

Project Code: PDF/01/2542

Project Title: การโคลนนิ่งตัวอ่อนสุกรโดยใช้เซลล์ใบหูและเซลล์กล้ามเนื้อหางเป็นเซลล์ต้นแบบ: ผลของระยะเวลาหลังเลี้ยงโอโอไซต์และฟิวส์ชั้นพารามิตอร์ต่ออัตราการเชื่อมและการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

Investigators: รังสรรค์ พาลพ่าย¹ เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู² และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ²

¹ โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² โครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail: Rangsun.P@chula.ac.th

Project Period: 1 กรกฎาคม 2542 – 30 มิถุนายน 2543

บทคัดย่อ

ทำการทดลองเพื่อทดสอบผลของระยะเวลาหลังเลี้ยงไข่อ่อนและฟิวส์ชั้นพารามิตอร์ที่แตกต่างกันต่ออัตราการเชื่อมระหว่างโอโอไซต์กับเซลล์ต้นแบบและการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ใช้ micromanipulator ฉีดเซลล์ใบหูและเซลล์กล้ามเนื้อหางซึ่งเป็นเซลล์ต้นแบบเข้าไปในบริเวณ perivitelline space ของโอโอไซต์ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว นำโอโอไซต์ครึ่งละใบไปไว้ระหว่างปลายของ electrode ในน้ำยาเชื่อมเซลล์ ในการทดลองที่ 1 ใช้กระแสไฟฟ้า DC pulse 20 V/โอโอไซต์ ระยะเวลา 10 20 30 40 หรือ 50 μ sec 2 ครั้ง พบว่าเซลล์ใบหูและเซลล์กล้ามเนื้อหางมีอัตราการเชื่อมสูงสุดเมื่อใช้กระแสไฟฟ้า 50 μ sec (71 และ 61%) และไม่มี ความแตกต่างกับกลุ่มที่ใช้เวลานาน 30 และ 40 μ sec อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะ 8-เซลล์ ของเซลล์ใบหูและเซลล์กล้ามเนื้อหางสูงสุดเมื่อใช้กระแสไฟฟ้า นาน 50 μ sec (21 และ 18%) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ใช้เวลานาน 30 และ 40 μ sec การทดลองนี้ตัวอ่อนหยุดเจริญที่ระยะ 8-เซลล์ ในการทดลองที่ 2 อัตราการเชื่อมและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะ 8-เซลล์เมื่อใช้ DC pulse 20 V/โอโอไซต์ นาน 40 μ sec 2 ครั้ง ของโอโอไซต์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วนาน 36, 41 และ 46 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิด การทดลองนี้ตัวอ่อนหยุดเจริญที่ระยะ 8-เซลล์ ในการทดลองที่ 3 เมื่อใช้โอโอไซต์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วนาน 46 ชั่วโมงและเชื่อมโดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 V/โอโอไซต์ นาน 40 μ sec 2 ครั้ง แล้วนำตัวอ่อนระยะ 8-เซลล์มาเลี้ยงแบบ co-culture และ nonco-culture กับเซลล์บุท่อไข่สุกร ปรากฏว่าทั้งสองกลุ่มไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์ การทดลองนี้อาจสรุปได้คือ 1) การใช้กระแสไฟฟ้า DC pulse 20V/โอโอไซต์ นาน 30, 40 และ 50 μ sec 2 ครั้ง มีความเหมาะสมในการเชื่อมเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิดกับโอโอไซต์ 2) การนำโอโอไซต์มาเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 36, 41 และ 46 ชั่วโมง ได้อัตราการเชื่อมและเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะ 8-เซลล์ไม่แตกต่างกันในเซลล์ต้นแบบทั้งสองชนิด 3) ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าการนำตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ 8-เซลล์มาเลี้ยงแบบ co-culture และ nonco-culture กับเซลล์บุท่อไข่สุกร แบบไหนจะดีกว่ากันเนื่องจากว่าทั้งสองกลุ่มไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 8-เซลล์

Keywords: pig, cloning, ear cells, tail muscle cells

Project Code: PDF/01/2542

Project Title: Cloning of porcine embryo by using ear cells and tail muscle cells as donor nuclei :
Effect of time after maturation and fusion parameters on the rate of fusion and development of embryo.

Investigators: Rangsun Parnpai Kriangsak Tasripoo and Maneewan Kamonpatana
Research Center for Bioscience in Animal Production,
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

E-mail: Rangsun.P@chula.ac.th

Project Period: 1 July 1999 – 30 June 2000

Abstract

The present experiment was carried out to examine the time after maturation and differences fusion parameters on the rate of fusion of enucleated porcine oocytes with donor cells and development of embryo. Donor cells were transferred into perivitelline space of enucleated oocytes by micromanipulator. Fusion was performed by placing individual oocytes between electrodes to electrostimulate. In experiment 1, using DC pulse 20 V/oocyte either 10 20 30 40 or 50 μ sec for two times each in fusion medium. The highest fusion rate was found when using fusion parameter at 50 μ sec in ear cells and tail muscle cells (71 and 61%). The highest rate of embryos developed to 8-cell stage was found when using fusion parameter at 50 μ sec in ear cells and tail muscle cells (21 and 18%). Embryos in this experiment could not develop beyond 8-cell stage. In experiment 2, fusion and developmental rate of embryos when using 20 V/oocyte for 40 μ sec two times each of oocytes cultured at 36, 41 and 46 hr were not different among both types of donor cells. In experiment 3, using oocytes cultured at 46 hr and fusion with 20 V/oocyte for 40 μ sec two times each to produced 8-cell stage reconstructed embryos. This experiment could not examine the effects of co-cultured and nonco-cultured of 8-cell stage reconstructed embryos with porcine oviductal epithelial cells because of all embryos could not develop beyond 8-cell stage. Our finding may be concluded that 1) Electrostimulation with DC pulse 20 V/oocyte for 30, 40 and 50 μ sec two times each was appropriated for fusion both types of donor cells with enucleated oocytes. 2) fusion and developmental rate of embryos when using 20 V/oocyte for 40 μ sec two times each of oocytes cultured at 36, 41 and 46 hr were not different among both types of donor cells. 3) Could not examine the effects of co-cultured and nonco-cultured of 8-cell stage reconstructed embryos with porcine oviductal epithelial cells because of all embryos could not develop beyond 8-cell stage.

Keywords: pig, cloning, ear cells, tail muscle cells