การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน

Growth Performance of Cloned Calves Derived from Ear Fibroblasts of Exotic Brahman Bull.

ธวัชชัย เวชยันต์[1] ชุติ เหล่าธรรมธร[1] จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์[1] สุจิตรา หมื่นไธสง[1] ปิยมาศ การสมดี[1] มาริน่า เกตุทัต คาร์นส์[1] เพลิน เมินกระโทก[2] สมพงษ์ ปาติตัง[2] สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์[3] สุริยา กิจสำเร็จ[3] และรังสรรค์ พาลพ่าย[1]

Tawatchai Vetchayun[1] Chuti Laowtammathron[1] Chanchao Lorthongpanich[1] Suchitra Muenthaisong[1] Piyamas Karnsomdee[1] Mariena Ketudat Cairns[1] Plern Meuankatoke[2] Sompong Patitung[2] Sombat Siriudomsate[3] Suriya Kitsumret[3] and Rangsun Parnpai[1]

บทคัดย่อ

เก็บชิ้นใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยม มาเลี้ยงแซ่แข็งเก็บไว้เป็นเซลล์ต้นแบบทำโคลนนิ่งโดย ฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในช่อง Perivitelline space ของไซโตพลาสซึมผู้รับ จากนั้นทำการเชื่อมเซลล์แล้วนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วเป็นเวลา 7 วัน นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้ จำนวน 64 ตัวอ่อนย้ายฝากให้แม่โคตัวรับ 40 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ) จากการทดลองพบว่าแม่โคตัวรับตั้งท้อง 35.0% (14/40) แท้งก่อนคลอด 28.5% (4/14) ลูกโคตายหลังคลอด 28.5% (4/14) ลูกโคโคลนนิ่งคลอดปกติ 50.0% (7/14) ลูกโคมีน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ย 41.2 กิโลกรัม อัตราการเจริญเติบโตระยะกินนมเฉลี่ย 920 กรัม/วัน ผลการตรวจ DNA microsatellite พบว่าลูกโคที่เกิดมาทั้ง 7 ตัว มีแถบDNAเหมือนกับโคต้นแบบทุกประการ และ แตกต่างจากแถบDNAของแม่โคตัวรับ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่าน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ยและอัตราการเจริญเติบโตระยะกินนมเฉลี่ยของลูกโคโคลนนิ่งสูงกว่าค่ามาตรฐาน

ABSTRACT

Ear skin of exotic Brahman bull cattle were cultured and frozen storage for use as donor cells in cloning experiment. Sixty four cloned blastocysts were transferred to 40 recipient (1-2 embryo / recipient). From the experiment found that 14 recipients getting pregnant 35.0% (14/40). From these, aborted recipients were 28.5%(4/14) and postnatal death of calves were 28.5%(4/14). Finally, clone calves were born 50% (7/14) with normal morphological appearance and healthy. The average birth weigh was 41.2 kg and daily weight gain was 920 g. The DNA microsatellite analysis of cloned calves and donor cells showed the same pattern and obviously different from recipients. The results of this experiment were revealed that birth weight and daily weight gain were 41.2 kilograms and 920 grams, respectively.

Key Words : cloning, cattle, growth rate

T Vetchayun : vetchayun@hotmail.com

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

School of Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakon Ratchasima 30000

[2]ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี,Suranaree University of Technology Farm

[3]เอสเคพัทยา แรนช์ อ. บางละมุง จ. ชลบุรี, SK Pattaya Ranch, Banglamoong, Chonburi

คำนำ

โคพันธุ์บราห์มันเป็นโคเนื้อพันธุ์พื้นฐานที่ใช้ปรับปรุงโคเนื้อพันธุ์พื้นเมืองของไทยให้เป็นโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง- บราห์มัน ซึ่งสามารถนำไปสร้างโคเนื้อและโคนมลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในเมืองไทยได้ การผลิตโคบราห์มันพันธุ์แท้เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์ภายในประเทศจึงมีความจำเป็นมาก การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถจำลองพันธุกรรมและลักษณะทางกายภาพของโคลักษณะดีเยี่ยมที่ใช้เป็นต้นแบบขึ้นมาใหม่ได้ซึ่งบ้านเรามีรายงานความสำเร็จจากการโคลนนิ่งมาแล้ว (รังสรรค์และคณะ, 2543 ; Parnpai *et al.,* 2000; 2002)การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสใบหูของพ่อโคบราห์มัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ตัดชิ้นส่วนของใบหู ขนาด 5 x 5 มม. จากโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ชื่อตูมตาม (999/1) ซึ่งมีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยม มาทำความสะอาดแล้วเลี้ยงในน้ำยา Alpha Minimum Essential Medium (αMEM, Sigma, M-7145) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, 10270-098) ที่อุณหภูมิ 37° C, 5% CO_2 in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4-5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากจนเต็มจานเลี้ยงเซลล์ จะทำการขยายการเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากๆ แล้วนำไปแช่แข็ง เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ก่อนที่จะทำการโคลนนิ่งประมาณ 2-3 วัน จะทำการละลายเซลล์ต้นแบบออกมาเลี้ยงใหม่ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย (Gibco, 2725-024)/EDTA (BDH, 100935V) เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จะใช้เซลล์ถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ ไว้ในน้ำเกลือขณะเข้าห้องปฏิบัติการ ใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาเจาะดูดไข่ออกจากถุงฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 มม. และเลือกเฉพาะไข่คุณภาพดีเลี้ยงในน้ำยาที่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) + 10%FBS 50 IU/ml HCG (Chorulon® ,Intervet), 0.02AU/ml FSH (Antrin®, Denka Phamaceutical) และ 1 µg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-8875) และนำไปเลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ / 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 °C, 5 %CO_2 in air นาน 21 ชั่วโมง จากนั้นทำการย่อยเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบ ๆ ไข่ออกให้หมดด้วย 0.2 % Hyaluonidase คัดเฉพาะไข่ที่สุกแล้ว (มี First polar body) มาดูดนิวเคลียสทิ้งไปโดยใช้ Micromanipulator ในน้ำยาที่มี 5 µg/ml Cytochalasin B (CB, Sigma, C-6762) ผสมอยู่และยืนยันผลโดยการนำส่วนที่ดูดออกมาได้ไปย้อมสี Hoechst 33342 (Sigma, C-2261) แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง อุลตราไวโอเลต หลังจากนั้นจะล้างไข่ 5 ครั้ง ในน้ำยา TMC 199-Hepes + 10% FBS (199H-10% FBS)

การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์

นำเฉพาะไข่ที่ดูดสารพันธุกรรมสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ Perivitteline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmerman fusion medium เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า ก่อนจ่ายกระแสไฟฟ้ากระแสตรง (DC pulse) ที่จ่ายโดย

เครื่องเชื่อมเซลล์ (SUT F-1, Suranaree University of Technology) ความแรงไฟฟ้า 24 Volt นาน 15 μsec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน หลังจากนั้นจะนำไข่ไปล้างในน้ำยา Emcaer (ICP bio.) 5 ครั้ง และพักไว้ 1 ชั่วโมงจึงตรวจการเชื่อมติดของไข่และเซลล์ต้นแบบ จากนั้นคัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมติดกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 μg/ml Cytochalasin D (CD, Sigma, C-8273) และ10 μg/ml Cycloheximide (CHX, Sigma, C-6798) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Parnpai et al. 2000)

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 1%FBS ในหลอดแก้ว นาน 2 วัน โดยจะเลี้ยง 20 ตัวอ่อนในน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 in air จากนั้นจะคัดเฉพาะตัวตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 5%FBS ร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค (10 ตัวอ่อน/ 100µl) ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% CO_2 in air เป็นเวลา 5 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูดน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่ง และแทนที่ด้วยน้ำยาใหม่ใช้เวลาเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมด 7 วัน จะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสแล้วนำไปย้ายฝาก

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่แม่โคตัวรับ

คัดเลือกโคลูกผสมจากฟาร์ม SK Pattaya Ranch จำนวน 40 ตัว โดยคัดเอาแม่โคและโคสาวที่มีระบบสืบพันธุ์ดี อายุ 2-5 ปี รังไข่สมบูรณ์ มีวงรอบการเป็นสัดสม่ำเสมอ แสดงอาการเป็นสัดชัดเจนมาเป็นแม่โคตัวรับ โดยจะใช้ทั้งโคที่เป็นสัดธรรมชาติ หรือฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่โคตัวรับเป็นสัด หลังจากแม่โคตัวรับเป็นสัดได้ 7 วัน จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส เข้าไปในปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ ของแม่โคตัวรับ โดยฝากได้ 1-2 ตัวอ่อน /แม่โคตัวรับ 1 ตัว หลังจากนั้นอีก 60 วัน ล้วงตรวจการตั้งท้องของแม่โค เมื่อใกล้ครบกำหนดคลอด จะทำการเตรียมคลอด และให้การช่วยเหลือขณะคลอดชั่งน้ำหนักลูกโคแรกคลอดจนถึงอายุ 6 เดือน

การตรวจ DNA Microsatellite

เจาะเลือดโคต้นแบบ (ตูมตาม 999/1) แม่โคตัวรับ และลูกโคโคลนนิ่ง แยกใส่หลอดทดลองที่ผ่านการอบไอน้ำฆ่าเชื้อแล้ว นำเลือดของตัวอย่างที่ได้มาสกัด Genomic DNA เพื่อใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในการตรวจสอบแล้วนำ genomic DNA ที่สกัดได้ของแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มขยายปริมาณ ณ ตำแหน่งที่จำเพาะด้วย DNA microsatellite primer (MGTC4B และ TGLA126) โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) นำ PCR product ที่ได้ของแต่ละตัวอย่าง มาแยกหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของชิ้นส่วนที่เพิ่มขยายปริมาณได้ด้วย 6% Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จากนั้นตรวจสอบความแตกต่างของชิ้น PCR product ของแต่ละตัวอย่างด้วย วิธี silver staining

ผลการทดลอง

การตั้งท้องและการคลอด

จากการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง 64 ตัวอ่อน ให้กับแม่โคตัวรับ 40 ตัว ตัวละ 1-2 ตัวอ่อน มีแม่โคตั้งท้อง 14 ตัว คิดเป็น 35% ของตัวรับทั้งหมด มีแม่โคตัวรับแท้งลูก 4 ตัว ก่อนคลอด ในวันที่ 186, 209, 234 และ 251 ของการตั้งท้อง คิดเป็น 28.5% ของโคที่ตั้งท้อง มีแม่โคตัวรับที่ตั้งท้องจนคลอด 10 ตัว ในจำนวนนั้นมีลูกโคโคลนนิ่งตายหลังคลอด 4 ตัว ในจำนวนนี้มีลูกแฝด 1 คู่ และมีลูกโคโคลนนิ่ง คลอดปกติ และมีชีวิตรอดจำนวน 7 ตัว คิดเป็น 50 % ของจำนวนแม่โคอุ้มท้อง

ผลการตรวจ DNA Microsattlelite

จากการตรวจหา DNA Microsttlelite ด้วย primer MGTC4B และ TGLA126 พบว่า DND ของลูกโคโคลนนิ่งทั้ง 7 ตัว (Toomtam 2-8) ให้แถบเหมือนกับ DNA ของตูมตาม 999/1 (Toomtam 1) ซึ่งเป็นเจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ (Fig.1) และแตกต่างจากแม่โคตัวรับ (BG13, BG24, BG47, CB23, CB20, BG30 และCB5)

.

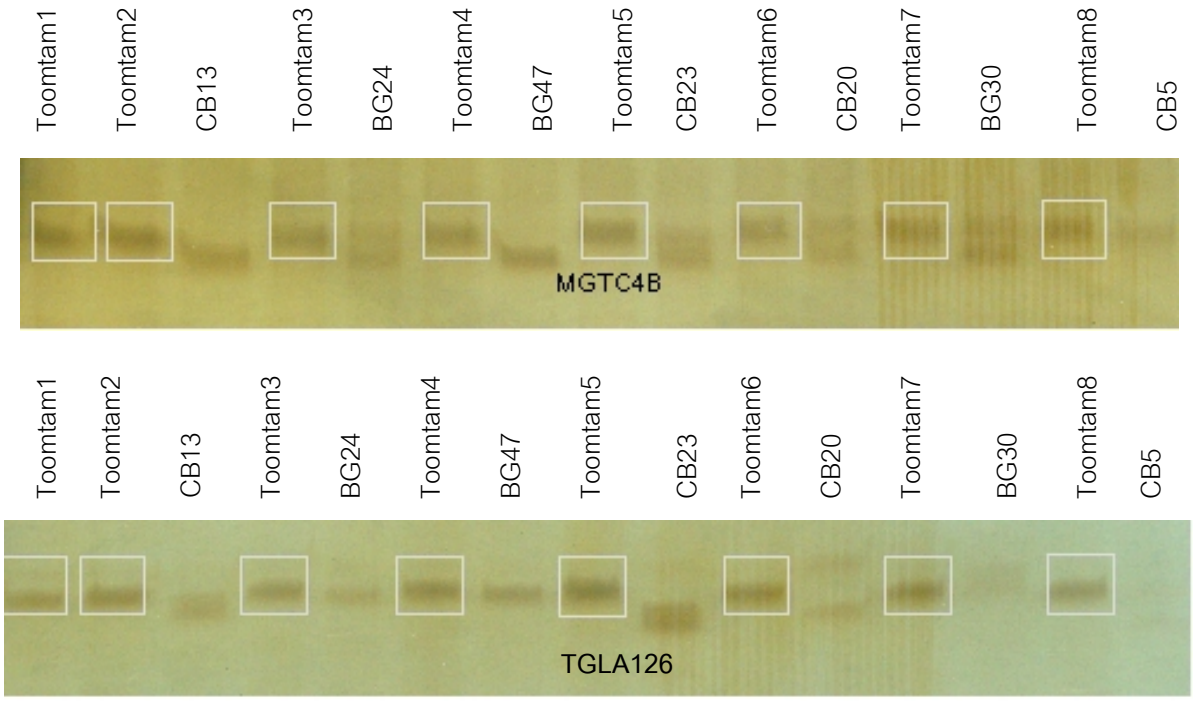

Fig1. DNA Microsttlelite of donor cells, cloned calves and recipients

Table 1. Body weight of cloned calves at birth upto 6 month.

Number	Weigh (Kg)							Growth rate
	Birth	1 m.	2 m.	3 m.	4 m.	5 m.	6 m.	(Kg/d.)
Tumtam 2	32.5	61.0	104.5	136.5	170.0	198.5	227.0	1.08
Tumtam 3	45.0	78.5	109.5	147.0	176.5	210.0	229.0	1.02
Tumtam 4	44.5	61.0	91.0	140.0	140.0	181.5	201.0	0.86
Tumtam 5	46.0	59.5	81.5	115.0	115.0	129.0	146.0	0.55
Tumtam 6	40.0	67.5	96.5	157.0	157.0	184.5	202.0	0.90
Tumtam 7	42.5	78.5	107.5	159.0	159.0	183.0	206.0	0.90
Tumtam 8	38.0	89.5	118.0	186.0	186.0	210.0	240.0	1.12
Mean	41.2	70.7	101.2	148.6	157.6	185.2	207.2	0.92

จาก Table1. พบว่าน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ยของลูกโคโคลนนิ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยมาตรฐานของโคพันธุ์บราห์มันในประเทศไทย ที่รายงานโดยศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง (31.6 กิโลกรัม) ดังนั้นแม่โคตัวรับควรมีขนาดใหญ่ กระดูกเชิงกรานกว้างไม่มีประวัติการคลอดยาก และเมื่อครบกำหนดคลอดควรดูแลพิเศษ เตรียมคลอดและให้การช่วยเหลือขณะคลอด อัตราการเจริญเติบโตขณะกินนมเฉลี่ยของลูกโคโคลนนิ่ง (920 กรัม/วัน) สูงกว่าค่าเฉลี่ยมาตรฐานของโคพันธุ์รามันในประเทศไทย ที่รายงานโดยศูนย์บำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง (730 กรัม/วัน)

สรุป

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อสายพันธุ์ดี ได้ลูกโคโคลนนิ่งที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังนั้นเทคโนโลยีการโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อสายพันธุ์ดีเยี่ยมโดยให้เพศและพันธุกรรมที่ต้องการได้

คำนิยม

การทดลองนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิงโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

รังสรรค์ พาลพ่าย ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ และ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเทคโนโลยีการโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาสัตว์

3-6 กุมภาพันธ์ 2547, 94-98.

Hill, J.H., R.C. Burghardt, K. Jones, C.R. Long, C.R. Looney, T. Shin, T.E. Spencer, J.A. Thomason, Q.A. Winger, and M.E. Westhusin. 2000. Evidence for placental abnormality as the major case of mortality in first-trimester somatic call cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.* 63:1787-1794.

Parnpai R, K.Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Developmantal potential of cloned bovine embryo derived from quiescent and non quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Theriogenology* 53:239.

Parnpai R, K.Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts and granulose cells. *Theriogenology* 57:443.