การโคลนนิ่งในโคและแพะ: การถ่ายแบบดีเอ็นเอครั้งแรกและการเจริญของตัวอ่อน

นางสาวมาลี อภิเมธีธำรง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6399-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING IN CATTLE AND GOATS: THE FIRST DNA REPLICATION AND THE DEVELOPMENT OF NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS

Miss Malee Apimeteetumrong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Theriogenology
Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic year 2004

ISBN 974-17-6399-9

Thesis Title	Cloning in cattle and goats: the first DNA replication and the development of nuclear transfer embryos
By	Miss Malee Apimeteetumrong
Field of study	Theriogenology
Thesis Advisor	Professor Mongkol Techakumphu, D.V.M., Doctorat 3^{e} cycle
Thesis Co-advisor	Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Xavier Vignon, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

.....Dean of Faculty of Veterinary Science
(Professor Narongsak Chaiyabutr, D.V.M., Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor Emeritus Peerasak Chantaraprateep, D.V.M., F.R.V.C.S., Maitre es Sciences Vétérinaires)

..... Thesis Advisor
(Professor Mongkol Techakumphu, D.V.M., Doctorat 3^{e} cycle)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

.....Member
(Professor Emeritus Pramuan Virutamasen, M.D.)

..... Member
(Associate Professor Chainarong Lohachit, D.V.M., Dr. Med.Vet.)

.....Member
(Associate Professor Weerapong Koykul, D.V.M., Ph.D.)

มาลี อภิเมธีธำรง. การโคลนนิ่งในโคและแพะ: การถ่ายแบบดีเอ็นเอครั้งแรกและการเจริญของตัวอ่อน (Cloning in cattle and goats: the first DNA replication and the development of nuclear transfer embryos). อ. ที่ปรึกษา : ศ.น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.น.สพ. ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต, ดร.ซาเวียร์ วิยอง, 103 หน้า. ISBN 974-17-6399-9.

การศึกษาในโค มีวัตถุประสงค์เพื่อหาเวลาที่เกิดและระยะเวลาที่มีการถ่ายแบบดีเอ็นเอครั้งแรกของตัวอ่อนโคระยะหนึ่งเซลล์ที่เกิดจากการโคลนนิ่งโดยด้วยเซลล์โซมาติก โดยใช้โอโอไซต์ผู้รับที่อยู่ในสภาวะต่างกันและศึกษาผลกระทบต่อการเจริญของตัวอ่อน ในกลุ่มโอโอไซต์ที่ไม่ถูกกระตุ้น (ระยะเมทาเฟส ทู) นำโอโอไซต์ที่ดึงเมทาเฟสออกแล้วมาเชื่อมกับเซลล์ไฟโบรบลาสที่ผ่านการเลี้ยงในสภาพอดอาหาร จากนั้นกระตุ้นด้วยสารไซโคลเฮกซิไมด์และไซโทคาลาซินบีนาน 5 ชั่วโมง ในกลุ่มโอโอไซต์ที่ถูกกระตุ้น (ไม่อยู่ในระยะเมทาเฟส ทู) นำโอโอไซต์ที่ดึงเมทาเฟสแล้วไปเลี้ยงใน 7% แอลกอฮอล์ นาน 5 นาที เลี้ยงต่อในสารไซโคลเฮกซิไมด์ 2 ชั่วโมง นำไปเชื่อมกับเซลล์ต้นแบบแล้วเลี้ยงต่อในสารเดิมอีก 3 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มในน้ำยาเลี้ยงจนถึงเวลาที่กำหนด ตรวจสอบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกัน พบว่าที่ 5 ชั่วโมงหลังการเชื่อมเซลล์ กลุ่มโอโอไซต์ที่ถูกกระตุ้นเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (10/27) ขณะที่อีกกลุ่มไม่พบว่ามีการสังเคราะห์ (0/25, P<0.001) ที่ 18 ชั่วโมงไม่พบว่าการถ่ายแบบดีเอ็นเอในกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น แต่ยังมีการตรวจพบในกลุ่มที่ถูกกระตุ้น (9/25, 36% P<0.001) อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์ในกลุ่มโอโอไซต์ที่ไม่ถูกกระตุ้นสูงกว่ากลุ่มที่ถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ (51.1% และ 22.8%, P<0.001)

การศึกษาในแพะ เพื่อศึกษาผลของวิธีการกระตุ้นต่อการเจริญของตัวอ่อนแพะโคลนนิ่ง ใช้โอโอไซต์ที่เจาะรังไข่แพะที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน เซลล์ต้นแบบเตรียมจากผิวหนังใบหูแพะพันธุ์พื้นเมืองเพศเมีย หลังจากเชื่อมเซลล์แล้วนำตัวอ่อนไปกระตุ้นด้วยสารไอโอโนมัยซินหรือแอลกอฮอล์ ตามด้วยสารไดเมธทิลอะมิโนพิวรีนและไซโทคาลาซินบี พบว่าอัตราการเชื่อมเซลล์ การแบ่งตัวและการเจริญถึงระยะมอรูลาและบลาสโตซีสต์ต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (86.2% เทียบกับ 82.9%, 90.5% กับ 82.4% และ9.5% กับ 5.9%, P>0.05) อัตราการตั้งท้องในแพะวันที่ 30 ถึง 45 หลังฝากตัวอ่อนอายุ 2 วัน ต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (3/5, 60% เทียบกับ 1/5, 20%, P>0.05)

ศึกษาผลการเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดซ้ำต่อประสิทธิภาพการเก็บและการตั้งท้องของแพะตัวให้ โดยนำข้อมูลย้อนหลัง 2 ปี (ระหว่าง พ.ศ. 2545-2547) มาวิเคราะห์ เก็บโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญและที่เจริญพร้อมปฏิสนธิในตัวสัตว์ด้วยวิธีผ่าตัดซ้ำในแพะที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จากการเจาะฟอลลิเคิล 1,476 ฟอลลิเคิล เก็บโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญพร้อมปฏิสนธิได้ทั้งหมด 1,242 ใบ เฉลี่ย 21.4 ± 1.5 ใบต่อตัวต่อครั้ง จากแพะ 50 ตัวเก็บ 69 ครั้ง โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิในตัวสัตว์เก็บได้ 333 ใบจากจำนวนคอร์ปัส ลูเตียมที่นับได้ 398 ใบ เฉลี่ยเก็บได้ 16.7 ± 2.1 ใบ ต่อตัวต่อครั้งจากแพะ 19 ตัว ในการเก็บ 20 ครั้ง อัตราการเก็บ 83.7 และ 84.1% (P>0.05) พบว่าการผ่าตัดเพื่อเจาะเก็บซ้ำ 2 ครั้งต่อเนื่องกันไม่มีผลต่อจำนวนฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ที่เก็บได้ อัตราการตั้งท้องหลังผสมธรรมชาติในแพะที่ถูกผ่าตัดหนึ่งถึงสามครั้งต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05)

ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าสภาวะของไซโทพลาซึมของโอโอไซต์ผู้รับมีผลต่อลักษณะการถ่ายแบบดีเอ็นในช่วงการเกิดวงจรของเซลล์ครั้งแรกและการเจริญของตัวอ่อนที่เกิดจากการโคลนนิ่งด้วยเซลล์โซมาติกในโค การกระตุ้นด้วยสารไอโอโนมัยซินหรือแอลกอฮอล์ ที่ใช้ศึกษาในแพะ ไม่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนทั้งนอกและในร่างกาย และการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดซ้ำสามารถกระทำได้สองถึงสามครั้งโดยไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องในแพะตัวให้

