Thesis Title The Ability of *in vitro* Embryo Development and Stem Cells Production of Elephant-Rabbit Somatic Cell Nuclear Transfer

Author Mr. Anucha Sathanawongs

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc.Prof. Apichart Oranratnachai	Chairperson
Assoc.Prof. Dr. Suvichai Rojanasthien	Member
Asst.Prof. Dr. Supamit Mekchay	Member

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the feasibility of using interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) techniques in Asian elephants (*Elephas maximus*), using elephant fibroblast as donor cells and rabbit oocytes as the recipient cytoplasts. Elephant fibroblasts were collected post-mortem from ear skin of female Asian elephant and cultured *in vitro*. Monolayer fibroblasts were trypsinized and used for iSCNT. The comparative study of blastocyts rate of iSCNT were significantly lower ($P<0.05$) than rabbit SCNT and rabbit parthenogenesis (19.4, 56.7, and 70.3%, respectively). We tried to improve the efficiency of iSCNT by using phytohemagglutinin-P (PHA-P) to increase the fusion rate and nocodazole to synchronize donor cell in G1 stage of cell cycle. The fusion rate of elephant-rabbit

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

couples treated with PHA-P was significantly increased (47.5%) as compared with non-treated group (26.2%; $P<0.05$). The cloned embryos could develop into blastocyst 27.8% when donor cells were treated with nocodazole, which were significantly higher than non-treated cells group 14.4% ($P<0.05$). The studies of interspecies zona-free SCNT and stem cells production were investigated. Fusion rates of zona-free group was higher than zona-intact group (59.8 and 43.6%, respectively; $P<0.05$) but blastocyst rates were not significantly different. Two rabbit embryonic stem cell (ES) like colonies could be derived from zona-intact and zona-free blastocyst and these cells were characterized for their stem-cell properties. But the ES cell couldn't be established from elephant iSCNT blastocysts when using the same protocol. In using this protocol, Asian elephant blastocysts can be produced by iSCNT of fibroblast cells into rabbit cytoplasts with the use of nocodazole and PHA-P. The blastocyst rate of cloned elephant embryos using rabbit cytoplasts are more than 25% and may have the potential to develop further study of elephant preservation. The rabbit parthenogenetic stem cells can be successfully isolated and useful for the regenerative medicine in the further.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความสามารถในพัฒนาของตัวอ่อนและการผลิตเซลล์ต้นแบบที่ได้จากการย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกายช้างเข้าไปในไข่กระต่าย

ผู้เขียน นายอนุชา สธนวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. อภิชาติ โอฬารรัตนชัย ประธานกรรมการ
รศ.ดร. สุวิชัย โรจนเสถียร กรรมการ
ผศ.ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อน ด้วยเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียสในช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสช้างเป็นตัวให้และไข่กระต่ายเป็นตัวรับ เก็บเซลไฟโบรบลาสจากผิวหนังของใบหูช้างเอเชียซึ่งเพิ่งตาย แล้วเลี้ยงเซลล์ผิวหนังภายนอกร่างกายจนได้เซลล์ไฟโบรบลาสเซลล์เดี่ยว สำหรับใช้ในการย้ายฝากนิวเคลียสโดยอาศัยเอนไซม์ทริปซิน ผลพบว่า อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิสด้วยเทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียสต่างสปีชีส์ต่ำกว่าการย้ายฝากนิวเคลียส และการกระตุ้นให้เกิดการเจริญตัวอ่อนด้วยกระแสไฟฟ้าของกระต่าย (19.4%, 56.7% และ 70.3% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การใช้สารพีเอชเอพี (phytohemagglutinin-P, PHA-P) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำการย้ายฝากนิวเคลียสโดยเพิ่มอัตราการเชื่อมติดกันของเซลล์กับไข่ และการใช้สาร nocodazole ในการเหนี่ยวนำเซลล์เข้าสู่ระยะพัก (G1 stage of cell cycle) เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิส อัตราการเชื่อมติดกันของเซลล์ช้างกับไข่กระต่ายที่ใช้สารพีเอชเอพี (47.5%) สูงกว่าไม่ใช้สารพีเอชเอพี (26.2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวอ่อนซึ่งเกิดจากการย้ายฝากนิวเคลียสสามารถพัฒนาจนถึงระยะบลาสโตซิสเท่ากับ 27.8% เมื่อทำการเหนี่ยวนำเซลล์ไฟโบรบลาสด้วยสาร nocodazole สูงกว่าตัวอ่อนซึ่งเกิดจากเซลล์ซึ่งไม่ถูกเหนี่ยวนำซึ่งมีค่าเท่ากับ 14.4% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การศึกษาการย้ายฝากนิวเคลียสโดยใช้ไข่ที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (zona-free SCNT) และการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลิตเซลล์ต้นกำเนิดพบว่า อัตราการเชื่อมติดกันของกลุ่มที่ไม่มีเปลือกหุ้มไข่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่มีเปลือกหุ้มไข่ (59.8% และ 43.6% ตามลำดับ; $P<0.05$) แต่การพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิสนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การผลิตเซลล์ที่เหมือนเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ทั้งจากกลุ่มที่มีเปลือกหุ้มไข่และกลุ่มที่ไม่มีเปลือกหุ้มไข่ และมีคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด แต่ไม่สามารถผลิตเซลล์ต้นกำเนิดได้จากตัวอ่อนของช้างที่ได้จากการย้ายฝากนิวเคลียสด้วยวิธีการเดียวกันกับกระต่าย การใช้วิธีการนี้สามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสของช้างเอเชียได้โดยการย้ายฝากนิเคลียส ซึ่งใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ใส่เข้าไปในไข่กระต่ายโดยการใช้สาร nocodazole และสารพีเอชเอพี ทำให้อัตราของบลาสโตซิสที่ได้จากการย้ายฝากนิวเคลียสช้างโดยใช้ไข่กระต่ายสูงถึง 25% และวิธีการนี้ยังเป็นประโยชน์ที่จะนำไปพัฒนาการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการอนุรักษ์ช้างเอเชีย และเซลล์ต้นกำเนิดของกระต่ายที่แยกมาได้นี้ยังเป็นประโยชน์สำหรับแพทย์ทางเลือกต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved