



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ telomerase และความยาวของ telomere ในเอ็มบริโอโคลนนิ่งของกระบือโดยใช้เซลล์ร่างกายจากลูกอ่อนกระบือเชื่อมกับเซลล์ไข่กระบือหรือไข่โค"

Telomerase activity and telomere length of cloned buffalo embryos reconstructed by fusion of buffalo fetal fibroblasts and enucleated buffalo or bovine oocytes

โดย จักเนียร สายบุญ และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ telomerase และความยาวของ telomere ในเอ็มบริโอโคลนนิ่งของกระปือโดยใช้เซลล์ร่างกายจากลูกอ่อนกระปือเชื่อมกับเซลล์ไข่กระปือหรือไขโค”

Telomerase activity and telomere length of cloned buffalo embryos reconstructed by fusion of buffalo fetal fibroblasts and enucleated buffalo or bovine oocytes

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|-----------------------------|------------------|
| 1. จำเนียร สายขุน | มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. หทัยทิพย์ ศรีรัตนอุดมชัย | มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. กนก ภาวสุทธิไพศิฐ | มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. ยินดี กิตียนันท์ | มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายด้วยวิธีถ่ายฝากนิวเคลียส (somatic cell nuclear transfer, NT) เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่าสามารถจะเพิ่มจำนวนสัตว์ที่มีคุณค่าสูงได้ เช่น สัตว์ที่ได้รับการตกแต่งพันธุกรรม (genetically modified) หรือสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (endangered species) แม้ว่าการโคลนนิ่งจะประสบผลสำเร็จในสัตว์หลายชนิด เช่น แกะ โค แพะ หมู หนู กระต่าย และแมว แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดลูกโคลนนิ่งยังต่ำมาก เนื่องจากอัตราการแท้งระหว่างตั้งท้องและระหว่างคลอดสูงมาก โดยสาเหตุเชื่อว่าเกิดจากความไม่สมบูรณ์หรือความผิดปกติของการแสดงออกของยีน (incomplete or abnormal gene expression) ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อศึกษาอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนกระบือที่ผลิตโดยวิธีโคลนนิ่ง (NT) การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (in vitro fertilization; IVF) และกระตุ้นให้เซลล์ไข่แบ่งตัว (parthenogenetic activation; PA) (2) เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน telomerase ในตัวอ่อนกระบือระยะต่างๆ ที่ผลิตโดยวิธี IVF NT และ PA ผลการศึกษาพบว่า อัตราการแบ่งตัวในระยะ 2-4 เซลล์ และ 8-16 เซลล์ของตัวอ่อน NT และ PA สูงกว่า ($P<0.05$) ตัวอ่อน IVF ตัวอ่อน PA สามารถพัฒนาถึงระยะมอรูล่า และบลาสโตซิสสูงกว่า ($P<0.05$) ตัวอ่อน IVF และ NT การศึกษาเอนไซม์ telomerase พบว่า เซลล์ไข่สูงจะมี telomerase activity ลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ไข่อ่อน ระดับเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อน IVF และ NT ระยะ 2-4 เซลล์และ 8-16 เซลล์ จะอยู่ในระดับต่ำ แต่จะเริ่มสูงในระยะมอรูล่า และสูงสุด ($P<0.05$) ในระยะบลาสโตซิส ส่วนระดับเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อน PA จะต่ำตั้งแต่ระยะ 2-4 เซลล์ จนถึงระยะมอรูล่า และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะบลาสโตซิส ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนทั้ง 3 ชนิด พบว่า ระดับเอนไซม์ ในระยะ 2-4 เซลล์ และ 2-16 เซลล์ ไม่แตกต่างกัน แต่ในระยะมอรูล่าเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อน IVF และ NT จะสูงกว่า ($P<0.05$) ตัวอ่อน PA และในระยะบลาสโตซิสตัวอ่อน PA และ NT จะมีเอนไซม์ telomerase สูงกว่า ($P<0.05$) ตัวอ่อน IVF จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า ตัวอ่อนโคลนนิ่งสามารถ reprogramme และมีการแสดงออกของยีน telomerase ได้เช่นเดียวกับตัวอ่อน IVF และตัวอ่อน PA แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในอนาคตน่าจะศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ เพิ่มมากขึ้นรวมทั้งกลไกระดับ molecular ของการ reprogramming ในตัวอ่อนโคลนนิ่ง เช่น DNA methylation

Abstract

Somatic cell nuclear transfer (NT) has become a powerful tool for propagating high valuable animals such as genetic modified animals and endangered species. Although this technique has been successfully used to produce cloned offspring in sheep, cattle, goats, mice, pigs, rabbit and cats, however, the calving rate born from these species was very low due to high abortion rate of fetuses during gestation and neonatal period. The incomplete genetic reprogramming following NT or abnormal expression of developmental genes have been documented as a causes of developmental failure. Therefore, the objective the present study were 1) to investigate the in vitro developmental potential of buffalo embryos produced by in vitro fertilization (IVF), NT and parthenogenetic activation (PA), and 2) to examine and compare the telomerase gene expression in different stages of buffalo embryos produced by IVF, NT and PA. The buffalo embryos produced by NT and PA cleaved and developed to the 8-16-cell stage at a significantly ($P<0.05$) higher rate than those derived from IVF. There was significantly ($P<0.05$) higher of PA embryos developed to the morula and blastocyst stages than that of embryos derived from IVF or NT. Telomerase activity was detected in higher amounts in immature compared with mature oocytes ($P<0.05$). In IVF and NT embryos, telomerase activity was low in the 2-4-cell and 8-16-cell stages, the activity was significantly ($P<0.05$) increased at the morula stage, reaching highest level at the blastocyst stage. In PA embryos, low level of telomerase activity was detected from the 2-4-cell to the morula stage, and the highest level of telomerase activity were found at the blastocyst stage ($P<0.05$). There were no differences in telomerase activity of embryos at the 2-4-cell and the 8-16-cell stages among three methods used for embryo production. Activity in the morula stage of embryos produced by IVF and NT systems was significantly ($P<0.05$) higher than that produced by PA system. Telomerase activity in PA and NT blastocysts was significantly ($P<0.05$) higher than that derived from IVF blastocysts. These results suggest that the successful reprogramming of telomerase activity in buffalo NT embryos follows a similar pattern to that in embryos derived from IVF and PA. Further experiments are needed to study the expression of other developmental genes and the molecular mechanism(s) underlying reprogramming such as DNA methylation in cloned embryos.

บทนำ

ความสำเร็จในการโคลนนิ่งแกะ Dolly โดยใช้เซลล์ร่างกาย ในปี ค.ศ. 1997 ซึ่งเกิดจากการถ่ายฝากนิวเคลียสของเซลล์เต้านมจากแม่แกะอายุ 6 ปีให้กับเซลล์ไข่ที่ดัดนิวเคลียสออก แล้วนำตัวอ่อนย้ายฝากให้แม่อุ้มท้องจนได้ลูกแกะโคลนนิ่ง (Wilmut et al., 1997) จากความสำเร็จครั้งนี้ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงครั้งใหญ่ในการศึกษาวิจัยด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ (Reproductive biology), cell differentiation และ cellular aging ต่อมานักวิจัยประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งโค (Cibelli et al., 1998; Kato et al., 1998) หนู (Wakayama et al., 1998) แพะ (Baguisi et al., 1999) หมู (Polejaeva et al., 2000) แมว (Shin et al., 2002) และ กระต่าย (Chesne et al., 2002) แต่อัตราการเกิดลูกโดยวิธีโคลนนิ่งยังอยู่ในระดับที่ต่ำมาก (< 5%) เนื่องจากการแท้งระหว่างตั้งครรภ์หรือการตายขณะคลอดมีอัตราที่สูงมาก ความสำเร็จของการโคลนนิ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของเซลล์ที่ใช้ทำโคลนนิ่ง (donor cell type) วงจรชีวิตของเซลล์ตัวให้และเซลล์ไข่ (cell cycle) การแสดงออกของยีน (gene expression, gene reprogramming) ของเซลล์ตัวให้ นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากเซลล์ร่างกายต้องเปลี่ยนจาก differentiated เป็น undifferentiated เซลล์ เพื่อจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนต่อไป นอกจากนี้การแสดงออกของยีน ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อน การฝังตัว และการพัฒนาของ fetus ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่ง หากเซลล์ที่ใช้ทำโคลนนิ่ง ขาดประสิทธิภาพหรือขาดความสมบูรณ์ในการ reprogramming (incomplete reprogramming) จะทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนล้มเหลวและเป็นสาเหตุสำคัญของการแท้งและการตายขณะคลอด (Gurdon et al., 1999)

Telomere เป็น DNA-protein structure ที่พบบริเวณปลายโครโมโซมของยูคาริโอต โดยมีการเรียงตัวของเบสเป็น hexamer repeat sequence (TTAGGG) (Zakian, 1995) เอนไซม์ telomerase จะคอยซ่อมและสร้าง telomere ให้สมบูรณ์อยู่เสมอ ในเซลล์ทั่วไปพบว่าทุกๆ ครั้งของการแบ่งตัว ความยาวของ telomere จะลดลง เซลล์ที่แบ่งตัวหลายครั้งจะมีความยาวของ telomere สั้นลงมากซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ telomerase ลดลง ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการแก่ตัวของเซลล์ (cell aging) เมื่อการทำงานของเอนไซม์ telomerase ลดลง หรือไม่ทำงาน เซลล์จะหยุดแบ่งตัว และ telomere จะสั้นลงอย่างมาก เป็นเหตุให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนไป ทำให้เซลล์หยุดแบ่งตัว (senescence) และตาย (apoptosis)

เอนไซม์ telomerase จะไม่พบหรือพบน้อยมากในเซลล์ทั่วไป ยกเว้นเซลล์สืบพันธุ์, เซลล์มะเร็ง เซลล์ human fibroblast ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการจะพบ telomere สั้นลง 48 ± 21 bp ต่อการแบ่งตัว 1 ครั้ง (Hanley et al., 1990; Levy et al., 1992) Hastine และคณะ (1990) พบว่าเซลล์ lymphocyte จะมีความยาวของ Telomere ลดลง 33 bp ทุกๆ ปี จากการศึกษาในกระต่ายโดย Eisenhauer และคณะ (1997) พบว่าการทำงานของ เอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่ระยะ antrum และระยะก่อนการตกไข่ (preovulatory) จะอยู่ในระดับที่สูง และจะลดต่ำลงเมื่อไข่ตกจากรังไข่แล้ว (ovulated oocyte) ในกระต่ายเพศผู้พบว่าการทำงานของเอนไซม์ telomerase ของ spermatogonia จะอยู่ในระดับสูง และลดลงในระยะ pachytene spermatocyte

และ spermatid แต่ไม่พบการทำงานของเอนไซม์ telomerase ใน epididymal sperm เลย เมื่อนำเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิปฏิสนธิกัน พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์นี้ใน เอ็มบริโอระยะ 4 เซลล์

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนของโคที่ได้จากการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ (Xu and Yang 2000; Bett and King; 1999) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในทุกระยะของตัวอ่อน และมากที่สุดที่ในระยะบลาสโตซิส Xu และ Yang (2001) ได้รายงานว่าพบการทำงานของเอนไซม์ telomerase ทุกระยะของการแบ่งตัวในตัวอ่อนโคที่ได้จากการโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ fibroblast จากใบหู เช่นเดียวกับที่พบในตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิในห้องทดลอง (IVF) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนกระบือที่ได้จากการโคลนนิ่ง หรือแม้แต่จากการทำ IVF การศึกษาจรรยาบรรณของยีน telomerase จะเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่จะบ่งชี้ถึงการ reprogramme ของตัวอ่อนที่ได้จากวิธีโคลนนิ่ง

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของ cell cycle และการทำงานของเอนไซม์ telomerase ของเซลล์ fetal fibroblast ของกระบือในสภาพการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน
2. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนกระบือระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการทำ โคลนนิ่ง (NT) การปฏิสนธิในห้องทดลอง (IVF) และตัวอ่อนที่กระตุ้นให้เซลล์ไข่แบ่งตัวเอง (PA)

การดำเนินการวิจัย (Research design)

ในช่วง 6 เดือนแรกผู้วิจัยได้ดำเนินการตามแผนที่วางไว้ทุกประการซึ่งประกอบด้วยกิจกรรมต่างๆ คือ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ fetal fibroblast (FF) ของลูกอ่อนกระป๋อง (fetus)

นำลูกอ่อนกระป๋องอายุ 30-50 วัน ที่อยู่ในมดลูกมาจากโรงฆ่าสัตว์ผ่ามดลูกเอาลูกอ่อนมาล้างด้วยน้ำเกลือที่มียาปฏิชีวนะ penicillin 100 mg/ml , streptomycin 100 mg/ml และ fungizone 0.25 mg/ml ใช้กรรไกรตัดส่วนขา คอ และเอาอวัยวะภายในออก แล้วตัดส่วนที่เหลือให้เป็นชิ้นละเอียดมากที่สุด จึงย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin-EDTA 0.25% โดยนำไป incubate ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที นำเนื้อเยื่อที่ย่อยแล้วมาตกตะกอนในหลอดพลาสติกขนาด 15 ml ที่มีน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) เสริมด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS) เป็นเวลานาน 10 นาที ดูดเอาเซลล์ที่ลอยอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงใส่จานพลาสติกขนาด 60 mm แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C และความชื้นสูงเป็นเวลา 20-40 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อล้างเอาเซลล์ที่ตายออก นำเซลล์ที่เกาะกับจานพลาสติกไปเลี้ยงต่อ เมื่อเซลล์แบ่งตัวจนเต็มแล้วนำเซลล์ที่ได้แช่แข็งไว้ในไนโตรเจน เหลวที่อุณหภูมิ -196 °C เพื่อเก็บไว้ทำการทดลองต่อไป

2. ศึกษา cell cycle ของ FF โดยใช้เครื่อง fluorescence activated cell sorter (FACS)

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาละลายที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำไปปั่นล้างเป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในน้ำยา DMEM เสริมด้วย FBS 10% เซลล์ที่เลี้ยงในระยะนี้เรียกว่า passage 1 (P₁) เมื่อเซลล์แบ่งตัวจนเต็ม ทำ subculture โดยดูดน้ำยาเลี้ยงเก่าออกแล้วล้างด้วย PBS แล้วใช้เอนไซม์ Trysin-EDTA 0.25% ย่อยให้เซลล์หลุดและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เซลล์ที่ได้จะนำไปเพาะเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เซลล์ในระยะนี้เรียกว่า passage 2 (P₂) ก่อนศึกษา cell cycle แบ่งเซลล์ FF เป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 Cycling cells : เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมลูกวัว 10% จนแบ่งตัวประมาณ 80% ของจานเพาะเลี้ยง (80% confluency)

กลุ่มที่ 2 Confluent cells: เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมลูกวัว 10% จนแบ่งตัวเต็มจานเพาะเลี้ยง (100% confluency) หรือจนเซลล์มาติดกัน

กลุ่มที่ 3 เพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมลูกวัว 0.5% เป็นเวลา 5 วัน (Serum-starved) เพื่อชักนำให้หยุดวงจรชีวิตของเซลล์อยู่ที่ระยะพัก (Quiescence)

นำเซลล์ที่จะศึกษา cell cycle มาย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ปั่นให้ตกตะกอนแล้ว fix ด้วย ethanol 70% ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเอา fixative ออกแล้ว incubate ด้วย PBS ที่มี propidium iodide

10µg/ml, RNase 0.5 mg/ml และ Triton X-100 0.1% ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้ววัดระดับ DNA ด้วยเครื่อง FACS Vantage flow cytometer วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม WINMDI

3. ศึกษา telomerase activity และความยาว telomere ของ FF

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง cell cycle และ telomerase activity ดังนั้นเซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้จะเตรียมและเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 2. เพื่อมาศึกษา telomerase activity และความยาว telomere ตามวิธีการของ Kim และคณะ (1994)

3.1 การศึกษา telomerase activity

การวัดการทำงานของเอนไซม์ telomerase อาศัยหลักการที่เรียกว่า "Telomerase repeat amplification protocol" (TRAP) โดยใช้ Telo TAGGG telomerase PCR ELISA^{PLUS} kit (Boehringer Mannheim) ซึ่งแบ่งการทำงานออกเป็น 3 ขั้นตอน

ก. การสกัดโปรตีน (เอนไซม์ telomerase) จากเซลล์

เซลล์จะถูกสกัดด้วย Nonidet P-40 lysis buffer (Tris, MgCl₂, EGTA, NaCl, glycerol, PMSF, 2-mercaptoethanol, sodium deoxycholate) และ RNase inhibitor

ข. การเพิ่มปริมาณ telomeric DNA ด้วยเทคนิค PCR

เติมเอนไซม์ telomerase ที่สกัดได้จากข้อ ก. ในหลอดทดลอง PCR ที่มีสารละลายประกอบด้วย primer 2 ตัว คือ P1-TS primer ซึ่งถูกติดฉลากด้วย biotin และ P2 primer หลังจากนั้น

เพิ่มปริมาณ telomeric DNA โดยอาศัยเทคนิค PCR

ค. การตรวจหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ telomerase

นำ PCR product จากข้อ ข. มา hybridized ด้วย probe ที่จำเพาะกับ telomeric DNA PCR product ซึ่ง probe นี้ถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) หลังจากนั้นเติม hybridization product ลงใน micro-titer plate ซึ่ง hybridization product ที่มี biotin เกาะอยู่ จะถูกจับด้วย streptavidin ที่ coat ติดกับ microplate การวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ telomerase จะปรากฏออกมาเป็นสี โดยเติม anti-digoxigenin antibody ซึ่งติดอยู่กับเอนไซม์ horseradish peroxidase ลงใน microplate ปฏิกริยา และจะเห็นสารละลายปฏิกริยาเกิดเป็นสีเหลืองเมื่อเติมสารละลาย tetramethylbenzidine (TMB) substrate ซึ่งจะถูก metabolize จากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองโดยเอนไซม์ peroxidase นำ microplate ปฏิกริยา ไปวัด absorbance ที่มีความยาวคลื่น 450 nm ใน micro-titer plate reader

3.2 การวัดความยาวของ telomere

ความยาวของ telomere จะถูกกำหนดโดยวิธีที่เรียกว่า "Terminal restriction fragment" (TRF) โดยใช้ Telo TAGGG Telomere Length Assay Kit (Boehringer Mannheim) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน

ก. การสกัด genomic DNA จากเซลล์

เซลล์ตัวอย่างถูกสกัด genomic DNA โดยอาศัย DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Boehringer Mannheim) เริ่มจากผสมเซลล์หรือเนื้อเยื่อตัวอย่างเข้ากับ cellular lysis buffer ซึ่งเป็น strong anionic detergent และสารละลาย Proteinase K หลังจากนั้นทำการกำจัด RNA โดยเติมสารละลาย RNase ส่วนโปรตีนจะถูกกำจัดโดย การเติมสารละลาย protein precipitation และในที่สุดจะได้ genomic DNA ตามต้องการ

ข. การย่อย genomic DNA

purified genomic DNA จากข้อ ก. ถูกย่อยด้วย Hinf I/Rsa I restriction enzyme ซึ่งเอ็นไซม์ทั้งสองตัวนี้จะตัดเฉพาะเจาะจงกับ Telomeric DNA

ค. gel electrophoresis และ Southern blotting

นำ digested DNA จากข้อ ข. มา run 0.6% agarose gel electrophoresis และ ทำการ transfer Digested DNA จาก agarose gel ไปยัง nylon membrane โดยใช้ Southern blotting

ง. Hybridization และ Chemiluminescent detection

blotted DNA fragments ถูก hybridized กับ probe ที่จำเพาะเจาะจงกับ Telomeric DNA ซึ่งถูกติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) ต่อมา incubate ด้วย DIG-specific antibody ซึ่งจับอยู่กับ alkaline phosphatase โดยที่ Anti-DIG จะจับกับ DIG ที่ติดอยู่บน blotted hybridization หลังจากนั้นวิเคราะห์หาความยาวของ Telomeric DNA โดยเติม CDP-Star ซึ่งเป็น alkaline phosphatase chemiluminescent substrate และนำไป expose กับ X-ray film ต่อไป

4. เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่กระปือและโคให้สุกในหยดน้ำยาเพาะเลี้ยง (In vitro maturation; IVM)

นำรังไข่กระปือจากโรงฆ่าสัตว์ใส่ใน NaCl 0.9% ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 °C มาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 3-4 ชั่วโมง ล้างรังไข่ 3 ครั้งด้วย NaCl 0.9% ที่มี penicillin 100 mg/ml, streptomycin 100 mg/ml และ fungizone 0.25 mg/ml ใช้เข็มขนาดเบอร์ 18 ติดกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml เจาะฟอลลิเคิล ขนาด 3-6 mm ที่พบบนผิวรังไข่ ดูดเซลล์ไข่และน้ำหล่อเลี้ยงเซลล์ไข่ (follicular fluid) เข้าในกระบอกฉีดยาดูดเซลล์ไข่ออกจากน้ำหล่อเลี้ยงภายใต้กล้อง stereomicroscope ที่กำลังขยาย 20-30 เท่า ล้างเซลล์ไข่ 3 ครั้งด้วยน้ำยา HEPES buffered Tyrode's Medium (TALP-HEPES) แยกเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ห่อหุ้มเซลล์ไข่ (cumulus cell) ตั้งแต่ 4-5 ชั้นขึ้นไปและ cytoplasm สม่่าเสมอไปเพาะเลี้ยงในหยดน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM 199 ที่ละลายอยู่ใน Earle's salt medium และเสริมด้วย 0.25 mM pyruvate, 10% heat-treated fetal calf serum (HTFCS), 5 µg/ml porcine follicle-stimulating hormone (pFSH), โดยเลี้ยงเซลล์ไข่ 10 ฟอง ต่อหยด น้ำยาเพาะเลี้ยงขนาด 50 µl ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 mm ที่คลุมด้วย mineral oil 10 ml ในตู้บ่มซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 39 °C ในบรรยากาศของ 5% CO₂ และความชื้นสูงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ไข่อสุกจะพบว่ามีกรกระจายของ

เซลล์ห่อหุ้มเซลล์ไข่ และถ้าย่อยเซลล์ห่อหุ้มเซลล์ไข่ออกจะพบโพลารอดี (first polar body) อยู่ที่ช่องระหว่างเปลือกหุ้มเซลล์ไข่และเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (perivitelline space; PVS)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่โคทำเช่นเดียวกับกระป๋องแต่เพาะเลี้ยงใน TCM 199 ที่ละลายอยู่ใน Earle's salt medium และเสริมด้วย 0.25 mM pyruvate, 10% heat-treated fetal calf serum (HTFCS), 15 $\mu\text{g/ml}$ porcine follicle-stimulating hormone (pFSH), 1 $\mu\text{g/ml}$ Luteinizing hormone (LH) และ 1 $\mu\text{g/ml}$ estradiol

ในช่วง 6 เดือนหลัง ผู้วิจัยพบปัญหาและอุปสรรคบางประการคือ จำนวนรังไข่และเซลล์ไข่โคมีจำนวนน้อยมากไม่เพียงพอต่อการทำวิจัย เนื่องจากโคที่ถูกฆ่าจากโรงฆ่าสัตว์ส่วนใหญ่เป็นตัวผู้ ทำให้ไม่มีรังไข่เพียงพอที่จะดำเนินการตามแผนที่วางไว้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนแปลงแผนการวิจัยโดยการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนจากกระป๋องที่ได้จากการโคลนนิ่ง IVF และการกระตุ้นให้แบ่งตัวเอง ซึ่งนับว่ามีความสำคัญมากเนื่องจากตัวอ่อน IVF และ PA เป็นกลุ่มควบคุมที่ดีที่จะเปรียบเทียบคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง โดยเฉพาะการแสดงออกของเอนไซม์ Telomerase

กิจกรรมต่างๆที่ดำเนินการในช่วง 6 เดือนหลังได้แก่

5. การทำปฏิสนธิเซลล์ไข่กระป๋องกับเซลล์อสุจิ (in vitro fertilization; IVF)

ใช้เซลล์อสุจิที่แช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว มาละลายและ swim up ในน้ำยา Sperm-TL โดยใช้ semen 100 μl ต่อน้ำยา sperm-TL 1 ml ทิ้งไว้ให้เซลล์อสุจิว่ายน้ำขึ้นมาเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ดูดเอาน้ำยาส่วนบนประมาณ 0.8 ml แล้วนำมาปั่นที่ 400 g เป็นเวลา 20 นาที ดูดเอาน้ำยาส่วนบนทิ้งไปเหลือ pellet ของเซลล์อสุจิที่ก้นหลอดเพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพเซลล์อสุจิและทำ IVF ในห้องทดลอง

เตรียมน้ำยา IVF-TALP เสริมด้วย 4 mg/ml BSA เตรียมหยदन้ำยาใน petri dish ขนาดหยदन้ำยา 50 μl เข้าตู้บ่มที่มี CO_2 5% อุณหภูมิ 39 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง นำไข่ที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง มาล้างด้วยน้ำยา TALP-HEPES 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำยา IVF อีก 2 ครั้ง จึงนำไปใส่ในหยदन้ำยา IVF ที่เตรียมไว้ โดยใช้ไข่ 10 ฟอง/50 μl ในหยदन้ำยา IVF จะมีเซลล์อสุจิความเข้มข้น 2×10^6 ล้าน/ml และมี 10 $\mu\text{g/ml}$ heparin 0.2 mM penicillamine และ 0.1 mM hypotaurine เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่กับเซลล์อสุจิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ไข่ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ BRL cell ในหยदन้ำยา TCM 199 เสริมด้วย 10% FBS เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบ เพอร์เซนตการแบ่งตัวจึงนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนไข่กระป๋องเป็นเวลาอีก 5 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนพัฒนาเป็นระยะบลาสโตซิสต์

6. การถ่ายฝากนิวเคลียส (nuclear transfer: NT) หรือโคลนนิ่ง (Cloning) โดยใช้เซลล์ fetal fibroblast การถ่าย

6.1 การเตรียม donor cell (FF)

เซลล์ FF ที่จะใช้ทำโคลนนิ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ระหว่าง P2 ถึง P8 และเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่มี PBS 0.5% เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เซลล์อยู่ในระยะ quiescence เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 จะให้ผลการทำโคลนนิ่งดีกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะอื่นของ cell cycle ใช้เอนไซม์ Trypsin-EDTA 0.25% ย่อยให้ FF หลุดจากจานพลาสติกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้วปั่นล้างให้ตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในหยดน้ำยาโคลนนิ่งที่มีเซลล์ไข่อยู่

6.2 การเตรียมเซลล์ไข่

นำเซลล์ไข่ที่มีการกระจายของ cumulus cell มา incubate ใน TALP-Hepes ที่มีเอนไซม์ hyaluronidase 0.1% แล้วใช้ปิเปตที่มีรูขนาดเล็กดูดเซลล์ไข่ขึ้นลงเพื่อให้ cumulus cell หลุดออกจากเซลล์ไข่ นำเซลล์ไข่ที่สุก (มี 1st polar body) ไปใส่ในน้ำยาโคลนนิ่งที่มี cytochalasin B 7.5 $\mu\text{g/ml}$ และ Hoechst 33342 10 $\mu\text{g/ml}$ ใช้ holding pipette จับเซลล์ไข่แล้วหมุนให้ PB อยู่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา ใช้ injection pipette เจาะเปลือกหุ้มเซลล์ไข่ดูดเอา PB และ cytoplasm 10-20% ออกมา ตรวจสอบว่าไม่มี DNA เหลืออยู่ในเซลล์ไข่ โดยเปิดแสง UV เป็นเวลา 2-5 วินาที ใช้ injection pipette ดูดเซลล์ FF 1 เซลล์ แล้วนำไปใส่ที่ช่องว่างระหว่างเปลือกหุ้มเซลล์ไข่และเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ นำเซลล์ไข่กับเซลล์ FF ไป fuse โดยผ่านกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง electrofusion นำเซลล์ที่ fuse แล้วไปเพาะเลี้ยงในน้ำยา TCM 199 เสริมด้วย 10% FBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจสอบความสำเร็จของการ fuse นำเซลล์ที่ fuse กันไปกระตุ้นด้วย calcium ionophore 5 μM เป็นเวลา 5 นาที แล้ว incubate ในน้ำยา 6-DMAP (dimethylaminopurine) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเซลล์ไข่ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ BRL cell ในหยดน้ำยา TCM 199 เสริมด้วย 10% FBS เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบ เปอร์เซนต์การแบ่งตัวจึงนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อไข่กระปือเป็นเวลาอีก 5 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนพัฒนาเป็นระยะ blastocyst

7. การกระตุ้นเซลล์ไข่ให้แบ่งตัวเอง โดยใช้ ionophore (Pathenogenetic activation: PA) นำเซลล์ไข่สุกที่ย่อยคลุมัลเซลล์ออกแล้วใส่ในน้ำยา TCM- Hepes ที่มี calcium ionophore (A23187) 5 μM เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ไข่ไปเพาะเลี้ยงในน้ำยา TCM 199 ที่มี DMAP 2 mM นำเซลล์ไข่ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ BRL cell ในหยดน้ำยา TCM 199 เสริมด้วย 10% FBS เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบ เปอร์เซนต์การแบ่งตัวจึงนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อไข่กระปือเป็นเวลาอีก 5 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนพัฒนาเป็นระยะ blastocyst

8. ศึกษา telomerase activity ของเอมบริโอโคลนนิ่ง

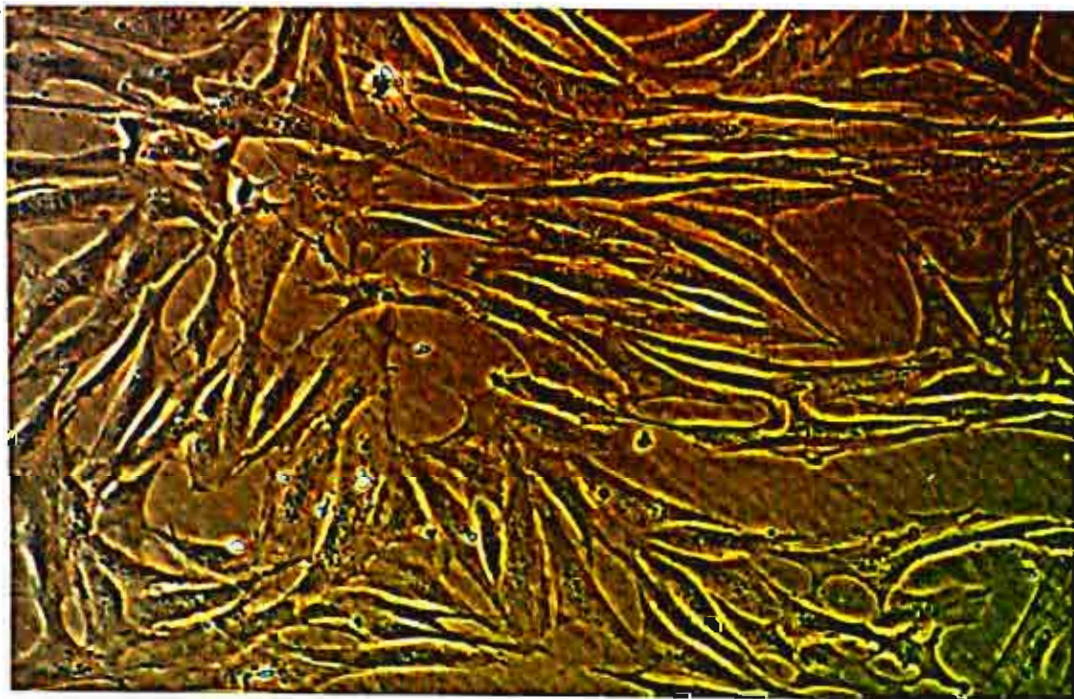
นำเซลล์ไข่อ่อน (immature oocyte) ซึ่งอยู่ระยะ prophase I เซลล์ไข่สุก (mature oocyte) ซึ่งอยู่ระยะ metaphase II และตัวอ่อนกระป๋องที่ผลิตโดยการทำ IVF, NT และ PA ในระยะ 2-4 เซลล์ 8-16 เซลล์ มอริลล่า และบลาสโตซิส มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase โดยใช้ Telomerase ELISA kit ตามวิธีในข้อ

3.1

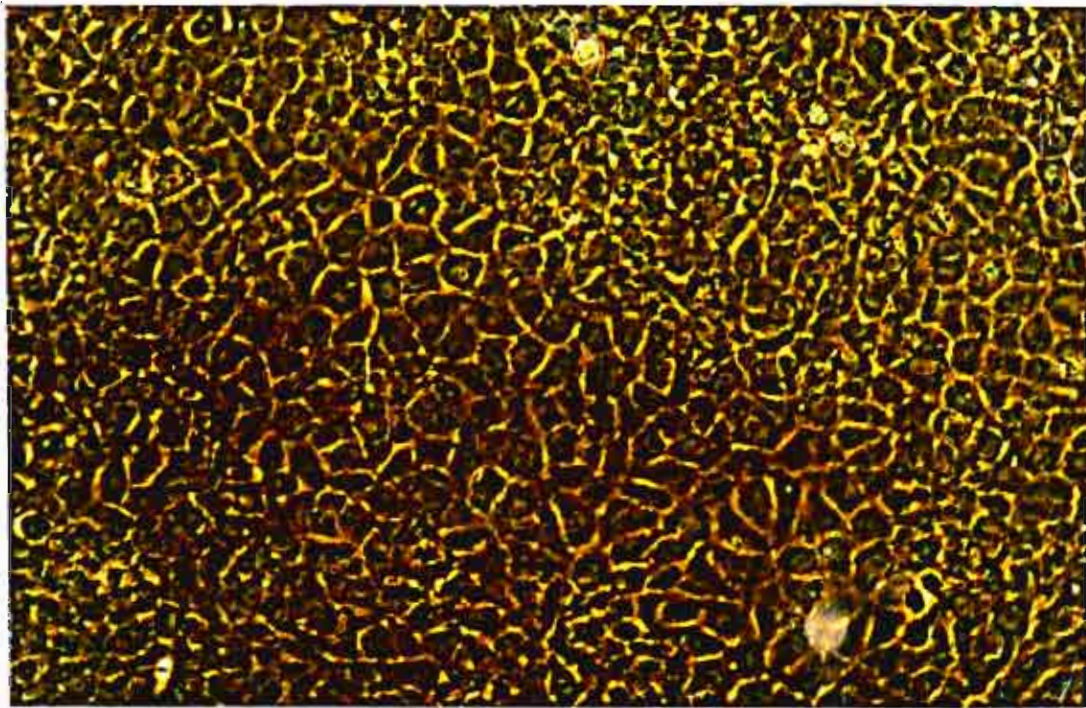
ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ fetal fibroblast (FF) ของลูกอ่อนกระป๋อง (fetus)

นำลูกอ่อนกระป๋องอายุประมาณ 30-50 วัน แยกเอาอวัยวะภายในออก ตัดขาหน้า ขาหลังและศีรษะออก ใช้กรรไกรตัดเนื้อเยื่อที่เหลือให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้เอนไซม์ Trysin-EDTA 0.25% เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C นำเซลล์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย DMEM เติมน้ำตาลกลูโคส 10% ในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง 2 ถึง 4 วัน จะได้เซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นรูปกระสวย (รูปที่ 1) เมื่อเซลล์แบ่งตัวจนเต็มจานเพาะเลี้ยง แช่แข็งเซลล์ FF ด้วย DMSO 10% ในน้ำยาเพาะเลี้ยงแล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บทำการทดลองต่อไป เพาะเลี้ยงเซลล์ FF และ passage ทุกๆ 7 วัน หรือเมื่อเซลล์แบ่งตัวจนเต็มจานเพาะเลี้ยง จากการศึกษาพบว่า FF เซลล์สามารถแบ่งตัวได้ดีในช่วง passage ต้นๆ (passage 1-10) หลังจาก passage 15 เซลล์จะแบ่งตัวช้าลง บางเซลล์มีลักษณะแบนๆและมีขนาดโตขึ้นเมื่อเทียบกับระยะแรกของการเลี้ยง ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่ใกล้หมดอายุ (senescence) เซลล์ FF จากลูกอ่อนกระป๋องบางตัวพบว่าการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและรูปร่างเป็น immortal cells คือมีลักษณะเป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยม (รูปที่ 2) ซึ่งจะสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างไม่จำกัด



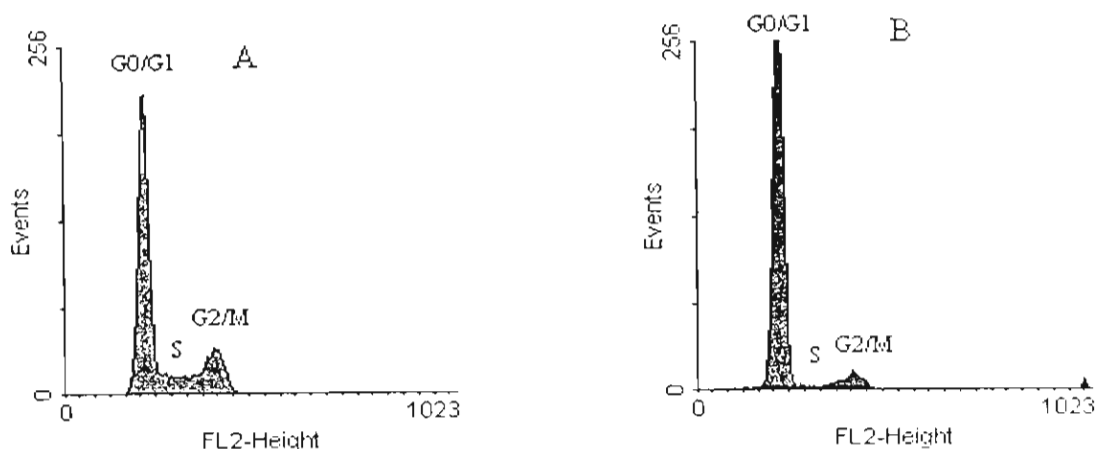
รูปที่ 1 ลักษณะรูปร่างเซลล์ FF ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง 2 ถึง 4 วัน เป็นเซลล์รูปกระสวย



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและรูปร่างเป็น immortal cells คือมีลักษณะเป็นเซลล์รูปหลายเหลี่ยม ซึ่งจะสามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างไม่จำกัด

2. การศึกษาวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle)

เมื่อนำเซลล์แต่ละกลุ่มไปผ่านขบวนการย้อมด้วยสี propidium iodide ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งให้สีฟลูออเรสเซนซ์เป็นสีแดง แล้วนำไปวัดปริมาณ DNA เพื่อศึกษา cell cycle โดยใช้เครื่อง Flow cytometer ผลการทดลองแสดงใน รูปที่ 3 และ ตารางที่ 1



รูปที่ 3 แสดงฮิสโตแกรมของวงจรชีวิตเซลล์ (cell cycle) ของเซลล์ฟีตัสไฟโบรบลาสต์ในระยะ G₀/G₁, S และ G₂/M (A) เพราะเลี้ยงแบบ cycling : G₀/G₁ = 67.5%, S = 12.9%, and G₂/M = 18.1%. B) เพราะเลี้ยงแบบ serum-starved : G₀/G₁ = 89.9%, S = 3.5%, and G₂/M = 5.6%.

ตารางที่ 1. แสดงผลการศึกษามูลของภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต่างกันต่อวงจรชีวิตของเซลล์โดยใช้เครื่อง Flow cytometer

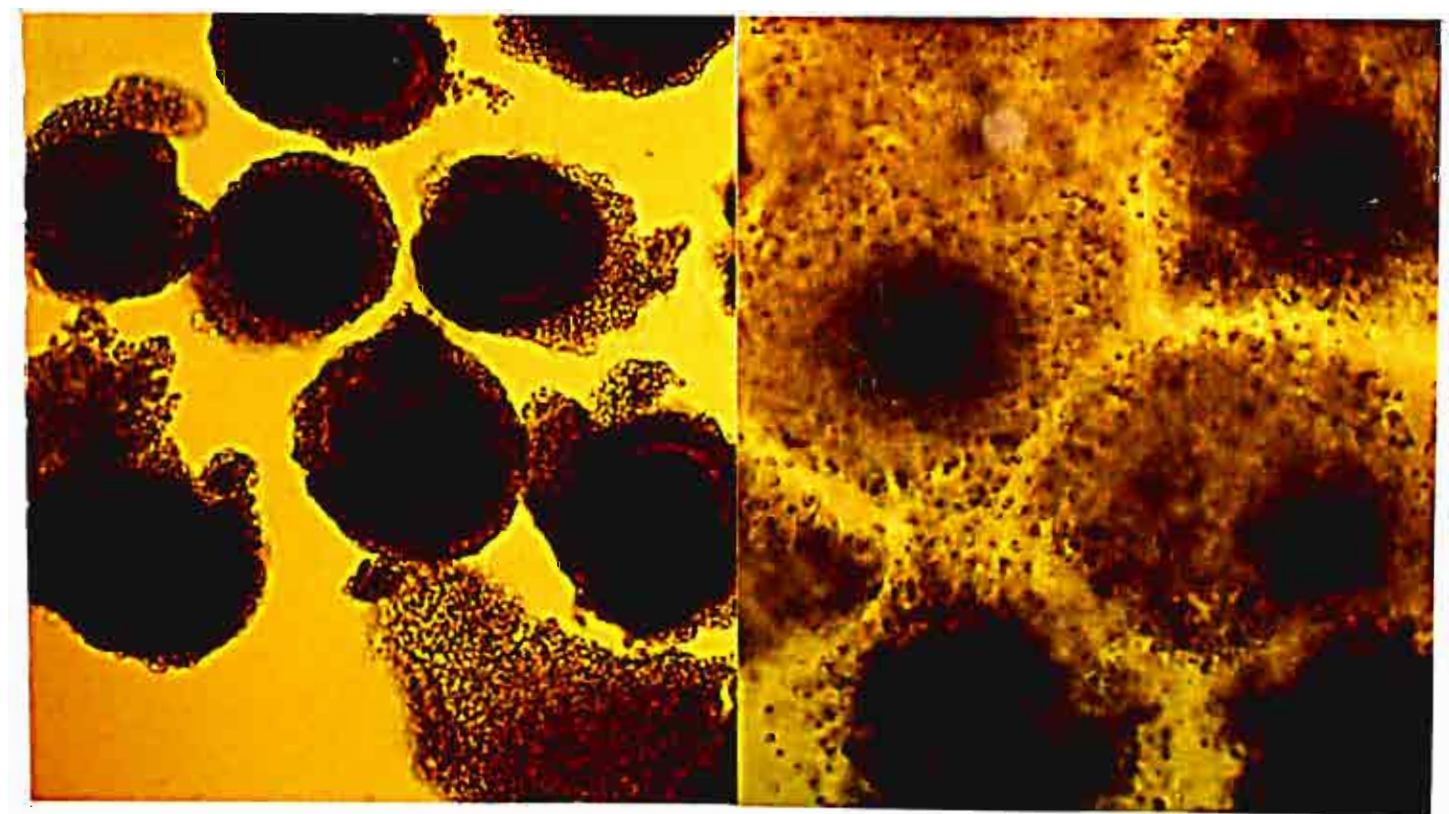
Culture treatment	% $\pm$ SD of cells at different cell cycle phase		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Cycling	68.2 $\pm$ 2.6 ^a	12.2 $\pm$ 2.3	18.3 $\pm$ 2.5 ^a
Confluent	72.8 $\pm$ 5.3 ^a	9.3 $\pm$ 3.4	14.5 $\pm$ 1.3 ^a
Serum-starved	88.8 $\pm$ 6.2 ^b	4.5 $\pm$ 2.1	5.1 $\pm$ 2.7 ^b

Different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมลูกวัว 0.5% (serum-starved เป็นเวลา 2 วัน จากเซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูปกระสวยจะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่มีลักษณะแบนๆเกาะติดกับจานเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ในระยะพัก เซลล์จะหยุดการแบ่งตัวอยู่ที่ระยะ G₀/G₀ 88.8% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงตามปกติในน้ำยาที่มีซีรัมลูกวัว 10%(cycling) ซึ่งเซลล์อยู่ที่ระยะ G₀/G₁ 68.2% ขณะที่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจนแบ่งตัวเต็มจานเพาะเลี้ยงหรือจนติดกัน (confluent) ได้เซลล์อยู่ที่ระยะ G₀/G₁ 72.3% เซลล์ที่อยู่ในระยะสร้างสารพันธุกรรม (DNA synthesis, S-phase) ระยะการแบ่งตัว (G₂/M) พบในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงตามปกติมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาที่ลดปริมาณซีรัมลูกวัวลง ในรายงานการวิจัยในแกะและโคพบว่าเป็นเซลล์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อนำมาทำโคลนนิ่งคือ เซลล์ที่อยู่ในระยะ G₀/G₁

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่โคและกระปือให้สุกในห้องทดลอง (in vitro maturation, IVM)

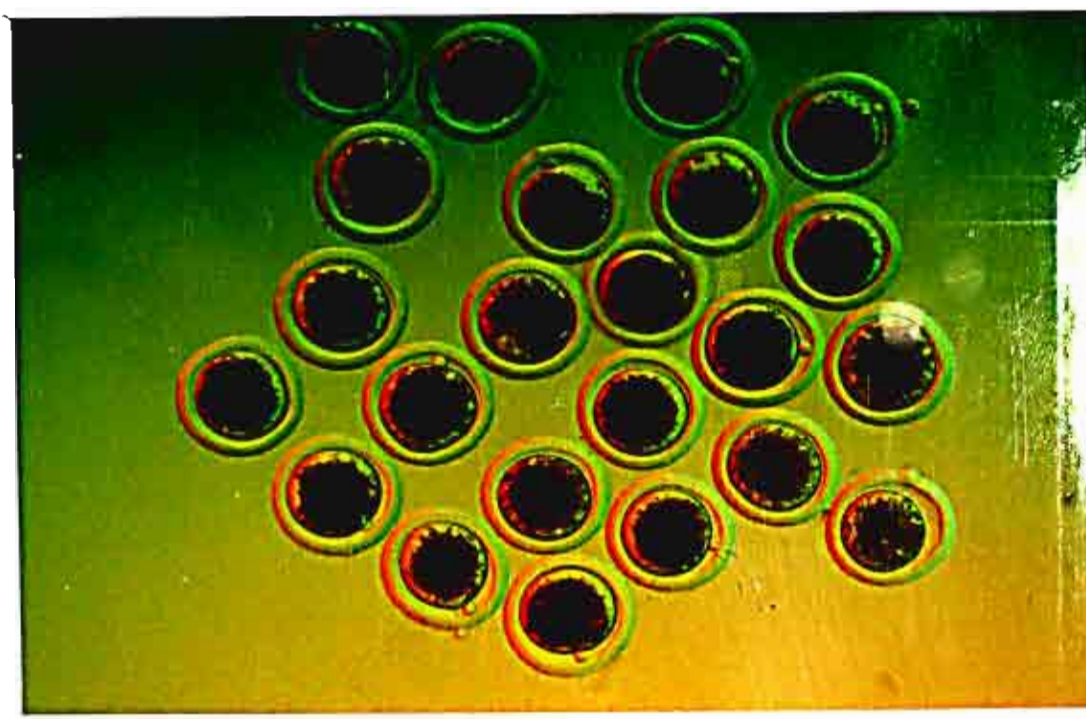
เซลล์ไข่อ่อนที่เจาะได้จะมีเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ (cumulus cells) ห่อหุ้มอย่างหนาแน่น (รูปที่ 4A) จำนวนเซลล์ไข่โคที่เจาะเก็บได้โดยเฉลี่ยเท่ากับ 8 ใบต่อ 1 รังไข่ ซึ่งมากกว่าในกระปือที่ได้ 3 ใบต่อ 1 รังไข่ เนื่องจากขนาดของฟอลลิเคิลของกระปือมีขนาดเล็กกว่าและมีจำนวนน้อยกว่าของโค เมื่อนำเซลล์ไข่ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเลี้ยงใน TCM 199 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ไข่ที่สุกจะพบว่ามีการกระจายของเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ (รูปที่ 4B) เมื่อใช้เอนไซม์ hyaluronidase ย่อยเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ออกจะพบ polar body อยู่ที่ช่องระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเปลือกหุ้มเซลล์ไข่ (perivitelline space) (รูปที่ 5) เซลล์ไข่สุกนี้จะนำไป IVF, NT และ PA เปอร์เซ็นต์การสุกของเซลล์ไข่โคเท่ากับ 75% ซึ่งสูงกว่าในกระปือซึ่งได้ 65% การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่กระปือให้สุกมีความยากกว่าเซลล์ไข่โคมาก ทำให้ได้อัตราการสุกของไข่กระปือต่ำกว่าของโค



รูปที่ 4 A) เซลล์ไข่อ่อนก่อนเพาะเลี้ยงจะมีเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ตั้งแต่ 5 ชั้นขึ้นไป ลักษณะ cytoplasm คมำเสมอ B) เซลล์ไข่สุกหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จะพบว่ามีการกระจายของเซลล์หุ้มเซลล์ไข่

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์ไข่ที่เจาะได้และอัตราการสุกหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง

สัตว์	จำนวนรังไข่	จำนวนไข่	จำนวนไข่สุก	เปอร์เซ็นต์ไข่สุก
โค	58	465	348	75%
กระบือ	391	1,567	1,017	65%



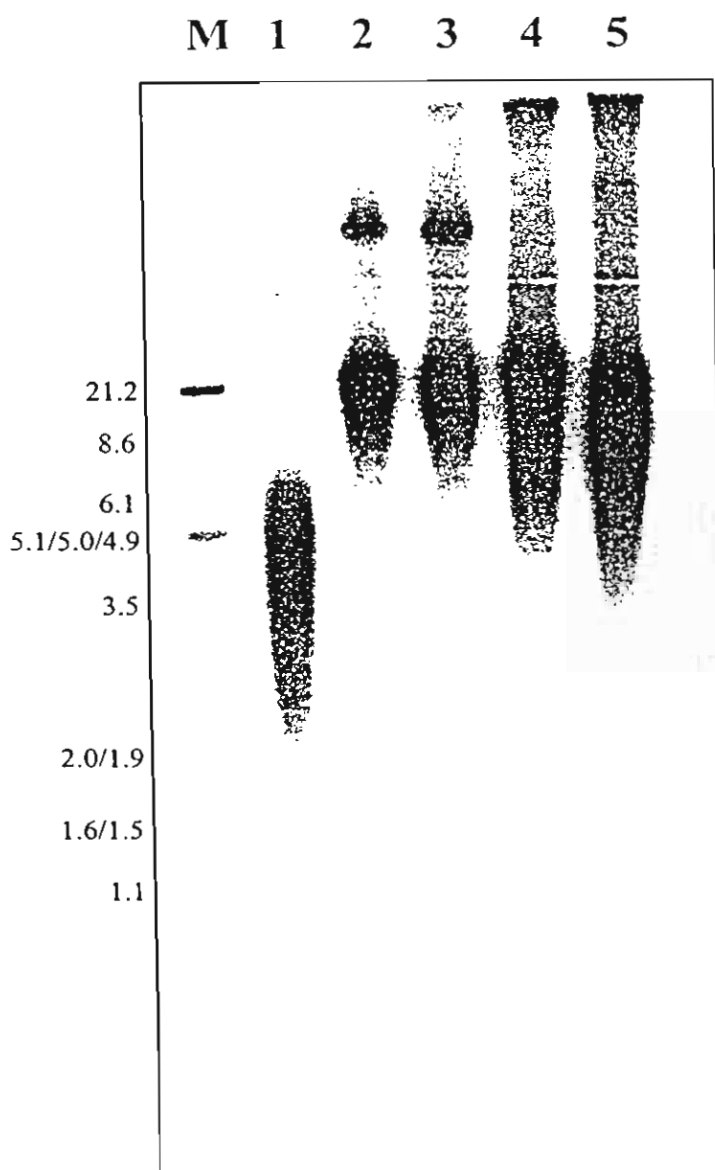
รูปที่ 5 เมื่อใช้เอนไซม์ hyaluronidase ย่อยเซลล์ห่อหุ้มเซลล์ไข่ออกจะพบ polar body อยู่ที่ช่องระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเปลือกหุ้มเซลล์ไข่ (perivitelline space)

4. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ของเซลล์ FF

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase พบว่าเซลล์ FF ที่เพาะเลี้ยงในระยะแรก (early passage) จะมีการทำงานของเอนไซม์ telomerase มากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปหลาย passage เซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน passage ที่ 3 มีการทำงานของเอนไซม์ telomerase สูงกว่า passage ที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์ที่อยู่ในระยะพัก โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรัมลูกวัว 0.5% เป็นเวลา 5 วัน หรือเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงปกติจนเซลล์มาติดกัน จะมีการทำงานของเอนไซม์ telomerase ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงตามปกติ เซลล์ฟีตัสไฟโบรบลาสต์มีการทำงานของเอนไซม์ telomerase สูงกว่าไฟโบรบลาสต์ ข้อมูลเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ telomerase นี้จะเป็นสิ่งสำคัญที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการ reprogramming ของเซลล์ FF หลังจากเชื่อมกับเซลล์ไข่ในการทำโคลนนิ่ง

5. ศึกษา ความยาว telomere ของเซลล์ FF

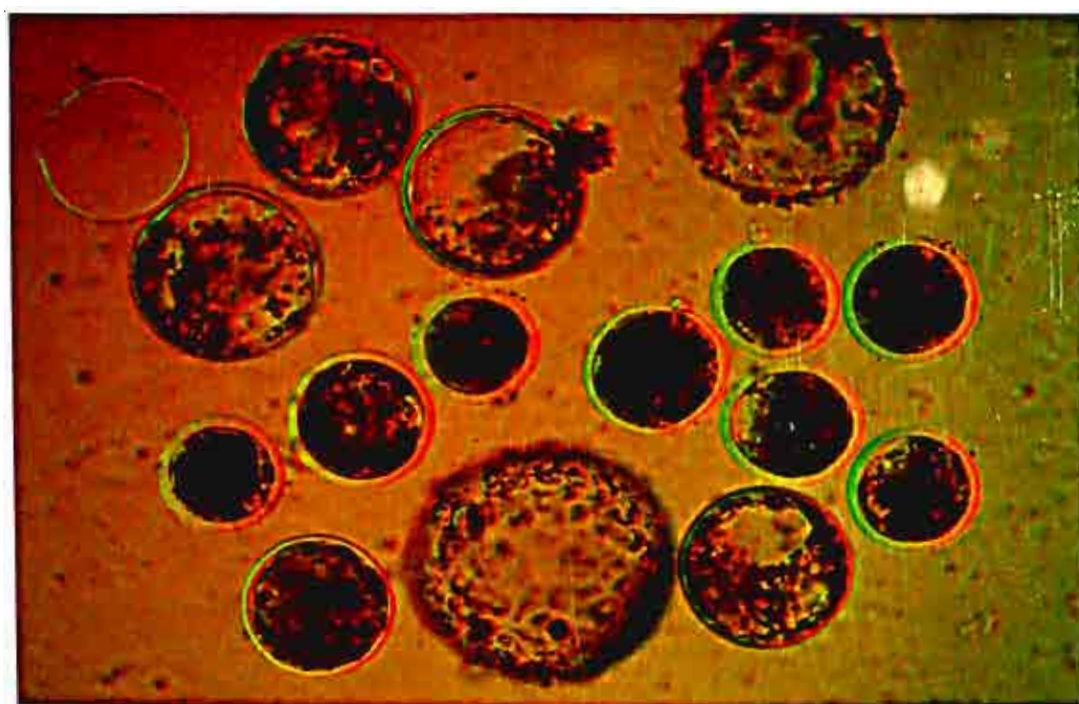
ผู้วิจัยได้ศึกษาความยาวของ telomere จากเซลล์ FF ที่ได้จากลูกวัวอายุ 2 เดือน และแม่วัวอายุ 6 ปี โดยใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน passage ที่ 3 และยังศึกษาความยาว telomere ของเซลล์ FF ที่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเป็น immortal cells เมื่อเพาะเลี้ยงใน passage ที่ 15 (ประมาณ 2 เดือน) จากการศึกษาพบว่า ความยาว telomere ของเซลล์ FF ได้จากลูกกระบือและแม่กระบือไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 6) ขณะที่ความยาวของ telomere ของ immortal เซลล์จะสูงกว่าเซลล์ FF ที่ได้จากลูกกระบือและแม่กระบือเล็กน้อย



รูปที่ 6 Southern blot แสดงความยาวของ telomere จากเซลล์ FF จากกระบืออายุ 6 ปี เซลล์ FF จากลูกกระบือเกิดใหม่อายุ 2 เดือน และ immortal cells ความยาว telomere ของเซลล์เซลล์ FF จากลูกกระบือและแม่กระบือไม่แตกต่างกัน ขณะที่ความยาวของ telomere ของ immortal เซลล์จะสูงกว่าเซลล์เซลล์ FF ได้จากลูกกระบือและแม่กระบือเล็กน้อย (Lane 1=low control, Lane 2=เซลล์ไฟโบรบลาสจากแม่กระบืออายุ 6 ปี Lane 3= เซลล์ไฟโบร บลาสจาก ลูกกระบือเกิดใหม่อายุ 2 เดือน Lane 4= immortal cells, Lane 5= high control)

5. การปฏิสนธิระหว่างเซลล์ไข่กับเซลล์อสุจิ (IVF)

หลังจากการปฏิสนธิระหว่างเซลล์ไข่กับเซลล์อสุจิเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จะได้ตัวอ่อน ในระยะ 1 เซลล์ (Zygote) และจะแบ่งตัวในระยะ 2-4 เซลล์ในวันที่ 1-2 ระยะ 6-8 เซลล์ ในวันที่ 3 ระยะมอรูล่าในวันที่ 5 และระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ 6-7 (รูปที่ 7) ของการเพาะเลี้ยง อัตราการพัฒนามเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆของ ตัวอ่อนกระป๋องที่ได้จากการทำ IVFแสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าเซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ 36 % ซึ่งตัวอ่อนเหล่านี้ พร้อมที่จะนำไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับตั้งครรภ์ และตกไข่ได้



รูปที่ 7 ตัวอ่อนกระป๋องที่ได้จากการทำ IVF ระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

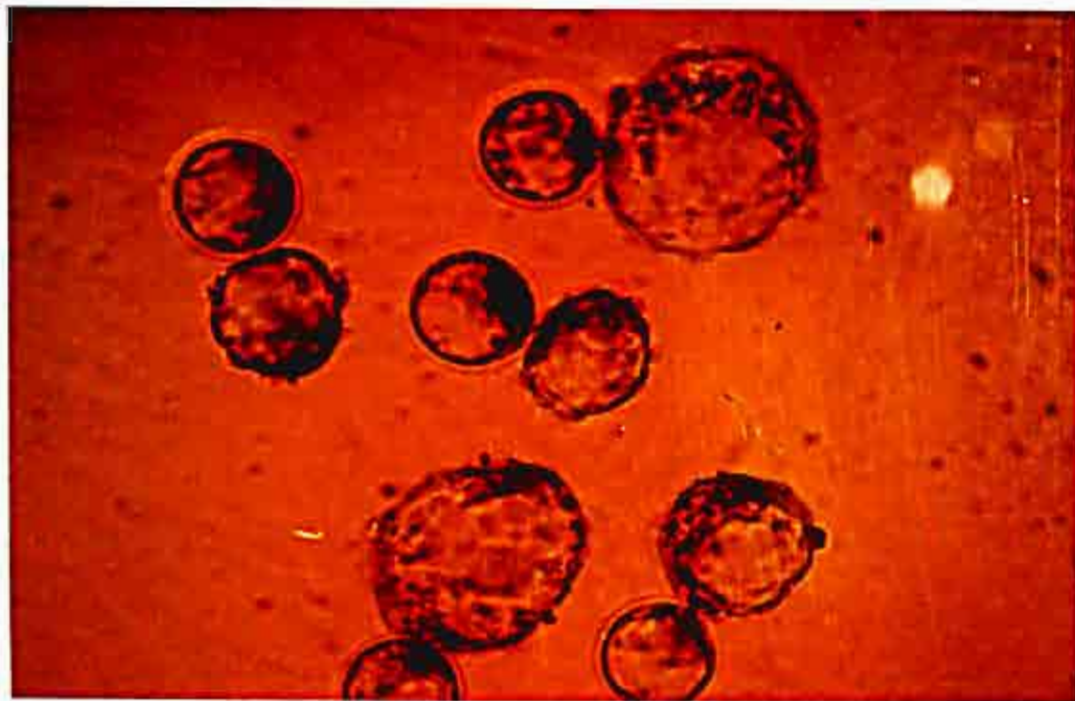
ตารางที่ 3. แสดงผลการพัฒนาของตัวอ่อนกระป๋องที่ผลิตโดยวิธี IVF, NT และ PA,

Method	Culture	No. (%) of embryos developed to			
		2-4-cell	8-16-cell	Morula	Blastocyst
IVF	131	84 (64) ^a	75 (51) ^a	46 (35) ^a	43 (33) ^a
NT	205	164 (80) ^b	146 (71) ^b	76 (36) ^a	65 (32) ^a
PA	238	185 (78) ^b	171 (72) ^b	152 (64) ^b	146 (57) ^b

Different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

6. การถ่ายฝากนิวเคลียส (Nuclear transfer ; NT หรือ โคลนนิ่ง)

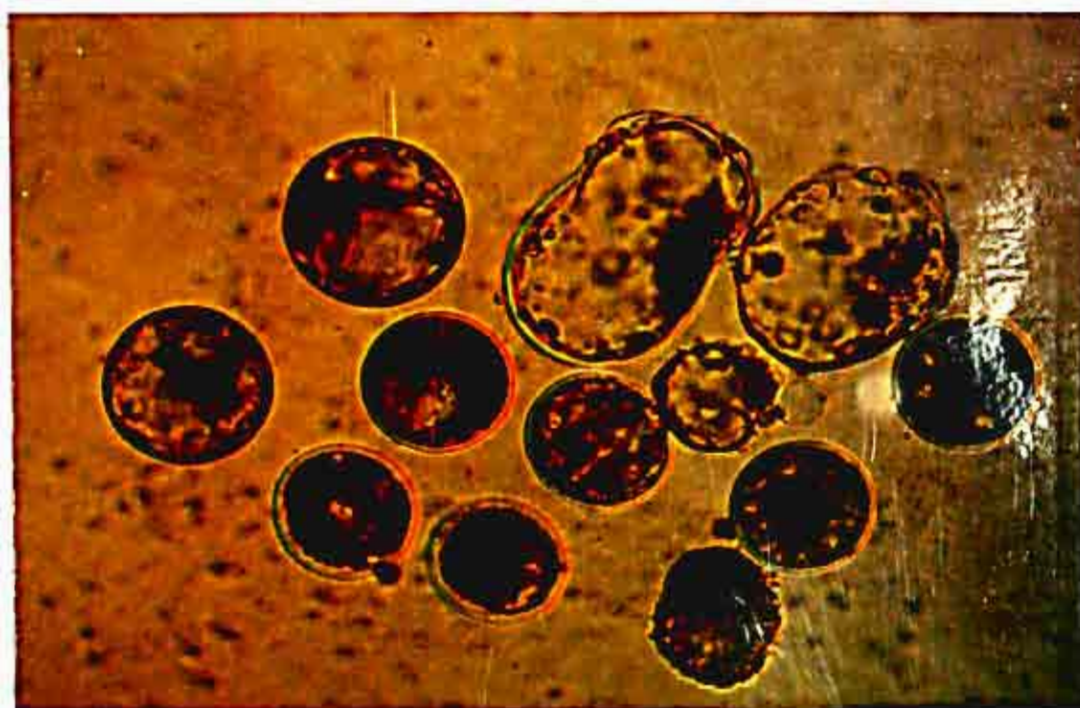
เซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์ตัวให้สำหรับทำโคลนนิ่งได้แก่ เซลล์ FF ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา DMEM+0.5%FBS เพื่อชักนำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวในระยะ G0/G1 ของ Cell cycle ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 อัตราการหลอม (fusion) ระหว่างเซลล์ไข่กับเซลล์ FF และอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆหลังจากการทำโคลนนิ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2 ตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งจะแบ่งตัวระยะ 2 เซลล์ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมงพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสตั้งแต่ช่วงท้ายของวันที่ 5 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ตัวอ่อนกระป๋องที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง ระยะบลาสโตซิสใน ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

7. การกระตุ้นเซลล์ไข่ให้แบ่งตัวเอง (Parthenogenetic activation; PA)

เซลล์ไข่สุกที่ได้รับการกระตุ้นด้วย calcium ionophore สามารถที่จะแบ่งตัวและพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ จนถึงระยะบลาสโตซิส (รูปที่ 9) ได้เช่นเดียวกับตัวอ่อนที่ได้จากการทำ IVF หรือการทำโคลนนิ่งดังแสดงไว้ในตารางที่ 3



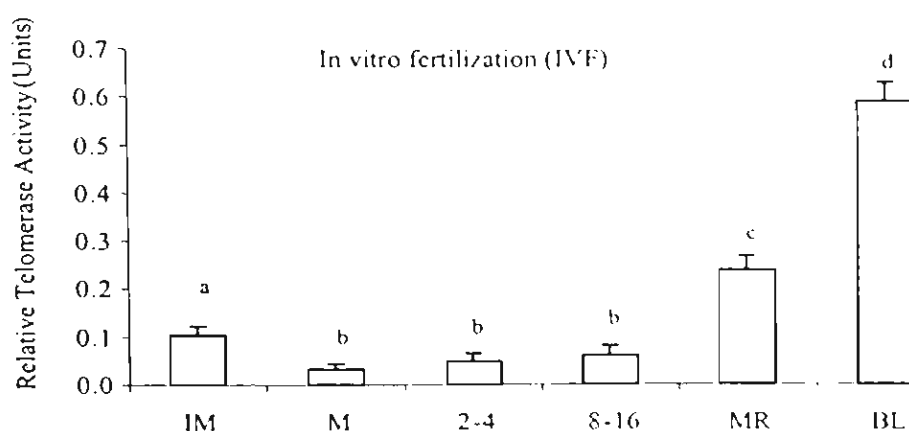
รูปที่ 9 ตัวอ่อนกระปือระยะบลาสโตซิส ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากจากกระตุ้นด้วย Calcium ionophore

8. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่และตัวอ่อนกระปือที่ได้จากการทำ IVF, NT และ PA

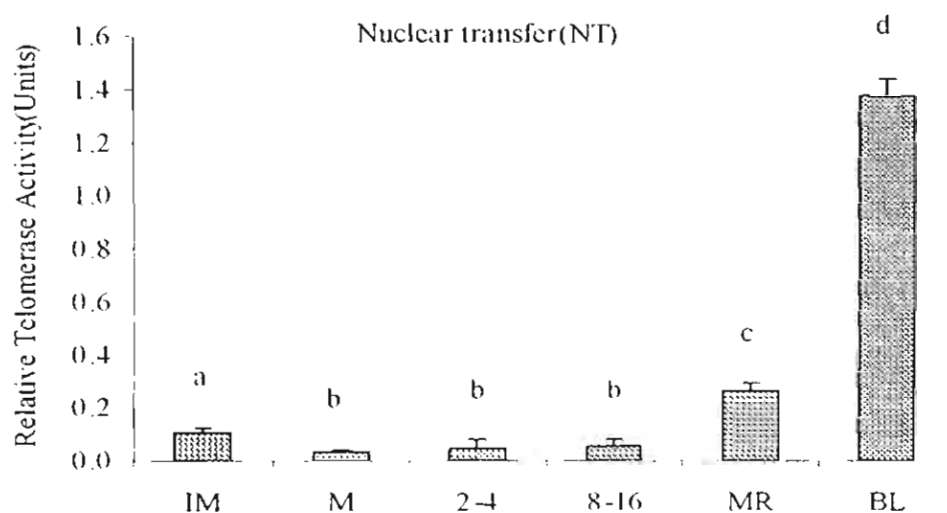
ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่และตัวอ่อนที่ได้จากการทำ IVF แสดงไว้ในรูปที่ 10 การแสดงออกของเอนไซม์ telomerase จะลดลงในระหว่างการเพาะเลี้ยงไข่ให้สุก กล่าวคือปริมาณเอนไซม์ในเซลล์ไข่อ่อนจะอยู่ในระดับสูงและลดลงเมื่อเป็นเซลล์ไข่สุก ปริมาณเอนไซม์ในตัวอ่อนลดลงต่อเนื่องในระยะ 2-4 เซลล์ และระยะ 8-16 เซลล์ การทำงานของเอนไซม์ telomerase การทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในระยะมอรูล่า และจะเพิ่มสูงสุดในระยะบลาสโตซิส

การทำงานของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนโคลนนิ่งแสดงไว้ใน รูปที่ 11 จากภาพพบว่า รูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนโคลนนิ่ง จะคล้ายกับตัวอ่อน IVF คือ เอนไซม์แสดงออกในระดับที่ต่ำ ในตัวอ่อนระยะ 2-4 และ 8-16 เซลล์ และจะเริ่มเพิ่มขึ้นในระยะมอรูล่าและเพิ่มสูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์

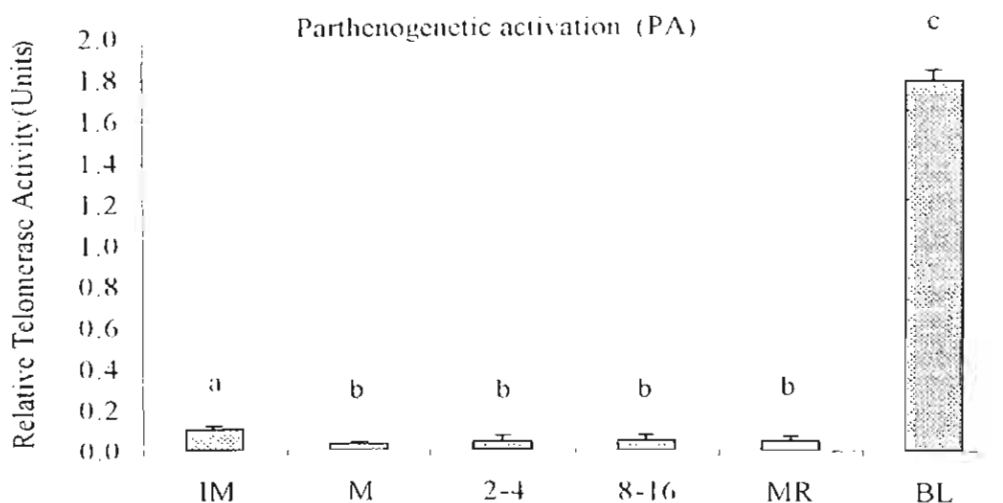
การแสดงออกหรือการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อน PA แสดงไว้ในรูปที่ 12 จากกราฟแท่งพบว่า การทำงานของเอนไซม์ telomerase จะอยู่ในระดับต่ำ ในตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์จนถึงระยะมอรูล่า การทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นในระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งแตกต่างตัวอ่อน IVF และ NT ซึ่งการทำงานของเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะมอรูล่า



รูปที่ 10 แสดงปริมาณของเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่ และในตัวอ่อน IVF ระยะต่างๆ telomerase จะลดลงในระหว่างการสุกเพาะเลี้ยงไข่ให้สุก และลดลงต่อเนื่องในตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ และระยะ 8-16 เซลล์ เอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในระยะมอรูล่า และจะเพิ่มสูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์ (IM = immature oocytes, M= mature oocytes , 2-4 = 2-4-cell embryos , 8-16 = 8-16 -cell embryos, MR = morula , and BL = blastocyst)

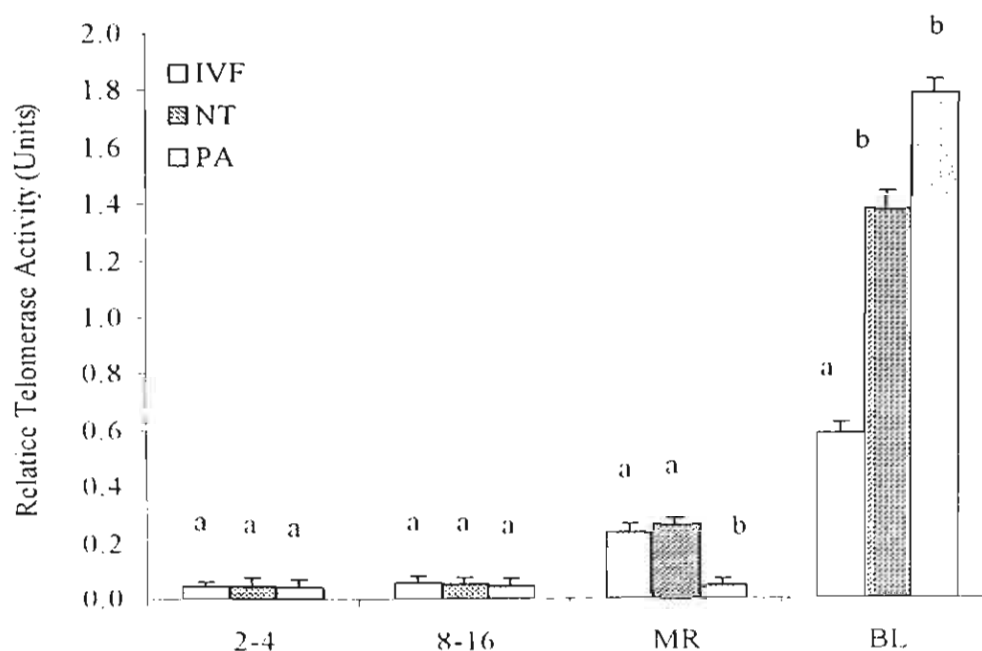


รูปที่ 11 แสดงปริมาณของเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่ และในตัวอ่อนใน านนี้ระยะต่างๆ เอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ และระยะ 8-16 เซลล์ อยู่ในระดับต่ำ เอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในระยะมอรูล่า และจะเพิ่มสูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์ (IM = immature oocytes, M= mature oocytes , 2-4 = 2-4-cell embryos , 8-16 = 8-16 -cell embryos, MR = morula , and BL = blastocyst)



รูปที่ 12 แสดงปริมาณของเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่ และในตัวอ่อน PA ระยะต่างๆ เอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ ระยะ 8-16 เซลล์ และระยะมอรูล่า อยู่ในระดับต่ำ เอนไซม์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์ (IM = immature oocytes, M= mature oocytes , 2-4 = 2-4-cell embryos , 8-16 = 8-16 -cell embryos, MR = morula , and BL = blastocyst)

เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในแต่ละระยะของการแบ่งเซลล์ ของตัวอ่อนที่ได้จาก IVF, NT และ PA ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 7 พบว่า การทำงานของเอนไซม์ในเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์ คือ ระยะ 2-8 เซลล์ และ 8-16 เซลล์ ของตัวอ่อนกระป๋องที่ผลิตโดย 3 วิธี จะอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ในระยะมอรูล่า ตัวอ่อน IVF และ NT จะมีเอนไซม์ telomerase มากกว่าในตัวอ่อน PA ขณะที่ในระยะบลาสโตซิสต์ตัวอ่อน PA และ NT จะมีเอนไซม์ telomerase มากกว่าในตัวอ่อน IVF ตัวอ่อน PA ในระยะบลาสโตซิสต์ เอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ตัวอ่อน NT และต่ำสุดคือตัวอ่อน IVF



รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในแต่ละระยะของการแบ่งเซลล์ ของตัวอ่อนที่ได้จาก IVF, NT และ PA การทำงานของเอนไซม์ในเริ่มต้นของการแบ่งเซลล์ คือ ระยะ 2-4 เซลล์ และ 8-16 เซลล์ ของตัวอ่อนกระป๋องที่ผลิตโดย 3 วิธี จะอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ในระยะบลาสโตซิสต์ที่ได้จาก PA จะมีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ตัวอ่อน NT และต่ำสุดคือตัวอ่อน IVF

(IM = immature oocytes, M = mature oocytes , 2-4 = 2-4-cell embryos , 8-16 = 8-16 -cell embryos, MR = morula , and BL = blastocyst)

บทวิจารณ์

จากผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการโคลนนิ่งสามารถ reprogramme การแสดงออกของ telomerase gene ได้ โดยจะเห็นได้จากการใช้เซลล์ FF ที่มีการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในระดับที่ต่ำ ห่อหุ้มรวมกับเซลล์ไข่ที่ดูดสารพันธุกรรมออกแล้ว สารต่างๆ ในไซโตพลาสซึมของไข่ สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ telomerase ได้ (telomerase reprogramming) ซึ่งการแสดงออกของเอนไซม์ในตัวอ่อนโคลนนิ่งก็คล้ายกับการแสดงออกในตัวอ่อนที่ได้จากการทำ IVF หรือ PA ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการวิจัยครั้งนี้

การ reprogramme ของ telomerase gene เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่บ่งชี้ว่าตัวอ่อนมีคุณภาพดี แม้ว่ายังมี gene อีกหลายชนิดที่ไม่ได้ศึกษาในครั้งนี้ที่ควบคุมเกี่ยวกับการพัฒนาการของตัวอ่อน ตลอดจนการฝังตัวและการเจริญในระหว่างตั้งครรภ์ ระดับของเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ไข่กระปือที่เพาะเลี้ยงจนสุกจะลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไข่อ่อน ผลการวิจัยครั้งนี้ได้ผลคล้ายกับการวิจัยในหนู rat ที่พบว่าเซลล์ไข่ระยะ preantial จะมีระดับเอนไซม์ telomerase สูงกว่าไข่ที่ตกออกมาจากรังไข่แล้ว (ovulated oocyte) (Eisenhauer et al., 1997) นอกจากนี้การวิจัยในเซลล์ไข่โค (Betts et al., 1999) และเซลล์ไข่มนุษย์ (Wright et al., 2001) ที่เพาะเลี้ยงไข่ให้สุกในห้องทดลองก็ได้ผลคล้ายกันคือ เซลล์ไข่ก่อนการเพาะเลี้ยง (immature oocyte) มีระดับเอนไซม์ telomerase สูงกว่าเซลล์ไข่สุก (mature oocyte) หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ผลการวิจัยในเซลล์ไข่กระปือในครั้งนี้และจากรายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า เอนไซม์ telomerase เกี่ยวข้องกับกระบวนการสุกของเซลล์ไข่ มีรายงานว่าอัตราการสังเคราะห์โปรตีนและ RNA ลดลงในระยะ germinal vesicle breakdown ซึ่งเป็นระยะที่จะนำไปสู่การสุกของเซลล์ไข่ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ telomerase ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ

ระดับของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนกระปือ IVF ระยะ 2-4 เซลล์ และระยะ 8-16 เซลล์ อยู่ในระดับต่ำเวลาจะเริ่มสูงขึ้นในระยะมอรูล่าและสูงสุดในระยะบลาสโตซิส ผลการวิจัยนี้ได้ผลคล้ายกับการวิจัยในโคและมนุษย์ สาเหตุของการลดลงของเอนไซม์ telomerase ในระยะแรกของการแบ่งเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เป็นที่น่าสังเกตว่ารูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์นี้คล้ายกับการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน ที่เปลี่ยนจากการใช้ยีนของเซลล์ไข่เป็นการใช้ยีนของตัวอ่อน (embryonic gene) ในโคพบว่า ยีนของตัวอ่อนเริ่มแสดงออกระยะ 8-16 เซลล์ ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อน (Xu and Yang, 2000) กล่าวคือ หลังการปฏิสนธิกับเซลล์สุจิ ตัวอ่อนใช้เอนไซม์ telomerase ที่สะสมในเซลล์ไข่ซึ่งจะลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากไม่มียีนที่จะสร้างเพิ่มขึ้น เมื่อมีการแสดงออกของยีนของตัวอ่อนในระยะ 8-16 เซลล์ เอนไซม์ telomerase จะถูกสร้างขึ้นมาใหม่จึงพบว่าระดับเอนไซม์นี้เริ่มสูงขึ้นในระยะมอรูล่า และเพิ่มสูงสุดในระยะบลาสโตซิส

ในตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งพบว่ารูปแบบการแสดงออกของ telomerase gene คล้ายกับในตัวอ่อน IVF กล่าวคือ ระดับเอนไซม์ telomerase ระยะ 2-4 เซลล์ และ 8-16 เซลล์ อยู่ในระดับต่ำ และจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะมอรูล่าและสูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์ ผลการวิจัยนี้แสดงว่าการ reprogramme ของ telomerase gene ในตัวอ่อนโคลนนิ่งจะเกิดขึ้นระยะบลาสโตซิสต์ โดยเซลล์ FF ที่ใส่เข้าไปในเซลล์ไข่จะถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์เอนไซม์ telomerase ในระยะบลาสโตซิสต์ การ reprogramme ของ telomerase gene ในตัวอ่อนกระป๋องโคลนนิ่งคล้ายกับตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง ซึ่งพบว่าระดับเอนไซม์ telomerase ในตัวอ่อนโคโคลนนิ่งจะสูงสุดในระยะบลาสโตซิสต์

ในตัวอ่อนกระป๋องที่ได้จากการกระตุ้นให้แบ่งตัวเอง (PA) พบว่า การการแสดงออกของ telomerase จะเริ่มต้นที่ระยะบลาสโตซิสต์ เมื่อเปรียบเทียบระดับเอนไซม์ telomerase ในแต่ละระยะของการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนที่ได้จาก IVF, NT และ PA พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากการทำโคลนนิ่ง (NT) มีการแสดงออกที่คล้ายกับตัวอ่อนที่ได้จาก IVF และ PA ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าในตัวอ่อนที่ผลิตโดยการโคลนนิ่งมีการแสดงออก และการ reprogramme ของ telomerase ยีนเช่นเดียวกับตัวอ่อน IVF แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาพิสูจน์ว่าการทำงานของเอนไซม์ telomerase เกี่ยวข้องกับอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อนภายหลังการย้ายฝากให้แม่ตัวรับหรือไม่อย่างไร เพราะยังมีอีกหลายตัวที่ควบคุมเกี่ยวกับการเจริญเติบโต การฝังตัว และการพัฒนาของตัวอ่อนจนกระทั่งคลอดออกมา การศึกษาในอนาคตควรที่จะศึกษายีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อนกระป๋อง ตั้งแต่ระยะเริ่มแบ่งตัว ฝังตัวกับมดลูก จนถึงระยะคลอด ซึ่งจะทำให้ทราบว่าการแสดงออกของยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อนโคลนนิ่งหรือไม่ และในสาเหตุของการแท้งในระหว่างตั้งครรภ์หรือไม่ อย่างไร

เอกสารอ้างอิง

1. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacio M J, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotech* 1999;17:456-460.
2. Betts DH, King WA. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 1999;25:397-403.
3. Dominko T, Mitalipara M, Haley B, Beyhan Z, Memili Mckusick B, First NL. Bovine cytoplasm supports Development of embryos produced by NT of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod* 1999;60:1496-1502.
4. Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Ltsueh AI. Telomerase activity in female and male rat germ cell undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 1997;56:1120-1125.
5. Gurdon JB, Colmon A. The future of cloning. *Nature* 1999;402:743-746.
6. Hanley CB, Futcher AS, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature* 1990;345:458-460.
7. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshine RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990;346:866-868.
8. Kato Y, Tetsuya T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves clones from somatic cells of a single adult. *Science* 1998;282:2095-2098.
9. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015.
10. Lanza RP, Cibelli JB, Blockwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Scherteazer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdony PM, West MD. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cell. *Science* 2000;288:665-669.
11. Lery MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992;225:951-960.

12. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000;407:86-90.
13. Shiel PG, Kind AJ, Campbell KH, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schineke AE. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 1999;399:316-317.
14. White LK, Bunch TD, Mitalipor S, Reed WA. Establishment and /or pregnancy after the transfer of NT embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis drier*) enucleated oocytes. *Cloning* 1999;1:47-54.
15. Wilmut I, Schieke AE, Mewhir J, Kind AH, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
16. Xu J, Yang X. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 2000;63:1124-1128.
17. Xu J, Yang X. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenic activation and nuclear transfer. *Biol Reprod* 2001;64:770-774.
18. Zakian VA. Telomeres : beginning to understand the end. *Science* 1995;270:1601-1607.

ผลงานวิจัยนี้ได้ส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Genesis ซึ่งมี impact factor = 3.297 ซึ่งขณะนี้
อยู่ระหว่างการ review

Telomerase Activity in Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocytes and Embryos Derived from In Vitro Fertilization, Somatic Cell Nuclear Transfer and Parthenogenetic Activation

Jumnian Saikhun^{1,2}, Hathaitip Sritanaudomchai², Kanok Pavasuthipaisit^{1,2},
Yindee Kitiyanant^{1,2}

¹Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

²Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Correspondence : Associate Professor Yindee Kitiyanant

Address : Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand

Telephone : 662-4419003-7 Ext 1389,1390

Fax : 662-4411013

Email : scykt@mahidol.ac.th

Short title : Telomerase Activity in Swamp Buffalo

ABSTRACT

Telomerase, a ribonucleoprotein, has been described as an essential component of highly proliferative cells as it stabilizes telomeres in order to avoid cellular senescence. In most mammalian species, telomerase activity is present in germ cells but not in somatic cells. The objective of this study was to examine the telomerase activity in swamp buffalo immature and mature oocytes, and preimplantation stage embryos derived from in vitro fertilization (IVF), somatic cell nuclear transfer (NT) and parthenogenetic activation (PA). Immature and mature oocytes, and embryos at 2-4-cell, 8-16-cell, morula and blastocyst were collected and the telomerase activity was assayed by using a Telomerase PCR ELISA kit. Telomerase activity was detected in all developmental stages evaluated from immature oocytes to blastocyst stage embryos. Telomerase activity was detected in higher amounts in immature compared with mature oocytes ($P < 0.05$). Embryos derived from NT showed a profile of telomerase activity similar to that of IVF. In IVF and NT embryos, telomerase activity was low in the 2-4-cell and 8-16-cell stages, the activity was significantly increased ($P < 0.05$) at the morula stage, reaching highest level at the blastocyst stage. In PA embryos, low level of telomerase activity was detected from the 2-4-cell to the morula stage, and the highest level of telomerase activity were found at the blastocyst stage. Telomerase activity in NT blastocysts is higher than that derived from IVF and the activity is highest in PA blastocysts. These results suggest that the successful reprogramming of telomerase activity in buffalo NT embryos follows a similar pattern to that in embryos derived from IVF and PA.

Key Words : telomerase activity, buffalo, nuclear transfer, in vitro fertilization, parthenogenetic activation

INTRODUCTION

Telomeres, the specialized DNA sequences located at the ends of eukaryotic chromosomes, consist of evolutionarily conserved repetitive noncoding DNA sequence (TTAGGG) that functions as stabilizing elements for the chromosomes during cell divisions (Preston, 1997). Telomeres have been observed to associate with nuclear envelope and may be necessary for initiation of homologue alignment during meiosis (Cooper et al., 1998) and chromosome segregation during mitosis (Yu et al., 1990). Telomeric DNA is not completely synthesized by conventional DNA polymerase during cell replication and also loses 50-200 base pairs with each cell division (Olovnikov, 1973; Greider and Blackburn, 1985). Telomere shortening correlates with the numbers of cell division and when the telomere length reaches a critical limit, it signals the cells to undergo replicative senescence, in which state the cells develop a characteristic morphology of large and flat and stop dividing (Faragher and Kipling, 1998).

Telomerase is a ribonucleoprotein that compensates for the loss of telomeric DNA by adding repeated sequences to the chromosomal ends using its intrinsic RNA component as a template for DNA synthesis (Dahse et al., 1997). The telomere hypothesis suggests that telomerase activity is high in embryonic cells and that it decreases in somatic tissues during development and differentiation. Telomerase activity has been detected in germline cells (Wright et al., 1996; Eisenhauer et al., 1997), embryonic cells (Eisenhauer et al., 1997; Betts and King, 1999; Xu and Yang, 2000; Wright et al., 2001), embryonic stem cell lines (Thomson et al., 1998), cancer and immortalized cell lines (Kim et al., 1994; Counter et al., 1994). High levels of telomerase activity were detected in rat oocytes from antral and preovulated follicles, but activity was significantly lowered in ovulated oocytes (Eisenhauer et al., 1997). Reports in cow (Bette and King, 1999) and human (Wright et al.,

2001) demonstrated that telomerase activity could be detected in all developmental stages starting from immature oocyte through blastocyst stage. Telomerase activity decreases gradually during early cleavage stage but increases at the morula and blastocyst stages. Recently, telomerase activity was also detected in bovine embryos derived from NT and PA (Xu and Yang, 2001). They found that telomerase activity in cloned embryos follows a similar pattern to that in the PA and IVF embryos, suggesting the successful reprogramming of telomerase after NT. Most of the previous studies used telomeric repeat amplification protocol (TRAP) method, in which the telomerase reaction product is amplified by polymerase chain reaction (PCR) to assay telomerase activity as described by Kim et al. (1994). However, the TRAP assay provides full sensitivity only when used with a radioactive label, and it requires visualization of results by autoradiography after gel electrophoresis, which is both hazardous and time consuming. Obyashiki et al., (1996) developed a nonradioactive procedure using fluorescence-labeled primers and automatic DNA sequencing to detect and quantitate telomerase activity. Furthermore, the telomerase activity detection in RKO colorectal tumor cells by standard radioactive TRAP, as well as by the PCR ELISA (a nonradioactive ELISA-based assay) showed that the results obtained with both procedures correlate well (Smilenov et al., 1997). The Telomerase PCR ELISA provides a way to perform a highly sensitive photometric enzyme immunoassay for the detection of telomerase activity, using nonradioactive ELISA technique.

Our previous reports demonstrated that buffalo fetal fibroblast could be reprogrammed after transfer into enucleated buffalo or bovine oocytes resulting in the production of cloned buffalo blastocysts (Kitiyanant et al., 2001; Saikhun et al. 2002). However, there has been no study on telomerase reprogramming of buffalo oocytes and embryos during early development. Moreover, investigating the dynamics of telomerase activity in buffalo

embryos produced by IVF or PA could serve as good developmental controls for NT studies. The objective of the present study was to investigate the dynamics of telomerase in swamp buffalo oocytes and preimplantation stage embryos derived from NT, IVF and PA by using the Telomerase PCR ELISA technique. Furthermore, the patterns of telomerase activity in embryos derived from those three systems were compared.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals in this study were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma, St. Louis, MO) unless stated otherwise.

Oocyte Collection and In Vitro Maturation

Buffalo oocytes were collected and matured in vitro by the method previously described (Pavasuthipaisit et al., 1992). Cumulus oocyte complexes (COCs) from abattoir ovaries were collected by aspirating the antral follicles (2 to 6 mm) using a 18-gauge needle containing TALP-HEPES. After being washed for three times, COCs were morphologically assessed under a stereomicroscope ($\times 200$) and only oocytes with compact and homogeneous cytoplasm were selected for in vitro maturation (IVM). All selected COCs were cultured in 50 μ l drops of maturation medium (TCM 199) (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) (Hyclone Laboratories, Inc, Logan, UT), 0.2 mM pyruvate and 5 μ g/ml FSH in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 39 °C. After culturing for 22 hr, mature oocytes were subjected to IVF, NT or PA. Immature (germinal vesicle) and mature (metaphase II, MII) oocytes were collected and stored at - 80 °C until telomerase activity was assayed.

In Vitro Fertilization of Buffalo Oocytes

In vitro production of buffalo embryos was based on the procedures reported in our previous study (Pavasuthipaisit et al., 1992) with minor modifications. Frozen ejaculated semen were thawed at 37°C and sperm was prepared by using swim up technique. Sperm

samples (0.25 ml) were layered under 1 ml of TALP- glucose free medium in centrifuge tubes. After 1 hr of incubation under a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 39 °C, the top portion (0.85 ml) of the medium was removed from the tube. Sperm suspension was centrifuged at 500g for 20 min, and the resulting sperm pellet was resuspended to a final concentration of 50×10^6 cells/ml in TALP for in vitro fertilization. A 10 µl aliquot (5×10^5 cells/drop) of sperm was placed in a culture dish with 50 µl of glucose free-TALP containing 10 µg/ml heparin to facilitate capacitation. Spermatozoa were incubated for 2 hr under a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 39 °C. Ten in vitro matured COCs were added to each fertilization drop containing capacitated sperm. After 18 to 20 hr of insemination, presumptive zygotes were removed from fertilization drops and transferred to in vitro culture.

Somatic Cell Nuclear Transfer

Cloned buffalo embryos derived from somatic cell NT were obtained as described previously (Kitiyanant et al., 2001). Briefly, after being cultured in maturation medium for 22 hr, buffalo oocytes were denuded by pipetting in TALP-HEPES containing 0.2 % hyaluronidase. Oocytes with an extruded first polar body (MII) were selected for enucleation and used as recipient cytoplasm in NT procedure. The MII oocytes were placed in TALP-HEPES supplemented with 10 % FCS, and 7.5 µg/ml cytochalacin B and were enucleated by aspirating the first polar body and the MII plate with small volume of surrounding cytoplasm. Successful enucleation was confirmed by Hoechst 33342 staining and observed under ultraviolet light. Buffalo fetal fibroblasts were obtained from a 40-day old fetus, and cultured in DMEM supplemented with 10 % FCS and used for NT between passages 2 and 6 of the culture. They were synchronized to enter into presumptive G0 by culturing in DMEM supplemented with 0.5 % FCS for 3 to 5 days prior to the NT

procedure. Immediately prior to NT, single cell suspension was prepared from donor cells by trypsinization using 0.25 % trypsin-EDTA. Individual donor cells were transferred into perivitelline space of the enucleated oocytes. Nuclear transfer units were washed and incubated in a fusion medium (0.3 M mannitol, 0.05 mM CaCl_2 , 0.1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM HEPES and 0.05% fatty acid-free (FAF) BSA) for 1 min. Fusion was performed by placing NT units in a fusion chamber between two platinum electrodes 0.2 mm apart and overlaid with fusion medium. Cell fusion was induced by two DC electrical pulses of 2.1 kV/cm for 20 μsec (1 sec interval). After being co-cultured with buffalo rat liver (BRL) cells in TCM 199 supplemented with 10 % FCS for 2 hr, the fusion rate was determined. Fused NT embryos were activated by exposure to 5 μM calcium ionophore A23187 for 5 min followed by incubation with 2 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) in culture medium for 4 hr under a humidified atmosphere of 5 % CO_2 at 39 °C and subjected to in vitro culture.

Parthenogenetic Activation of Buffalo Oocytes

The PA procedure was performed as described previously (Liu et al., 1998). Briefly, after being cultured in maturation medium for 22 hr, buffalo oocytes were denuded by pipetting in TALP-HEPES containing 0.2 % hyaluronidase. The oocytes with an extruded first polar body (MII) were parthenogenetically activated by exposure to 5 μM calcium ionophore A23187 for 5 min followed by incubation with 2 mM 6-DMAP in culture medium for 4 hr under a humidified atmosphere of 5 % CO_2 at 39 °C subjected to in vitro culture.

Embryo Culture and Collection

The IVF, NT and PA embryos were cultured under the same systems. They were co-cultured with BRL cells in 50 μ l of TCM 199 supplemented with 10 % FCS under a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 39 °C. After culturing for 2 days, the embryos were assessed for the first cleavage completion and transferred to 50 μ l drops of TCM 199 containing buffalo oviductal epithelial cells. Cleaved embryos were cultured under the same system as with BRL cells for 7 days. Embryonic development to the 2-4-cell, 8-16-cell, morula and blastocyst stages were recorded on Days 2, 3, 5 and 7 of in vitro culture, respectively. At each stages, embryos were collected, washed twice in PBS and then frozen at -80 °C until the telomerase activity was assayed.

Telomerase Activity Assay

The Telomerase PCR ELISA kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) was used to measure the telomerase activity of buffalo oocyte and embryo. The original TRAP method described by Kim et al. (1994) was modified.

Preparation of cell extracts

Cell extracts from oocytes or embryos were prepared as described by the manufacture using lysis reagent provided in the kit. Briefly, pools of 5 frozen (-80 °C) immature and mature oocytes or embryos at each stages were lysed in pre-cooled 200 μ l of lysis reagent for 60 min and cell extracts were centrifuged at 16000 g for 2 min at 4 °C. The 175 μ l of supernatant was removed and the cell extracts were measured for the protein

concentration using spectrophotometer and immediately used for the TRAP reaction or shock freeze aliquots in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

Telomerase essentially requires integrity of its internal RNA component of the telomerase-specific primer. Therefore, preincubation of the cell extracts with RNase (DNase-free) will fully destroy telomerase activity contained in the extracts and offers as a negative control. Positive control was supplied with the kit. Positive control cell extract was prepared from immortalized telomerase - expressing human kidney (293-cell). One microliter of low ($0.001\text{ amol}/\mu\text{l}$) or high ($0.1\text{ amol}/\mu\text{l}$) positive control DNA template (TS8) was mixed with $1\text{ }\mu\text{l}$ of lysis reagent and nuclease-free water was added to a total volume of $50\text{ }\mu\text{l}$. For each sample to be tested and the control template, $25\text{ }\mu\text{l}$ of reaction mixture (biotinylated telomerase substrate P1-TS, optimized anchor-primer P2, nucleotides, and Taq DNA polymerase) and $5\text{ }\mu\text{l}$ of the internal standard (IS) were transferred into a PCR reaction tube. One microgram total protein of cell extracts was added into PCR tubes. The reaction tubes were incubated at 25°C for 30 min, then telomerase was inactivated by heating at 94°C for 5 min. Samples were then subjected to 30 PCR cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, and 72°C for 90 sec.

Hybridization and ELISA

An aliquot of the PCR product was denatured in $20\text{ }\mu\text{l}$ of denaturation reagent containing less than 0.3% sodium hydroxide and incubated at $15\text{--}25^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The mixture was transferred into a streptavidin-coated 96-well plate and hybridized with a digoxigenin (DIG) labeled, telomeric repeat specific detection probe. After shaking at 37°C for 2 hr, the

hybridization solution was removed and washed each well 3 times with 250 μ l of washing buffer for a minimum of 30 sec each and then removed washing buffer carefully. One hundred microliters of anti-DIG conjugated horseradish peroxidase (HRP) was added per well, covered with a cover-foil and incubated at room temperature for 30 min while the plate was shaking at 300 rpm. The solution was removed and rinsed 5 times with 250 μ l washing buffer into each well for a minimum of 30 sec each and then carefully removed the washing buffer. The amount bound to DIG was determined by the addition of 100 μ l per well of TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzimide) substrate solution prewarmed to room temperature, covered the wells with foil and incubated for color development at room temperature for 10-20 min while shaking at 300 rpm. Without removing the reacted substrate, 100 μ l of stop reagent containing less than 5% sulfuric acid was added into each well to stop color development. The absorbance of the samples was measured at 450 nm using an ELISA microtiter plate reader within 30 min after addition of the stop reagent. The experiments were replicated five times. For each replication, each sample was assayed at least twice and an average value was taken. The level of telomerase activity in each sample was determined by comparing the signal from the sample to the signal obtained using a known amount of a control template. Relative telomerase activity (RTA) of each sample was calculated using the following formula :

$$RTA = \frac{(A_S - A_{S0} / A_{S,IS})}{(A_{TS8} - A_{TS8,0}) / A_{TS8,IS}}$$

A_S : absorbance of sample

A_{S0} : absorbance of sample of RNase treated sample

$A_{S,IS}$: absorbance of internal standard (IS) of the sample

A_{TS8} : absorbance of control template (TS8)

$A_{TS8,0}$: absorbance of lysis buffer

$A_{TS8,IS}$: absorbance of internal standard (IS) of the control template (TS8)

Statistical Analyses

Data of the telomerase assay experiment was collected from five replicated on different pooled-oocyte or -embryo samples ($n = 25$). Analysis of variance (one-way ANOVA) was used to determine any significant difference between RTA of oocytes and embryos at each developmental stages. The relationship of relative telomerase activity and dilution of positive cell extracts was subjected to regression analysis. Difference between treatments were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Telomerase Assay Verification

To verify that the Telomerase PCR ELISA assay kit is suitable to detect telomerase activity, we first determined the telomerase activity in cell lines known to express telomerase activity and those known to lack the activity. As expected, telomerase activity was found in high levels in the 293-cell, KB-cell (human carcinoma cell line) and buffalo ES-like cell (established in our laboratory) but having low level in buffalo fetal fibroblast and RNase treated 293-cell (Fig. 1). A subsequent experiment was examined a dose-response relationship between telomerase activity and amount of 293-cell extract. Figure 2 clearly shows a dose response resulting from progressive dilutions. A linear relationship was found between the telomerase activity and dilution ($r = 0.93$). These results indicated that the Telomerase PCR ELISA assay kit is a suitable method for quantification of telomerase activity

Telomerase Activity in Buffalo Embryos

Samples were taken to determine telomerase activity in all developmental stages from immature oocytes through blastocyst stage embryos. For each replication, pooled-oocyte or -embryo sample ($n = 5$) was assayed at least twice and average value was taken. Telomerase activity was presented in relatively high amounts in immature and decreased significantly ($P < 0.05$) in mature oocytes (Fig. 3). Telomerase activities in IVF-derived embryos at different stages are shown in Figure 4. Low levels of telomerase activity were detected in the 2-4-cell stage and the 8-16-cell stage embryos. The activity was significantly increased ($P < 0.05$) at the morula stage and was highest at the blastocyst

stage. A similar pattern of telomerase activity with IVF embryos was also detected in the NT system (Fig. 4), telomerase activity having low level from the 2-4-cell to 8-16-cell stages and increasing significantly ($P < 0.05$) in the morula stage and reaching the highest level in the blastocyst stage ($P < 0.05$). In the PA system (Fig. 5), telomerase activity was low and not significantly different from the 2-4-cell to the morula stages. A significantly increased ($P < 0.05$) activity was detected at the blastocyst stage.

A direct comparison of telomerase activity among the various stages, from the 2-4-cell to the blastocyst stages of buffalo embryos produced by IVF, NT and PA systems, is shown in Figure 6. There were no differences in telomerase activity of embryos at the 2-4-cell and the 8-16-cell stages among three methods used for embryo production. Activity in the morula stage of embryos produced by IVF and NT systems was significantly higher than that produced by PA system. Highest telomerase activity was found in the blastocysts from all three systems but telomerase activity in blastocysts from the PA and NT systems appeared to be higher ($P < 0.05$) than those the IVF

DISCUSSION

The present study demonstrated that telomerase activity could be detected in buffalo oocytes through all developmental stages of IVF, NT or PA embryos. Our results confirmed the previous findings in rat oocytes and embryos, in which telomerase activity decreased from high levels in oocytes from early antral and preovulated follicles to lower level in the ovulated oocytes (Eisenhauer et al., 1997). A high level of telomerase activity in the immature oocytes was also detected in the cow (Betts and King, 1999) and recently in human (Wright et al., 2001). This high level of telomerase activity detected in immature oocyte and decreased in mature oocyte suggests a possible role of telomerase during meiosis of female germ cells in buffalo. It has been reported that during germinal vesicle breakdown process, the rates of protein and RNA synthesis declined dramatically (Wassarman and Albertini, 1994). Moreover, as much as one half of the polyadenylated RNA accumulated during oocyte growth was either degraded or deanylated during meiosis (Wassarman and Albertini, 1994). These biochemical changes may be responsible for the decrease of telomerase activity in oocyte maturation process.

In IVF system, the telomerase activities decreased gradually from immature oocytes to the 8-16-cell stage embryos. Enzyme activity increased again at the morula stage and reached its highest level at the blastocyst stage. Our findings are in agreement with the previous studies in bovine (Betts and King, 1999; Xu and Yang, 2000) and human embryos (Wright et al., 2001). Betts and King (1999) reported that relative telomerase activity decreased during bovine oocyte maturation and subsequent development to the 6-8-cell stage but significantly increased at the morula and blastocyst stages. On the other hand, Xu and Yang (2000) demonstrated that telomerase activity was increased after fertilization and then decreased gradually until the embryos reached the 8-cell stage. Telomerase

activity increased again after 8-cell stage and reached its highest levels in the blastocyst stage. Those authors suggested that a dramatic changes of telomerase activity in bovine embryos coincides with the maternal-zygotic transition during early embryonic development. In many species, the timing of the in vitro developmental block reportedly coincides with the stage when the regulation of embryo development switches from control by maternal proteins to the control by embryonic gene products (Telford et al., 1990). Our previous findings demonstrated that in vitro developmental block occurred in 8-16-cell stage during in vitro culture of buffalo IVF system (Pavasuthipaisit et al., 1992). The maternal proteins including telomerase gradually decrease during early cleavage until approximately the 8-16-cell stage. Once embryonic gene transcription starts, new telomerase proteins are synthesized and this will account for the increase of telomerase activity after the 8-16-cell stage as demonstrated in our study and others.

Our results demonstrated that telomerase activity in NT embryos was up-regulated as early as the morula stage and reached highest levels at the blastocyst stage which was similar to the IVF system. These findings suggested a successful reprogramming of telomerase in buffalo NT embryos reconstructed with fetal fibroblast which displayed low level of telomerase activity. High levels of telomerase activity were detected in reconstructed day 7 embryos tested by TRAP assay, whereas the bovine fibroblasts used as donor cells in the NT experiments were negative for telomerase activity (Lanza et al., 2000). Our results are consistent with recently report by Xu and Yang (2001) who demonstrated that up-regulation of telomerase activity in bovine NT embryos began as early as the morula stage. Another study by Betts et al. (2001) found that reprogramming of telomerase activity in bovine NT embryos was observed at the blastocyst stage which was delayed when compared with fertilization-derived embryos, in which high telomerase activity was observed after activation of the embryonic genome at the 8-16-cell stage

In PA embryos, low level of telomerase activity was detected from the 2-4-cell to the morula stage but the activity was significantly increased at the blastocyst stage. A direct comparison of telomerase activity in buffalo embryos produced by different procedures indicated that telomerase activity detected in the PA blastocysts was higher than that derived from IVF and NT. The reasons for higher telomerase activity in PA blastocysts than in IVF and NT blastocysts are unclear. Higher levels of telomerase in PA blastocysts when compared to those produced by IVF and NT was also reported in bovine (Xu and Yang, 2001). They suggested that the lower level of telomerase activity in NT blastocysts might come from a loss of cytoplasm in the enucleation steps or possibly from the variance between embryos, whereas the lower telomerase activity in IVF blastocysts might come from the nonmaternal genes that could have been actually suppressed the telomerase gene expression and, hence, reduced the telomerase activity. Chian and Sirard (1996) found that bovine oocyte activation by sperm and PA induced different cytoplasmic responses for protein synthesis.

Additionally, we also found that telomerase activity detected in NT blastocysts was higher than that derived from IVF blastocysts which differed from the previous report by Xu and Yang (2001) who demonstrated that telomerase activity in bovine NT blastocysts was lower than IVF. This discrepancy may come from species difference or from different NT techniques employed or from donor cell types. The reason for higher telomerase activity in NT blastocysts than that in IVF blastocysts is unknown. The lower telomerase activity in IVF blastocysts may be due to the suppression of telomerase gene by sperm factors as suggested by Xu and Yang (2001). At the same time, the telomerase gene from transferred somatic nuclei may be stimulated by factors in ooplasm, hence, higher the telomerase activity in NT system.

When the data on a per cell basis of embryos were analyzed, we found telomerase activity declined gradually from the immature oocyte through the blastocyst stage in IVF, NT and PA embryos. The similar declined of telomerase activity on a per cell basis have been reported in bovine (Xu and Yang, 2000) and human (Wright et al., 2001) IVF embryos. The reasons of these patterns is unknown. Further studies are needed to examine the underlying mechanisms.

In summary, telomerase activity has a trend involving an increase from the mature oocyte to morula stage in both NT and IVF systems, whereas in PA system similar levels of the activities are present until the morula stage but all three types of embryos have the highest levels of telomerase activity at the blastocyst stage. These results demonstrated that telomerase plays an important role in oocyte maturation and embryonic development and there is successful reprogramming of telomerase activity in embryos produced by NT. Further investigations are required to examine the relationship between telomerase activity in preimplantation stage embryos and the survival of embryos after transfer into surrogate mother.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Thailand Research Fund (The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program to J.S.), National Center for Genetic engineering and Biotechnology and Mahidol University. The authors thank Professor Prapon Wilairat and Associate Professor Thanit Kusamran for their editorial assistance.

REFERENCES

- 467
468
469 Betts DH, King WA. 1999. Telomerase activity and telomere detection during early
470 bovine development. *Dev Genet* 25:397-403.
- 471 Betts DH, Bordignon V, Hill JR, Winger Q, Westhusin ME, Smith LC, King WA. 2001.
472 Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned
473 cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1077-1082.
- 474 Chian RC, Sirard MA. 1996. Protein synthesis is not required for male pronuclear
475 formation in bovine zygotes. *Zygote* 4:41-48.
- 476 Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl
477 JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts.
478 *Science* 280: 1256-1258.
- 479 Copper JP, Watanabe Y, Nurse P. 1998. Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic
480 telomere clustering and recombination. *Nature* 392: 825-828.
- 481 Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. 1994. Telomerase activity in human
482 ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2900-2904.
- 483 Dahse R, Fiedler W, Ernst G. 1997. Telomeres and telomerase: biological and clinical
484 importance. *Clin Chem* 43:708-714.
- 485 Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ. 1997. Telomerase activity
486 in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod*
487 56:1120-1125.
- 488 Faragher RG, Kipling D. 1998. How might replicative senescence contribute to human
489 aging? *Bioessays* 20:985-991.
- 490 Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal
491 transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405-413.

- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015.
- Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. 2001. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 3:97-104.
- Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM, West MD. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288:665-669.
- Liu L, Ju JC, Yang X. 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev* 49:298-307.
- Obyashiki JH, Obyashiki K, Toyama K, Shay JW. 1996. A nonradioactive, fluorescence-based telomeric repeat amplification protocol to detect and quantitate telomerase activity. *Trends Genet* 12:395-396.
- Olovnikov AM. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Theor Biol* 41:181-190.
- Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, Thonabulsombat C, Tocharus C, Sriurairatana S, White KL. 1992. In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* 38:545-555.
- Preston RJ. 1997. Telomerase and chromosome stability. *Radiation Res* 147:529-534.
- Saikhun J, Pavasuthipaisit K, Jaruansuwan M, Kitiyanant Y. 2002. Xenonuclear transplantation of buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal and adult somatic cell nuclei into bovine (*Bos indicus*) oocytes cytoplasm and their subsequent development. *Theriogenology* 57:1829-1837.

- Sandell LL, Zakian VA. 1993. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery and chromosome loss. *Cell* 75:729-739.
- Smilenov LB, Morgan SE, Mellado W, Sawant SG, Kastan MB, Pandita TK. 1997. Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene* 15:2659-2665.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26:90-100.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergie JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Wassarman PM, Albertini DF. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd: pp79-122.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18:173-179.
- Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Larzendorf SE. 2001. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 7: 947-955.
- Xu J, Yang X. 2000. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 63:1124-1128.
- Xu J, Yang X. 2001. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biol Reprod* 64:770-774.
- Yu GL, Bradly JD, Attardi LD, Blackburn EH. 1990. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNA. *Nature* 344:126-132.

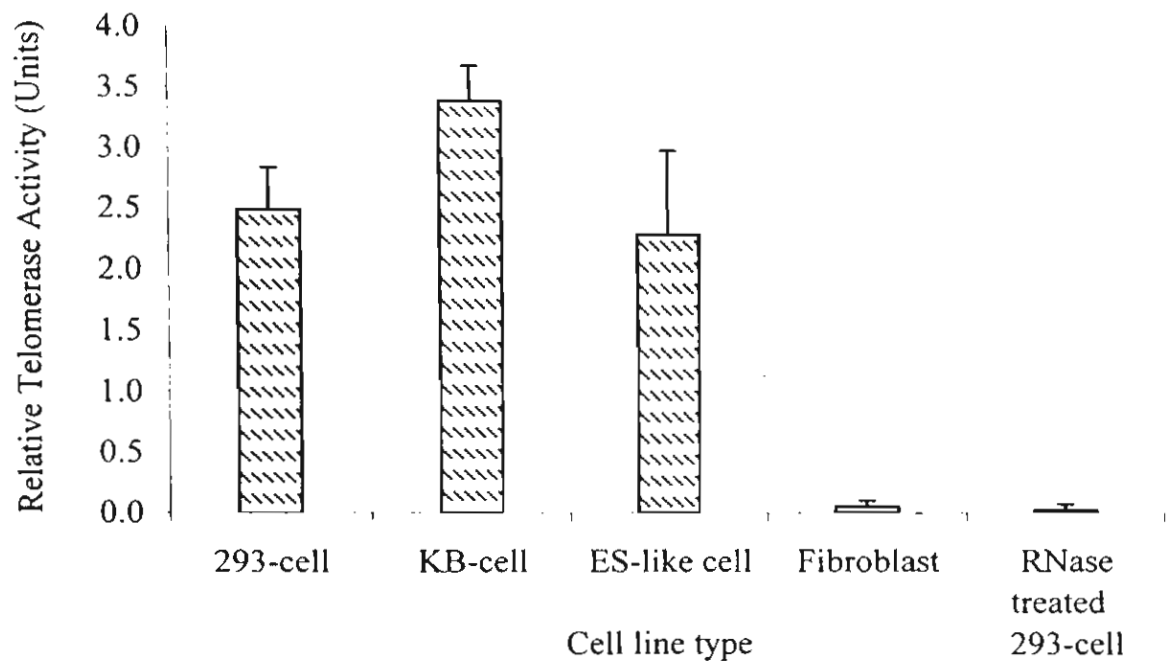


Fig. 1. Relative telomerase activity (RTA) in cell extracts of positive and negative cell lines. Cell extracts from 293-cell, KB-cell, buffalo ES-like cell, buffalo fetal fibroblast, and RNase treated 293-cell were diluted to 100 cell equivalents. Data are the means $\pm$ SEM of five replications.

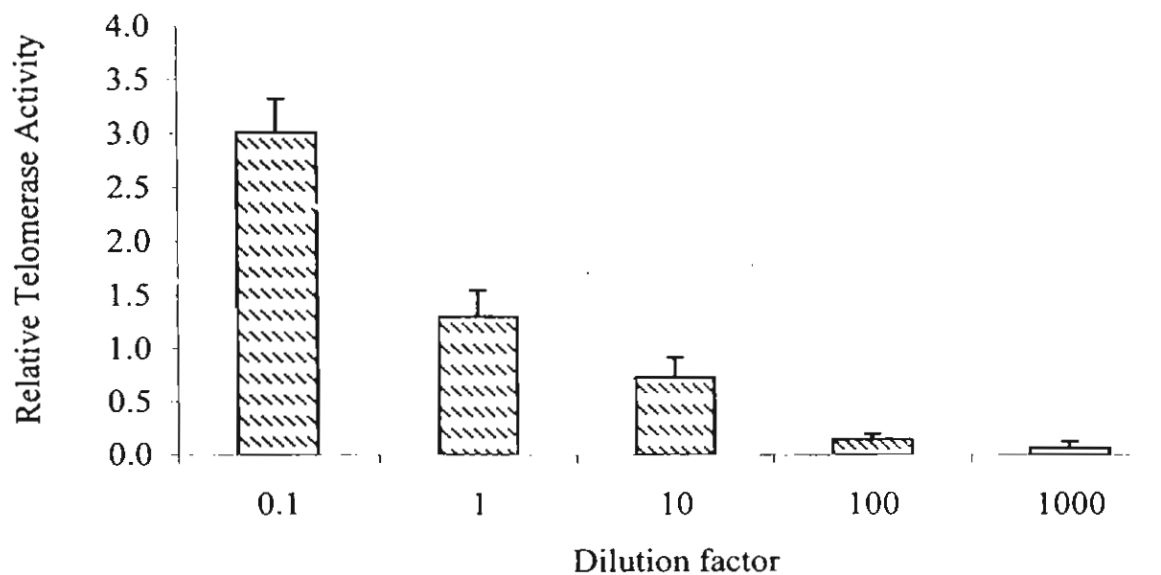


Fig. 2. Relationship between relative telomerase activity (RTA) and telomerase positive 293-cell extract. RTA was measured in 10-fold dilutions of cell extracts using the the Telomerase PCR ELISA kit and absorbance was measured at 450 nm to represent RTA of the corresponding cell dilutions. A linear relationship is found between RTA and dilution factor of the cell extract ($r = 0.93$).

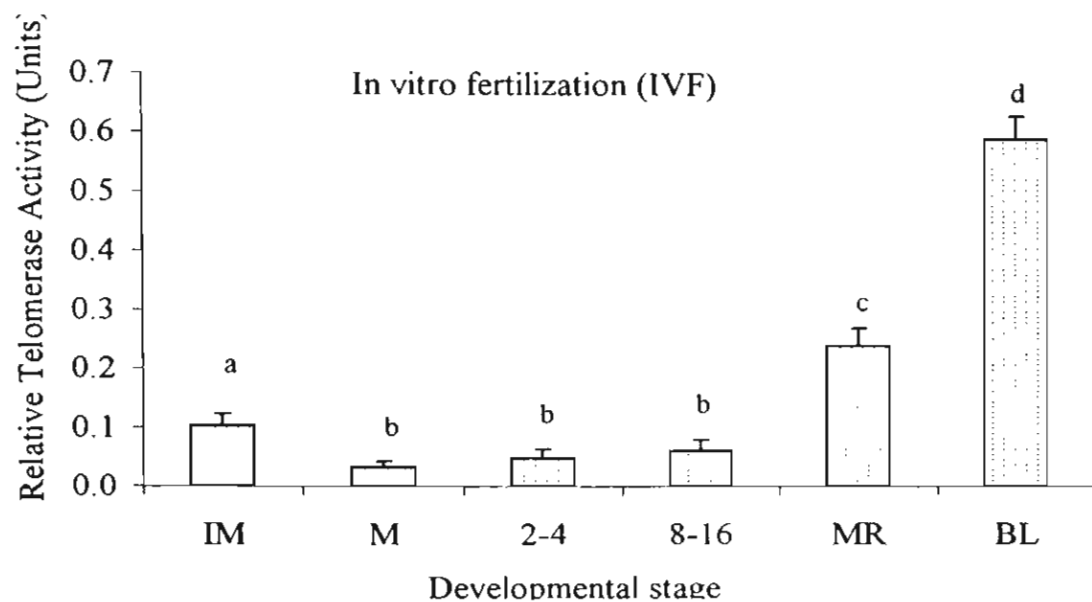


Fig. 3. Relative telomerase activity (RTA) in buffalo oocytes and IVF embryos. RTA was measured in 1 mg protein extracts from immature oocytes (IM), mature oocytes (M), 2-4-cell embryos (2-4), 8-16-cell embryos (8-16), morula (MR), and blastocyst (BL). RTA decreased from immature to mature oocytes and increased significantly at the morula stage. Highest level of telomerase activity was detected in the blastocyst stage. Different letters above the bars represent significant differences ($P < 0.05$).

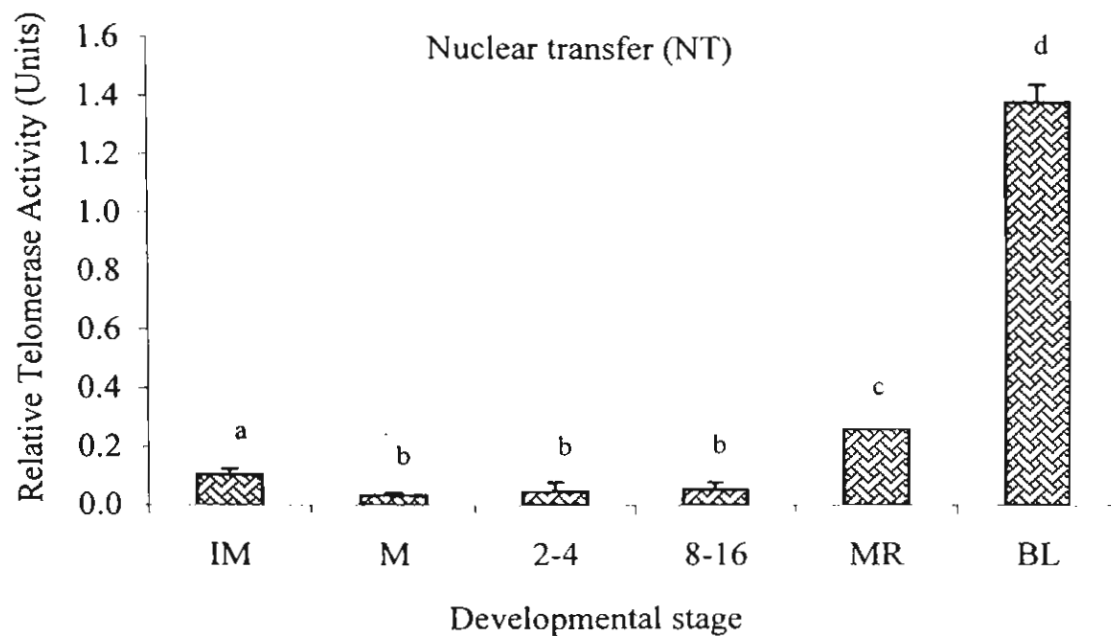


Fig. 4. Relative telomerase activity (RTA) in buffalo oocytes and NT embryos. RTA was measure in 1 mg protein extracts from immature oocytes (IM), mature oocytes (M), 2-4-cell embryos (2-4), 8-16-cell embryos (8-16), morula (MR), and blastocyst (BL). RTA decreased significantly from immature to mature oocytes ($P < 0.05$). A significant increase of telomerase activity was found in the morula stage and reached highest level at the blastocyst stage. Different letters above the bars represent significant differences ($P < 0.05$).

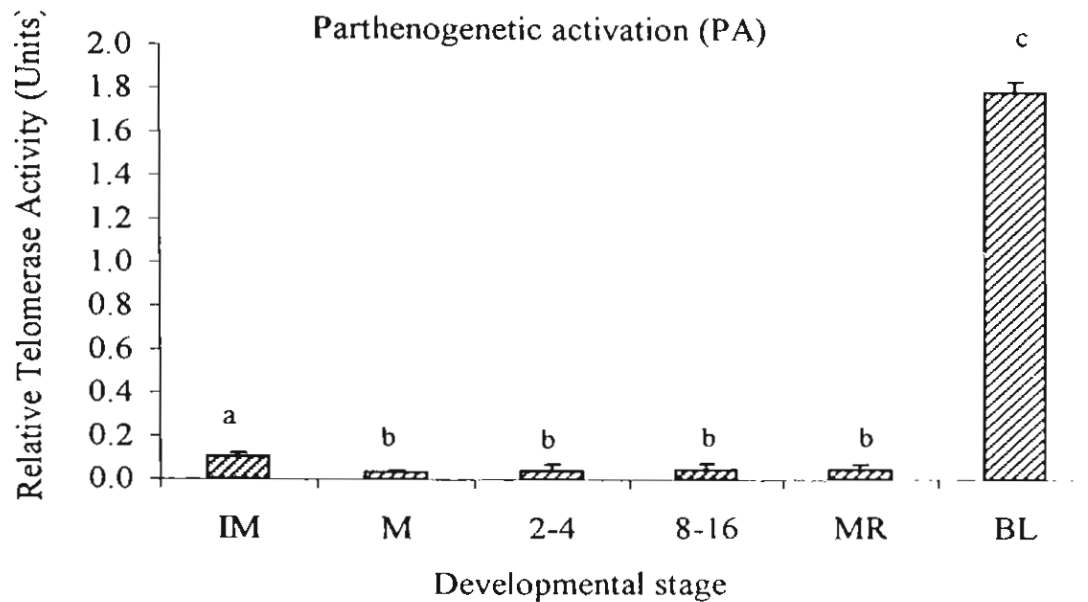


Fig. 5. Relative telomerase activity (RTA) in buffalo oocytes and PA embryos. RTA was measured in 1 mg protein extracts from immature oocytes (IM), mature oocytes (M), 2-4-cell embryos (2-4), 8-16-cell embryos (8-16), morula (MR), and blastocyst (BL). RTA decreased during oocyte maturation and had low level until the morula stage. A significant increase of telomerase activity was found in blastocyst stage embryo. Different letters above the bars represent significant differences ($P < 0.05$).

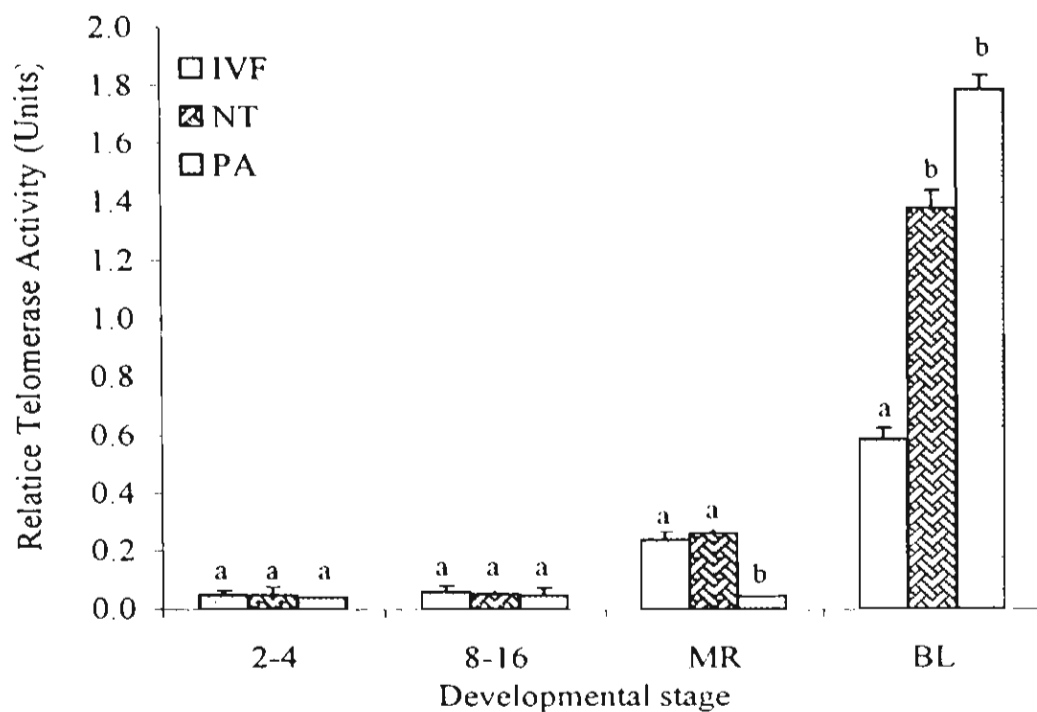


Fig. 6. A comparison of relative telomerase activity (RTA) in preimplantation stage embryos derived from IVF, NT, and PA. Blastocyst stage embryos have higher telomerase activity than other stages in all three systems. The telomerase activity in blastocyst stage embryos of PA and NT systems are higher than that of such embryos in the IVF ($P < 0.05$). Columns with different superscripts within each stage are significantly different ($P < 0.05$).

