DEVELOPMENT OF PLURIPOTENT STEM CELL FROM MOUSE EMBRYOS

YUPARAT ODGLUN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DRGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนหนู (DEVELOPMENT OF PLURIPOTENT STEM CELLS FROM MOUSE EMBRYOS)

ยุพารัตน์ อดกลั้น 4836211 SIBC/M

วท.ม.(ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เนตรนภิส ธีระวัลย์ชัย, Ph.D., สุภักดี จุลวิจิตรพงษ์, M.D., ทัศนีย์ เพิ่มไทย, Ph.D.

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูเป็นเซลล์ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนถึงชีววิทยาของเซลล์ หรือการศึกษาในสาขา regenerative medicine แม้ว่าในปัจจุบันเซลล์ชนิดนี้สามารถสั่งซื้อจากต่างประเทศได้ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดเรื่องของระยะเวลาในการใช้เซลล์และความไม่คงที่ของพันธุกรรม เนื่องจากเซลล์ดังกล่าวมักมีอายุมาก นอกจากนี้ยังอาจเกิดความเสียหายในระหว่างการขนส่ง ดังนั้นการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูขึ้นในห้องทดลองของเราเองจึงยังมีความจำเป็น ด้วยเหตุผลดังกล่าวในการศึกษานี้จึงมีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู เพื่อเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาในอนาคต การสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูนั้นจุดที่สำคัญคือการแยก ICM ออกจากเซลล์อื่นๆก่อนทำการเพาะเลี้ยง จึงทำการศึกษาในเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบสองวิธีที่นิยมใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ได้แก่ whole embryo culture technique และ immunosurgery technique เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจากสายพันธุ์ ICR โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกตัวอ่อนหนูในระยะ blastocysts จากหนูเพศเมียที่ผ่านการกระตุ้นให้ตกไข่และกำจัดเปลือกหุ้มด้วยเอนไซม์โปรเนส จากนั้นจึงแบ่งเป็นสองกลุ่ม โดยวิธีการสุ่มเลือกเพื่อทำการเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูด้วยวิธีที่ต่างกันโดย กลุ่ม A ใช้วิธี whole-embryo culture technique ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะ blastocysts ที่กำจัดเปลือกหุ้มแล้วทั้งใบ ส่วนกลุ่ม B จะใช้วิธี immunosurgery technique ซึ่งแยกเฉพาะส่วนของ ICM มาเพาะเลี้ยง โดยนำตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มจะนำไปเพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู จนกระทั่งได้กลุ่มเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ซึ่งจะทำการคัดเลือกเพื่อทำการ subculture ยี่สิบครั้งจนกว่าจะได้สายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู จากการทดลองดังกล่าวพบว่าการเกิด colony formation ของ ICM ที่เพาะเลี้ยงในกลุ่ม B จะมากกว่ากลุ่ม A (91.4% และ 63.8% ตามลำดับ) และยังพบว่าลักษณะของเซลล์ที่ได้จากกลุ่ม B มีลักษณะที่เหมาะในการนำไปสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูมากกว่าดังนั้นจำนวน colony ที่มีความเหมาะสมในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจึงได้จากกลุ่ม B มากกว่าที่ได้จากกลุ่ม A (77.6% และ 36.2% ตามลำดับ) จากนั้นในการสร้างสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูในครั้งต่อมาจึงเลือกใช้วิธี immunosurgery technique จนกระทั่งสามารถสร้างหนึ่งสายพันธุ์เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูได้จากตัวอ่อนหนูจำนวนแปดร้อยหกสิบเจ็ดตัว หลังทำการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้นี้พบว่ามีการแสดงออกของ marker ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู ได้แก่ Oct-4, SSEA-1และ alkaline phosphatase นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆในร่างกายโดยวิธี spontaneous differentiation จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงเทคนิคที่เหมาะสมในการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจากหนูสายพันธุ์ ICR และวิธีการทดสอบคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู วิธีการเหล่านี้สามารถใช้เป็นต้นแบบของการศึกษาทางด้านเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในประเทศไทยให้มีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้นต่อไป

111 หน้า.

Copyright by Mahidol University

DEVELOPMENT OF PLURIPOTENT STEM CELLS FROM MOUSE EMBRYOS

YUPARAT ODGLUN 4836211 SIBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: NEDNAPIS TIRAWANCHAI, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), SUPHAKDE JULAVIJITPHONG, M.D. (OBSTETRICS&GYNAECOLOGY), TATSANEE PHERMTHAI, Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

ABSTRACT

The mouse embryonic stem cell cell (mESC) is a beneficial tool for studying gene function, cell biology, and regenerative medicine. Although ES cells are now commercially available, they can only be used for a limited period of time due to their aging and karyotypic instability after long-term culture. Furthermore, mES cells may be damaged or lost during transportation. Therefore, we developed a mouse embryonic stem cell from an ICR mouse strain. As the inner cell mass (ICM) derivation is a critical point to achieve the mESC establishment, the preliminary study was set up to compare the effectiveness of two popular techniques: whole-embryo culture and immunosurgery techniques for mESC derivation from the ICR mouse strain. Blastocysts were obtained by superovulation of the ICR mice and pronase treated to dissolve their zona pelucida (ZP) before being randomly divided into two groups. Group A: the whole-embryo culture technique, ZP-free blastocysts were cultured directly on mouse embryonic fibroblast (MEFs). Group B: the immunosurgery technique, ZP-free blastocysts were further treated with anti-mouse whole antibody and guinea pig complements to strip off trophoblast cells so that only ICM was collected for culture. Both sample groups were plated on mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblast (MEF) culture containing mES medium which was used as feeder cells. After colony formation was observed on day 7, suitable colonies were disaggregated by trypsinisation. Disaggregated cells were subcultured and plated on the feeder cells (passage 1). After 20 passages of subculturing, the mESC line was established. In the preliminary study, it is found that the ICM colony formation rate was higher using the immunosurgery technique (91.4%) than the whole-embryo culture technique (63.8%). In addition, the number of suitable colonies for mESC development was higher using the immunosurgery technique (77.6%) than the whole embryo culture technique (36.2%). The immunosurgery technique was used to develop mESC in further experiments. One mESC line from 867 blastocysts was derived using the immunosurgery technique. mESC characteristics were confirmed by a positive signal of OCT-4, SSEA-1 and alkaline phosphatase. The mESC was induced to spontaneously differentiate *in vitro*. Various cell types were observed including cardiomyocyte-like cell, fibroblast-like cell and neuron-like cell. We developed here a suitable technique to establish the mESC line with pluripotent characteristics. This development is a model for isolation of non-rodent ESC which will lead to a wide range of clinical applications and promising avenues for future research.

KEY WORDS: EMBRYONIC STEM CELLS/ PLURIPOTENT/ OUTBRED MOUSE/ ICM ISOLATION

111 pp.

Copyright by Mahidol University