กนกวรรณ ศรีรัตนา : ผลของ Trichostatin A ต่อการเจริญเติบโตจนครบกำหนดคลอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งและตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่ง (EFFECTS OF TRICHOSTATIN A ON FULL-TERM DEVELOPMENT OF CLONED BOVINE AND GAUR EMBRYOS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 106 หน้า

องค์การระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติได้ขึ้นทะเบียนกระทิงให้เป็นสัตว์ป่าที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง เทคโนโลยีการผสมพันธุ์ไม่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์ได้ เนื่องจากขาดแคลนไข่และตัวรับ การย้ายฝากนิวเคลียสข้ามสายพันธุ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการทำโคลนนิ่งสัตว์ใกล้สูญพันธุ์โดยใช้ไข่และตัวรับจากสัตว์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จในการผลิตลูกสัตว์ยังต่ำอยู่มาก เนื่องจากกระบวนการ reprogramming ที่ไม่สมบูรณ์ของเซลล์ต้นแบบ จากการวิจัยที่มีมาก่อนพบว่า Trichostatin A (TSA) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำหน้าที่ยับยั้งการดึงหมู่อะเซทิลบนโปรตีนฮีสโตนออก สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำโคลนนิ่งในสัตว์หลายชนิด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือ ศึกษาผลของ TSA ที่มีต่อการเจริญเติบโตจนครบกำหนดคลอดของตัวอ่อนโคที่ได้จากการย้ายฝากนิวเคลียสในสายพันธุ์เดียวกันและตัวอ่อนกระทิงที่ได้จากการย้ายฝากนิวเคลียสข้ามสายพันธุ์

เซลล์ต้นแบบที่ใช้ในการทดลองนี้มาจากเซลล์ไฟโบรบลาสของโคและกระทิงทั้งเพศผู้และเพศเมีย การผลิตตัวอ่อนโคและกระทิงทำโดยหลอมรวมเซลล์ต้นแบบเข้ากับไข่โคที่กำจัดสารพันธุกรรมออกแล้ว จากนั้นตัวอ่อนที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่เติม TSA และกลุ่มที่ไม่เติม TSA สำหรับกลุ่มที่เติม TSA ตัวอ่อนจะถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวและเลี้ยงในน้ำยาที่มี 50 nM TSA เป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการย้ายตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่เติม TSA นาน 7 วัน สำหรับกลุ่มที่ไม่เติม TSA จะทำการกระตุ้นแล้วเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่มีการเติม TSA จากผลการทดลองพบว่าอัตราการเชื่อมติดของเซลล์ต้นแบบกับไข่ อัตราการแบ่งตัว อัตราการเจริญสู่ระยะ 8 เซลล์ และมอรูล่าของตัวอ่อนโคและกระทิงไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่เติม TSA และกลุ่มที่ไม่เติม TSA แต่พบว่า TSA สามารถเพิ่มอัตราการเจริญในระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนโค แต่ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงได้ อีกทั้งคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลอง นอกจากนี้ การใช้เซลล์ต้นแบบเพศผู้หรือเพศเมียไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะก่อนการฝังตัว

ในการทดลองนี้ยังได้ทำการศึกษาอัตราการเจริญระยะหลังฝังตัวของตัวอ่อนโคแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แบบหยด ก่อนการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งจะถูกละลายและล้างในสารละลายที่เจือจางเป็นลำดับขั้น จากนั้นตัวอ่อนโค ตัวอ่อนโคแช่แข็ง ตัวอ่อนกระทิง จากกลุ่มที่เติมและไม่เติม TSA จะถูกย้ายฝากให้โคตัวรับโดยวิธีไม่ผ่าตัด จากการทดลองพบว่า TSA ช่วยเพิ่มอัตราการ

ตั้งท้องในวันที่ 45 หลังการย้ายฝากในกลุ่มของตัวอ่อนโค แต่ไม่สามารถเพิ่มอัตราการตั้งท้องในตัวอ่อนกระทิงและตัวอ่อนโคแช่แข็งได้ อีกทั้ง TSA ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของลูกอ่อนจากระยะหลังฝังตัวในวันที่ 45 ไปจนถึงครบกำหนดคลอดของลูกอ่อนในทุกกลุ่มทดลอง การใช้เซลล์ต้นแบบเพศผู้และเพศเมีย ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงระยะหลังฝังตัว นอกจากนี้อัตราการเจริญระยะหลังฝังตัวของตัวอ่อนโคแช่แข็งไม่แตกต่างจากตัวอ่อนโคที่ไม่ได้แช่แข็ง แม้ว่าพบการแท้งของโคตัวรับที่ระยะ 3 เดือนแรก และ/หรือ ระยะ 3 เดือนสุดท้ายของการตั้งท้อง แต่มีโคตัวรับที่สามารถตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดได้ สุดท้ายได้ลูกโคเพศผู้จากกลุ่มที่เติม TSA จำนวน 3 ตัว แต่ลูกโคตายระหว่างคลอด 1 ตัว และได้ลูกโคแฝดเพศผู้จากตัวอ่อนโคแช่แข็งกลุ่มที่เติม TSA นอกจากนี้ยังได้ลูกกระทิงเพศผู้จากกลุ่มที่ไม่เติม TSA จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงมีความผิดปกติภายในปอด มีชีวิตได้เพียง 12 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรมยืนยันได้ว่าลูกโค ลูกอ่อนกระทิงจากการแท้ง ลูกอ่อนกระทิงที่เป็นมัมมี่ และลูกกระทิงที่เกิดขึ้น มีสารพันธุกรรมมาจากเซลล์ต้นแบบ ลูกโคทั้ง 4 ตัว มีการเจริญเติบโตเป็นปกติและยังมีชีวิตอยู่จนถึงปัจจุบัน การทดลองนี้สรุปได้ว่า TSA สามารถเพิ่มอัตราการเจริญในระยะก่อนฝังตัว และอัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนโคย้ายฝากนิวเคลียสในสายพันธุ์เดียวกันได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนกระทิงย้ายฝากนิวเคลียสข้ามสายพันธุ์จากระยะตัวอ่อนไปจนถึงครบกำหนดคลอดได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา กนกวรรณ ศรีรัตนา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

KANOKWAN SRIRATTANA : EFFECTS OF TRICHOSTATIN A ON FULL-TERM DEVELOPMENT OF CLONED BOVINE AND GAUR EMBRYOS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 106 PP.

INTERSPECIES SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER/ TRICHOSTATIN A/GAUR/BOVINE/FULL-TERM DEVELOPMENT

The International Union for Conservation of Nature has classified a gaur (*Bos gaurus*) as an endangered species and listed as vulnerable. Artificial reproduction as somatic cell nuclear transfer (SCNT) in endangered species has been limited due to the lack or shortage of oocytes and recipients. Interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) is an alternative technique for cloning endangered species using an oocyte and a recipient from related domestic species. However, the success rate of live offspring produced by this technique is still low because there was an incomplete reprogramming of donor cells. From previous studies, trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, can improve cloning efficiency in several species. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of TSA on full-term development of bovine SCNT and gaur iSCNT embryos.

Male and female fibroblasts from bovine and gaur were used as the donor cells. The bovine SCNT and gaur iSCNT embryos were produced by the fusion of an individual donor cell with enucleated bovine oocytes. After that, the embryos were divided into two groups: TSA-treated and non TSA-treated. For TSA-treated group, the embryos were chemically activated and cultured in culture medium supplemented

with 50 nM TSA. After 10 h of TSA treatment, embryos were continuously cultured in culture medium without TSA supplementation for 7 days. For non TSA-treated group, the embryos were activated and cultured in culture medium without TSA for 7 days. The results indicated that TSA treatment had no positive effects on the rates of fusion, cleavage, development to 8-cell and morula stages of bovine SCNT and gaur iSCNT embryos. However, TSA could enhance the blastocyst rate of bovine SCNT embryos but not in the gaur iSCNT embryos. Similar qualities of blastocysts were found in all treatment groups. Moreover, there were no differences on pre-implantation development of embryos derived from male or female fibroblasts.

The effect of TSA on post-implantation development of vitrified/thawed bovine SCNT embryos was also examined. The vitrified/thawed embryos were produced by the vitrification of bovine SCNT embryos using microdrop method and thawed by a stepwise dilution method. The bovine SCNT, vitrified/thawed bovine and gaur iSCNT embryos of TSA-treated and non TSA-treated groups were non-surgically transferred into synchronized bovine recipients. The results showed that TSA treatment could increase the pregnancy rate on day 45 after embryo transfer of bovine SCNT embryos. However, no beneficial effects were found in gaur iSCNT or vitrified/thawed bovine SCNT embryos. TSA could not enhance the fetal development after day 45 until term of all embryo types. No differences were found in the post-implantation development of gaur iSCNT embryos derived from male or female fibroblasts. Moreover, vitrified/thawed embryos have similar post-implantation developmental potential as fresh embryos. Although abortions at the first and/or third trimester of gestation were found, some recipients could maintain pregnancy status until term. Finally, three cloned calves from TSA-treated bovine

embryos were delivered. However, one calf of those died during veterinary-assisted delivery. Furthermore, twin cloned calves from vitrified/thawed embryos of TSA-treated group were born. One cloned gaur from male gaur iSCNT embryos in the non TSA-treated group was born. The cloned gaur died 12 h after birth with pulmonary disorder. DNA microsatellite analysis confirmed that all cloned bovine calves and gaur aborted fetus, mummified fetus and newborn were genetically identical to the donor cells. Up to now, the four cloned bovine calves have normal growth and are still alive.

In conclusion, TSA could enhance the pre-implantation development and pregnancy rate in bovine SCNT embryos. But no beneficial effects were found in full-term development of gaur iSCNT embryos.

School of Biotechnology Student's Signature K. Srirattana

Academic Year 2009 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature