SOMATIC CELL CLONING IN SWAMP BUFFALO
(BUBALUS BUBALIS)

JUMNIAN SAIKHUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-4531-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายในกระบือ

SOMATIC CELL CLONING IN SWAMP BUFFALO (BUBALUS BUBALIS)

จำเนียร สายขุน 4238012 SCAN/D

ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์, กนก ภาวสุทธิไพศิฐ, M.D., Ph.D. (Anatomy), ยินดี กิติยานันท์, D.V.M., M.Sc. (Anatomy), อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์, D. Vet. Med.Sc. (Theriogenology)

บทคัดย่อ

การถ่ายฝากนิวเคลียสหรือโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเพื่อผลิตสัตว์โคลนนิ่งประสบความสำเร็จในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด อย่างไรก็ตาม การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายในกระบือยังมีรายงานน้อยมาก วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อพัฒนาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการโคลนนิ่งในกระบือโดยการนำเซลล์ไข่จากรังไข่ของกระบือและโคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาเพาะเลี้ยงให้สุกเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ด้วยการกระตุ้นให้แบ่งตัวเอง ทำปฏิสนธินอกร่างกายและทำการถ่ายฝากนิวเคลียส ผลการวิจัยพบว่า แคลเซียมไอโอโนฟอร์ หรือ เอธานอล เมื่อใช้ร่วมกับ 6-dimethylaminopurine มีผลต่อการกระตุ้นและการพัฒนาของเซลล์ไข่อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากการถ่ายฝากเซลล์คูมูลัส และเซลล์ไฟโบรบลาสจากทั้งลูกอ่อนกระบือ ลูกที่เกิดใหม่และกระบือโตเต็มวัย สามารถแบ่งตัวและพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนกระบือสามารถชักนำให้อยู่ในระยะ G0/G1 ของวงจรชีวิตเซลล์โดยใช้วิธีลดซีรั่มในการเพาะเลี้ยง หรือ ใช้รอสโคไวติน และให้อยู่ในระยะ G1/S โดยใช้ อะฟิดิโคลิน อัตราการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ที่ลดซีรั่มสามารถพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสได้ดีกว่าการใช้เซลล์ที่ได้จากการใช้รอสโคไวตินและอะฟิดิโคลิน การศึกษาการรีโมเดลของนิวเคลียสในตัวอ่อนโคลนนิ่งพบว่า เซลล์ที่ได้จากการลดซีรั่มสามารถเกิดการรีโมเดลของนิวเคลียส แบ่งตัวและพัฒนาได้เร็วกว่าการใช้เซลล์ที่ไม่ได้ลดซีรั่ม การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส พบว่า การทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสในตัวอ่อนโคลนนิ่ง คล้ายกับการทำงานของเอนไซม์ในตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายหรือการกระตุ้นให้แบ่งตัวเอง นอกจากนี้การศึกษาการโคลนนิ่งระหว่างสายพันธุ์พบว่า เซลล์ไข่โคสามารถชักนำให้เซลล์ร่างกายกระบือมีการแบ่งตัวและพัฒนาจนถึงระยะบลาสโตซีสได้เช่นเดียวกับการใช้เซลล์ไข่กระบือ และการใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน ในการโคลนนิ่งระหว่างสายพันธุ์โดยใช้เซลล์ไข่โคมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งได้ดีกว่าการใช้เซลล์คูมูลัสและเซลล์โอวิดัค

การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการการโคลนนิ่งในกระบืออย่างประสิทธิภาพและเซลล์ไข่โคสามารถใช้ในการโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์โดยใช้เซลล์ร่างกายของกระบือได้

120 pp. ISBN 974-04-4531-4

SOMATIC CELL CLONING IN SWAMP BUFFALO (BUBALUS BUBALIS)

JUMNIAN SAIKHUN 4238012 SCAN/D

Ph.D. (ANATOMY)

THESIS ADVISORS : KANOK PAVASUTHIPAISIT, M.D., Ph.D. (ANATOMY), YINDEE KITIYANANT, D.V.M., M.Sc. (ANATOMY), ANUCHAI PIYOPUMMIN, D. Vet. Med. Sc. (THERIOGENOLOGY)

ABSTRACT

Somatic cell nuclear transfer or cloning has been developed and successfully used to produce cloned animals in many mammalian species. However, the knowledge of somatic cell cloning in swamp buffalo has been extremely rare. The objective of the present study was to establish an effective somatic cell cloning protocol for this species. Buffalo and bovine oocytes obtained from abattoir ovaries were matured in vitro and used for parthenogenetic activation, in vitro fertilization and nuclear transfer experiments.

The results showed that calcium ionophore or ethanol used in combination with 6-dimethylaminopurine effectively induces buffalo oocyte activation and parthenogenetic development. The cleavage, blastocyst rate, and total number of cells did not significantly differ in the four cell groups used: cumulus cells, fetal, calf and adult fibroblast cells. Buffalo fetal fibroblasts can be successfully synchronized in the quiescent G0/G1 phase of the cell cycle by serum starvation or roscovitine treatment and in G1/S phase by aphidicolin treatment. The rates of blastocyst development of embryos reconstructed with quiescent G0/G1 cells synchronized by serum starvation were improved as compared to those derived from roscovitine and aphidicolin treatments. The nuclear remodeling event of cloned embryos derived from serum starved cells can occur in enucleated oocyte, mitotic division and can reach more advanced stages faster than serum fed cells. Telomerase activity detection indicates the successful reprogramming of telomerase activity in cloned embryos follow a similar pattern as in embryos derived from in vitro fertilization and parthenogenetic activation. The interspecies cloning experiments showed that the cytoplasm of enucleated bovine oocyte has the ability to support the mitotic division of buffalo somatic nuclei up to the blastocyst stage, and buffalo fetal fibroblasts can support the in vitro development of interspecies cloned embryos after transfer to enucleated bovine oocytes better than that of cumulus and oviductal cells.

These findings indicate that an effective somatic cell cloning protocol in swamp buffalo was established in the present study and buffalo somatic cell nuclei can be reprogrammed in enucleated bovine oocytes, resulting in the production of interspecies cloned blastocysts.

KEY WORDS : CLONING/BUFFALO/SOMATIC CELL/EMBRYO/OOCYTE

120 pp. ISBN 974-04-4531-4