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

การทดลองแช่แข็งตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งแบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระบือปลัก หลังการแช่แข็งและละลายตัวอ่อนระยะมอลูลาโดยวิธี solid surface vitrification method (SSV) การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่าขนาดของเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ที่เคลื่อนตัวออกจากเปลือกมีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนโคลนนิ่งกระบือปลักหลังจากแช่แข็งด้วยวิธี vitrification และละลายหรือไม่ การทดลองแรกตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอลูลาจะถูกนำมาแช่ไว้ในน้ำยาแช่แข็งที่มี 4% EG ซึ่งละลายในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 39°C นาน 12-15 นาที จากนั้นย้ายไปใส่ไว้ในน้ำยาแช่แข็งที่มี 35% EG, 5% polyvinylpyrrolidone, 0.4M trehalose ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS จากนั้นหยดน้ำยาปริมาณ 1-2 µl ที่มีตัวอ่อนอยู่ 1-2 ตัวอ่อนลงไปบนผิวโลหะที่แช่อยู่ในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว ซึ่งผิวหน้าแท่งเหล็กจะมีอุณหภูมิประมาณ -150°C การละลายตัวอ่อนจะทำโดยการนำหยดน้ำยาที่มีตัวอ่อนไปละลายในน้ำยา 0.3M trehalose ในน้ำยา TCM 199-HEPES + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 39°C นาน 3 นาที และนำไปล้าง 5 ครั้งในน้ำยา TCM 199 + 20%FCS ตัวอ่อนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่แข็งและละลายระยะมอลูลาจะถูกเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคใน 100 µl ของน้ำยา SOFaa + 10% FCS ที่อุณหภูมิ 39°C ใน 5% CO_2 ในอากาศ นาน 3 วัน จากตัวอ่อนจำนวน 58 ตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็ง มีตัวอ่อนที่ปกติหลังละลายจำนวน 49 ตัวอ่อน (84.5%) หลังจากการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วพบว่าตัวอ่อนแช่แข็งละลายระยะมอลูลาเจริญเติบโตสู่ระยะ hatching blastocyst ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (39/49; 79.6% vs 42/50; 84.0%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งด้วยวิธี SSV สามารถใช้ในการแช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะมอลูลาได้ การทดลองที่สองตัวอ่อนระยะ hatching blastocysts อายุ 6.5 วันจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ early-hatching stage, middle-hatching stage and late-hatching stage โดยแบ่งตามขนาดของตัวอ่อนที่โผล่พ้นเปลือกออกมา ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสดังกล่าวจะถูกแช่แข็งในน้ำยา 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose in TCM 199-HEPES + 20% FCS โดยใช้ Cryotop เป็นภาชนะในการเก็บแช่แข็งตัวอ่อน อัตรารอดหลังการละลายและเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอ่อนกลุ่ม late-hatching stage มีความทนทานต่อการแช่แข็งสูงที่สุด (100%) รองลงมาคือ early-hatching stage (83%) and middle-hatching stage (75%) ตามลำดับ

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

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

equilibrated in 4% EG in TCM 199-HEPES + 20% FCS at 39°C for 12-15 min before placed in vitrified solution consisting of 35% EG, 5% polyvinylpyrrolidone, 0.4M trehalose in TCM 199-HEPES + 20% FCS. Vitrified droplet consisted of 1-2 embryos were formed by dropping 1-2 µl on a metal surface cooled down to -150°C. Thawing was performed by directed placing vitrified droplets into 0.3M trehalose in TCM 199-HEPES + 20% FCS at 39°C for 3 min and washed 5 times in TCM 199 + 20% FCS. Fresh and frozen-thawed morulae were co-cultured with bovine oviductal epithelium cell in 100 µl droplets of SOFaa + 10%FCS at 39°C in 5% CO_2 in air for 3 days. A total of 58 morulae were vitrified and 49 (84.5%) had normal morphology without lysis after thawing. The hatching rate of vitrified and fresh morulae was not different (39/49; 79.6% vs 42/50; 84.0%). This experiment demonstrated that SSV method can be used to cryopreserved cloned swamp buffalo morulae. The second experiment, hatching blastocysts were harvested at day 6.5, and classified into one of three categories, early-hatching stage, middle-hatching stage and late-hatching stage, according to the ratio of extruding embryonic diameter from zona pellucida to embryonic diameter inside the zona pellucida. The blastocysts were vitrified in 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose in TCM 199-HEPES + 20% FCS, using Cryotop as a cryodevice. The post-thaw survival of the blastocysts after *in vitro* embryo culture for 24 h found that late-hatching stage (100%) had high cryo-tolerant than early-hatching stage (83%) and middle-hatching stage (75%), respectively.