

V.ULUSAL REPRODÜKSİYON ve SUNİ TOHURLAMA KONGRESİ
01 – 04 Ekim 2009 / Elazığ
(Sözlü Bildiri Özet Formu)

BİLDİRİ SUNUCUSUNUN

Adı, Soyadı, Ünvanı :SEZEN ARAT / DOÇ.DR./BAŞUZMAN ARAŞTIRMACI

Kurumu : TÜBİTAK MAM-GMBE

Adresi :TÜBİTAK MAM GMBE Merkez Bina Gebze Kocaeli 41470

e-mail :sezen.arat@mam.gov.tr

Telefon / Fax : 02626773351/05323414694 Fax:02626412309

Aynı Hayvana Ait Farklı Hücre Tiplerinin Ve Büyüme Faktörlerinin Embriyo Gelişimi
Üzerine Etkileri

Sezen Arat, Arzu Taş Çaputçu, Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Haydar Bağış, Sakir Sekmen Erman Ateş

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Gebze Kocaeli

E-mail: sezen.arat@mam.gov.tr

Nükleer transfer (NT) çalışmalarının amaçlarından biri de nesli tehlike olan türlerin klonlanmasıdır. Nükleer transfer de kullanılan hücrenin tipide etkili parametrelerden biridir. Bu çalışmada; büyüme faktörlerinin oositin maturasyonuna etkisi ve NT'de kullanılan farklı hücre tiplerinin klonlanmadaki etkisi araştırılmıştır. Birinci çalışmada; kullanılacak olgunlaşmamış sığır yumurtaları mezbaha materyalinden aspire edilerek 10%FCS, sodyum piruvat, bLH, bFSH (Grup1) veya EGF ilave edilen(Grup2) veya10ng/ml EGF ve 100ng/ml IGF-1(Grup 3) ilave edilen TCM199 medyumunda 39°C%5CO₂'li inkübatörde 18 saat tutularak olgunlaştırılmıştır. Maturasyon oranları incelendiğinde grup 2 (%75) ve 3 (%75)'ün grup 1'e (%64)göre daha yüksek oranlara sahip olduğu görülmüştür. İkinci deneyde; Boz sığır ırkından elde edilen granüloza, kıkırdak ve fibroblast hücreleri nükleus kaynağı olarak kullanılmıştır. Farklı hücre tiplerinin ve medyum konsantrasyonlarının embriyo gelişim üzerine etkileri araştırılmıştır. Olgunlaşmış yumurtalar enükle edilerek somatik hücre transferi yapılmıştır. Yumurta-hücre çiftleri Zimmerman medyumu içerisinde 133V/500 µm for 30 µs 1 atış ile füzyona tabi tutulmuşlardır. Füzyonu takiben NT çiftleri CaI (5µM 5 dak), cytochalin D (2.5 µg/ml)- cycloheximide (CHX,10µg/ml) 1 saat ve CHX medyumunda 4 saat tutularak kimyasal aktivasyonları gerçekleştirilmiştir. Blastosist gelişim oranları incelendiğinde de granüloza hücrelerinin (%34,98) diğer hücre tiplerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (kıkırdak %24,00 ve fibroblast %21,05). Granüloza, hücreleri ile yapılan NT çiftleri Sage+8 mg/ml BSA ile 72 saat kültüre edildikten sonra üç gruba (1-Sage+4mg/ml BSA+%5FCS; 2-Sage+4mg/ml BSA+%5FCS+100ng/ml IGF-1, 3- Sage+4mg/ml BSA+%5FCS+100ng/ml IGF-1+50ng/ml EGF) ayrılarak 4 gün daha kültüre edilmişlerdir. Kültür medyumuna serum ile beraber büyüme faktörlerinin eklenmesinin blastosist gelişimini üzerine olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. (Grup1 %34,98 Grup2 % 32,14 ve Grup3 %41,07)Sonuç olarak; büyüme faktörlerinin serum ile beraber uygulanmasının oosit maturasyonu ve blastosist gelişimi üzerine yararlı etkileri vardır. Bu çalışma TÜBİTAK -TOVAG 104O360 ve KAMAG 106G005 projesi ile desteklenmiştir.

Effects Of Different Cell Types And Growth Factors On Bovine Nuclear Transfer Embryo Development

Sezen Arat, Arzu Taş Çaputçu, Tolga Akkoç, Gaye Çetinkaya, Haydar Bağış, Sakir Sekmen Erman Ateş

TUBITAK, MAM, Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Kocaeli, Turkey

Correspondence: Sezen.Arat@mam.gov.tr.

One of the application fields of nuclear transfer (NT) is to increase the decreasing numbers of native animal races by cloning. Therefore; one of the several parameters affecting reprogramming of somatic cells is the type of cells. The objective of this study was to examine the effect of growth factors on the maturation, and cell types on somatic cell cloning(SSC). In the first experiment, bovine oocytes isolated from slaughterhouse ovaries were matured in TCM199 supplemented with 10% FBS, sodiumpyruvate, bFSH, and bLH without growth factors (group 1) or with EGF (group 2) or with 10ng/ml EGF and 100ng/ml IGF-1 (group 3) for 18 hours. Maturation rates were higher in group 2 and 3 (75 % and 75% respectively) than in group 1 (64 %). In the second experiment; as nuclear material source; granulosa, cartilage and fibroblast cells obtained from the ear tissue of a female Anatolian grey bull were used. The effects of cell types and different medium combinations on NT embryo development rates. Enucleated oocytes were used for somatic cell transfer. After transfer of single cells to enucleated oocytes, oocyte-cell couples were fused by a DC pulse of 133V/500 μ m for 30 μ s in the Zimmerman's medium. After fusion, fused Nuclear transfer (NT) units were activated using a combination of CaI (5 μ M for 5 min), cytochalasin D (2.5 μ g/ml) and cycloheximide (CHX, 10 μ g/ml) for 1 h and CHX alone for 4 h. When the results were compared, Granuloza cells have a higher blastocysts development rates (GC %34,98, Cartilage%24,00 Fibroblast %21,05). NT units with granulose cells were cultured in Sage cleavage medium supplemented with 8 mg/ml BSA for 72 h and then developing embryos were divided into three groups in 1) Sage with 4 mg/ml BSA and 5% FCS, 2) Sage with 4mg/ml BSA and %5FCS, 100ng/ml IGF-1, 3) Sage with 4 mg/ml BSA, 100ng/ml IGF-1, 50 ng/ml EGF and 5% FCS, for an additional 4 days. The results showed that serum and growth factors were have a positive effects on embryo development rates. The results indicate that growth factors have a beneficial effect on oocyte maturation and blastocyst development if they are added in culture medium with serum. This study was supported by grants from TUBITAK (TOVAG-104O360 and KAMAG-106G005).