บทคัดย่อ

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการโคลนนิ่งสามารถผลิตสัตว์เกิดมาได้หลายชนิด แต่ยังได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี และอัตราลูกสัตว์เกิดมาในอัตราต่ำ ซึ่งมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง ปัจจัยหลักของเทคโนโลยีการโคลนนิ่งคือการ reprogram ที่ผิดปกติในตัวอ่อนโคลนนิ่ง สำหรับการโคลนนิ่งกระทิงจำเป็นต้องทำโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เนื่องจากขาดแหล่งของไซโตพลาสซึมตัวรับและสัตว์ตัวรับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลสำเร็จการโคลนนิ่งข้สมสปีชีส์ในกระทิงยังต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสนใจในการปรับปรุงการ reprogram ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ด้วยการทดสอบการใช้สารเคมี 4 ตัว ได้แก่ sodium butyric acid (NaBu) suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA) Scriptaid และ 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC) เพื่อช่วยปรับปรุงการ reprogram ให้ดีขึ้น จากผลการทดลองพบว่า NaBu ที่ความเข้มข้น 0.5 mM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง SAHA ที่ความเข้มข้น 1 μM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง Scriptaid ที่ความเข้มข้น 0.5 μM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 5-aza-dC ที่ความเข้มข้น 0.1 μM บ่มกับตัวอ่อนหลังเชื่อมเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถช่วยเพิ่มการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสต์ของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ ผลการศึกษาการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีนที่ตำแหน่ง H4K5 พบว่ากลุ่มที่เติมด้วย NaBu, SAHA และ Scriptaid สามารถเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติม แต่กลุ่มที่เติม 5-aza-dC ไม่เพิ่มขึ้น การศึกษาการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5, Hat1 และ Hdac1* ในตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ระยะ 8 เซลล์ และบลาสโตซีสต์ พบว่าการเติมสารเคมีทั้ง 4 ตัวสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Oct4, Cdx2, Gcn5 และ Hat1* ในตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์และ 8 เซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่เพิ่มในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ นอกจากนี้สารเคมีทั้ง 4 ตัวสามารถลดการแสดงออกของยีน *Hdac1* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาอัตราการตั้งท้องของตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการเติมสารทั้ง 4 ตัวพบว่า มีตัวรับตั้งท้องในทุกกลุ่มทดลอง แต่มีการแท้งทั้งหมดจึงไม่มีลูกกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เกิดมา จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า NaBu, SAHA, Scriptaid และ 5-aza-dC สามารถเพิ่มอัตราการเจริญชองตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์ถึงระยะบลาสโตซีสต์ ส่วนการเพิ่มการเติมหมู่อะเซทิลบนฮีสโตนโปรตีนที่ตำแหน่ง H4K5 นั้น NaBu, SAHA และ Scriptaid สามารถทำให้เพิ่มขึ้น ยกเว้น 5-aza-dC ที่ไม่ช่วยทำให้เพิ่ม

Abstract

In present, offspring of several species had been produced from cloning technology. However, the quality of cloned embryos and birth rate still low which have many factors involved. The main factor is the abnormal reprogramming of cloned embryos. In case of gaur cloning, it needs to do interspecies cloning due to lack of recipient cytoplasm and recipients. Especially, the success rate of interspecies cloning in gaur is very low when compared with another species. Thus, in this study we interested to improve reprogramming of gaur interspecies cloned embryos by using 4 chemicals treatment including sodium butyric acid (NaBu), suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA), Scriptaid and 5-aza-2-deoxycytidine (5-aza-dC). The results showed that treated with 0.5 mM NaBu for 12 h after fusing, 1 µM SAHA for 12 h after fusing, 0.5 µM Scriptaid for 12 h after fusing and 0.1 µM 5-aza-dC for 12 h after fusing significantly improved development of interspecies cloned gaur embryos to blastocyst stage when compared with another group. Treatment of NaBu, SAHA and Scriptaid significantly increased histone acetylation protein at H4K5 when compared with untreated group, but in 5-aza-dC group did not increase. Treatment of all 4 chemicals significantly increased the expression of *Oct4, Cdx2, Gcn5* และ *Hat1* genes in 1 cell and 8 cell stage embryos but did not affect in blastocysts and significantly decreased the expression of *Hdac1* gene. The results of embryo transfer showed that recipients in all groups were pregnant, however, all pregnant recipients aborted. In conclusion, NaBu, SAHA, Scriptaid and 5-aza-dC could increase development of interspecies cloned gaur embryos to blastocyst stage. NaBu, SAHA and Scriptaid could increase histone acetylation at H4K5. We could not get interspecies cloned gaur calf born from this experiment.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี