

SỰ BIỂU HIỆN GENE ĐA TIỀM NĂNG Ở MỨC PHIÊN MÃ TRONG TẾ BÀO GỐC PHÔI BÒ

Lê Thành Long^{1*}, Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Đoàn Chính Chung²,
Đỗ Minh Sĩ², Lê Hữu Trình³, Hoàng Nghĩa Sơn¹

¹Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *lelong2510@gmail.com

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, tp. Hồ Chí Minh

³Đại học Y Dược, tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và nuôi cấy tế bào gốc từ phôi bò giai đoạn phôi nang. Tế bào gốc phôi bò được nuôi cấy trên lớp tế bào nuôi dưỡng là nguyên bào sợi phôi chuột bị bất hoạt bởi mitomycin C. Phương pháp real-time qRT-PCR được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện của các gene đa tiềm năng của tế bào gốc phôi bò. Các quần thể tế bào gốc phôi bò dương tính với alkaline phosphatase, tuy nhiên, sự biểu hiện của alkaline phosphatase giảm trong lần cấy chuyển thứ ba. Kết quả phân tích định lượng bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ cho thấy, sự biểu hiện của gene oct4 ở lần thứ ba cấy chuyển cao hơn lần thứ nhất và lần thứ hai. Sự biểu hiện của gene nanog và sox-2 giảm trong quá trình cấy chuyển tế bào gốc phôi bò, trong đó sự biểu hiện của sox-2 giảm mạnh ở lần cấy chuyển thứ ba, thấp hơn 10 lần so với lần cấy chuyển thứ nhất. Sự biểu hiện của gene c-myc tăng ở lần cấy chuyển thứ ba. Những thay đổi trong sự biểu hiện các gene trên tương ứng với những thay đổi về mặt hình thái trong quá trình cấy chuyển. Quần thể tế bào gốc phôi biểu hiện những đặc điểm của sự biệt hóa khi các gene nanog và sox-2 giảm sự biểu hiện và gene oct4 và c-myc tăng sự biểu hiện hơn mức bình thường.

Từ khóa: Biểu hiện gene, gene đa tiềm năng, phôi bất hoạt, tế bào gốc phôi bò.

MỞ ĐẦU

Các dòng tế bào gốc phôi đã được phân lập thành công từ phôi nang của chuột, khỉ và người, ngoài ra, việc thu nhận còn có thể được thực hiện từ phôi ở giai đoạn trước khi liên kết chặt với nhau (compact) [5, 12]. Hầu hết những cố gắng phân lập và nuôi cấy tế bào gốc phôi bò được thực hiện ở phôi nang giai đoạn ngày 7-9 hoặc có thể phân lập từ phôi giai đoạn ngày thứ 12-14 [7]. Hình thái là một trong hai đặc điểm tiêu chuẩn được sử dụng đầu tiên để nhận diện tế bào gốc phôi bò trong nuôi cấy. Các đặc điểm khác như kích thước nhỏ, hình dạng tròn đều hay tỷ lệ nhân so với tế bào chất cao được sử dụng để xác định các dòng tế bào gốc phôi. Các tế bào này phụ thuộc vào dưỡng bào và lớp nội mô, chúng luôn được tìm thấy trong phôi nang hay ICM được phân lập trong nuôi cấy sơ cấp. Tuy nhiên, việc nuôi cấy tế bào gốc phôi có thể bị thất bại nếu chỉ dựa trên các đặc điểm hình thái [14]. Việc sử dụng kết hợp các tiêu chuẩn hình thái và phân tích các chỉ thị (marker) biểu hiện sẽ giúp cho việc nhận diện các quần thể tế bào gốc phôi bò hay sự hiện diện của dưỡng bào

hay tế bào lớp nội bì trong quá trình nuôi cấy tế bào gốc phôi chính xác hơn. Một chiến lược hữu ích cho việc mô tả các dòng tế bào gốc phôi là việc phân tích sự biểu hiện các marker phân tử liên quan tới tính đa tiềm năng. Tuy nhiên, tới nay vẫn chưa tìm được marker nào đặc hiệu cho tế bào gốc phôi bò. Ở bò, sự dương tính với các marker SSEA-1, SSEA-3 và SSEA-4 đã được mô tả trong các dòng tế bào gốc phôi bò được thu nhận từ phôi bò trước khi compact [5]. Tương tự, sự biểu hiện của SSEA-1 đã được xác định bởi Saito et al. (2003) [10], trong khi không có tế bào giống tế bào gốc phôi nào được phân tích bởi các tác giả này dương tính với SSEA-3 hay SSEA-4. Tuy nhiên, sự biểu hiện của các gene đa tiềm năng như oct4, nanog, sox-2 trong tế bào gốc phôi bò vẫn chưa được hiểu rõ. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá sự biểu hiện của các gene đa tiềm năng trong tế bào gốc phôi bò qua các lần cấy chuyển khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tạo phôi in vitro

Trứng bò được thu nhận từ lò mổ, sau đó được chuyển về phòng thí nghiệm. Phức hợp trứng-cumulus (Cumulus-Oocyte complex) được thu nhận bằng phương pháp chọc hút và được nuôi trong môi trường TCM199 (Sigma) bổ sung 20% FBS (Gibco), 1% Pen/Strep (Gibco), 2 µg/ml β-estradiol (Sigma), 10IU FSH (Sigma) và 10IU LH (Sigma) ở 38,5°C 5% CO₂ trong vòng 22-24 giờ. Trứng chín được thụ tinh với tinh trùng trong vi giọt thụ tinh với mật độ 1x10⁶ tinh trùng/ml. Trứng được thụ tinh sẽ được loại bỏ tinh trùng và được nuôi cấy trong môi trường nuôi phôi Sofa ở 38,5°C; 5% CO₂ [9].

Nuôi cấy tế bào gốc

Phôi bò giai đoạn phôi nang được xử lý loại bỏ màng zona bằng pronase (5 mg/ml) (Sigma). Phôi đã loại bỏ màng zona được chuyển lên đĩa chứa tế bào nuôi dưỡng bị bất hoạt bởi mitomycin C (10 µg/ml) (Sigma). Phôi nguyên sẽ được nuôi cấy trong môi trường tế bào gốc phôi Knock-out DMEM (Gibco) chứa 20% Knock-out Serum Replacement (Gibco), 1% pen/strep (Gibco), 200 µM mercaptoethanol (Sigma), 1% L-glutamine (Gibco), 1.000 IU/ml lif, 1% non-essential amino acid (Gibco), 1% nucleoside (0,73 g/L cytidine; 0,85 g/L guanosine; 0,73 g/L uridine; 0,8 g/L adenosine; 0,24 g/L thymidine) [15].

Nhuộm alkaline phosphatase

Tế bào được rửa 2 lần bằng PBS/BSA 1%.

Sau đó, tế bào được cố định trong paraformaldehyde 4% 30 phút. Tế bào được rửa bằng nước cất 2 lần và được ủ với fast red TR salt và naphthol AS-MX phosphate ở pH 8,4 trong vòng 30 phút. Tế bào được rửa sạch bằng nước cất 2 lần và được nhuộm với hematoxylin eosin trong 30 phút. Sau đó, tế bào được rửa bằng nước cất 2 lần và được quan sát dưới kính hiển vi để đánh giá sự biểu hiện của alkaline phosphatase [15].

Đánh giá sự biểu hiện gene mức độ phiên mã

RNA tổng được thu nhận bằng RNeasy Mini Kit (Qiagen). Nồng độ RNA được xác định bằng máy đo quang phổ Biophotometer (Eppendorf). Sự biểu hiện gene được định lượng bằng phương pháp Real-time qRT-PCR với kit PCR BIO 1-Step RT-PCR Kit (PCR Biosystems). Trình tự mỗi được mô tả trong bảng 1 [13]. Chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện như sau: 45°C trong 10 phút, 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ gồm: 95°C trong 10 giây, 58°C trong 15 giây, 62°C trong 15 giây. Quá trình phân tích đường cong tan chảy được tiến hành từ 60°C đến 95°C với mỗi bước đọc là 0,5°C trong vòng 30 giây. Phương pháp định lượng tương đối sự biểu hiện của gene được tiến hành theo phương pháp 2^{-ΔΔCt} [4]. Sự biểu hiện của gene mục tiêu trong mỗi nhóm thí nghiệm được xác định bằng việc chuẩn hóa giá trị Ct của gene mục tiêu với gene tham khảo (β-actin) và nhóm đối chứng [13].

