

## ANADOLU BOZ SIĞIR IRKININ KLONLANMASI

S Arat<sup>1</sup>, A Tas<sup>1</sup>, H Bagis<sup>1</sup>,  
H Sağırkaya<sup>2</sup>, Y Nak<sup>2</sup>, D Nak<sup>2</sup>, S Pabuccuođlu<sup>3</sup>, Ü Cirit<sup>3</sup>, E Karaman<sup>3</sup>, K Demir<sup>3</sup>, K Ak<sup>3</sup>,  
T Akkoc<sup>1</sup>; G Cetinkaya<sup>1</sup>,

1. TUBİTAK, MAM-Genetik Mühendisliđi ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli,
2. Uludađ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama A.D, Görükle, Bursa
3. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama A.D Avcılar, İstanbul

Nükleer transfer(NT) çalışmalarının uygulama alanlarından biri sayıları azalmış olan yerli ırkların klonlanarak sayılarının artırılmasıdır. Bu çalışmada Marmara Bölgesinin yerli siğir ırkı olan ve yarı vahşi yaşıyan Boz Siđir Irkının klonlanması hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılacak olgunlaşmamış siğir yumurtaları mezbaha materyalinden aspire edilmiş ve 10%FCS, sodyum piruvat, EGF, bLH, bFSH ve penisilin/streptomisin içeren TCM199 medyumunda 39°C%5CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 18 saat tutularak olgunlaştırılmıştır. Olgun yumurtalar (MII) kumulüs hücrelerinden temizlendikten sonra metafaz pleytleri ve birinci polar cisimleri alınmıştır. Erkek Boz Siđirin kulak dokusundan elde edilen kıkırdak hücreleri nükleüs kaynağı hücre olarak kullanılmıştır. NT sonrası yumurtalara 133V/500µm 30µs 1 atış yapılarak füzyon uygulanmış ve yarım saat sonra füze olmuş olan NT üniteleri Cal ile 5 dk (5µM ) CD(2.5 µg/ml)+cycloheximide(CHX,10µg/ml) kombinasyonu ile 1 saat ve CHX ile 4 saat muamele edilerek aktive edilmişlerdir. Aktivasyondan sonra NT üniteleri 8mg/ml BSA'lı Sage embriyo bölünme medyumunda 72 saat kültüre edildikten sonra üç gruba ayrılmışlardır. Birinci gruptakiler 8mg/ml BSA'lı Sage blastosist medyumunda, ikinci gruptakiler 8 mg/ml BSA+%5 FCS'lu Sage blastosist medyumunda, üçüncü gruptakiler ise 4 mg/ml BSA+%5 FCS'lu Sage blastosist medyumunda ilave olarak 4 gün daha kültüre edildiler. Bunun sonucunda birinci grupta blastosist oranı (%19) ikinci (%33,3) ve üçüncü gruptan (%40,68) anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Blastosist dönemindeki 73 embriyonun 63 adedi Uludađ Üniversitesinde bulunan 17 alıcıya ve 10 adedi İstanbul Üniversitesinde bulunan 5 alıcıya 2-5 arasında olmak üzere transfer edilmiştir. Bunun sonucunda 35 gün üzerinde toplam 11 gebelik (%50) tespit edilmiştir. Bunlardan 6 adedi 42 günlükken kaybedilmiş diğer 5 adedinde ise gebelik devam etmektedir ve 7 adedinde gebelik gerçekleşmemiştir. Gebelik muayenesi yapılmayan 4 alıcı inek daha vardır. Çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG 104O360 ve TÜBİTAK-KAMAG 106G005 projeleri ile desteklenmiştir.  
E-mail: Sezen.Arat@mam.gov.tr

## CLONING OF ANATOLIAN GREY COW

S Arat<sub>1</sub>, A Tas<sub>1</sub>, H Bagis<sub>1</sub>,

H Sağırkaya<sub>2</sub>, Y Nak<sub>2</sub>, D Nak<sub>2</sub>, S Pabuçcuođlu<sub>3</sub>, Ü Cirit<sub>3</sub>, E Karaman<sub>3</sub>, K Demir<sub>3</sub>, K Ak<sub>3</sub>,  
T Akkoc<sub>1</sub>; G Cetinkaya<sub>1</sub>,

1. TUBITAK, Research Institute for Genetic Engineering, Gebze, Kocaeli, Turkey,

2. Uludag University Faculty of Veterinary Medicine Department of Reproduction and Artificial Insemination, Görükle, Bursa

3. Istanbul University Faculty of Veterinary Medicine Department of Reproduction and Artificial Insemination Avcılar, İstanbul

One of the application fields of nuclear transfer (NT) is to increase the decreasing numbers of native animal races by cloning. In the present study, cloning of native Anatolian gray cattle living semi-wildly especially in Marmara Region was aimed. Immature bovine oocytes were aspirated from slaughterhouse material and in vitro matured in tissue culture medium-199 (TCM-199) supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate, EGF, bLH, bFSH and penicillin/streptomycin for 18 hour at 39°C and 5% CO<sub>2</sub> in humidified air. After removing the cumulus cells of matured oocytes (MII), meiotic spindles and first polar bodies were removed. As nuclear material source, cartilage cells obtained from the ear tissue of an male Anatolian gray bull were used. Following NT, oocyte-cell complexes were fused by one 30 µs pulse of 133V/500 µm. Thirty min later than fusion, fused NT units were activated by exposing to calcium ionophore (5 µM), cytochalasin D (2.5 µg/ml) + cycloheximide (CHX, 10 µg/ml) combination and CHX for 5 min, 1 h and 4 h, respectively. After activation, NT units were cultured in Sage cleavage® medium supplemented with 8 mg/ml BSA for 72 h and then developing embryos were divided into three groups. Embryos in the first group, second group and third group were respectively cultured in Sage blastocyst® media supplemented with 8 mg/ml BSA, 8 mg/ml BSA + 5% FCS and 4 mg/ml BSA + 5% FCS for additional 4 days. Development rates to blastocyst were 19.0% (4/21), 33.3% (25/75) and 40.68% (59/145) for the first, second and third groups, respectively. Sixty-three of 73 embryos were transferred into 17 recipient cows in Uludag University and the remaining embryos were transferred into 5 recipient cows in Istanbul University (2-5 blastocysts/a recipient cow). Eleven pregnancies were diagnosed over to 35 days (50%). Six of them was lost after 42 days and remaining five pregnancies are going on. Recently, there are 4 recipient cows which were not yet diagnosed for pregnancy. Experimental studies are in progress for this study. This study was supported by grants from TUBITAK, Turkey (TOVAG-1040360 and KAMAG-106G005).

**Contact E-mail:** Sezen.Arat@mam.gov.tr