สารบัญเรื่อง

บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2
ระเบียบวิธีดำเนินงานวิจัย	3
ผลการวิจัย	11
อภิปรายและวิจารณ์ผล	20
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	26
บรรณานุกรม	27

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 อิทธิพลของ SCF และ E-cadherin ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด 17
ตารางที่ 2 ลำดับเบสของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียเปรียบเทียบ 19

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 **ตัวอ่อนของไก่และการเก็บเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด** 12

ภาพที่ 2 **เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในกระแสเลือด**ของตัวอ่อน 13

ภาพที่ 3 เซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา 14

ภาพที่ 4 เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด 15

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบชนิดโปรตีนที่มีการแสดงออกต่างกันระหว่างชนิดเซลล์พี่เลี้ยง 16

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบชนิดโปรตีนที่มีการแสดงออกร่วมกันระหว่างชนิดเซลล์พี่เลี้ยง 16

ภาพที่ 7 **อิทธิพลของ** SCF **และ** E-cadherin **ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด** **18**

ภาพที่ 8 Somatic chimera 20

บทนำ

การเพาะเลี้ยงและเก็บแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดรวมถึงการสร้างลูกผสมไคเมอร่าจากการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดให้กับตัวรับที่เป็นสปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์ ถือเป็นเทคโนโลยีสำคัญที่สามารถเก็บ รักษาจีโนมของสัตว์ปีกไว้ได้สมบูรณ์และสามารถนำกลับมาผลิตเป็นตัวสัตว์ขึ้นใหม่ได้ เนื่องจากการแช่แข็ง เซลล์ไข่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ การเก็บแช่แข็งเสปิร์มเพียงอย่างเดียวจึงสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมได้เพียง ครึ่งหนึ่งของจีโนมเท่านั้น ส่วนการเก็บแช่แข็งเซลล์เนื้อเยื่อแม้จะเก็บรักษาจีโนมได้ทั้งหมดเช่นกัน หากแต่การ ผลิตตัวสัตว์ขึ้นใหม่จากเซลล์เนื้อเยื่อเหล่านี้ต้องอาศัยเทคโนโลยีที่ยังอยู่ระหว่างการพัฒนา คือ cloning และ induced pluripotent stem cell (iPS)

การเก็บแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีก เป็นเทคนิคที่ต้องอาศัยความรู้ความ ชำนาญเฉพาะด้าน ซึ่งทักษะการศึกษาและปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างจากการเก็บเพาะเลี้ยง เซลล์ทั่วไปอย่างมาก การถ่ายทอดประสบการณ์โดยผู้เชี่ยวชาญชาวต่างชาติจึงสามารถร่นระยะเวลาการศึกษา พัฒนาเทคโนโลยีเหล่านี้ในประเทศไทยได้มาก อีกทั้งยังเปิดโอกาสเข้าไปมีส่วนร่วมในเครือข่ายนักวิจัยที่มี ความรู้ความชำนาญด้านเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดสัตว์ปีกจากนานาประเทศ โครงการวิจัยนี้สามารถบรรลุ เป้าหมายแต่ละด้านที่กำหนดไว้ คือด้านการพัฒนาเทคโนโลยีเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดและการสร้างไคเมอร่า สัตว์ปีกขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทย การพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีความรู้และทักษะเฉพาะด้าน การส่งเสริม การศึกษาขึ้นสูง และการสร้างองค์ความรู้ใหม่เผยแพร่ต่อสาธารณะผ่านบทความตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ นานาชาติ เทคโนโลยีเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ปีกซึ่งเป็น ทรัพยากรของชาติที่ประเมินค่ามิได้ อย่างไรก็ตาม การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ ด้วยเทคโนโลยีขั้นสูงนี้ ควรมีหน่วยงานระดับชาติที่รับผิดชอบโดยตรงเพื่อให้การดำเนินงานมีประสิทธิภาพ และยั่งยืน การถ่ายทอดเทคโนโลยีภายในประเทศและไปสู่ประเทศเพื่อนบ้านมีความสำคัญต่อการสร้าง เครือข่ายการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติในเขตภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเป็นแหล่งความหลากหลาย ทางชีวภาพที่สำคัญของโลก

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรทางธรรมชาติที่สำคัญต่อสมดุลนิเวศน์ของโลก และด้วยเหตุที่สภาพภูมิอากาศเหมาะสมต่อการเพาะปลูกจึงเป็นบริเวณที่มีการขยายตัวของเกษตรกรรมลุกล้ำพื้นที่ป่าอย่างกว้างขวาง จากข้อมูลสารสนเทศกรมป่าไม้แสดงให้เห็นว่าพื้นที่ป่าลดลงจาก 43.21% ในปี 2516 เป็น 25.28% ในปี 2541 และได้รับการฟื้นฟูให้มีพื้นที่ป่าเพิ่มขึ้นจากนั้นมาเป็น 31.62% ในปี 2557 (http://forestinfo.forest.go.th/55/Content.aspx?id=72) การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมไปเป็น เกษตรอุตสาหกรรมโดยเฉพาะการปลูกพืชเชิงเดี่ยวทำให้ขาดความหลากหลายของรูปแบบที่อยู่อาศัยเพื่อการดำรงชีวิตของนกต่างชนิดกัน [1] ส่งผลกระทบต่อสัตว์ป่าโดยตรงทั้งการสูญเสียที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร [2] การปนเปื้อนของสารเคมี [3] หรือยา เช่น การใช้ Diclofenac ที่เป็นผลให้นกแร้งในทวีปเอเชียหลายชนิดมีประชากรลดลงอย่างรวดเร็วจนเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ [4-6] หรือยิ่งไปกว่านั้นหากเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ เช่น ผลกระทบจากการได้รับสารปรอทปนเปื้อน จะทำให้การอนุรักษ์ด้วยการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติ (In situ conservation) เป็นไปได้ยาก [7-9] ประชากรนกในธรรมชาติก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว และในจำนวนนี้มีตัวอย่างนก ที่อยู่ในข่ายเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เช่น Gurney's Pitta (*Pitta gurneyi*) ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในนกหายากที่สุดในโลก การสำรวจพบว่าในประเทศไทยมีจำนวนลดลงเหลือ 20-25 คู่ จาก 39-40 คู่ที่มีรายงานไว้ในปี ค.ศ. 1986

(http://www2.wcmc.org.uk/species/data/species_sheets/gurneypi.htm)

นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงธรรมชาติอาจเกี่ยวเนื่องต่อการเกิดโรคระบาดสัตว์ ซึ่งเป็นภัยคุกคามที่มีแนวโน้มทวีความรุนแรงมากขึ้น เช่น โรคไข้หวัดนก ที่ได้รับการยืนยันชัดเจนถึงการก่อโรคในสัตว์ปีกอพยพและในนกธรรมชาติ ปัญหาการติดเชื้อนี้ส่งผลกระทบต่อมาตรการเฝ้าระวังโรค [10-12] ซึ่งหากความรุนแรงของการระบาดมีมากขึ้น อาจนำไปสู่มาตรการป้องกันรุนแรงที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อประชากรนกในธรรมชาติ หรือแม้แต่ประชากรของไก่พื้นเมืองที่เป็นแหล่งอาหารโปรตีนสำคัญสำหรับคนไทยก็ถูกทำลายไปมากในช่วงที่มีการระบาดของโรค

เทคโนโลยีชีวโมเลกุลเป็นทางเลือกหนึ่งในการให้กำเนิดชีวิตจากสารพันธุกรรม เช่น เทคโนโลยี โคลนนิ่ง ซึ่งแม้ว่าในปัจจุบันการโคลนนิ่งยังไม่ประสบผลสำเร็จในสัตว์ปีก เนื่องจากการมีเซลล์ไข่ที่มีขนาดใหญ่ และมีไข่แดงในปริมาณมากทำให้เป็นอุปสรรคต่อการถ่ายฝากสารพันธุกรรม อย่างไรก็ตามการพัฒนา เทคโนโลยีดังกล่าวยังอยู่ในความสนใจของนักวิจัยที่จะพัฒนาให้สำเร็จในอนาคต นอกจากนี้ยังมีเทคโนโลยี การเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปแล้วกลับกลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีคุณสมบัติ pluripotency ได้อีก ด้วย (Induced pluripotent stem cell, iPS cell) ดังนั้นการเก็บรักษาเซลล์ของนกที่ใกล้สูญพันธุ์เหล่านี้จึง เป็นอีกหนทางสำคัญในการการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืนต่อไปใน อนาคต

สำหรับกระบวนการเก็บรักษาเซลล์นี้ Kuwana และคณะ (1996) (international patent ID: W096/06160) ได้พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังเพียงเล็กน้อย ทำให้การเก็บตัวอย่างไม่มีผลกระทบต่อสุขภาพของนกอนุรักษ์เหล่านี้ ขณะที่กระบวนการเพาะเลี้ยงทำให้ได้เซลล์จำนวน

มากพอสำหรับการเก็บรักษาและการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อโรค นอกจากนั้นยังอาจคัดกรองพันธุกรรมที่มีความผิดปกติแฝงอยู่ได้ด้วย ทำให้การเก็บรักษาสารพันธุกรรมที่ผ่านกระบวนการตรวจสอบ ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพในรูปแบบของเซลล์แช่แข็งเป็นทางออกที่ดีของการอนุรักษ์นกที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

ส่วนการให้กำเนิดสัตว์ขึ้นใหม่จากเซลล์แช่แข็งนั้น ทีมนักวิจัยร่วมชาวญี่ปุ่นได้พัฒนาเทคนิคการสร้างลูกผสมไคเมอร่าขึ้นโดยการย้ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่เก็บจากกระแสเลือดตัวอ่อน (primordial germ cells) [13, 14] หรือที่เก็บจาก geneital ridges ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงและเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว [15] จากนั้นก็สามารถใช้โปรแกรมการผสมพันธุ์ระหว่างลูกผสมไคเมอร่าเหล่านี้เพื่อสร้างสายพันธุ์แท้กลับมาในที่สุด [16-18] แม้ว่าจะมีรายงานการสร้างลูกผสมไคเมอร่าในสัตว์ปีกได้สำเร็จด้วยการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ ต้นกำเนิดทั้งระหว่างสปีชีส์เดียวกันและข้ามสปีชีส์แล้วก็ตาม [19-21] การจะทดลองทำตามสิ่งที่รายงานนั้นเป็นไปได้ยากและอาจใช้เวลายาวนานด้วยเหตุที่เป็นเทคโนโลยีที่ต้องการประสบการณ์ และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน และ อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ก็ยังมีรายละเอียดการเตรียมที่อาจแตกต่างกันไปตามแต่ละห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่อาจเรียนรู้ได้จากการอ่านรายงานวิจัยเท่านั้น โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการรับถ่ายทอดเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นจากหน่วยงานของนักวิจัยชาวญี่ปุ่นที่ร่วมโครงการ ซึ่งอาจเป็นเทคโนโลยีที่เป็นจุดเปลี่ยนของวิทยาศาสตร์ด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรสัตว์ปีกในธรรมชาติในอนาคต

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

โครงการนี้เป็นการถ่ายทอดเทคโนโลยีเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดสัตว์ปีก ซึ่งประกอบด้วย 4 **ขั้นตอนหลัก ดังนี้**

1. **การเก็บแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากกระแสเลือดของตัวอ่อน**
2. **การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา** (Japanese quail)
3. **การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง และการเก็บรักษา เซลล์ด้วยการแช่แข็ง** (cryopreservation)
4. **การถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดให้ตัวรับเพื่อสร้างลูกผสมไคเมอร่า**

1. การเก็บแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจะเคลื่อนที่จากจุดกำเนิดในระยะแรกของพัฒนาการของตัวอ่อนผ่านกระแส เลือดไปสู่อวัยวะเป้าหมายคือ genital ridge **เพื่อเจริญต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ในต่อมเพศ** (gonad) **การศึกษาในไก่พบว่า เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเริ่มปรากฏในกระแสเลือดในระยะพัฒนาการที่** 11 HH (Hamburger and Hamilton stage) **และจะมีจำนวนมากที่สุดในระยะที่** 14 HH [22] **การศึกษานี้จึงเก็บตัวอย่างเซลล์จากตัวอ่อนไก่ระยะที่** 13-15 HH **โดยมีขั้นตอนปฏิบัติงาน ดังนี้**