ภาควิชา สูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4375952231 : MAJOR THERIOGENOLOGY
KEY WORDS : ACTIVATION / CATTLE / DNA REPLICATION / EMBRYO / GOAT / NUCLEAR TRANSFER / REPEATED OOCYTE COLLECTION

MALEE APIMETEETUMRONG : CLONING IN CATTLE AND GOATS: THE FIRST DNA REPLICATION AND THE DEVELOPMENT OF NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS. THESIS ADVISOR : PROF. MONGKOL TECHAKUMPHU, D.V.M., Doctorat 3e cycle, PROF. ANNOP KUNAVONGKRIT, D.V.M., Ph.D., XAVIER VIGNON, Ph.D., 103 pp. ISBN 974-17-6399-9.

In cattle, the objectives of the study were to investigate the onset and the length of the first DNA replication in the 1-cell stage of bovine somatic nuclear transfer embryos produced from the different state of recipient cytoplasts and to evaluate its influence on the development of the embryos. Cumulus-oocyte complexes obtained from slaughterhouse ovaries were matured *in vitro* then enucleated. In the non-activated group (NT-MII), the enucleated oocytes were fused with starved ear skin fibroblasts and activated immediately with cycloheximide (CHX) and cytochalasin B for 5 h. In the activated group (NT-ACT), the enucleated oocytes were activated with 7% ethanol for 5 min and cultured in CHX for 2 h, fused with donor cells and incubated in CHX for an additional 3 h. Nuclear transfer (NT) embryos were then cultured *in vitro*. DNA synthesis determination was performed using immunocytochemistry. At 5-hour post fusion (hpf), DNA synthesis started in NT-ACT embryos (10 of 27 embryos) whereas it was not observed in NT-MII group (0 of 25 embryos, $P< 0.001$). The DNA replication ended at 18 hpf in NT-MII group, however 9 of 25 embryos (36%) in NT-ACT group still synthesized DNA at this time ($P<0.001$). Development rates to the blastocyst stage were significantly higher in NT-MII group than in NT-ACT group (51.1% versus 22.8% of cultured embryos, $P< 0.001$). These data demonstrate that the DNA synthesis is longer and starts earlier in somatic nuclei transferred into activated cytoplasts than in those transferred into non-activated cytoplasts.

In goats, the effect of activation protocols on the development of cloned goat embryos was investigated. Immature oocytes obtained from FSH-stimulated goats were matured and enucleated before NT. Donor cells were prepared from a locally bred goat, After fusion, the reconstructed embryos were activated with either ionomycin or ethanol followed by culturing in 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cytochalasin B (CB). There were no significant differences between the NT embryos derived from the ionomycin and ethanol groups, in fusion (86.3% versus 82.9%, $P>0.05$), cleavage (90.5% versus 82.4%, $P>0.05$) and for morula/blastocyst rates (9.5% versus 5.9%). Pregnancy rates at Day 30 to 45 were also not significantly different in the recipients receiving NT embryos from ionomycin group (3/5, 60%) and those from ethanol group (1/5, 20%, $P>0.05$).

Another study was conducted to determine the effect of repeated surgical oocyte collection by laparotomy on the numbers of follicles aspirated and oocytes recovered, as well as its effect on pregnancy in the donors. Retrospective data obtained during the past two years (2002-2004) were analyzed. Immature and matured oocytes were collected from FSH-stimulated donor goats. For immature oocyte collection, a total of 1,476 follicles were aspirated from 50 does in 69 sessions and 1,242 oocytes were recovered (21.4 ± 1.5, mean ± SEM, oocytes/donor/session), for a collection rate of 84.1%. For matured oocyte collection, a total of 398 corpora lutea were observed in 19 donors subjected to 20 collections by means of flushing the oviducts, and 333 oocytes recovered (16.7 ± 2.1, mean ± SEM, oocytes/donor/session), for a collection rate of 83.7%. No significant differences in the number of follicles aspirated and oocytes obtained were found between the collections ($P>0.05$).

In conclusion, the results indicate that stages of recipient cytoplasts affect the kinetics DNA replication during the first cell cycle as well as the development NT embryos in bovine. Somatic nuclei obtained from locally bred goats, could be activated by ionomycin or ethanol treatment in combination with 6-DMAP plus CB. Repeated OPU in the two consecutive sessions, in the same donors, had no significant influence on the numbers of follicles, oocytes with good quality as well as the collection efficiencies ($P>0.05$). Therefore, the oocyte collection in goats, at laparotomy, can be performed two to three times without any detrimental effects on pregnancy of the oocyte donors.

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction Student's signature .....

Field of study: Theriogenology Advisor's signature M. Techakumphu

Academic year 2004 Co-advisor's signature A. Kunavongkrit

ACKNOWLEDGEMENTS

The studies in this thesis were carried out at the Institut National de la Recherché Agronomique (INRA), Jouy en Josas, France and the Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development, Pathumthani, Thailand. This work was financially supported by grants from the Golden Jubilee Ph.D. program, Thailand Research Fund, French Embassy in Thailand and the Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives.

I express my sincere gratitude to my advisor, Prof. Dr. Mongkol Techakumphu, for giving me a great opportunity to undertake the Ph.D. program and for his confidence in me. I would like to thank my co-advisor, Prof. Dr. Annop Kunavongkrit, for valuable advice. I also would like to thank another co-advisor, Dr. Xavier Vignon, for scientific guidance and teaching me to conduct my experiment in France. I am also grateful to Dr. Jean Paul Renard, who allowed me to start my training in bovine cloning in his laboratory at INRA, Jouy en Josas, France. I wish to express my thanks to the members of my committee, Prof. Emeritus Peerasak Chantaraprateep, Prof. Emeritus Pramuan Virutamasen, Assoc. Prof. Dr. Chainarong Lohachit, Assoc. Prof. Dr. Weerapong Koykul, for their helpful suggestions. I also would like to thank Assoc. Prof. Dr. Prachin Virakul and Assoc. Prof. Sompongse Jaidee for their suggestions and continuous encouragement throughout my graduate program. I thank Dr. Yant Sukwongs and Dr. Surachit Thongsodsaeng for their support.

I wish to express my thanks to Dr. Ayuth Harintharanon, the director of the Bureau of Biotechnology for Animal Production, for his support. Without him I would never had finished my experiment in Thailand. I wish to thank to Patrick Chesné for his kind teaching me everything on cloning procedure and for his hospitality. A special thank to Bui LinhChi for all help and being my friend during my stay in France. I am grateful to Etienne Laloy, Jean-Luc Servely for teaching me on somatic cell culture and their friendship, Daniel LeBourhis and Vyette Lavergne for teaching me on the preparation of Vero cells co-culture.

With special thanks to Anone Thuangsanthia, Narong Leingcharoen, Jureerat Sumretprasong and Viboon Yiengvisavakul for their help during the complement of my thesis in Thailand. I wish to thank Dr. Nucharin Songsasen for a critical reading of my manuscript on nuclear transfer in goats. I also thank Pranee Numchaisrika and Ampika Thongphugdee for their help and continuous encouragement. I thank the staffs of the Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and the Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development, especially Asst. Prof. Dr. Padet Tummaruk, Instructor Nawapen Phutikanit, Ann, Mam, Porne, Naree and Sumitra for being very helpful over the years. Thanks to all Ph.D. and M.Sc. students for happy memories from many activities. I am grateful to the staff of the Center of Research and Development on Embryo Transfer Technology for taking care of my goats.

Finally, I wish to express my most sincere thanks to my family, especially to my mother for being very supportive of me on education during my whole life. Thanks to my father, my brothers and sisters for continuous encouragement.

DECLARATION OF WORK PERFORMED

I declare that with the exception of the items indicated below, all work reported in this thesis was performed by me.

Patrick Chesné assisted in the micromanipulation of the nuclear transfer experiments in cattle. Etienne Laloy assisted in the preparation of donor cells in cattle. Daniel LeBourhis and Vyette Lavergne assisted in the preparation of Vero cells co-culture of the nuclear transfer experiments in cattle. Synchronization of estrus in goats was done by Narong Leingcharoen. The surgical recovery of goat oocytes and the transfer of cloned embryos were performed by Anone Thuangsanthia, Jureerat Sumretprasong, Viboon Yiengvisavakul and Prof. Dr. Mongkol Techakumphu. Asst. Prof. Dr. Padet Tummaruk and Narong Leingcharoen assisted in the statistical analysis. DNA analysis of the cloned goat fetus was made in the DNA Technology Laboratory, BIOTEC, Thailand.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (in Thai).....iv

ABSTRACT (in English).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

DECLARATION OF WORK PERFORMED.....vii

CONTENTS.....viii

LIST OF TABLES.....xii

LIST OF FIGURES.....xiv

LIST OF ABBREVIATIONS.....xv

CHAPTER I: INTRODUCTION.....1

Rationale.....1

Objectives.....3

Hypothesis.....3

Research merit.....4

CHAPTER II: LITERATURE REVIEW.....5

Somatic cell nuclear transfer in mammals.....5

Somatic cell nuclear transfer technique.....6

Sources of donor nuclei.....9

Stages of donor cell cycle.....9

Sources of recipient cytoplasts.....10

Stages of recipient cytoplasts used for nuclear transfer.....11

Activation of nuclear transfer oocytes.....12

DNA replication in reconstructed embryos.....14

Efficiency of somatic nuclear transfer.....15

Nuclear reprogramming of cloned embryos.....16

CHAPTER III: EFFECT OF RECIPIENT ON THE KINETICS OF DNA REPLICATION DURING THE 1-CELL STAGE IN BOVINE NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS.....20

Introduction.....20

Materials and methods.....21

Chemicals and media.....21

Preparation of donor cells.....21

Preparation of recipient oocytes.....22

Somatic cell nuclear transfer.....24

Characterization of DNA synthesis in nuclear transfer embryos and parthenogenetic embryos.....26

Statistical analysis.....26

Results.....27

DNA synthesis in nuclear transfer embryos and parthenogenetic embryos.....27

Developmental potential of nuclear transfer embryos.....28

Discussion.....34

CHAPTER IV: THE EFFECT ACTIVATION PROTOCOLS ON THE DEVELOPMENT OF CLONED GOAT EMBRYOS.....39

Introduction.....39

Materials and methods.....40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chemicals and media.....40

Preparation of donor cells.....40

Preparation of recipient oocytes.....41

Somatic cell nuclear transfer and activation.....44

Parthenogenetic activation of oocytes.....44

Preparation of recipient animals and embryo transfer.....45

Statistical analysis.....48

Results.....48

The effect of activation protocols on developmental potential of NT embryos and parthenogenetic embryos *in vitro*.....48

The effect of activation protocols on developmental potential of NT embryos *in vivo*.....48

Discussion.....55

CHAPTER V: REPEATED OOCYTE COLLECTION AND ITS INFLUENCE ON PREGNANCY IN DONOR GOATS.....60

Introduction.....60

Materials and methods.....61

Animals.....61

Treatment of animals.....61

Oocyte collection.....62

Statistical analysis.....64

Results.....64

Oocyte collection.....64

The effect of repeated aspiration on the number of oocytes recovered.....65

The effect of repeated collection on pregnancy.....65

Discussion.....69

SUMMARY AND CONCLUSIONS.....72

REFERENCES.....74

APPENDICES.....92

CURRICULUM VITAE.....103

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Live clones produced by somatic nuclear transfer	6
2	Efficiency of somatic nuclear transfer	17
3	BrdU incorporation in bovine NT embryos after 30 min BrdU-exposure at 5, 6 and 18-hour post fusion	29
4	BrdU incorporation in bovine NT embryos after 18-hour continuous exposure	29
5	Developmental potential of bovine NT embryos derived from non-activated and activated cytoplasts reconstructed with donor nuclei at presumptive G0 stage	33
6	Effect of activation protocols on the developmental potential of NT embryos and parthenotes *in vitro*	50
7	Cell numbers of morulae/blastocysts at Day 9 after nuclear transfer or or parthenogenetic activation	51
8	Effect of activation protocols on the developmental potential of NT embryos and parthenotes *in vivo*	52
9	Immature and matured oocyte recoveries from multiple follicle stimulated goats	66
10	Follicles aspirated and oocytes recovered from a group of 8-Mixed Native goats subjected to two consecutive collection sessions at 2-4 month-intervals	67

Table Page

11 Pregnancy rates of donor goats subjected to natural mate with fertile males, regardless of the breeds and collection procedures.....68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Diagram of somatic nuclear transfer technique	8
2	Diagram of donor cell preparation prior to transfer into recipient oocytes	23
3	Nuclear transfer procedure used to produce bovine embryos with non-activated and activated cytoplasts	25
4	DNA synthesis of the first cell cycle in bovine NT embryos and parthenogenetic oocytes derived from non-activated and activated cytoplasts	30
5	BrdU incorporation in bovine NT embryos at the 1-cell stage after 30 min BrdU-exposure at 6, 10 and 16 hour post fusion (X400)	31
6	BrdU incorporation in bovine NT embryos at the 1-cell stage after 30 min BrdU-exposure at 4, 18 and 22 hour post fusion and at 6 hour post fusion in the parthenogenetic embryo	32
7	Protocol of gonadotropin treatment for ovarian superstimulation in donor goat	42
8	Nuclear transfer procedure used to produce goat embryos	43
9	Representations of the somatic NT procedure with ear skin fibroblasts in goats	46
10	Goat embryos produced by NT or by parthenogenetic activation of oocytes	53
11	Development of cloned goat embryos after transfer into the recipient	54
12	Oocyte collection by aspiration and flushing	63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

BrdU	5'-bromo-2'deoxyuridine
Ca^{2+}	calcium ion
CB	cytochalasin B
CHX	cycloheximide
CIDR-G	controlled internal drug release device-goat
CL	corpora lutea
CO_2	carbon dioxide
COCs	cumulus-oocyte complexes
CRL	crown-rump length
d	day
DC	direct current
DMAP	dimethylaminopurine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM-G	Dulbecco's modified Eagle medium with GLUTAMAX-1
DMSO	dimethyl sulphoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
FCS	fetal calf serum
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSH	follicle stimulating hormone
h	hour

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Hepes	N-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
hpa	hour post activation
hpf	hour post fusion
hpm	hour post *in vitro* maturation
ICM	inner cell mass
i.m.	intramuscular
IVM	*in vitro* maturation
kV/cm	kilovolt per centimetre
LH	luteinizing hormone
LOPU	laparoscopic ovum pick up
LOS	large offspring syndrome
M199	Medium 199
MII	metaphase of meiosis II
min	minute
ml	millilitre
mM	millimole
mm	millimetre
mOsm	milliosmole
MPF	maturation promoting factor
M phase	metaphase
NT	nuclear transfer
NT-ACT	cloned embryos produced by transferring somatic nuclei into activated oocytes

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NT-MII	cloned embryos produced by transferring somatic nuclei into non-activated oocytes
OPU	ovum pick up
P-ACT	parthenogenetic embryos produced by activation of activated oocytes
PBS	phosphate buffered saline
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandin $F_{2\alpha}$
PI	propidium iodide
P-MII	parthenogenetic embryos produced by activation of non-activated oocytes
rpm	revolutions per minute
SEM	standard error of the mean
SNT	somatic nuclear transfer
TE	trophectoderm
v/v	volume per volume
µg/ml	microgram per millilitre
µl	microlitre
µM	micromole
µm	micrometre, micron
µs	microsecond

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย