

การทดลองที่ 2 ผลของชนิดของเซลล์ต้นแบบต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนโคลนโคและกระบือปลัก

Effects of donor cell types on developmental potential of cattle and swamp buffalo cloned embryos

บทนำ

โคและกระบือปลักเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญด้านการให้เนื้อ นม และแรงงานทางการเกษตร ปัจจุบันประชากรกระบือปลักลดจำนวนลงเนื่องจากอัตราการสืบพันธุ์ต่ำและมนุษย์ลดความต้องการ ทำให้ในอนาคตกระบือปลักอาจจะเป็นสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ การย้ายฝากนิวเคลียสด้วยเซลล์ร่างกายหรือการทำโคลนนิ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มจำนวนกระบือปลักพันธุ์ดี การทำโคลนนิ่งในโคมีความก้าวหน้ากว่าในกระบือปลักมาก ทั้งในด้านอัตราการผลิตตัวอ่อน โคลนในห้องทดลอง และอัตราการได้ลูกสัตว์โคลนเกิดมา การทำโคลนนิ่งโค เซลล์ต้นแบบแต่ละชนิดมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โคลน มีรายงานน้อยมากในกระบือปลักที่ทำการเปรียบเทียบชนิดของเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่ง และยังไม่มียางานการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำโคลนนิ่งโคและกระบือโดยตรง ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการใช้เซลล์ต้นแบบ 4 ชนิดเพื่อทำโคลนนิ่งโคและกระบือปลัก ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไขกระดูก เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อน เซลล์แกรนูโลซา และเซลล์คิมูลัส เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โคลนโคและกระบือปลัก

วิธีการทดลอง

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไขกระดูก

เก็บตัวอย่างไขกระดูกโคและกระบือปลักเพศผู้ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่น้ำเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 มม. แล้วนำไปวางในจานเลี้ยงเซลล์ แล้วปิดด้วยกระจกแก้ว จากนั้นเติมน้ำยา α MEM+10% FCS 5 mL หลังจากเลี้ยงได้ 8-10 วันจะมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เจริญขึ้นมาแล้วใช้สารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04% EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) เก็บเกี่ยวเซลล์แล้วนำไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM+10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตร.ซม. ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วจะเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อน

เก็บตัวอย่างลูกอ่อนโคและกระบือที่อายุประมาณ 50 วัน จากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในถุงพลาสติกและแช่ในกระดิกที่มีน้ำแข็งระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำการตัดส่วนที่เป็นผิวหนังของลูกอ่อนให้มีขนาดประมาณ

1x1 ซม. จำนวน 2 ชิ้น แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% จากนั้นตัดผิวหนังให้มีขนาดประมาณ 1x1 มม. แล้วนำไปไว้ในหลอดขนาด 50 mL ที่มีสารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04% EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) นาน 30 นาทีโดยเขย่าหลอดเป็นระยะ ดูดสารละลายที่มีเซลล์ที่ถูกย่อยออกมาไปกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 ไมครอน แล้วนำไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM+10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตร.ซม. ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วจะเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

การเตรียมเซลล์แกรนูโลซา

เก็บรังไข่ 2 ใบจากโคและกระปือตัวเดียวกันแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 mL ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. นำส่วนที่ดูดได้ไปไว้ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มม. แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยาย 40 เท่า แล้วคัดเลือกเซลล์แกรนูโลซาที่มีลักษณะติดกันเป็นแผ่นจำนวน 100 แผ่นไว้ในน้ำยา PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++} แล้วนำไปไว้ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 mL ที่มีสารละลาย Trypsin/EDTA นาน 20 นาทีแล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลงจนเซลล์แยกออกจากกัน แล้วนำไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM+10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตร.ซม. ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วจะเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

นำเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงใหม่ในน้ำยา α MEM+10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO_2 in air ก่อนใช้ 2-3 วัน แล้ว passage ทุกๆ 4-5 วัน จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมเซลล์คิวมูลัส

จะทำการแยกเก็บเซลล์คิวมูลัสโคและกระปือ จากไข่ที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว แล้วนำเซลล์คิวมูลัสสดไปใช้โดยไม่ผ่านการแช่แข็ง

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่โคและกระปือจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G (สำหรับโค) หรือเบอร์ 21G (สำหรับกระปือ) ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 mL ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ L น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/mL HCG, 0.02 AU/mL FSH และ 1 μ g/mL E_2 นำไปเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไข่กระปือที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้วมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออก แล้วคัดเลือกเฉพาะใบที่สุกแล้ว (มี 1" PB) ไปดูเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator

ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5 $\mu\text{g/mL}$ cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการคูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูได้ไปย้อมด้วย 5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342

การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (Parnpai et al., 1999) โดยใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบทั้ง 4 ชนิด (เปรียบเทียบชนิดเซลล์ต้นแบบ) จำนวน 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitelline space ของไข่ที่คูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไข่ครั้งละใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า จ่ายกระแสไฟ 26V/ใบ ระยะเวลา 17 μsec 2 ครั้งต่อเนื่องกัน แล้วนำไปไว้ในน้ำยา Emcare holding นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted microscope คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA, 10 $\mu\text{g/mL}$ cycloheximide (CHX) และ 1.25 $\mu\text{g/mL}$ cytochalasin D (CD) ในตู้บที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนย้ายฝากนิวเคลียสในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (Parnpai et al., 1999) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ไข่/100 μL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 , 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10 ไข่/100 μL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การทำ Parthenogenic activation (PA)

นำไข่โคและกระปือที่สุกแล้ว และไม่ต้องคูดนิวเคลียสออกมากกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ที่มี 1.25 $\mu\text{g/mL}$ CD และ 10 $\mu\text{g/mL}$ CHX ในตู้บที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไข่ไปเลี้ยงในหลอดแก้วเหมือนกับการเลี้ยงตัวอ่อนย้ายฝากนิวเคลียสในหลอดแก้ว

การนับจำนวนเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

นำตัวอ่อนโคและกระปือระยะแซซซิงบลาสโตซิสต์อายุ 7 วันซึ่งได้จากการย้ายฝากนิวเคลียสและจากการทำ PA มาย่อยชั้น zona pellucida ออกด้วย 0.5% protease แล้วนำไปล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา mDPBS+0.1% PVP แล้วนำไปบ่มในน้ำยา mDPBS+10% rabbit anti-buffalo spleenocytes นาน 45 นาที แล้วล้าง 3 ครั้งในน้ำยา mDPBS+0.1% PVP แล้วนำไปบ่มในน้ำยา mDPBS+10% guinea pig complement, 10 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide

และ 10 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33258 นาน 45 นาที แล้วล้าง 3 ครั้งในน้ำยา mDPBS+0.1% PVP แล้วนำไปไว้บนสไลด์แก้ว ปิดด้วย glycerol แล้วปิดด้วย cover slip แล้วทำด้วยน้ำยาทาเล็บบรรอบๆ cover slip จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ epifluorescence เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ ICM (สีฟ้า) และเซลล์ trophectoderm (สีแดง)

ผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Reproduction and Development (Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and Pampai, R. 2010. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 56: 49-54.) ดังรายละเอียดในเอกสารแนบหมายเลข