บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ในปลากลุ่ม Pangasiid ในขั้นแรกได้ทำการพัฒนายีนเครื่องหมายที่ใช้ในการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ในปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) การศึกษานี้ได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน *vasa* ในปลาบึก และให้ชื่อว่า *Pgi-vasa* โดยยีน *Pgi-vasa* ประกอบด้วยกลุ่มของโมทีฟของกรดอะมิโนที่เป็นคุณลักษณะของยีน *vasa* ในปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ชุดซ้ำของกรดอะมิโน RG และ RGG กรดออะมิโน ATPase motifs และกรดออะมิโน DEAD-box การวิเคราะห์แผนภาพ Phylogenetic เปรียบเทียบกับโปรตีนของกลุ่ม DEAD-box family พบว่าโปรตีนของยีน *Pgi-vasa* จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน Vasa การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ายีน *Pgi-vasa-vasa* มีการแสดงออกที่รังไข่และอัณฑะ ผลการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาร่วมกับ in situ hybridization โดยโพรบ Antisense พบว่ายีน *Pgi-vasa* มีการแสดงออกเฉพาะที่เซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell) และสามารถใช้ในการจำแนกโอโอไซท์ (oocyte) ไพรมารีโอโอไซท์ (primary oocyte) และ โอโอโกเนีย (oogonia) ในรังไข่ และจำแนก สเปริมมาโตไซท์ (spermatocytes) และ สเปริมาโตโกเนีย (spermatogonia) ในอัณฑะได้ การศึกษาต่อมาทำการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้ และปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาผู้รับ การศึกษาถึงระยะที่เหมาะสมของปลาบึกต่อการเป็นปลาผู้ให้ พบว่าปลาบึกที่ระยะ Immature หรือที่น้ำหนักตัวตั้งแต่ 1 - 10 กิโลกรัม เหมาะสมที่จะเป็นปลาผู้ให้ เนื่องจากพบจำนวนของ spermatogonia หรือ oogonia สูงที่สุด ระยะของลูกปลาสวายวัยอ่อนที่เหมาะสมสำหรับเป็นปลาผู้รับ คือ ที่ระยะ 4 dph (day post hatching; dph) เอ็นไซม์ (Dissociation enzyme) ที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์จากอัณฑะปลาบึกคือ 0.4 % Collagenase IV และ 0.03 % Dispase II โดยให้จำนวนเซลล์ Spermatogonia 1.4 x 10^6 เซลล์ ต่อเนื้อเยื่ออัณฑะ 100 มิลลิกรัม เอ็นไซม์ (Dissociation enzyme) ที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์จากรังไข่ปลาบึกคือ 0.4 % Collagenase IV และ 0.03 % Dispase II เช่นเดียวกัน โดยให้จำนวนเซลล์ Oogonia 5.3 x 10^5 เซลล์ ต่อเนื้อเยื่อรังไข่ 100 มิลลิกรัม การปลูกถ่ายเซลล์ที่สกัดได้จากอัณฑะของปลาบึก เข้าสู่ลูกปลาสวายวัยอ่อน พบว่ามีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia เท่ากับ 90 % การปลูกถ่ายเซลล์ที่สกัดได้จากรังไข่ของปลาบึก เข้าสู่ลูกปลาสวายวัยอ่อน พบว่ามีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ oogonia เท่ากับ 80 % ปลาสวายผู้รับวัยอ่อนที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ มีอัตราการรอดเท่ากับ 26 % ซึ่งอัตราการรอดของลูกปลาสวายไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับบการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

Abstract

This study aimed to develop germ cell transplantation technology in Pangasiid. First, development of gene marker for identification of germ cell in giant catfish (*Pangasianodon gigas*) was performed. Cloning and expression analysis of vasa cDNA of giant catfish was conducted and designated this as *Pgi-vasa*. The *Pgi -vasa* contained all of the predicted consensus motifs that are shared among the vasa genes in other fish species, including RG and RGG repeats, ATPase motifs, and a DEAD-box, and phylogenetic analysis using various DEAD-box family proteins demonstrated that the *Pgi-vasa* protein clustered within the Vasa family. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) indicated that *Pgi-vasa* mRNA only occurred in ovary and testis. Histological characterization and in situ hybridization showed that the antisense probe of *Pgi-vasa* was able to identify oocyte, primary oocyte and oogonia in ovary as well as spermatocytes and spermatogonia in testis. Secondly, in order to develop germ cell transplantation, the giant catfish was used as donor fish, and the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) was used as recipient. The optimum growth stage of giant catfish to be used as donor fish was the fish as size of 1 – 10 kg body weight since the high proportion of spermatogonia or oogonia were highest. The optimum stage of recipient larvae of the striped catfish were 4 dph (day post hatching; dph). The optimum enzyme for dissociation of testis was 0.4 % Collagenase IV and 0.03 % Dispase II which resulted in isolated Spermatogonia 1.4 x 10^6 cells/ 100 mg of testis. Similarly, 0.4 % Collagenase IV and 0.03 % Dispase II were the suitable enzyme to dissociate ovary which could isolate oogonia 5.3 x 10^5 cells/ 100 mg of ovary. Germ cell transplantation was developed by microinjection of the spermatogonial of giant catfish into the recipient larvae of striped catfish. The colonization rate of spermatogonia was 90 %. In addition, germ cell transplantation of dissociated cell of ovary into striped catfish larvae resulted in the colonization of 80 %. The survival rate of transplanted larvae was 26 % which was not significantly different comparing to control un-injected fish (P>0.05).