การผลิตสัตว์โดยเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียส : จากอดีตถึงปัจจุบัน

Animal Production by Nuclear Transfer Technology : From Past to Present

อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์[1*] และ ปริวรรต พูลเพิ่ม[1]

Anuchai Pinyopummin[1] and Pariwat Poolperm[1]*

ABSTRACTS

Animal production using nuclear transfer technology has been studied for over 15 years since the first nuclear transferred lamb was produced using embryonic cell as donor in 1986. The birth of "Dolly" in 1997 brought all interests to this technology since it was produced by the transfer of somatic cell nucleus. In the beginning, the objective of the technology was to produce animals with superior genetics. However, the technique had low productivity and high cost of production, so it has been used to produce transgenic animals instead. Nonetheless, the further studies on factors affecting success rate are required. This review concluded not only the nuclear transfer technology in several species using embryonic cells and somatic cells as donor, but also the development of the technique from past to present.

Key words : nuclear transfer, embryonic cells, somatic cells

บทคัดย่อ

การผลิตสัตว์โดยเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียส มีการศึกษากันมาเป็นเวลามากกว่า 15 ปีนับตั้งแต่รายงานการเกิดลูกแกะตัวแรกในปี พ.ศ.2529 ซึ่งใช้เซลล์ตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ ต่อมาการเกิดของลูกแกะที่ชื่อว่า "ดอลลี่" ในปี พ.ศ.2540 เป็นความก้าวหน้าครั้งสำคัญยิ่งของเทคโนโลยีนี้ เนื่องจากเป็นการใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ จุดประสงค์เริ่มแรกของการใช้เทคโนโลยีนี้คือเพื่อการผลิตสัตว์ที่มีลักษณะดีเด่น แต่อัตราความสำเร็จในการผลิตสัตว์โดยวิธีนี้ค่อนข้างต่ำและไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ จึงมีการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ในการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งมีโอกาสให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่า อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่จะช่วยเพิ่มโอกาสประสบความสำเร็จของเทคโนโลยีนี้ต่อไป บทความนี้ได้รวบรวมการศึกษาเทคโนโลยีนี้ในสัตว์ชนิดต่างๆ ทั้งที่ใช้เซลล์ตัวอ่อนและเซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ รวมทั้งวิธีการที่มีการพัฒนาจากอดีตมาจนถึงปัจจุบัน

คำสำคัญ : การถ่ายฝากนิวเคลียส เซลล์ตัวอ่อน เซลล์ร่างกาย

บทนำ

การผลิตสัตว์โดยการโคลน (cloning) หมายถึงการผลิตสัตว์ที่มีพันธุกรรมเหมือนกับสัตว์ต้นแบบ แต่สัตว์ที่เกิดจากการโคลนซึ่งกล่าวถึงกันในปัจจุบันนั้นมีแต่สารพันธุกรรมที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์เท่านั้นที่เหมือนกับสัตว์ต้นแบบ โดยสารพันธุกรรมที่ไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA; mtDNA) จะไม่เหมือนกับสัตว์ต้นแบบ โดยส่วนนี้จะมาจากไซโทพลาสซึมของไข่ (oocyte) ที่ใช้ (Meirelles *et al.*, 2001; St John, 2002) และยังพบ mtDNA จากสัตว์ที่เป็นตัวตั้งท้อง (recipient) ในเลือดของลูกอ่อน (fetus) ที่เกิด

[1] ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Obstetrics, Gynaecology and Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphangsaen Campus, Nakorn Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author : Tel. 0 - 3428 - 1053 - 6, 0 - 3428 - 2264, Fax. 0 - 3435 - 1878, E- mail address : fvetacp@ku.ac.th

โดยวิธีดังกล่าว (Hiendleder *et al*., 2003) แต่ดูเหมือนว่าคำว่า "โคลน" จะถูกนำไปใช้และเป็นที่รู้จักมากกว่าคำว่า "การถ่ายฝากนิวเคลียส (nuclear transplantation หรือ nuclear transfer)" ซึ่งเป็นคำที่ใช้กันแต่เดิมและมีความถูกต้อง ในบทความนี้ขอย้อนกลับไปใช้คำว่า "การถ่ายฝากนิวเคลียส" ซึ่งเป็นคำที่ใช้กล่าวถึงเทคโนโลยีนี้ที่ทำให้เกิดลูกสัตว์ตัวแรกคือ แกะ ในปี พ.ศ. 2529 (Willadsen, 1986) จากการใช้เซลล์ตัวอ่อน (embryonic cells) เป็นเซลล์ต้นแบบ และต่อมาการเกิดของลูกสัตว์ตัวแรกที่ใช้เซลล์ร่างกาย (somatic cell) เป็นเซลล์ต้นแบบซึ่งคือ แกะอีกเช่นกัน ในปี พ.ศ. 2540 (Wilmut *et al*., 1997) อย่างไรก็ตามลูกสัตว์ที่เกิดจากการโคลนอย่างแท้จริง สามารถเกิดขึ้นได้เช่นกัน โดยมีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ คือในกรณีของการเกิดแฝดแท้ (identical twin) และที่เกิดโดยเทคโนโลยีการแบ่งตัวอ่อน (embryo splitting) ซึ่งสามารถแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 2-8 ส่วน และแต่ละส่วนสามารถพัฒนาไปเป็นลูกสัตว์ได้ โดยลูกสัตว์ที่เกิดจากการแบ่งตัวอ่อนเป็น 2 ส่วน มีรายงานในหนูเมาส์ หนูแรท กระต่าย แพะ แกะ โค ม้า ลิง ที่เกิดจากการแบ่งตัวอ่อนเป็น 4 ส่วน มีรายงานในกระต่าย แกะ สุกร โค ม้า และที่เกิดจากการแบ่งตัวอ่อนเป็น 8 ส่วน มีรายงานในกระต่าย แกะ และสุกร (อ้างใน Loskutoff *et al*., 1993; Mitalipov *et al*., 2002a) ทั้งนี้ความสามารถของตัวอ่อนที่ถูกแบ่งในการพัฒนาไปเป็นลูกสัตว์จะขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ โดยถ้าเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวลูก (inner cell mass, ICM) และเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นรก (trophoblast) มีจำนวนเซลล์น้อยเกินไป ตัวอ่อนนั้นจะไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการแบ่งตัวอ่อน การถ่ายฝากนิวเคลียสไม่มีข้อจำกัดในส่วนนี้ แต่มีข้อจำกัดในส่วนของการทำงานของนิวเคลียสที่ถ่ายฝาก ซึ่งส่วนใหญ่ไม่สามารถทำงานได้เหมือนนิวเคลียสของตัวอ่อนปกติ ทำให้ตัวอ่อนที่ได้พัฒนาต่อไปไม่ได้ (Han *et al*., 2003; Miyoshi *et al*., 2003; Rideout *et al*., 2001; Shiota and Yanagimachi, 2002)

ทำไมจึงต้องผลิตสัตว์โดยการถ่ายฝากนิวเคลียส

จุดประสงค์เดิมของการใช้เทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียสคือ การเพิ่มจำนวนสัตว์ที่มีลักษณะดีเด่นตามต้องการอย่างรวดเร็ว โดยการใช้นิวเคลียสมาจากสัตว์ต้นแบบที่ดีเด่นมาผลิตตัวอ่อน แล้วทำการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) ให้แก่สัตว์ที่เป็นตัวตั้งท้อง ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนลูกที่มีลักษณะดีเด่นได้อย่างรวดเร็ว แต่เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการผลิตสัตว์โดยวิธีนี้มีน้อยมาก (Table 1, 2) ทำให้จุดประสงค์ดังกล่าวไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ (Cross, 1989; Stice *et al*., 1998; Wolf *et al*., 1998) อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีนี้ สามารถนำไปใช้ในการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic animals) (Schnieke *et al*., 1997) และมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการแบบเดิม ซึ่งทำโดยการฉีดสารพันธุกรรมเข้าไปโปรนิวเคลียสของตัวอ่อน (pronuclear microinjection) โดยเป้าหมายในการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมนั้นได้แก่ การทำให้สัตว์สามารถผลิตโปรตีนสำหรับใช้รักษาโรคหรือเป็นแหล่งให้อวัยวะสำหรับเปลี่ยนถ่ายให้มนุษย์ ทำให้สัตว์มีความต้านทานโรคมากขึ้น ให้ผลผลิตตามคุณลักษณะที่ต้องการได้มากขึ้น และเป็นตัวอย่างสำหรับการศึกษาโรคในคน (Wall *et al*., 1997; Rudolph, 1999; Piedrahita, 2000; Houdebine, 2002; Prather *et al*., 2003) นอกจากการใช้เทคโนโลยีนี้เพื่อผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมแล้ว อาจพิจารณานำไปใช้ในการผลิตสัตว์ป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (Lanza *et al*., 2000; Loi *et al*., 2001) หรือเพื่อผลิตตัวอ่อนมนุษย์สำหรับให้เซลล์เริ่มต้นที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ต่างๆ ของร่างกาย (embryonic stem cells, ES cells) ซึ่งสามารถนำไปทดแทนเซลล์ที่ผิดปกติ (therapeutic cloning) อย่างไรก็ตาม จุดประสงค์นี้ยังคงเป็นที่ถกเถียงเกี่ยวกับด้านจริยธรรม (Colman and Kind, 2000; Nippert, 2002)

เซลล์ต้นแบบที่ใช้ในการถ่ายฝากนิวเคลียส

เซลล์ต้นแบบที่ใช้สำหรับถ่ายฝากนิวเคลียส แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เซลล์ตัวอ่อนและเซลล์ร่างกาย (Table 1, 2) เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการผลิตสัตว์โดยวิธีนี้มีน้อย ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าเซลล์กลุ่มใดให้ผลดีกว่ากัน แต่การใช้เซลล์ตัวอ่อนอาจมีโอกาสที่จะประสบผลสำเร็จมากกว่า (Wakayama *et al*., 1999; Bortvin *et al*., 2003) อย่างไรก็ตามในการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม สามารถเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มได้เช่นเดียวกัน เช่น ในกรณีของเซลล์ตัวอ่อน สามารถใช้ ES cell (Ono *et al*., 2001a) และในกรณีของเซลล์ร่างกาย สามารถใช้เซลล์ fetal fibroblast (Schnieke *et al*., 1997) หรือเซลล์ skin fibroblast (Bondioli *et al*., 2001) เป็นต้น

Table 1. Efficiency of nuclear transfer in different species using embryonic cells as nuclear donors

Species	Donor cell type	Blastocysts/ fused embryos (%)	Live births /transferred (%)	Reference
Sheep	8-cell	8/24 (33)	3/4 (75)	Willadsen, 1986
	l16-cell	13/49 (27)	3/14 (21)[a]	Smith and Wilmut, 1989
	Embryonic stem cell	34/244 (14)	5/34 (14)	Campbell *et al*., 1996
Cattle	1-cell	5/38 (13)	2/2 (100)	Robl *et al*., 1987
	9-16-cell	8/50 (16)	2/7 (28)	Prather *et al*., 1987
	Morula	152/641 (24)	9/59 (15)	Chesne *et al*., 1993
	Inner cell mass	30/629 (5)	2/26 (8)	Keefer *et al*., 1994
	Embryonic stem cell	109/406 (27)	4/34 (12)	Sims and First, 1994
Rabbit	8-cell	NA	6/164 (4)[b]	Stice and Robl, 1988
	8-16-cell	NA	23/110 (21)[c]	Collas *et al*., 1990
	Morula	NA	8/243 (3)[c]	Yang *et al*., 1992
Mouse	2-cell	20/88 (23)	3/20 (15)	Kono *et al*., 1991a
	4-cell	84/118 (71)	18/61 (30)	Kono *et al*., 1991b
	8-cell	18/39 (46)	3/17 (18)	Cheong *et al*., 1993
	Morula	8/46 (17)	2/8 (25)	Tsunoda *et al*., 1997
	Inner cell mass	23/36 (64)	2/18 (11)	Tsunoda *et al*., 1998
	Trophectoderm	16/26 (62)	2/25 (8)	Tsunoda *et al*., 1998
	Embryonic stem cell	312/1087 (29)	26/312 (8)	Wakayama *et al*., 1999
Pig	4-cell	7/83 (8)	1/34 (3)	Prather *et al*., 1989
Goat	Morula	18/57 (31)	45/141 (31)	Yong and Yuqiang, 1998
Monkey	8-cell	53/101 (52)	2/53 (4)	Meng *et al*., 1997
Fish	Blastula	203/291 (70)	7/203 (3)[d]	Wakamatsu *et al*., 2001

NA : not available

[a] included one lamb which died at 130 days gestation due to clostridial infection of a recipient ewe

[b] six full-term offspring from total 164 manipulated eggs

[c] transferred at 2-4 cell-stage

[d] hatched embryos

Table 2. Efficiency of nuclear transfer in different species using fetal and adult somatic cells as nuclear donors

Species	Donor cell type	Blastocysts/fused embryos (%)	Live births /transferred (%)	Reference
Sheep	Fetal fibroblast	34/172 (20)	2/34 (6)	Wilmut *et al*., 1997
	Adult mammary epithelium	29/277 (10)	1/29 (3)	Wilmut *et al*., 1997
Mouse	Fetal gonadal cell (ovary)	108/150 (72)	4/108 (4)	Wakayama and Yanagimachi, 2001
	Fetal gonadal cell (testis)	114/176 (65)	2/112 (2)	Wakayama and Yanagimachi, 2001
	Fetal fibroblast	278/938 (30)	5/272 (2)	Ono *et al*., 2001b
	Fetal neural cell	32/83 (38)	5/32 (16)	Yamazaki *et al*., 2001
	Newborn Sertoli cell	297/1189 (25)	7/215 (3)	Ogura *et al*., 2000
	Adult fibroblast (tail tip)	(50-58)	3/274 (1) [a]	Wakayama and Yanagimachi, 1999
	Adult cumulus	378/625 (60)	31/1385 (2)[a]	Wakayama *et al*., 1998
	Adult Sertoli cell	63/159 (40)	1/59 (2)[b]	Wakayama *et al*., 1998
	Adult neurons	50/223 (22)	0/46 (0)	Wakayama *et al*., 1998
	Adult spleen	19/87 (22)	0/19 (0)	Wakayama and Yanagimachi, 2001
	Adult macrophanges	83/296 (28)	0/77 (0)	Wakayama and Yanagimachi, 2001
	Adult thymus	5/226 (2)	NA	Wakayama and Yanagimachi, 2001
Rat	Fetal fibroblast	1/7 (14)	NA	Hayes *et al*., 2001
	Adult cumulus	32/193 (16)	0/269 (0)	Hayes *et al*., 2001
Cattle	Fetal fibroblast	33/276 (12)	4/28 (14)	Cibelli *et al*., 1998
	Fetal germ cell	53/140 (38)	1/20 (5)	Zakhartchenko *et al*., 1999a
	Newborn skin	43/123 (35)	2/10 (20)	Kato *et al*., 2000
	Newborn liver	6/24 (25)	2/5 (40)[c]	Kato *et al*., 2000
	Adult fibroblast (ear skin)	49/82 (60)	1/16 (6)	Zakhartchenko *et al*., 1999b
	Adult mammary epithelium	36/140 (26)	1/4 (25)	Zakhartchenko *et al*., 1999b
	Adult mural granulosa	208/412 (50)	2/22 (9)	Wells *et al*., 1998
	Adult leukocyte	60/316 (19)	1/19 (5)	Galli *et al*., 1999
	Adult muscle	73/346 (21)	4/26 (15)	Shiga *et al*., 1999
	Adult oviduct epithelium	19/45 (42)	1/3 (33)	Kato *et al*., 2000
	Adult cumulus	55/100 (55)	2/14 (14)	Kato *et al*., 2000
	Adult uterine epithelium	51/98 (52)	2/14 (14)[d]	Kato *et al*., 2000
Goat	Fetal fibroblast	89/230 (39)	3/85 (3)	Baguisi *et al*., 1999
	Adult cumulus	22/66 (33)	3/234 (1)[e]	Zou *et al*., 2001
	Adult granulosa	NA	7/91 (8)[f]	Keefer *et al*., 2002

Table 2. (cont.) Efficiency of nuclear transfer in different species using fetal and adult somatic cells as nuclear donors

Species	Donor cell type	Blastocysts/ fused embryos (%)	Live births /transferred (%)	Reference
Pig	Fetal fibroblast	188/210 (90)	1/110 (1)	Onishi *et al*., 2000
	Fetal genital ridge	NA	2/164 (1)	Betthauser *et al*., 2000
	Adult granulosa	NA	5/401 (1)	Polejaeva *et al*., 2000
	Adult fibroblast (ear skin)	NA	2/168 (1)	Bondioli *et al*., 2001
Rabbit	Fetal fibroblast	37/97 (38)	0/653 (0)	Li *et al*., 2002
	Fetal germ cell (male)	8/130 (6)	0/62 (0)	Moens *et al*., 1996
	Fetal germ cell (female)	4/271 (1)	0/73 (0)	Moens *et al*., 1996
	Adult fibroblast (ear skin)	17/130 (13)	0/402 (0)	Dinnyes *et al*., 2001
	Adult cumulus	135/287 (47)	6/371 (2)	Chesne *et al*., 2002
Cat	Adult fibroblast (oral mucosa)	NA	0/84 (0)	Shin *et al*., 2002
	Adult cumulus	NA	1/3 (33)	Shin *et al*., 2002
Mule	Fetal fibroblast	NA	0/195 (0)	Woods *et al*., 2002
Guar	Adult fibroblast (skin)	81/692 (12)	1/<44 [g]	Lanza *et al*., 2000
Mouflon	Adult granulosa	7/23 (30)	1/7 (14)	Loi *et al*., 2001
Monkey	Fetal fibroblast	(1)	0/14 (0)	Mitalipov *et al*., 2002b
	Adult fibroblast	NA	0/1 (0)	Wolf *et al*., 1999
Fish	Somite stage fibroblast	34/544 (6)	15/34 (3)[h]	Lee *et al*., 2002

NA not available

[a] transferred at 2-cell to blastocyst stage

[b] live fetus at 8.5 days postcoitum

[c] included one calf died at parturition

[d] both died during Caesarian section

[e] included two kids died shortly after birth due to respiratory difficulties

[f] included one kid died at parturition

[g] Advanced Cell Technology announces birth of first cloned endangered species: Noah is born (http://www.advancedcell.com/pr_01-12-2001.html)

[h] hatched embryos

วิธีการถ่ายฝากนิวเคลียส

หลักการของเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียสคือ การประกอบเซลล์ตัวอ่อนขึ้นมาใหม่ โดยใช้นิวเคลียสของเซลล์ตัวอ่อนหรือเซลล์ร่างกายจากสัตว์ที่ต้องการ (จำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n) รวมเข้ากับส่วนของไซโทพลาสซึมของไข่ (oocyte) ซึ่งนำเอาส่วนของนิวเคลียสเดิมออกไปแล้ว (enucleation) (จำนวนโครโมโซมเท่ากับ 0) โดยไข่ที่ใช้ควรเป็นไข่ที่พร้อมจะผสมกับอสุจิ (mature oocyte) เมื่อทั้งสองส่วนรวมกันแล้ว จะกลายเป็นตัวอ่อนที่มีส่วนประกอบของเซลล์คล้ายกับตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิตามธรรมชาติ

วิธีการถ่ายฝากนิวเคลียสเพื่อผลิตตัวอ่อนจนถึงปัจจุบัน สามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบ ดังนี้

1. แบบที่ต้องทำให้ส่วนของนิวเคลียสรวมกับส่วนของไซโทพลาสซึมของไข่ (karyoplast fusion)

2. แบบที่ใส่ส่วนของนิวเคลียสเข้าไปในไซโทพลาสซึมของไข่โดยตรง (karyoplast microinjection)

3. แบบทำการถ่ายฝากนิวเคลียส 2 ครั้ง (serial nuclear transfer)

4. แบบทำการถ่ายฝากนิวเคลียสร่วมกับ การรวมกับตัวอ่อนที่เหนี่ยวนำให้มีจำนวนโครโมโซม 4n (nuclear transfer and tetraploid embryo complementation)

แบบที่ต้องทำให้ส่วนของนิวเคลียสรวมกับส่วนของไซโทพลาสซึมของไข่

เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลูกสัตว์ตัวแรกจากเทคโนโลยีนี้ (Willadsen, 1986) โดยส่วนของนิวเคลียสมาจากเซลล์ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ และส่วนของไซโทพลาสซึมมาจากไข่ที่ตกมาที่ท่อนำไข่ (*in vivo* mature oocyte) หลังจากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า (electrofusion) ทำให้ทั้งสองส่วนรวมกัน (Fig. 1a) ตัวอ่อนที่ได้ถูกใส่เข้าไปเพาะเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะ (*in vivo* culture) เป็นเวลา 4.5- 5.5 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอ่อนออกมา และทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่มีการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีส (blastocyst) ให้แกะตัวตั้งท้อง การศึกษานี้ทำให้เกิดลูกแกะจำนวน 3 ตัว ตั้งแต่นั้นมาวิธีนี้ได้เป็นต้นแบบของเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียสที่ใช้เซลล์ตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ (Table 1) และเป็นวิธีที่ใช้ในการทำให้เกิดลูกสัตว์ตัวแรกที่เกิดจากการถ่ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย (Wilmut *et al*., 1997) ซึ่งเป็นแกะเช่นกัน (ชื่อ Dolly) และเป็นการเปิดประวัติศาสตร์หน้าใหม่ของเทคโนโลยีนี้ (Table 2) เนื่องจากแต่เดิมคิดกันว่าเซลล์ตัวอ่อนเท่านั้นที่สามารถใช้เป็นเซลล์ต้นแบบได้ เนื่องจากสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่างๆของร่างกายได้ แต่เซลล์ร่างกายนั้นได้มีการเปลี่ยนแปลงไปแล้วจึงไม่น่าที่จะมีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ตัวอ่อน

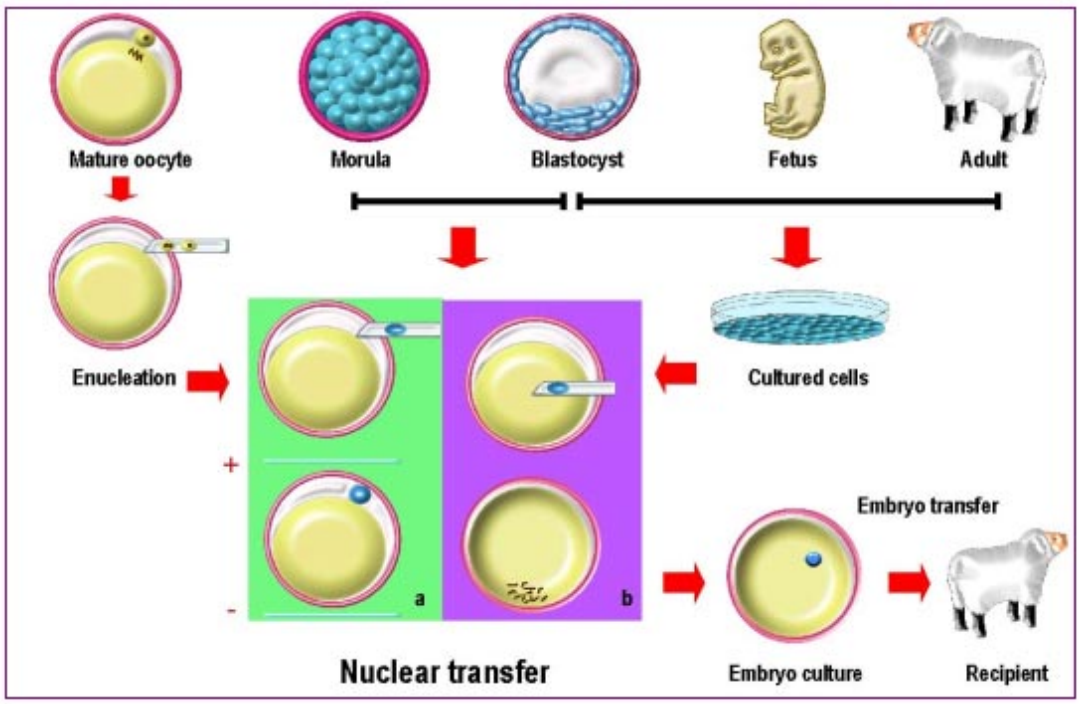

Figure 1 Nuclear transfer procedures: a) karyoplast fusion and b) karyoplast microinjection.

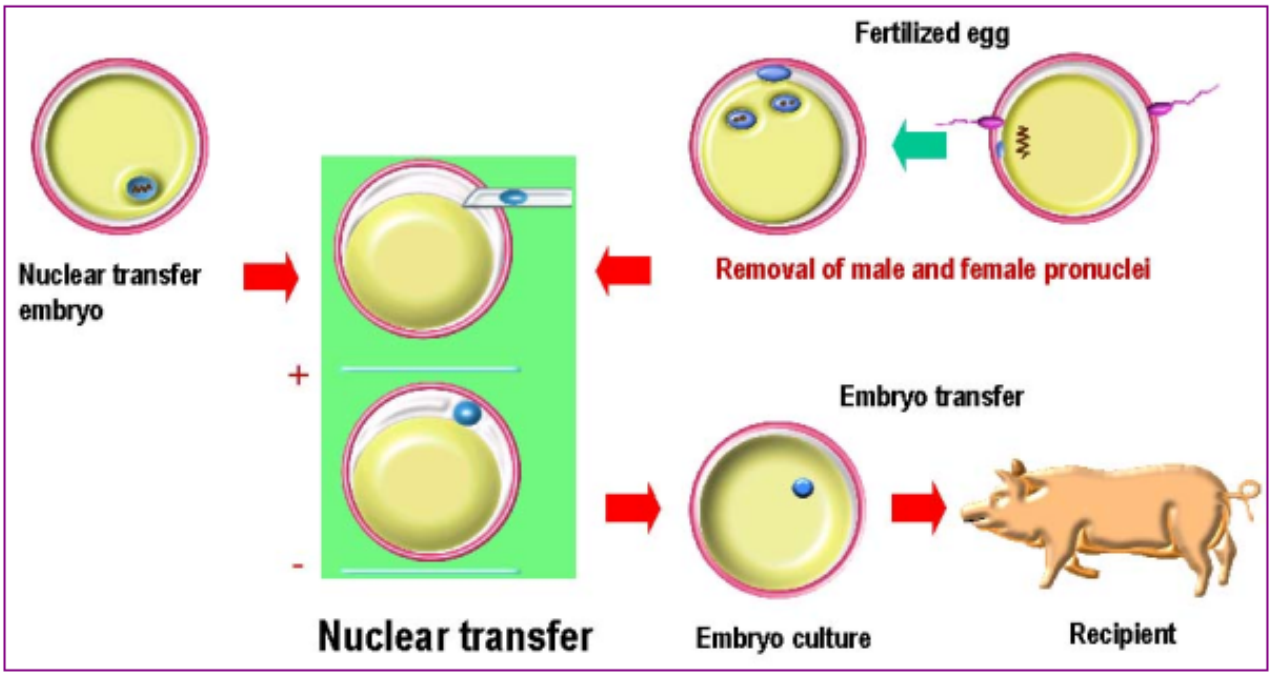

Figure 2 Serial nuclear transfer procedure.