Bảng 1. Trình tự các môi cho phản ứng Real-time qRT-PCR

Gene	Sequences (5'–3')	Product size (bp)
Oct4	F: GTTCTCTTTGGAAAGGTGTTTC R: AACTCGGACCACGTCTTTC	313
Nanog	F: GTGTTTGGTGAACCTCCTG R: GGGAATTGAAATACTTGACAG	307
c-myc	F: CGCGGTCGCCTCCTTCTCGCCCAGG R: GTCCGGGGAAGCGCAGGGC	418
Sox-2	F: CATCCACAGCAAATGACAGC R: TTTCTGCAAAGCTCCTACCG	251
β-actin	F: GGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC R: AAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	220

F, R: môi xuôi và môi ngược.

Phương pháp thống kê

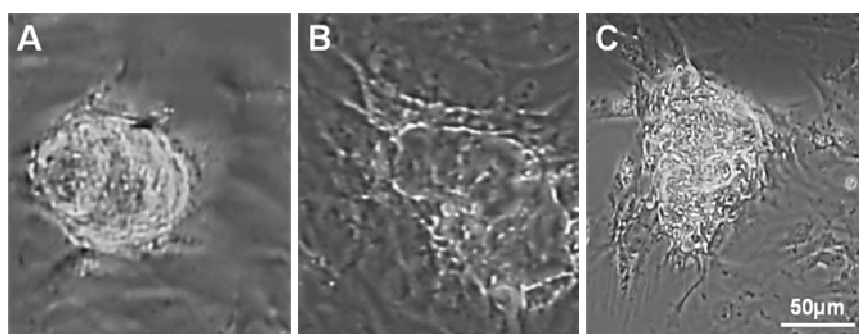
Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm thống

kê SigmaPlot 11.0, giá trị $P \leq 0,05$ được đánh giá là có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tế bào gốc phôi bò được nuôi cấy trên lớp tế bào nuôi dưỡng và phát triển trong môi trường chứa 10^3 IU/ml LIF. Sau 48 giờ nuôi cấy, các quần thể tế bào gốc phôi bò hình thành và phát triển trên lớp tế bào feeder. Hình thái các quần thể tế bào gốc phôi bò ở lần cấy chuyển thứ nhất trơn nhẵn, các quần thể trên đều có đường bao quanh rất rõ. Đó là một đặc

điểm này vẫn được duy trì ở các quần thể tế bào gốc phôi bò trong lần cấy chuyển thứ hai (hình 1). Tuy nhiên, đến lần cấy chuyển thứ ba, hình thái của các quần thể tế bào gốc phôi bò bị thay đổi, tuy đường bao quanh quần thể vẫn còn nhưng hình dạng quần thể tế bào gốc không đều và quần thể tế bào dẹp xuống. Đây là những đặc điểm của quá trình biệt hóa, quá trình này đang diễn ra ở quần thể tế bào gốc phôi bò trong lần cấy chuyển thứ ba.

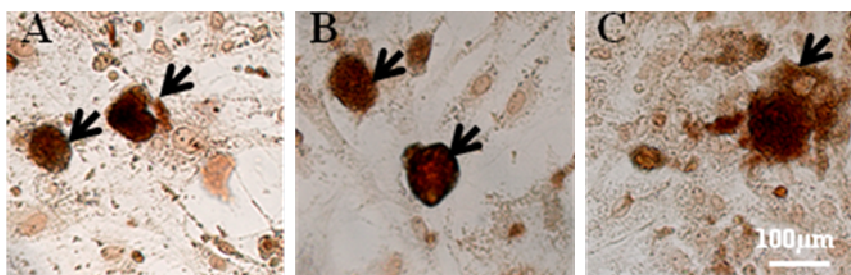


Hình 1. Quần thể tế bào gốc phôi bò nuôi cấy trên lớp tế bào nuôi dưỡng

A: quần thể tế bào gốc cấy chuyển lần thứ nhất; B: quần thể tế bào gốc cấy chuyển lần thứ hai; C: quần thể tế bào gốc cấy chuyển lần thứ ba.

Alkaline phosphatase là một marker đặc trưng cho tế bào gốc phôi chuột và tế bào gốc phôi người. Trong nhiều nghiên cứu trước đây, sự biểu hiện của alkaline phosphatase cũng được nhận thấy ở tế bào gốc phôi bò [2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng nhận thấy sự biểu hiện alkaline phosphatase ở tế bào gốc phôi bò qua các lần cấy chuyển khác nhau. Đây là

một marker đơn giản nhất để xác định tính đa tiềm năng của tế bào gốc phôi. Tế bào gốc phôi ở lần cấy chuyển thứ nhất và thứ hai biểu hiện alkaline phosphatase mạnh. Sự biểu hiện của alkaline phosphatase của tế bào gốc phôi ở lần cấy chuyển thứ ba giảm so với lần thứ nhất và thứ hai (hình 2).



Hình 2. Quần thể tế bào gốc phôi bò dương tính với alkaline phosphatase (mũi tên đen)

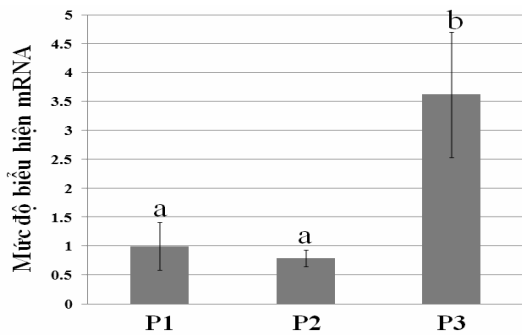
A: quần thể tế bào gốc cấy chuyển lần thứ nhất; B: quần thể tế bào gốc cấy chuyển lần thứ hai; C: quần thể tế bào gốc cấy chuyển lần thứ ba.

Kết quả real-time pcr cho thấy, sự biểu hiện của oct4 trong tế bào gốc phôi bò ở lần cấy

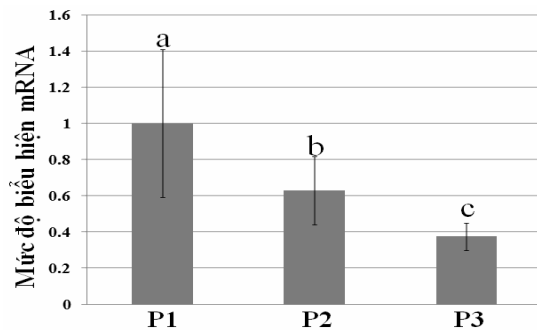
chuyển thứ nhất và lần cấy chuyển thứ hai không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P \leq 0,05$). Trong

khi đó, sự biểu hiện của oct4 ở lần cấy chuyển thứ ba cao gấp 3,5 lần ($P \leq 0,05$) so với lần cấy chuyển thứ nhất (hình 3). Hình 4 mô tả sự biểu hiện của gene nanog trong tế bào gốc phôi bò ở các lần cấy chuyển khác nhau. Sự biểu hiện của nanog ở mức độ phiên mã giảm dần từ lần cấy chuyển thứ nhất đến lần cấy chuyển thứ ba ($P \leq 0,05$). Sự biểu hiện của nanog ở lần cấy chuyển thứ ba giảm hơn một nửa so với lần cấy chuyển thứ nhất ($P \leq 0,05$). Hình 5 mô tả mức độ biểu hiện của gene c-myc trong tế bào gốc phôi bò ở các lần cấy chuyển khác nhau. Sự biểu hiện ở mức phiên mã của gene c-myc trong lần cấy chuyển thứ nhất và thứ hai không có sự khác biệt

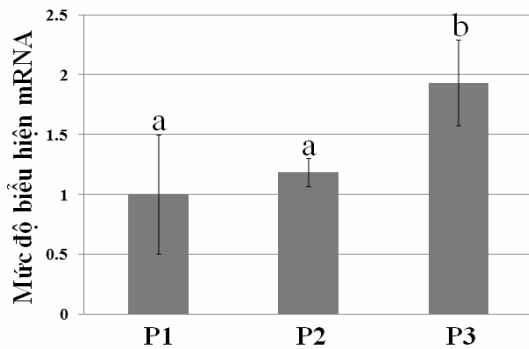
về mặt thống kê ($P \leq 0,05$). Trong khi đó, sự biểu hiện của gene c-myc trong tế bào gốc phôi bò ở lần cấy chuyển thứ ba cao hơn gần gấp hai lần với lần cấy chuyển thứ nhất ($P \leq 0,05$). Kết quả này cho thấy có một mối quan hệ song song trong sự biểu hiện của gene c-myc và gene oct4 ở tế bào gốc phôi bò. Trong quá trình cấy chuyển từ lần thứ nhất đến lần thứ ba, sự biểu hiện của gene sox-2 ở mức độ phiên mã có xu hướng giảm trong tế bào gốc phôi bò (hình 6). Sự biểu hiện của gene sox-2 ở lần cấy chuyển thứ 3 chỉ bằng 1/10 so với lần cấy chuyển thứ nhất. Điều đó chứng tỏ sự biểu hiện của sox-2 giảm rất mạnh qua ba lần cấy chuyển liên tiếp trên.



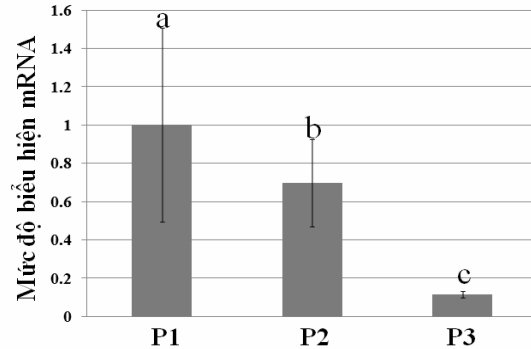
Hình 3. Sự biểu hiện mức độ phiên mã của gene oct4 ở các lần cấy chuyển khác nhau. P1, P2, P3: cấy chuyển lần thứ nhất, thứ hai, thứ ba. a, b: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).



Hình 4. Sự biểu hiện mức độ phiên mã của gene nanog ở các lần cấy chuyển khác nhau. P1, P2, P3: cấy chuyển lần thứ nhất, thứ hai, thứ ba. a, b, c: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).



Hình 5. Sự biểu hiện mức độ phiên mã của gene c-myc ở các lần cấy chuyển khác nhau. P1, P2, P3: cấy chuyển lần thứ nhất, thứ hai, thứ ba. a, b: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).



Hình 6. Sự biểu hiện mức độ phiên mã của gene sox-2 ở các lần cấy chuyển khác nhau. P1, P2, P3: cấy chuyển lần thứ nhất, thứ hai, thứ ba. a, b, c: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$).

Việc thu nhận và duy trì các dòng tế bào gốc phôi từ phôi bò giai đoạn phôi nang là một trong những thách thức và khó khăn nhất trong tất cả

các loài động vật có vú và sự biểu hiện của các gene đa tiềm năng trong tế bào gốc phôi bò còn chưa rõ [3]. Sự biểu hiện cao của các gene đa

tiềm năng như oct4, nanog, sox-2 liên quan đến tính đa tiềm năng và khả năng tự làm mới của tế bào gốc phôi, trong khi đó, mức độ biểu hiện thấp của các gene trên thường gây ra sự biệt hóa [1, 6]. Đây có thể là nguyên nhân của việc tế bào gốc phôi bò khó có khả năng tiếp tục tăng sinh và tự làm mới qua nhiều lần cấy chuyển liên tục. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy, sự biểu hiện của gene nanog và gene sox-2 ở mức phiên mã giảm mạnh qua các lần cấy chuyển khác nhau. Quá trình giảm này tương ứng với sự thay đổi hình thái của các quần thể tế bào gốc phôi bò khi được cấy chuyển. Sự giảm biểu hiện của nanog và sox-2 là nguyên nhân dẫn tới sự biệt hóa của tế bào gốc phôi bò.

Gene c-myc là một nhân tố phiên mã liên quan tới nhiều chức năng của tế bào, bao gồm quá trình điều hòa chu kỳ tế bào, tăng sinh, phát triển, biệt hóa và quá trình biến dưỡng của tế bào [11]. Nhân tố này có khuynh hướng biểu hiện mạnh trong các tế bào tăng sinh nhanh và biểu hiện thấp hay không biểu hiện trong pha nghỉ. Gene c-myc còn biểu hiện chức năng trong quá trình tự làm mới và biệt hóa của các tế bào tiền thân và tế bào gốc, cụ thể là sự tương tác giữa các tế bào gốc và các vi môi trường xung quanh nó. Sự biểu hiện tăng gấp gấp hai lần của gene c-myc trong lần cấy chuyển thứ ba so với lần cấy chuyển thứ nhất của tế bào gốc phôi bò cho thấy quá trình phân chia của tế bào gốc phôi bò đang diễn ra mạnh hơn. Hiện nay, việc nghiên cứu sự biểu hiện của gene c-myc trong tế bào gốc phôi bò còn chưa được biết rõ. Trong nghiên cứu tái chương trình hóa nguyên bào sợi bò thành tế bào gốc cảm ứng đa tiềm năng, Summer et al. (2011) [13] đã cho thấy, sự biểu hiện của c-myc trong nguyên bào sợi cao hơn trong tế bào gốc cảm ứng đa tiềm năng. Điều này chứng minh sự biểu hiện gene c-myc trong lần cấy chuyển thứ ba của tế bào gốc phôi bò có thể cảm ứng sự biệt hóa.

Trong quá trình biệt hóa của tế bào gốc phôi, sự biểu hiện của gene oct4 thường giảm đi. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chúng tôi lại thấy sự biểu hiện của gene oct4 tăng mạnh so với lần cấy chuyển thứ nhất và thứ hai. Trạng thái tế bào phụ thuộc vào các yếu tố phiên mã, các yếu tố này hoạt hóa hoặc ức chế sự biểu hiện gene theo những chương trình khác nhau.

Protein oct4 là một yếu tố phiên mã thiết yếu cho việc duy trì tính đa tiềm năng của tế bào gốc phôi. Mức độ biểu hiện của oct4 quyết định đến các trạng thái khác nhau của tế bào gốc phôi. Tế bào gốc phôi chỉ duy trì được trạng thái đa tiềm năng nếu sự biểu hiện của oct4 duy trì trong khoảng $\pm 50\%$ sự biểu hiện đa bội bình thường của tế bào gốc phôi. Nếu sự biểu hiện của oct4 cao hơn hoặc thấp hơn khoảng biểu hiện trên, tế bào gốc phôi sẽ biệt hóa [8]. Như vậy, sự tăng biểu hiện của gene oct4 của tế bào gốc phôi bò ở lần cấy chuyển thứ ba làm không duy trì tính đa tiềm năng mà cảm ứng sự biểu hiện của quá trình biệt hóa.

Lời cảm ơn: Chúng tôi chân thành cảm ơn Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Avilion A. A., Nicolis S. K., Pevny L. H., Perez L., Vivian N., Lovell-Badge R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function, *Genes Dev.*, 17: 126-140.
2. Cao S., Wang F., Chen Z., Liu Z., Mei C., Wu H., Huang J., Li C., Zhou L., Liu L., 2009. Isolation and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method, *Journal of Experimental Zoology*, 311(A): 368-376.
3. Gong G. C., Roach M. L., Jiang L., Yang X., Tian X. C., 2010. Culture conditions and enzymatic passaging of bovine ESC-like cells, *Cell Reprogram*, 12: 151-160.
4. Livak K. J., Schmittgen T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, *Methods* 25: 402-408.
5. Mitalipova M., Beyhan Z., First N. L., 2001. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos, *Cloning*, 3: 59-67.
6. Miyanari Y., Torres Padilla M. E., 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog, *Nature*, 483: 470-473.
7. Munoz M., Rodriguez A., De Frutos C.,

- Caamano J. N., Diez C., Facal N., Gomez E., 2008. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic derived cell-lines, *Theriogenology*, 69: 1159-1164.
8. Niwa H., Miyazaki J., Smith A. G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells, *Nature Genetics*, 24: 372-376.
9. Pease S., Lois C., 2000. Mammalian and Avian Transgenesis New Approaches, Chapter 8, Springer: 173-177
10. Saito S., Sawai K., Ugai H., Moriyasu S., Minamihashi A., Yamamoto Y., Hirayama H., Kageyama S., Pan J., Murata T., Kobayashi Y., Obata Y., Yokoyama K. K., 2003. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309: 104-113.
11. Schmidt E. V., 1999. The role of c-myc in cellular growth control, *Oncogene*, 18: 2988-2996.
12. Strelchenko N., 1996. Bovine pluripotent stem cells, *Theriogenology*, 45: 131-140.
13. Sumer H., Liu J., Malaver-Ortega L. F., Lim M. L., Khodadadi K., Verma P. J., 2011. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts, *J. Anim. Sci.*, 89: 2708-2716.
14. Talbot N. C., Caperna T. J., Edwards J. L., Garrett W., Wells K. D., Ealy A. D., 2000. Bovine blastocyst-derived trophoblast and endoderm cell cultures: interferon tau and transferring expression as respective in vitro markers, *Biol. Reprod.*, 62: 235-247.
15. Wang L., Duan E., Sung L., Jeong B., Yang X., Tian X., 2005. Generation and Characterization of Pluripotent Stem Cells from Cloned Bovine Embryos, *Biology Of Reproduction*, 73: 149-155.

THE TRANSCRIPT EXPRESSION OF PLURIPOTENT GENES IN BOVINE EMBRYONIC STEM LIKE CELLS

Le Thanh Long¹, Nguyen Thi Phuong Thao¹, Doan Chinh Chung²,
Do Minh Si², Le Huu Trinh³, Hoang Nghia Son¹

¹Institute of Tropical Biology, VAST

²University of Science, Ho Chi Minh city

³University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh city

SUMMARY

In this study, the bovine embryonic stem like cells were isolated and cultured from blastocyst stage embryos. The bovine embryonic stem like cells were cultured on the feeder cells which were 10 µg/ml mitomycin C-inactivated mouse embryonic fibroblasts. The real time qRT-PCR was applied to estimate the pluripotent gene expression of bovine embryonic stem like cells. The bovine embryonic stem like cell colonies were positive to alkaline phosphatase. However, the alkaline phosphatase expression of bovine embryonic stem like cells was down regulated in third passage. The result of relative quantification of pluripotent gene transcripts showed that the oct4 transcripts expression in third passage was higher than that in the first and the second passages. The nanog and sox-2 transcript expression in bovine embryonic stem like cells were down regulated during passages, especially, the sox-2 transcript expression in the third passage was dramatically down regulated than in the first passage (10 times lower). The c-myc transcript expression of

bovine embryonic stem like cells in the third passage was higher than in the first and the second passages. The transcript expression modification of pluripotent genes including oct4, nanog and sox-2 were related to the morphological changes of bovine embryonic stem like cells including flat and irregular sharp which were characteristics of differentiation of embryonic stem like cell colonies.

Keywords: Bovine embryonic stem like cells, c-myc, nanog, oct4, sox-2.

Ngày nhận bài: 11-10-2014