กุลนันทน์ บุญเชิด: การพัฒนาเทคโนโลยี gene editing สำหรับ dead end gene ในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) (DEVELOPMENT OF GENE EDITING OF DEAD END GENE IN STRIPED CATFISH (*PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS*))
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร, 90 หน้า

คำสำคัญ: ปลาสวาย/Crispr/Cas9/ยีน Dead end/*Pangasianodon hypophthalmus*/เซลล์สืบพันธุ์

การพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เพื่อผลิตพ่อแม่ปลาอุ้มบุญ เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์พันธุ์ปลา โดยในการเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์นั้น จำเป็นต้องผลิตปลาผู้รับที่ไม่มีเซลล์สืบพันธุ์แรกเริ่ม (Primordial germ cell; PGC) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาเทคนิค CRISPR/Cas9 ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน dead end (*dnd*) ในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalamus*) เพื่อลดจำนวน PGC ในลูกปลาสวายวัยอ่อน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 การโคลนและการ characterization ยีน *dnd* และการศึกษาแสดงออกของยีน *dnd* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลาสวาย และ การทดลองที่ 2 การพัฒนาเทคนิค CRISPR/Cas9 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *dnd*

การทดลองที่ 1 ได้ทำการโคลนและการ characterization ยีน *dnd* และการศึกษาแสดงออกของยีน *dnd* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลาสวาย molecular characterization ของยีน *dnd* และการแสดงออกยีน *dnd* ในเนื้อเยื้อต่างๆ จากการศึกษาได้ทำการโคลนยีนบางส่วนของ cDNA พบว่ายีน *dnd* มี 1,513 bp ประกอบด้วย ORF ที่ 1,137 bp encode ได้กรดอะมิโน 399 residues และในส่วนของ 3’-UTR มี 371 bp ประกอบไปด้วย consensus motifs ซึ่งมีความสอดคล้องกันในปลาหลาย ๆ species ประกอบไปด้วย RNA recognition motif (RRM), N-terminal regions (NR), และ C-terminal regions (CR1-4) สำหรับการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) ที่เกี่ยวกับโปรตีน Dnd นั้นพบว่าโปรตีน Dnd ในปลาสวายจัดอยู่ในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง ผลการวิเคราะห์ RT-PCR พบการแสดงออกของ *dnd* mRNA เฉพาะที่รังไข่และอัณฑะเท่านั้น และพบการวิเคราะห์ Quantitative RT-PCR พบว่ายีน *dnd* มีการการแสดงออกสูงในรังไข่และอัณฑะเช่นกัน

ในการทดลองที่ 2 การพัฒนาเทคนิคการยับยั้งยีน *dnd* โดยใช้ CRISPR/Cas9 เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสม จึงได้ออกแบบ sgRNA 3 ตำแหน่ง บริเวณ 5’ UTR ร่วมกับการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ sgRNA (100 และ 200 ng/µl) และ Cas9 (100, 250 และ 500 ng/µl) จากการทดลองได้ทำการฉีด sgRNA+Cas9 ใน fertilized egg ของปลาสวาย จากการทดลองไม่พบความแตกต่างของอัตราการฟัก อัตราการรอด และไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโต sgRNA/Cas9 สามารถทำ

ให้เกิด indel mutation ดังนี้ deletion (1-16 nt), insertion (1-13 nt) and substitution (1-13 nt) การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาในระยะ 60 วันหลังจากฟักพบว่า ในทุกกลุ่มการทดลองของการฉีด sgRNA/Cas9 สามารถเหนี่ยวนำให้จำนวนเซลล์ PCG ลดลง นอกจากนั้นยังพบว่าความเข้มข้นที่ 200 ng/µl ของ sgRNA3 และความเข้มข้นที่ 500 ng/µl ของ Cas9 สามารถลดจำนวนเซลล์ PCG ได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย situ hybridization โดยใช้ probe antisense *dnd* และ *vasa* อีกด้วย ในทุกกลุ่มการทดลองของการฉีด sgRNA/Cas9 เกิดการลดการแสดงออกของยีน *dnd, cxcr4b, dazl, nanos1*, *nanos2* และ *vasa* นอกจากนั้นยังพบการลดลงของการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลาที่ฉีด sgRNA3 200 ng/µl และ Cas9 500 ng/µl ($P$<0.05). การวิเคราะห์ค่า GSI ในปลาอายุ 1 ปี พบว่า GSI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลาที่ฉีดด้วย sgRNA และ Cas9 ที่ความเข้มข้น 500 ng/µl นอกจากนี้ได้มีการศึกษาสัณฐานวิทยาของรังไข่ และอัณฑะ ในปลาอายุ 1 ปี พบว่ารังไข่มีจำนวน previtellogenic oocyte น้อยมาก และในอัณฑะพบ spermatogonia จำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน จึงสรุปได้ว่า CRISPR/Cas 9 ที่ออกแบบยับยั้งบริเวณ 5'-UTR สามารถลดการแสดงออกของยีน *dnd* และสามารถลดจำนวนเซลล์ PGC ได้ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ตำแหน่ง sgRNA ที่ใกล้ start codon มากที่สุดจะมีประสิทธิภาพมากที่สุดเช่นกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา กุลนันทน์ บุญเชิด

ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

KUNLANAN BOONCHERD : DEVELOPMENT OF GENE EDITING OF DEAD END GENE IN STRIPED CATFISH (*PANGASIANODON HYPOPHTHALMUS*)
THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 90 PP.

Keyword: Striped catfish/Crispr/Cas9/Dead end gene/ *Pangasianodon hypophthalmus*/Germ cell

To establish surrogate broodstock technology in fish, germ cell transplantation has been developed for its application in aquaculture industries and fish conservation approaches. To increase the efficiency of germ cell transplantation, production of primordial germ cell-less (PGC) fish for use as recipient larvae is required. This study therefore aimed to produce germ cell-less fish larvae using the CRISPR/Cas9 mediated dead end (*dnd*) knockout technique in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalamus*). There were two experiments including 1) cloning and characterization of *dnd* and its expression in various tissues and 2) development of CRISPR/Cas9 mediated *dnd* knockout techniques.

In the Experiment 1, molecular characterization of *dnd* and its expression in various tissues was investigated. The partial cDNA of *dnd* contained 1,137 bp of open reading frame encoding 399 amino acid residues and 371 bp of partial 3'-UTR. Characterization of *dnd* found that *dnd* contains all the predicted consensus motifs that are shared among *dnd* in other fish species, including the RNA recognition motif (RRM), N-terminal regions (NR), and four C-terminal regions (CR1-4). Phylogenetic analysis demonstrated that Dnd clustered within the teleost Dnd. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) indicated that *dnd* mRNA occurred only in the testes and ovaries. Quantitative RT-PCR showed that *dnd* was highly expressed in the ovaries and testes.

In Experiment 2, to optimize CRISPR/Cas9 induced *dnd* knockout, three sgRNAs including sgRNA1, sgRNA2 and sgRNA3 were designed to target exon encoding 5'-UTR. The combination of two concentration of each sgRNA (100 or 200 ng/µl) and three concentrations of Cas9 (100, 250 or 500 ng/µl) were microinjected into fertilized eggs

of striped catfish. Our results showed that there were no significant differences in the hatching rate of fertilized eggs and survival rates of embryos as well as growth of fish among various concentration of each sgRNA and Cas9 protein ($P$>0.05). These sgRNAs/Cas9 were able to generate indel mutation including deletion (1-16 nt), insertion (1-13 nt) and substitution (1-13 nt). Using histological study, all sgRNA/Cas9 led to a decreased number of PGC in gonad obtained from 60-dph fry, and fry injected with sgRNA3 targeting 5'UTR near to start codon at 200 ng/µL and Cas9 at 500 ng/µL showed the lowest PGC number. The reduction of PGC number was confirmed by in situ hybridization using antisense *dnd* and *vasa* probe. All combinations of sgRNA/Cas9 reduced expression of germ cell marker genes including *dnd, cxcr4b, dazl, nanos1*, *nanos2* and *vasa*, and significant lowest expression levels were observed in gonad obtained from fish injected with sgRNA3 at 200 ng/µL and Cas9 at 500 ng/µL ($P$<0.05). In addition, at 1 year of age, significant lower GSI was observed in fish injected with all sgRNAs at various concentration and Cas9 at 500 ng/µL ($P$<0.05). Moreover, compared to control fish without sgRNA/Cas9 injection, different morphological appearances in ovary and testis were observed in sgRNA/Cas9 injected fish, i.e., few previtellogenic oocyte in ovary and spermatogonial cell-less testes. Taken together, CRISPR/Cas 9 targeting *dnd1* knockout at 5'-UTR was achieved which resulted in down-regulation of *dnd1* and lowered PGC, and the sgRNA targeted exon nearest start codon showed the highest knockout activity.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Technology and Innovation Student's Signature Kunlanan Booncherd

Academic Year 2022 Advisor's Signature