แบบที่ใส่ส่วนของนิวเคลียสเข้าไปในไซโทพลาสซึมของไข่โดยตรง

Collas and Barnes (1994) ได้แยกส่วนของเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวลูก (ICM) จากตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีส และใส่เซลล์ดังกล่าว (จำนวน 1 เซลล์) เข้าไปในไซโทพลาสซึมของไข่โดยตรง (Fig. 1b) แล้วกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro* culture) และทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่มีการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสให้โคตัวตั้งท้อง การศึกษานี้ทำให้เกิดลูกโคจำนวน 2 ตัว วิธีนี้ต่อมาใช้ในการทำให้เกิดลูกสัตว์อีกชนิดหนึ่ง (หนูเมาส์ชื่อ Cumulina) ที่ช่วยยืนยันว่าเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียส สามารถใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบได้ (Wakayama *et al*., 1998)

แบบทำการถ่ายฝากนิวเคลียส 2 ครั้ง

ในทั้งสองวิธีข้างต้น การถ่ายฝากนิวเคลียสจากเซลล์ต้นแบบทำเพียงครั้งเดียว โดยใช้ไซโทพลาสซึมของไข่ที่พร้อมจะผสมกับอสุจิ (แต่ยังไม่ถูกผสม) ซึ่ง Wakayama *et al*. (2000) ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้ไซโทพลาสซึมดังกล่าวให้ผลดีกว่าใช้ไซโทพลาสซึมของไข่ที่ถูกอสุจิเข้าผสมแล้ว (zygote) อย่างไรก็ตาม หลังจากถ่ายฝากนิวเคลียสแล้ว การกระตุ้นไข่โดยกระแสไฟฟ้าหรือสารเคมีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในไข่ (เช่น ระดับของแคลเซี่ยม) แตกต่างไปจากไข่ที่ถูกกระตุ้นโดยอสุจิในระหว่างการปฏิสนธิ ซึ่งอาจมีผลต่อความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน (Sun *et al*., 1992; Wang *et al*., 1998; Ducibella *et al*., 2002) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการถ่ายฝากนิวเคลียสแบบ 2 ครั้งขึ้น (Kwon and Kono, 1996) โดยขั้นตอนแรกในการศึกษานี้ ทำการถ่ายฝากนิวเคลียสจากเซลล์ตัวอ่อนหนูเมาส์ระยะ 4 เซลล์ให้รวมกับไซโทพลาสซึมของไข่ที่พร้อมจะผสมกับอสุจิ เมื่อได้ตัวอ่อนแล้ว ทำการถ่ายฝากนิวเคลียสจากตัวอ่อนที่ได้ให้รวมกับไซโทพลาสซึมใหม่ ซึ่งเป็นไซโทพลาสซึมของไข่ที่ถูกอสุจิเข้าผสมแล้ว ทำให้ตัวอ่อนใหม่ที่ได้มีส่วนประกอบภายในเซลล์ 0ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมพันธุ์โดยอสุจิ วิธีนี้ทำให้เกิดลูกหนู 6 ตัวจาก 1 ตัวอ่อนที่เป็นเซลล์ต้นแบบ (ระยะ 4 เซลล์) และต่อมาหลักการนี้ได้ใช้ในการทำให้เกิดลูกสุกร (Fig. 2) ที่เกิดจากการถ่ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย (Polejaeva *et al*., 2000)

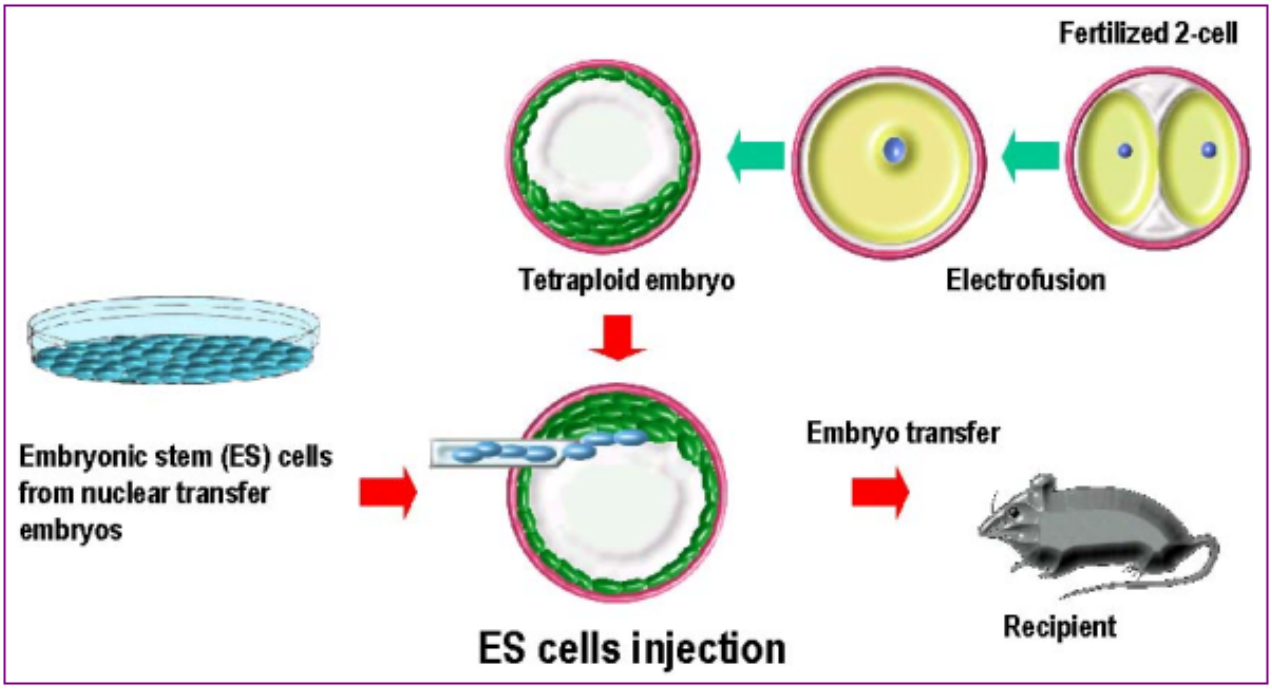

Figure 3 Nuclear transfer and tetraploid embryo complementation procedure.

แบบทำการถ่ายฝากนิวเคลียสร่วมกับการรวมกับตัวอ่อนที่เหนี่ยวนำให้มีจำนวนโครโมโซม 4n

เนื่องจากประสิทธิภาพของเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียสค่อนข้างต่ำมาก จึงมีการศึกษาถึงวิธีที่อาจนำมาใช้ร่วมกับเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตลูกสัตว์ที่มีพันธุกรรมคล้ายกับสัตว์ต้นแบบ ในวิธีการนี้ จะผลิตตัวอ่อนโดยการถ่ายฝากนิวเคลียสขึ้นมาก่อน เมื่อได้ตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะบลาสโตซีส ทำการแยกเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นตัวลูก (ICM) ออกมาเพาะเลี้ยง (ES cells ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n) แล้วนำ ES cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนี้ไปเกาะรวม (aggregation) กับตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n (เกิดโดยการใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นให้เซลล์ของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์รวม (fuse) กลายเป็นเซลล์เดียว) หรือใส่เข้าไป (injection) ในตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n ระยะบลาสโตซีส (Fig. 3) การรวมของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกับเซลล์ตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n หมายถึงเซลล์จะมาเกาะกันเท่านั้น ไม่ได้รวมกันกลายเป็นเซลล์ใหม่เหมือนกับการถ่ายฝากนิวเคลียส จำนวนโครโมโซมในเซลล์จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้เซลล์ที่มาจากตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n ส่วนใหญ่จะพัฒนาไปเป็นส่วนของรก (extraembryonic membranes) และส่วน ES cells จะพัฒนาไปเป็นตัวลูก (Nagy *et al*., 1990)

ลูกสัตว์ที่เกิดจากการรวมกันระหว่าง ES cells และตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n มีรายงานในหนูเมาส์ (Nagy *et al*., 1990; Wang *et al*., 1997; Eggan *et al*., 2001) และโค (Iwasaki *et al*., 2000) เท่าที่ทราบมีเพียงรายงานในหนูเมาส์ที่ใช้ ES cells ที่เกิดจากตัวอ่อนที่ได้จากการถ่ายฝากนิวเคลียสร่วมกับการรวมกับตัวอ่อนที่เหนี่ยวนำให้มีจำนวนโครโมโซม 4n ในการผลิตลูกสัตว์ (Hochedlinger and Jaenisch, 2002) ซึ่งใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) เป็นเซลล์ต้นแบบในการผลิตตัวอ่อนหนูเมาส์ หลังจากนั้นทำการแยกเอา ICMมาเพาะเลี้ยงเป็น ES cells แล้วนำ ES cells ที่ได้จำนวน 8-20 เซลล์ใส่เข้าไปในตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n ระยะบลาสโตซีส ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่ได้สามารถพัฒนาไปเป็นลูกหนูได้

ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ลูกสัตว์ที่ได้จะมีเซลล์ทั้งจาก ES cells และจากตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n อยู่ภาย-

ในตัว (chimera) (Nagy *et al*., 1990; Wang *et al*., 1997; Iwasaki *et al*., 2000) นอกจากนั้น ES cell ที่มาจากตัวอ่อนหนูเมาส์ตัวผู้ (40,XY) เมื่อนำใช้ผลิตลูกสัตว์โดยวิธีนี้ พบว่าสามารถทำให้เกิดลูกหนูเมาส์ทั้งเพศผู้ (40,XY) และเพศเมีย (39,XO) เนื่องจากโครโมโซมของ ES cell เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเพาะเลี้ยง (ES cell subclone) (Eggan *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจใช้ในการผลิตสัตว์แปลงพันธุกรรมได้ โดยทำการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของ ES cell ก่อนที่จะนำมารวมกับตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม 4n (Wang *et al*., 1997; Misra *et al*., 2001)

การผลิตสัตว์โดยการถ่ายฝากนิวเคลียสในประเทศไทย

ในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาถึงวิธีการและการพัฒนาของตัวอ่อนที่เกิดจากเทคโนโลยีการถ่ายฝากนิวเคลียสในโค (Parnpai *et al*., 2000; Saikhun *et al*., 2000) สุกร (Parnpai *et al*., 2001) กระบือ (Parnpai *et al*., 1999; Kitiyanant *et al*., 2001; Saikhun *et al*., 2002) แมว (Kitiyanant *et al*., 2003) และกระต่าย (Techakumphu *et al*., 2003) และมีการกล่าวถึงการเกิดลูกสัตว์จากเทคโนโลยีนี้ในโค (Kamonpatana, 2000) เท่านั้น ส่วนในสัตว์อื่นยังไม่มีรายงาน

สรุป

เทคโนโลยีการผลิตสัตว์โดยการถ่ายฝากนิวเคลียสมีการพัฒนาจากการใช้เซลล์ตัวอ่อนมาเป็นใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ โดยในขณะนี้ยังมีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จต่ำ เนื่องจากยังไม่สามารถทำให้นิวเคลียสที่ถ่ายฝากทำงานได้เหมือนกับนิวเคลียสของตัวอ่อนปกติ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อไป และเทคโนโลยีนี้เป็นเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการผลิตสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรมซึ่งจะมีบทบาทที่สำคัญต่อมนุษย์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณอารี ทองคำ หน่วยโสตทัศนศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในการวาดภาพประกอบบทความ

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.

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

Bondioli, K., J. Ramsoondar, B. Williams, C. Costa, and W. Fodor. 2001. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H- transferase transgenic boar. Mol. Reprod. Dev. 60:189-195.

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

Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie, and I. Wilmut. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380:64-66.

Cheong, H. T., Y. Takahashi, and H. Kanagawa. 1993. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. Biol. Reprod. 48:958-963.

Chesne, P., Y. Heyman, N. Peynot, and J. P. Renard. 1993. Nuclear transfer in cattle: birth of cloned calves and estimation of blastomere totipotency in morulae used as a source of nuclei. C R Acad. Sci. III 316:487-491.

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. 20:366-369.

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.

Collas, P., and J. M. Robl. 1990. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. Biol. Reprod. 43:877-884.

Collas, P., and F. L. Barnes. 1994. Nuclear transplantation by microinjection of inner cell mass and granulosa cell nuclei. Mol. Reprod. Dev. 38:264-267.

Colman, A., and A. Kind. 2000. Therapeutic cloning: concepts and practicalities. Trends Biotechnol. 18:192-196.

Cross, B. A. 1989. Animal biotechnology. Philos. Trans R Soc. Lond. B Biol. Sci. 324:563-574.

Dinnyes, A., Y. Dai, M. Barber, L. Liu, J. Xu, P. Zhou, and X. Yang. 2001. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation. Biol. Reprod. 64:257-263.

Ducibella, T., D. Huneau, E. Angelichio, Z. Xu, R. M. Schultz, G. S. Kopf, R. Fissore, S. Madoux, and J. P. Ozil. 2002. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. Dev. Biol. 250:280-291.

Eggan, K., H. Akutsu, J. Loring, L. Jackson-Grusby, M. Klemm, W. M. Rideout, 3rd, R. Yanagimachi, and R. Jaenisch. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98:6209-6214.

Eggan, K., A. Rode, I. Jentsch, C. Samuel, T. Hennek, H. Tintrup, B. Zevnik, J. Erwin, J. Loring, L. Jackson-Grusby, M. R. Speicher, R. Kuehn, and R. Jaenisch. 2002. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. Nat. Biotechnol. 20:455-459.

Galli, C., R. Duchi, R. M. Moor, and G. Lazzari. 1999. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. Cloning 1:161-170.

Han, Y. M., Y. K. Kang, D. B. Koo, and K. K. Lee. 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. Theriogenology 59:33-44.

Hayes, E., S. Galea, A. Verkuylen, M. Pera, J. Morrison, O. Lacham-Kaplan, and A. Trounson. 2001. Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. Physiol. Genomics 5:193-204.

Hiendleder, S., V. Zakhartchenko, H. Wenigerkind, H.-D. Reichenbach, K. Bruggerhoff, K. Prelle, G. Brem, M. Stojkovic, and E. Wolf. 2003. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: Neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. Biol. Reprod. 68:159-166.

Hochedlinger, K., and R. Jaenisch. 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. Nature 415:1035-1038.

Houdebine, L.-M. 2002. Transgenesis to improve animal production. Livest. Prod. Sci. 74:255-268.

Iwasaki, S., K. H. Campbell, C. Galli, and K. Akiyama. 2000. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. Biol. Reprod. 62:470-475.

Kamonpatana, M. 2000. Artificial breeding of large ruminant production: Based on experiences in Thailand. Thai J. Vet. Med. 30:13-22.

Kato, Y., T. Tani, and Y. Tsunoda. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. J. Reprod. Fertil. 120:231-237.

Keefer, C. L., S. L. Stice, and D. L. Matthews. 1994. Bovine inner cell mass cells as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. Biol. Reprod. 50:935-939.

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

Kitiyanant, Y., J. Saikhun, B. Chaisalee, K. L. White, and K. Pavasuthipaisit. 2001. Somatic cell cloning in Buffalo *(Bubalus bubalis)*: effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. Cloning Stem Cells 3:97-104.

Kitiyanant, Y., J. Saikhun, and K. Pavasuthipaisit. 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. Theriogenology 59:1775-1786.

Kono, T., O. Y. Kwon, and T. Nakahara. 1991a. Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. J. Reprod. Fertil. 93:165-172.

Kono, T., Y. Tsunoda, and T. Nakahara. 1991b. Production of identical twin and triplet mice by nuclear transplantation. J. Exp. Zool. 257:214-219.

Kwon, O. Y., and T. Kono. 1996. Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 13010-13013.

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

Lee, K. Y., H. Huang, B. Ju, Z. Yang, and S. Lin. 2002. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. Nat. Biotechnol. 20:795-799.

Li, G. P., D. Y. Chen, L. Lian, Z. M. Han, Z. Y. Zhu, and G. E. Seidel, Jr. 2002. Rabbit cloning: improved fusion rates using cytochalasin B in the fusion buffer. Mol. Reprod. Dev. 61:187-191.

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

Loskutoff, N. M., W. H. Johnson, and K. J. Betteridge. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. Theriogenology 39:95-107.

Meirelles, F. V., V. Bordignon, Y. Watanabe, M. Watanabe, A. Dayan, R. B. Lobo, J. M. Garcia, and L. C. Smith. 2001. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. Genetics 158:351-356.

Meng, L., J. J. Ely, R. L. Stouffer, and D. P. Wolf. 1997. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. Biol. Reprod. 57:454-9.

Misra, R. P., S. K. Bronson, Q. Xiao, W. Garrison, J. Li, R. Zhao, and S. A. Duncan. 2001. Generation of single-copy transgenic mouse embryos directly from ES cells by tetraploid embryo complementation. BMC Biotechnol. 1:12.

Mitalipov, S. M., R. R. Yeoman, H. C. Kuo, and D. P. Wolf. 2002a. Monozygotic twinning in rhesus monkeys by manipulation of *in vitro*- derived embryos. Biol. Reprod. 66:1449-1455.

Mitalipov, S. M., R. R. Yeoman, K. D. Nusser, and D. P. Wolf. 2002b. Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. Biol. Reprod. 66:1367-1373.

Miyoshi, K., S. J. Rzucidlo, S. L. Pratt, and S. L. Stice. 2003. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. Biol. Reprod. 68:1079-1086.

Moens, A., S. Chastant, P. Chesne, J. E. Flechon, K. J. Betteridge, and J. P. Renard. 1996. Differential ability of male and female rabbit fetal germ cell nuclei to be reprogrammed by nuclear transfer. Differentiation 60:339-345.

Nagy, A., E. Gocza, E. M. Diaz, V. R. Prideaux, E. Ivanyi, M. Markkula, and J. Rossant. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development 110:815-821.

Nippert, I. 2002. The pros and cons of human therapeutic cloning in the public debate. J. Biotechnol. 98:53-60.

Ogura, A., K. Inoue, N. Ogonuki, A. Noguchi, K. Takano, R. Nagano, O. Suzuki, J. Lee, F. Ishino, and J. Matsuda. 2000. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. Biol. Reprod. 62:1579-1584.

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.

Ono, Y., N. Shimozawa, K. Muguruma, S. Kimoto, K. Hioki, M. Tachibana, Y. Shinkai, M. Ito, and T. Kono. 2001a. Production of cloned mice from embryonic stem cells arrested at metaphase. Reproduction 122:731-736.

Ono, Y., N. Shimozawa, M. Ito, and T. Kono. 2001b. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. Biol. Reprod. 64:44-50.

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

Parnpai, R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Feasibility for multiplication of exotic cattle with cloning technology by using ear fibroblast as donor cell. The Proceeding of 38th Kasetsart University Annual Conference, 1-4 February 2000, Kasetsart University, Bangkok. pp. 79-85.

Parnpai, R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2001. Cloning of pig embryo by using ear and tail fibroblasts as donor nuclei: effect of time after maturation and pulse duration on the rate of fusion and development of embryo. Thai J. Agric. Sci. 34:187-194.

Piedrahita, J. A. 2000. Targeted modification of the domestic animal genome. Theriogenology 53: 105-116.

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.

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

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

Prather, R. S., R. J. Hawley, D. B. Carter, L. Lai, and J. L. Greenstein. 2003. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. Theriogenology 59:115-123.

Rideout, W. M., 3rd, K. Eggan, and R. Jaenisch. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. Science 293:1093-1098.

Robl, J. M., R. Prather, F. Barnes, W. Eyestone, D. Northey, B. Gilligan, and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in bovine embryos. J. Anim. Sci. 64:642-647.

Rudolph, N. S. 1999. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. Trends Biotechnol. 17:367-374.

Saikhun, J., K. Pavasuthipaisit, M. Jaruansuwan, and Y. Kitiyanant. 2002. Xenonuclear transplantation of buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal and adult somatic cell nuclei into bovine (*Bos indicus*) oocyte cytoplasm and their subsequent development. Theriogenology 57:1829-1837.

Saikhun, J., Y. Kitiyanant, M. Jaruansuwan, B. Chaisalee, and K. Pavasuthipaisit,. 2000. Development and transfer cloned bovine embryos using nuclei of cumulus cells, fetal and adult fibroblast. Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden. p.236.

Schnieke, A. E., A. J. Kind, W. A. Ritchie, K. Mycock, A. R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman, and K. H. Campbell. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. Science 278:2130-2133.

Shiga, K., T. Fujita, K. Hirose, Y. Sasae, and T. Nagai. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. Theriogenology 52:527-535.

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

Shiota, K., and R. Yanagimachi. 2002. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. Differentiation 69:162-166.

Sims, M., and N. First. 1994. Production of calves by

transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91:6143-6147.

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

St John, J. C. 2002. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. Theriogenology 57:109-123.

Stice, S. L., and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. Biol. Reprod. 39:657-64.

Stice, S. L., J. M. Robl, F. A. Ponce de Leon, J. Jerry, P. G. Golueke, J. B. Cibelli, and J. J. Kane. 1998. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. Theriogenology 49:129-138.

Sun, F. Z., J. Hoyland, X. Huang, W. Mason, and R. M. Moor. 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. Development 115:947-956.

Techakumphu, M., P. Numchaisrika, R. Rangsiwiwat, S. Suvajanakorn, K. Prugsananon, W. Boonkasemsanti, V. Ahnonkitpanich, and P. Virutamasen. 2003. Development of rabbit cloned embryos by using cumulus cells, serum-starved and non-starved fibroblast cells as donor nucleus. The Proceeding of 41st Kasetsart University Annual Conference, 3-7 February 2003, Kasetsart University, Bangkok. pp. 538-545.

Tsunoda, Y., and Y. Kato. 1997. Full-term development after transfer of nuclei from 4-cell and compacted morula stage embryos to enucleated oocytes in the mouse. J. Exp. Zool. 278:250-254.

Tsunoda, Y., and Y. Kato. 1998. Not only inner cell mass cell nuclei but also trophectoderm nuclei of mouse blastocysts have a developmental totipotency. J. Reprod. Fertil.113:181-184.

Wakamatsu, Y., B. Ju, I. Pristyaznhyuk, K. Niwa, T. Ladygina, M. Kinoshita, K. Araki, and K. Ozato. 2001. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98:1071-1076.

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.

Wakayama, T., I. Rodriguez, A. C. Perry, R. Yanagimachi, and P. Mombaerts. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96:14984-14989.

Wakayama, T., and R. Yanagimachi. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. Nat. Genet. 22: 127-128.

Wakayama, T., H. Tateno, P. Mombaerts, and R. Yanagimachi. 2000. Nuclear transfer into mouse zygotes. Nat. Genet. 24:108-109.

Wakayama, T., and R. Yanagimachi. 2001. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. Mol. Reprod. Dev. 58:376-383.

Wall, R. J., D. E. Kerr, and K. R. Bondioli. 1997. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. J. Dairy Sci. 80:2213-2224.

Wang, Z. Q., F. Kiefer, P. Urbanek, and E. F. Wagner. 1997. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. Mech. Dev. 62:137-145.

Wang, W. H., L. R. Abeydeera, R. S. Prather, and B. N. Day. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. Mol. Reprod. Dev. 51:346-353.

Wells, D. N., P. M. Misica, H. R. Tervit, and W. H. Vivanco. 1998. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. Reprod. Fertil. Dev. 10:369-378.

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

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.

Wolf, E., V. Zakhartchenko, and G. Brem. 1998. Nuclear

transfer in mammals: recent developments and future perspectives. J. Biotechnol. 65:99-110.

Wolf, D. P., L. Meng, N. Ouhibi, and M. Zelinski-Wooten. 1999. Nuclear transfer in the rhesus monkey: practical and basic implications. Biol. Reprod. 60:199-204.

Woods, G. L., K. L. White, D. K. Vanderwall, K. I. Aston, T. D. Bunch, K. D. Campbell, and L. N. Meerdo. 2002. Cloned mule pregnancies produced using nuclear transfer. Theriogenology 58:779-782.

Yamazaki, Y., H. Makino, K. Hamaguchi-Hamada, S. Hamada, H. Sugino, E. Kawase, T. Miyata, M. Ogawa, R. Yanagimachi, and T. Yagi. 2001. Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 98:14022-14026.

Yang, X., S. Jiang, A. Kovacs, and R. H. Foote. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. Biol. Reprod. 47:636-643.

Yong, Z., and L. Yuqiang. 1998. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: production of goats by serially cloning embryos. Biol. Reprod. 58:266-269.

Zakhartchenko, V., G. Durcova-Hills, W. Schernthaner, M. Stojkovic, H. D. Reichenbach, S. Mueller, R. Steinborn, M. Mueller, H. Wenigerkind, K. Prelle, E. Wolf, and G. Brem. 1999a. Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. Mol. Reprod. Dev. 52:421-426.

Zakhartchenko, V., R. Alberio, M. Stojkovic, K. Prelle, W. Schernthaner, P. Stojkovic, H. Wenigerkind, R. Wanke, M. Duchler, R. Steinborn, M. Mueller, G. Brem, and E. Wolf. 1999b. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. Mol. Reprod. Dev. 54:264-272.

Zou, X., Y. Chen, Y. Wang, J. Luo, Q. Zhang, X. Zhang, Y. Yang, H. Ju, Y. Shen, W. Lao, S. Xu, and M. Du. 2001. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. Cloning 3:31-37.

Received 12 May 2003
Accepted 26 May 2003