การพัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนกระต่ายในหลอดทดลองหลังการย้ายฝากนิวเคลียส โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์

ปราณี นำชัยศรีค้า[1*] มงคล เตชะกำพุ[2] รัฐจักร รังสิวิวัฒน์[1]
กำธร พฤกษานานนท์[1] ประมวล วีรุตมเสน[1]

[1]หน่วยเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* ผู้เสนอผลงาน

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อปรับปรุงเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียสด้วยเซลล์โซมาติกในกระต่าย โดยใช้เทคนิคการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 2 ครั้งร่วมกับสารเคมี 2 ชนิดด้วยกัน คือ Cyclohexamide (CHX) และ 6-Dimethlyaminopurine (DMAP) นำเอาเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ผ่านการเลี้ยงมา 9-15 ครั้ง ย้ายฝากแทนสารพันธุกรรมของโอโอไซต์ที่ดูดออกจำนวน 159 ใบ แล้วนำโอโอไซต์ไปกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 2 ครั้งโดยห่างกันครั้งละ 1 ชม. (3 DC pulses, 1.2 Kv.cm^{-1} เป็นเวลา 20 µsec ใน 0.3 M mannitol) หลังจากกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าครั้งที่ 2 แล้ว ก็จะนำไปเลี้ยงในน้ำยา TCM199+10% fetal calf serum ที่มี Cyclohexamide (CHX) 5 µg.ml^{-1} และ 6-Dimethlyaminopurine (6-DMAP) 2 mM เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นล้างและเลี้ยงใน TCM199 + 10% fetal calf serum ติดตามการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุก 24 ชม. เป็นเวลา 7 วัน พบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเท่ากับ 68.6% (109/159) อัตราการแบ่งตัวเป็นมอรูล่าและบลาสโตซีส เท่ากับ 28.9% (46/159) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคนี้ในการผลิตตัวอ่อนระยะมอรูล่าและบลาสโตซีสได้

คำสำคัญ: การย้ายฝากนิวเคลียส, เซลล์ไฟโบรบลาสต์, กระต่าย

In vitro Development of Rabbit Embryos after Nuclear Transfer by Using Cultivated Fibroblast Cells

Pranee Numchaisrika[1*] Mongkol Techakumphu[2] Ratajuk Rungsiwiwut[1]
Kamtorn Prugsananon[1] Pramuan Virutamasen[1]

[1]Department of Obstetrics Gynaecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
[2]Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

* Presentation person

The objective of the study was to improve the technique of somatic cell nuclear transfer in rabbit by using a double electrical activation and then activated with two drugs; Cyclohexamide (CHX) and 6-Dimethlylaminopurin (DMAP). The metaphase II and 1st polar body of oocyte were aspirated by enucleated micropipete under inverted microscope. The cultivated fibroblast cells from the 9th-15th passage were transferred to enucleated oocyte. The reconstructed oocytes were then activated by two sets of electrical stimulation 1 hour apart (3 DC pulses of 1.2 Kv/cm for 20 µsec each in mannitol 0.3 M). After the second set of electrostimulation, they were incubated in 5 µg/ml CHX and 2 mM DMAP in TCM199 for one hour then washed and cultured in TCM199 +10% FCS. The cleavage, morula and blastocyst rates were recorded every 24 hours for 7 days. The study showed that the cleavage rate was 68.6% (109/159), the morula and blastocyst rates were 27.0% (43/159) and 2.75% (3/159) respectively. The cloned rabbit embryos at morula and blastocyst stage can be produced by this protocol.

Key words: Nuclear transfer, fibroblast cells, rabbit