234537

การศึกษานี้เป็นการทดลองเพื่อผลิตแพะโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูและลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ โดยนำเซลล์ใบหูจากแพะเพศผู้และเพศเมีย เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเพศเมีย 3 ตัว ฉีดเข้าในไข่แพะที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วทำการเชื่อมให้เซลล์ติดกันด้วยกระแสไฟฟ้า นำไข่ที่เชื่อมติดกับเซลล์ต้นแบบมากระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี cytochalasin D และ cycloheximide เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa เป็นเวลา 32-36 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มไฟโบรบลาสจากใบหู อัตราการแบ่งตัว อัตราการเจริญสู่ระยะ 2 และ 4 เซลล์ ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ ของตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์เพศผู้สูงกว่าเพศเมีย และเมื่อนำตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ ไปย้ายฝากให้แพะตัวรับ มีเพียงแพะตัวรับที่ได้รับตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูเพศผู้เท่านั้นที่ตั้งท้อง (2/15, 13.3%) ส่วนแพะตัวรับ 19 ตัว ที่ได้รับตัวอ่อนแพะโคลนนิ่งจากเซลล์ไฟโบรบลาสเพศเมียไม่พบการตั้งท้อง เมื่อทำการผ่าตัดทำคลอดแพะตัวรับทั้งสอง ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมามีสุขภาพแข็งแรง แต่ลูกแพะตัวที่สองตายหลังจากคลอดได้ 32 ชั่วโมง เมื่อนำเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของลูกแพะโคลนนิ่งมาเป็นเซลล์ต้นแบบ พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ มีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูแพะเพศผู้ แต่ไม่พบการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนให้แพะตัวรับจำนวน 12 ตัว สำหรับกลุ่มไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเพศเมีย 3 ตัว พบว่าอัตราการเชื่อมติด อัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญสู่ระยะ 2-8 เซลล์ มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามไม่พบการตั้งท้องของตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อน อย่างไรก็ตามรายงานนี้นับเป็นรายงานความสำเร็จครั้งแรกในประเทศไทย ที่สามารถผลิตลูกแพะโคลนนิ่งได้ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากไข่แพะแช่แข็งด้วยวิธี cryotop เมื่อนำไข่แช่แข็งมาทำการละลายพบว่าอัตรารอดชีวิตของไข่แช่แข็งต่ำกว่าไข่สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (92.4% และ 99.4% ตามลำดับ) และเมื่อทำการโคลนนิ่งพบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ต้นแบบกับไข่แช่แข็งและไข่สดไม่มีความแตกต่างกัน อัตราการแบ่งตัวและการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง และ parthenogenetic activation (PA) จากไข่แช่แข็งต่ำกว่าไข่สด อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญสู่ระยะมอรูล่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ได้จากการทำ PA ในกลุ่มไข่สด (10.4%) มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ เมื่อนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการทำโคลนนิ่งและ PA ของกลุ่มไข่สดและไข่แช่แข็งมาทำการแช่แข็งและทำละลาย พบว่าตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็ง การศึกษาครั้งนี้นับเป็นรายงานแรกในการโคลนนิ่งแพะโดยใช้ไข่แช่แข็งด้วยวิธี cryotop

Abstract

In this study, we demonstrated the production of cloned goats using ear fibroblasts and fetal fibroblasts as donor cell. The ear fibroblasts of male and female goat, fetal fibroblasts from 3 individuals were transferred into enucleated goat oocytes and fusion with electrical stimuli. Then, the fused oocytes were activated with 7% ethanol for 5 min followed by incubated in cycloheximide and cytochalasin D for 5 h. After activation, the reconstructed embryos were cultured in mSOFaa medium for 32-36 h. For ear fibroblasts group, the rates of cleavage, development to 2- and 4-cell were no significant difference but the development to 8-cell of embryo derived from male ear fibroblasts was significant higher than that of female ear fibroblasts. The 2-8 cell stage embryos were surgically transferred into the oviducts of recipients. Only the recipients carried male cloned goat embryos were pregnant (2/15, 13.3%). On the other hand, 19 recipients of cloned embryos derived from female fibroblasts were not pregnant. Both pregnant recipients delivered two healthy male kids by Caesarean section. Both kids were phenotypically and genotypically identical to the donor. Unfortunately, one kid died 32 h after birth. Ear fibroblasts from cloned goat newborn were used as donor cell. We found that the development to 8-cell was higher than that from male ear fibroblasts. However, no pregnant recipient was found after transferred embryos to 12 recipients. In fetal fibroblasts from different 3 fetuses, there was no significant difference in the rates of fusion and cleavage but the development to 2-8 cell stages were significant difference when compared among groups. However, no pregnant recipient was found after embryo transfer. This is the first report of successful birth of cloned goat in Thailand. In this study, we examined the developmental potential of cloned goat embryos from vitrified oocytes by Cryotop method. After thawing, the survival rate of vitrified oocytes was significantly lower than fresh oocytes (92.4% and 99.4% respectively). When vitrified oocytes were used as recipient cytoplasm for cloning, the result shown that there was no significant different on fusion rate between vitrified and fresh oocytes. The cleavage and development to 8-cell stage rates of cloned and parthenogenetic activation (PA) embryos derived from vitrified oocytes were significantly lower than that fresh ooctyes. However, there was no significant different on development to morula stage among groups. Moreover, the blastocyst rate of PA embryos derived from fresh oocytes was significantly higher than other groups (10.4%). Vitrified cloned and PA embryos at blastocyst stage could not recovery after thawing. This is the first report of goat cloning using vitrified oocytes by Cryotop method.