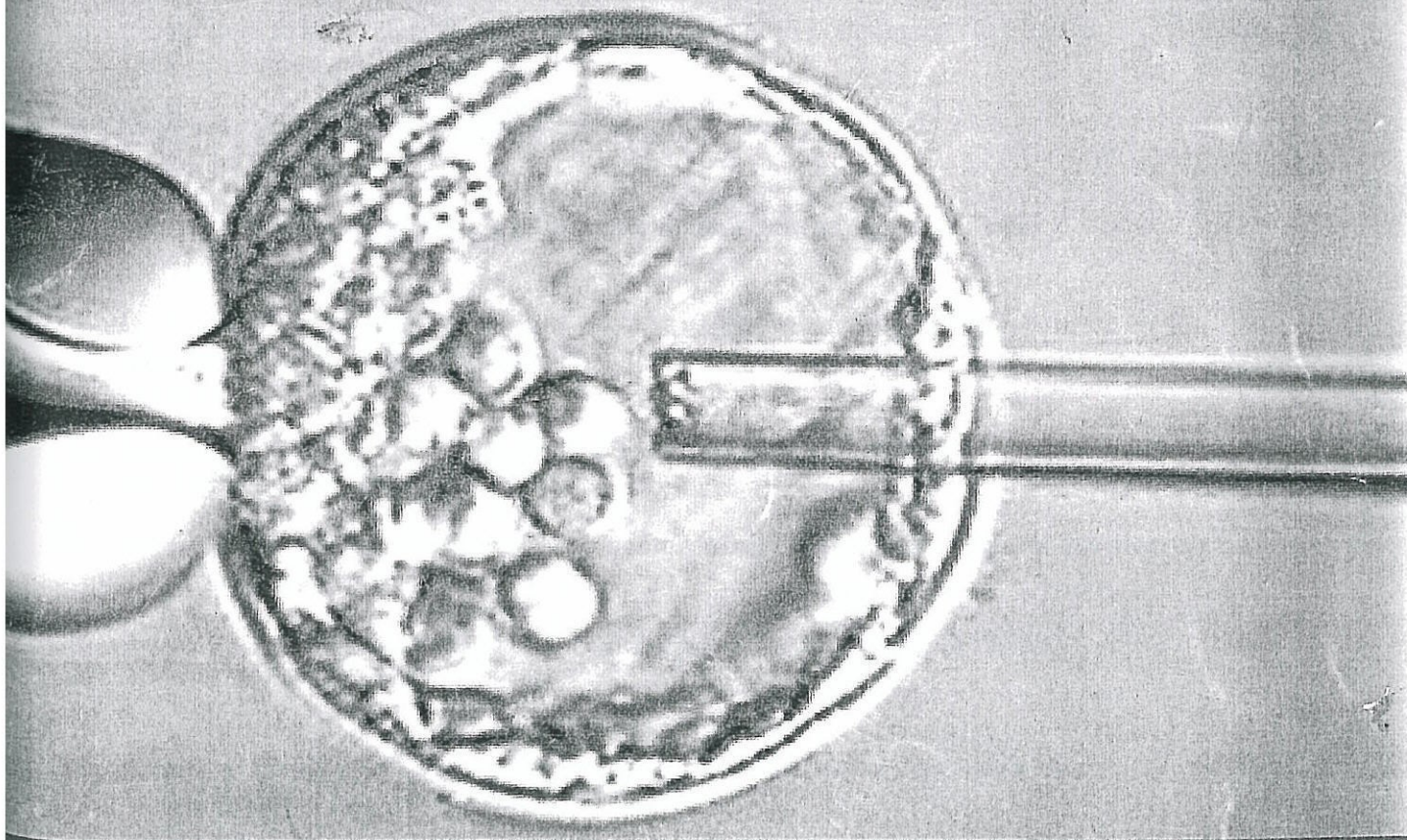
Asian Reproductive Biotechnology Society



**The 3rd Annual Conference of Asian
Reproductive Biotechnology Society**

"Innovation for future life"

Hanoi, Vietnam November 29 – December 3, 2006



**Hosted by the Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan
& Vietnamese Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam**

26. **Effect of synchronization of ovulation with GNRH or HCG on fertility of dairy cow during the hot and the cold period of the year** 147
F. De Rensis
27. **Effects of the addition of chelating agents to freeze-drying buffer for boar spermatozoa on DNA integrity and on developmental ability *in vitro* and *in vivo* after intracytoplasmic sperm head injection** 148
Michiko Nakai
28. **Roles of intracellular CAMP in oocytes or cumulus-oocyte complexes on gap junctional communications and oocyte meiotic maturation in pigs** 149
Manabu Ozawa
29. **Some results in oocyte maturation, spermatozoa capacitation and canine oviductal epithelial cells culture** 150
Quach Tuyet Anh
30. **Inhibition of pentose phosphate pathway by addition of diphenyleneiodonium (DPI) or dehydroepiandrosterone (DHEA) to culture media inhibit reactive oxygen species production during the early cleavage stages of *in vitro* produced porcine embryos** 151
Ni Wayan Kurniani Karja
31. **Asynchronous remodeling of paternal and maternal chromatin in the porcine egg** 153
Gabbine Wee
32. **Maturation competence of growing pig oocytes after short-term growth culture** 154
Thuy Chau Phan
33. **Pronuclear formation following intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: possible role for MAP kinase inactivation** 155
Yong-Xun Jin
34. **Cryopreservation of immature porcine oocytes using open pulled straw vitrification** 156
Sasitorn Rungarunlert
35. **Cryopreservation of bovine embryos by vitrification method** 157
Nguyen Thi Thoa
36. **Vitrification versus slow freezing protocol for human embryo cryopreservation** 158
Dang Quang Vinh
37. ***In vitro* fertilization with cryopressed rat spermatozoa: comparison of semen derived from cauda epididymides and ejaculates** 159
Yasunari Seita
38. **Studying on applying new frozen semen extenders for bull in Vietnam** 160
Dao Duc Tha, Nguyen Van Ly, Vu Ngoc Hieu
39. **Conservation of genetic resources of Ban minipig using intracytoplasmic sperm injection** 161
Dang Nguyen Quang Thanh
40. **Determination Pregnancy Associated Glycoproteins (Pags) In Swamp Buffaloes (Bubalus Bubalis) By Radioimmunoassay** 162
N.V. Hanh
41. **Factors influencing the sow reproductive performance on small-holder farms after implementation of an artificial insemination service** 164
Nutthee Am-In

DEDIFFERENTIATION OF MARBLED CAT (*Pardofelis marmorata*) NUCLEI AFTER RECONSTRUCTED WITH ENUCLEATED DOMESTIC CAT AND BOVINE OOCYTES

Sumeth IMSOONTHORNROKSA¹, Chanchao LORTHONGPANICH¹, Kanokwan SRIRATTANA¹, Nucharin SRIPUNYA¹, Chuti LAOWTAMMATHRON¹, Wanchai TUNWATTANA², Wachiravit SOMSA³, Wichit KONGKHAM³, Kavee KRETAPOL³, Mariena KETUDAT-CAIRNS¹, and Rangsun PARNPAI^{1*}

¹ Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. ² Khao Kaew Open Zoo, Chonburi 20110, Thailand. ³ Nakhon Ratchasima Zoo, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand.

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

Marbled cat is a member of the felid family and considered to be risk of extinction. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has potential to conserve endangered species. This study was carried out to investigate the possibility of using domestic cat and bovine oocytes as recipient cytoplasts marbled cat cloning for marbled cat cloning. The developmental capacity of both recipient cytoplast was also compared. A small piece of marbled cat (MCC), domestic cat (DCC; control) and bovine (BC; control) ear skin were biopsied and cultured *in vitro*. Fibroblasts from the three cell sources were used as donor nuclei. The sources of recipient cytoplasts were domestic cat (DCO) and bovine (BO) oocytes. The SCNT procedures of DCC and BC have been performed as previously report (Lorthongpanich C et al. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004. 16: 149 and Laowtammathron C et al. *Theriogenology* 2005. 64: 1185-1196) The cloned MCC-DCO and DCC-DCO embryos were culture *in vitro* using DCO's culture system and MCC-BO and BC-BO embryos were cultured in BO's culture system, respectively. The MCC-BO blastocysts were stained with 10 µg/ml Hoechst 33342 and the cell nuclei were counted.

Table1. *In vitro* development of cloned marbled cat and bovine embryos after reconstructed with domestic cat and bovine cytoplasts.

Experiment	Fused (%)	Cleaved (%)	8-Cell (%)	Mor (%)	BL (%)
DCC-DCO	78/98 ^a (80)	69/78 ^b (88)	50/78 ^b (64)	27/69 ^a (39)	21/69 ^a (30)
MCC-DCO	76/101 ^a (75)	65/76 ^b (86)	39/76 ^b (51)	16/65 ^b (25)	0/65 ^b (0)
MCC-BO	78/98 ^a (80)	73/78 ^a (94)	64/78 ^a (82)	10/73 ^b (14)	7/73 ^{b*} (10)
BC-BO	95/120 ^a (79)	79/81 ^a (98)	66/81 ^a (81)	36/79 ^a (46)	25/79 ^a (32)

^{a, b} Values with different superscripts indicated the significantly different; P<0.05 (ANOVA)

* Early blastocyst like embryo

The result found that MCC fibroblasts could fused with DCO (75%; 76/101) and BO (80%; 78/98) with no significant different. The cleavage and 8-cell stage rates of MCC-DCO were not significantly different from DCC-DCO but significantly different when compared with MCC-BO and BC-BO, respectively. After staining the MCC-BO blastocysts have about 8 to 16 nuclei. Therefore, we called blastocyst like embryos. These results demonstrated that the early development of cloned marbled cat was influenced by recipient cytoplasts, while the development to blastocyst was donor nucleus specific. The domestic cat and bovine cytoplasts could supported mitotic cleavage of marbled cat nuclei up to morula stage, but were not able to support the development up to blastocyst stage.

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาดพ่าย

- ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาดพ่าย
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai
ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154
ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

4. ประวัติการศึกษา

- | | |
|--|---|
| 4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา | ปีที่จบ 2523 |
| สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา | ประเทศ ไทย |
| 4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา | ปีที่จบ 2525 |
| สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | ประเทศ ไทย |
| Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy
in swamp buffalo. | |
| 4.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction | ปีที่จบ 2541 |
| สถาบัน Kyoto University | ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น) |
| Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells. | |
| 4.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and <i>in vitro</i> fertilization in farm animals.
ด้วยทุน British Council | |
| สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528. | |
| 4.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS) | |

5. ประวัติการทำงาน:

- 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

6. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

- 6.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- 6.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ
- 6.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ
- 6.4 Embryonic stem cells
- 6.5 Cryopreservation of gametes and embryos

7. ผลงานวิจัย

7.1. ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.** 2009. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Domestic Anim.* DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01636.x
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2010. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 613-624.
- Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R.** and Heraud, P: 2010. 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. 2010. Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. *BMC Cell Biology* 11: 12.

- Sripunya, N., Somfai, T., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R.** 2010. 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.** 2010. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 56: 49-54.
- 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. *Ferti. Steril.* 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.

7.2 นำเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ

- Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Takeda, K., Nagai T. and **Parnpai, R.** 2009. Somatic cell nuclear transfer in swamp buffalo. *Proceeding of Buffalo Propagation Conference, 17 December, 2009, Tainan, Taiwan, RPC.*
- Srirattana, K., Takeda, K., Matsukawa, K., Tasai, M., Akagi, S., Nirasawa, K., Nagai, T., Y., Kanai, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2009. Quantitative analysis of mitochondrial DNA in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) interspecies cloned embryos. *Proceeding of the 6th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society conference, 16-20 November, 2009, Siem Reap City, Cambodia.* P.57.
- Parnpai, R.** 2009. Progress of inter-species somatic cell nuclear transfer in bovidae and felidae family. *Proceeding The 7th Asian Symposium on Animal Biotechnology.* Chungbuk National University, Korea, 19 June, 2009.
- Suksawaeng, S. Danna, Y. and **Parnpai, R.** 2009. Heart chicken may able to maintain and induce mice embryonic stem cells to form hepatic plate-like structure. *Proceeding of the 4th World Congress on Regenerative Medicine, 12-14 March 2009, Bangkok, Thailand.* p.174.
- Srirattana K., Laowtammathron C., Devahudi R., Imsoonthornrukka S., Sangmalee A., Tunwattana W., Lorthongpanich C., Sripunya N., Keawmungkun K., Phewsoi W., Ketudat-Cairns M., and **Parnpai R.** 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of inter-species cloned gaur (*Bos gaurus*) embryos. *Proceeding of the Annual Conference of International*

- Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 21: 126.
- Liang Y. Y., Ye D. N., Laowtammathron C., Phermthai T., and **Parnpai R.** 2009. In vitro production of swamp buffalo embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments. Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 21: 230.
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression profile of Oct4 in pre-implantation embryo of cloned endangered felid species. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 89.
- Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Effect of activation treatments on development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 137.
- Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Niches, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2007. Embryonic stem cell establishment from mouse single blastomere. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 112.
- Parnpai, R.** 2007. The progress of interspecies SCNT: Bovidae and felidae cases. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 46.
- Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Birth of cloned goat : a preliminary study for conservation of endangered mountain goat. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 80.

- Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Telomerase activity of in inter-species somatic cell nuclear transfer gaur embryos. Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 130.
- Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 141.
- Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Kumpong, O., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression and distribution of Oct-4 in interspecies-cloned long-tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos. Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 149.
- Parnpai, R.**, Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Muenthaisong, S., and Ketudat Cairns, M. 2006. Recent status of somatic cell nuclear transfer for conservation of endangered species. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 44-47.
- Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Somsa, W., Kongsila, A., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Development of interspecies cloned long tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos after reconstructed with bovine enucleated oocytes and culturing in different condition. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 125-126.
- Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Tangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos taurus*) embryos. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 134-135.

- Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Tanwatana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Differentiation of marbled cat (*Pardofelis marmorata*) nuclei after reconstructed with enucleated domestic cat and bovine oocytes. Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 140.
- Parnpai, R.**, Muenthaisong, S., Suteevun, T., Na-Chiangmai, A., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Sanghuayphrai, N. and Ketudat Cairns, M. 2006. Production of swamp buffalo embryos: Comparison of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer techniques. *Proceeding of the 5th Asian Buffalo Congress*, Naning, China, 18-22 April, 2006, p. 616-620.
- Curchoe, C., Suteevun, T., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Analysis of the expression pattern of the imprinted *IGF2R* gene in cloned cattle. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand.* p 159.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron C., Monson R.L., M. Wiltbank., Sangsitavong S., **Rarnpai R.** and Rutledge, J.J. 2005. Kinetic changes of *in vitro* produced bovine sexed pre-implantation embryos. 2005. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology*, Bangkok, Thailand, 3-4 November, 2005, p.157.
- Sang-ngam, C., Imsoonthornruksa S., Tangthai C., Srirattana, K., Tunwattana, W., Muenthaisong, S., Laowtammathron C., Lorthongpanich, C., Ketudart-cairn, M. and **Parnpai, R.** 2005. Interspecies nuclear transfer using female and male gaur (*Bos gaurus*) skin fibroblasts reconstructed with enucleated bovine oocytes. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand.* p 170.
- Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Expression of chromatin remodeling genes in cloned and IVF swamp buffalo embryos. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand.* p 97-99.
- Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai. R.** 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th*

- International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction*. Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.
- Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, Imsoonthornsuksa, S., Tangthai, C., Sang-ngam, C., Hochi, S., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2005. Developmental potential of parthenogenetic activation of swamp buffalo embryos between fresh and vitrified oocytes. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction*. Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 93-97.
- Parnpai, R.** 2005. Somatic cell nuclear transfer of cattle and buffalo in Thailand. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction*. Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 4-16.
- Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 174.
- Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and **Parnpai, R.** 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference*. Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Wongviriyaya, 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 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference*. Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April 2004. p. 61.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 149.
- Parnpai, R.**, Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., and Hochi, S. 2004. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after

- vitrification and nuclear transfer. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*. Portland, USA, 10-14 January, 2004, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 180-181.
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Somwan, S., Muankatoke, P., Patitung, S. and **Parnpai, R.** 2003. Production of dairy and beef cattle by cloning technology. *Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar and Symposium*. Mie University, Mie, Japan, 21 October 2003. p. 389-393.
- Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi S. and **Parnpai, R.** 2003. Effect of Ficoll in vitrification solution on the post-warmed development of vitrified cloned bovine hatching blastocysts. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 48-51.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Terao, T. Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2003. Developmental potential of cloned swamp buffalo embryo reconstructed with vitrified matured oocytes. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 43-47.
- Parnpai, R.** 2003. Mammalian somatic cell cloning status in Thailand. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present Status and Future Trends*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003, p. 18-26.
- Parnpai, R.** and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*. Auckland, New Zealand, 11-15 January, 2003, Published in *Theriogenology* 59: 279.
- Parnpai, R.,** Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*. Foz Do Iguassu, Brazil, 12-15 January, 2002., Published in *Theriogenology* 57: 443.
- Parnpai, R.,** Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Developmental potential of vitrified cloned swamp buffalo morulae derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the*

International Embryo Transfer Society Conference, Omaha, USA, 13-16 January, 2001, Published in Theriogenology 55: 284.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 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.

7.3 ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

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

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

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒนโนดร พฤทธิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. การย้ายฝากตัวอ่อน (E.T.) ในประเทศไทย. *แก่นเกษตร* 15: 271-280.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ จันทร์เจ้า ลือทองพานิชย์. 2545. แนวทางการโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *วารสารสัตวป่าเมืองไทย.* 10: 82-85.

7.4 นำเสนอในการประชุมระดับชาติ

ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กาญจนา ปัญญาไว ศิวัช สังข์ศรีทวงษ์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2553. ผลของโกรทแฟกเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กภายนอกในร่างกายในกระบือปลัด: การศึกษาเบื้องต้น. *การประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 11 ประจำปี 2553 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.* หน้า 309-313.

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กาญจนา ปัญญาไว วันวิสาข์ ผิวสร้อย กนกวรรณ ศรีรัตนานา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2553. อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้วของไข่อ่อนโคหลังจากแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Solid Surface Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 สาขาสัตวแพทยศาสตร์.* กรุงเทพฯ, หน้า 103-108.

วันวิสาข์ ผิวสร้อย กนกวรรณ ศรีรัตนานา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กาญจนา ปัญญาไว และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2553. อัตราการเจริญของตัวอ่อนช้างที่ได้จากการโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ*

ประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ, หน้า 238-245.

หยวนหยวน เหลียง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2553. อัตราการรอดของไข่สุกกระบือปลักที่ผ่านการ vitrification ด้วยวิธี Microdrop และ Cryotop และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนภายหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าในไซโตพลาสซึม. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 95-102.

กนกวรรณ ศรีรัตน สุมเมธ อิมสุนทรรักษา ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ลือทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิวิทย์ เทวาทูดี อนวัช แสงมาลี วันชัย ต้นวัฒนะ วชิรวิทย์ สมสา มารินา เกตุทัต-คาร์เนต และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2552. ผลของ Trichostatin A ต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและตัวอ่อนกระตังโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 2 สาขาสัตว*. กรุงเทพฯ, หน้า 10-16.

ชูติ เหล่าธรรมธร กนกวรรณ ศรีรัตน อนวัช แสงมาลี สุมเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ลือทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิวิทย์ เทวาทูดี ธรรมบุญทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์เนต และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2552. ลูกโคโคลนนิ่งเกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification แบบหยด. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 2 สาขาสัตว*. กรุงเทพฯ, หน้า 99-105.

หยวนหยวน เหลียง อนวัช แสงมาลี สุมเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ลือทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตน นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชูติ เหล่าธรรมธรรดา นาเย มารินา เกตุทัต-คาร์เนต และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2552. ผลของการใช้สารเคมีกระตุ้นการแบ่งตัวต่อการพัฒนาของตัวอ่อนกระบือภายหลังการ ICSI. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 78-86.

อนวัช แสงมาลี สุมเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ลือทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตน นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชูติ เหล่าธรรมธร ฤทธิวิทย์ เทวาทูดี มารินา เกตุทัต-คาร์เนต และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2552. ผลของเซลล์ต้นแบบต่อประสิทธิภาพและคุณภาพของตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์*. กรุงเทพฯ, หน้า 87-94.

สุเมธ อิมสูนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา ชูติ เหล่าธรรมธร มาริษา เกตุทัต-คาร์เนล และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2551. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ nuclear reprogramming ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์โคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย*. มหาสารคาม, หน้า 292-297.

กาญจนา ธรรมนู วราภรณ์ ตัณฑนุช จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2551. การศึกษาตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสของหนูเม้าส์ด้วยวิธี synchrotron infrared microspectroscopic mappings และ focal plane array imaging. *เรื่องเต็มการการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย*. มหาสารคาม, หน้า 131.

สุรัชย์ รัตนสุข รั้งสรรค พาลพ่าย และ มาริษา เกตุทัต-คาร์เนล. 2551. การเปรียบเทียบไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบเพศของโค. *เรื่องเต็มการการประชุมวิชาการระดับนานาชาติสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย*. มหาสารคาม, หน้า 184.

ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิมสูนทรรักษา ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย อนวัช แสงมาลี ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี รุ่ง จันทาบุญ มาริษา เกตุทัต-คาร์เนล และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2551. การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว*. กรุงเทพฯ, หน้า 25-30.

นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา ชูติ เหล่าธรรมธร วันวิสาข์ ผิวสร้อย ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิมสูนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มาริษา เกตุทัต-คาร์เนล วันชัย ต้นวัฒนะ ธรรมนู 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 อิมสูนทรรักษา ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี มาริษา เกตุทัต-คาร์เนล และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2551. ลูกแพะเกิดจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว*. กรุงเทพฯ, หน้า 19-24.

อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิมสูนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชูติ เหล่าธรรมธร ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี มาริษา เกตุทัต-คาร์เนล และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2551. ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำ

ย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 85-90.*

สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ วันวิสาข์ ผิวสร้อย ชูติ เหล่าธรรมธร วันชัย ต้นวัฒนะ วชิรวิทย์ สมสา วิจิต กองคำ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2551. การแสดงออกของ ยีน *Oct4* ในตัวอ่อนโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 344-348.

ชูติ เหล่าธรรมธร กนกวรรณ ศรีรัตนา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ฤทธิวิทย์ เทวาหุติ อนวัช แสงมาลี ธรรมบุญ ทองประไพ โขชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2551. ผลของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีอื่นๆ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 349-352.

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ แขงชวี หยาง คาโรลิน่า เพียโทรสกา-นิชชี แอนโทนี ชาง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2551. การทดสอบสารเคมีที่มีผลต่ออัตราการความสำเร็จของการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนจากเซลล์ตัวอ่อนก่อนระยะฝังตัว. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 340-343.

อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2551. ความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งแพะและความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์เลี้ยงผา. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 332-335.

กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิมสุนทรรักษา วันชัย ต้นวัฒนะ จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ วันวิสาข์ ผิวสร้อย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2551. การเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์เทโลเมอเรสในตัวอ่อนกระทั่งโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4* ขอนแก่น, หน้า 336-339.

ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ธรรมบุญ ทองประไพ โขชัย ชัยมงคล มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2550. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและอัตราการพัฒนาในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคนม โดยใช้ไข่เชื้อ

โคนมแช่แข็งจากพ่อโค 5 ตัว. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 245-250.*

สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ลือทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนานุชจรินทร์ ศรีปัญญา อนวัช แสงมาลี รุ่ง จันทาบุญ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รัชสรณ์ พาลพ่าย. 2550. อัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคบราห์มันแช่แข็งแบบย้ายฝากโดยตรง หรือการล้างตัวอ่อนแบบ 3 ขั้นตอนก่อนนำไปย้ายฝาก. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 260-265*

ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ลือทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา กนกวรรณ ศรีรัตนาศิวสังข์ศรีทวงษ์ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รัชสรณ์ พาลพ่าย. 2549. การผลิตตัวอ่อนแยกเพศโคที่ปฏิสนธิในหลอดแก้ว. *การประชุมสัมมนาปริญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 47. น่าน, หน้า 7.*

สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันทรเจ้า ลือทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนานุชจรินทร์ ศรีปัญญา ชูติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รัชสรณ์ พาลพ่าย. 2549. อิทธิพลของขนาดการฟักออกจากเปลือก ต่ออัตราการรอดชีวิตหลังจากแช่แข็งแบบ vitrification ของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง. *การประชุมสัมมนาปริญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 47. น่าน, หน้า 59.*

กนกวรรณ ศรีรัตนานุชจรินทร์ ลือทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา ชมพูนุท แดงไทย ชูติ เหล่าธรรมธร มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รัชสรณ์ พาลพ่าย. 2549. ผลของเซลล์ต้นแบบต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระปือปลักโคลนนิ่ง. *การประชุมสัมมนาปริญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 47. น่าน, หน้า 47-48.*

ธวัชชัย เวชยันต์ ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ลือทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุรียา กิจสำเร็จ และ รัชสรณ์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสตาบของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ลือทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ธวัชชัย เวชยันต์ มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิจิ โสชิ และ รัชสรณ์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระปือปลัก Parthenogenetic activation จากโอโอไซท์สดและโอโอไซท์แช่แข็งโดยวิธี Vitrification. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ มทส และความร่วมมือด้านการพัฒนาทีมงานวิจัยในเครือข่ายอุดมศึกษานครราชสีมา, ประจำปี 2548. หน้า 37-39.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ทัสสุมา เทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ โจ้วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ ซินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนกระปือปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrifaction. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 59-66.*

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

จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ซินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2547. การเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนควายโคลนนิ่งหลังจากการแช่แข็งไข่โดยวิธี Vitrifaction. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 83-87.*

จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ วัชระ วงศ์วิริยะ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2547. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังแมวขาวเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตวแพทย. กรุงเทพฯ, หน้า 351-355.*

ชูติ เหล่าธรรมธร ทัสสุมา เทราโอ จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ ซินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรค พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก Vitrifaction. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.*

รั้งสรรค พาลพ่าย ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาดิตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.*

รั้งสรรค พาลพ่าย ธวัชชัย เวชยันต์ ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ปิยมาศ การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาดิตัง สมบัติ ศิริ อุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *บทความย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่อง กลุ่มงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547. หน้า 29.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ทิศสุมาเทราโอ ธวัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2547. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *บทความวิจัยการสัมมนาเรื่องกลุ่มงานวิจัยในภาคอุดมศึกษานครราชสีมา ปี 2547*. หน้า 26.

จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง วัชรระ วงษ์วิริยะ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวดาว (*Felis bengalensis*) ข้ามชนิดโดยใช้ไข่แมวบ้าน (*Felis catus*) เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน*. พิษณุโลก, หน้า 112-115.

จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมว โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาวิทยาศาสตร์* กรุงเทพฯ, หน้า 84-88.

ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การทดสอบการผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ มทส และความร่วมมือด้านงานวิจัยในภาคอุดมศึกษา นครราชสีมา ประจำปี 2546*. หน้า 54-55.

8. การเขียนตำราหนังสือ

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

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

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

รังสรรค์ พาดพ่าย 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. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อน โคนมจนประสบความสำเร็จ ได้ลูกแฝด โคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

9.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

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

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

9.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือข่ายเนชั่น

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

10. การจดสิทธิบัตร

10.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชั้น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายเดช แสงเพชร งามชัยภูมิ ป๋องภัยรี มีสมบัติ สมิง เต็มพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือนเมษายน 2550

10.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชั้น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายเดช แสงเพชร งามชัยภูมิ ป๋องภัยรี มีสมบัติ สมิง เต็มพรมราช ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรรัมย์ “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 β -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, Mophology and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, หัวหน้า
โครงการ CP 2004

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

- Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsarellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*) Proceeding of the 10th 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 β -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 β -glucosidase production by *Pichia pastoris* in stirred and air-lift bioreactor. Proceeding the 14th 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 14th 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 14th 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. Gultinan (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 5th 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

นายสัตวแพทย์ อนวัช แสงมาลี

1. ชื่อ (ภาษาไทย): นาย. อนวัช แสงมาลี

(ภาษาอังกฤษ): Mr. Anawat Sangmalee

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2502 00123 59 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษาปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด

111 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224 154 โทรสาร 044-223 285

ที่อยู่บ้าน: 250/1 หมู่ 6 หมู่บ้านสุรสวัสดิ์แลนด์ ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

E-mail: anawat.vet@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา สัตวแพทยศาสตร์

ปีที่จบ 2548

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศไทย

5.2 ประกาศนียบัตรบัณฑิตศึกษา หลักสูตร โรคและการจัดการสุขภาพในฟาร์มโคนม ปีที่จบ 2549

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ :

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย - ไม่มี -

7.2 ผู้ร่วมวิจัย