1.1 **ขนส่งไข่ไก่ที่ได้รับการผสมจากฟาร์มพ่อแม่พันธุ์มาที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตว-แพทยศาสตร์ โดยเฉลี่ยประมาณสัปดาห์ละหนึ่งครั้ง ๆ ละประมาณ** 50 **ฟอง**

1.2 เก็บรักษาไข่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C และทะยอยนำไข่เข้าตู้ฟัก โดยจะเก็บไข่ไว้ในตู้เย็นไม่เกิน 5 วัน

1.3 ฟักไข่ในตู้ฟักที่อุณหภูมิ 38.5 °C และมีถาดน้ำเพื่อให้ความชื้นในตู้ฟัก จนตัวอ่อนพัฒนาไปถึงระยะ 13-15 HH ซึ่งเป็นระยะเวลาฟักประมาณ 50-56 ชั่วโมง

1.4 เก็บเลือดจากเส้นเลือด Sinus terminalis และ Omphalomesenteric (vitelline) arteries ของตัวอ่อนภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยใช้ glass capillary pipette ที่ประกอบเข้ากับสายยางและ Mouth piece สำหรับดูดเก็บเซลล์ การเตรียม Glass capillary pipette จะใช้ Thin-walled glass capillary, model G 100 (Narishige Scientific Instrument, Tokyo, Japan) ยืดปลาย ให้เรียวด้วยเครื่อง Quartz glass micropipette puller ตัดปลายให้ได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-50 μm และฝนปลายให้แหลมคม

1.5 แยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากเซลล์เม็ดเลือดด้วยวิธี double density gradient centrifugation ดัดแปลงจาก Zhao and Kuwana, 2003 [23] โดยถ่ายตัวอย่างเลือดลงบน nycodenz ความเข้มข้น 11% และ 5.5% ที่บรรจุในหลอดพลาสติคปลอดเชื้อขนาด 5 mL จากนั้นปั่นเหวี่ยง เพื่อตกตะกอนแยกเซลล์เม็ดเลือดออกจากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดด้วยแรงเหวี่ยง 400 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดส่วนใหญ่จะแขวนลอยอยู่ในชั้นของ nycodenz ที่ความเข้มข้น 5.5%

1.6 ดูดเก็บเซลล์แขวนลอยในชั้นบนของ nycodez และล้างเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ KAv-1

1.7 ถ่ายเซลล์แขวนลอยลงบน tissue culture disk เพื่อตรวจแยกชนิดของเซลล์ภายใต้กล้อง inverted phase contrast microscope และใช้ glass micropipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปลายเข็ม ประมาณ 20 μm ดูดเก็บเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดแยกจากเซลล์เม็ดเลือดที่เหลือปะปนอยู่ การแยก ชนิดของเซลล์อาศัยรูปร่างและขนาด โดยเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจะมีลักษณะกลมนิวเคลียสขนาด ใหญ่เกือบเต็มเซลล์ สะท้อนแสงภายใต้ dark field เซลล์มีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 10-22 μm [24]

1.8 เก็บเซลล์ในหลอด microtube ที่แช่ในน้ำแข็งเพื่อใช้ในการศึกษาถัดไป

2. การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนนกกระทา

เซลล์พี่เลี้ยงมีบทบาทสำคัญต่อการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเซลล์พี่เลี้ยงที่ให้ ประสิทธิภาพต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่ได้ดีคือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อของตัวอ่อน นกกระทา (Japanese quail) โดยมีขั้นตอนการเตรียมเซลล์ดังนี้

2.1 นำไข่นกกระทาจากฟาร์มพ่อแม่พันธุ์เข้าตู้ฟักจนตัวอ่อนเจริญถึงระยะพัฒนาการที่ 13-15 HH ซึ่งเป็นระยะเวลาฟักประมาณ 46-50 ชั่วโมง จากนั้นใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดแยกเนื้อเยื่อบริเวณส่วน ท้ายลำตัว อาศัยกล้องสเตอริโอเพื่อกำหนดตำแหน่งและการตัดเก็บเนื้อเยื่อ จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อที่เก็บ ได้ไปวางบน tissue culture disc ที่มี Phosphate buffered saline (PBS) ที่ปราศจากเกลือ แคลเซี่ยมและแมกนีเซี่ยม, pH 7.4

2.2 ตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็กๆ โดยใช้กรรไกรหรือใบมีดผ่าตัดขนาดเล็ก จากนั้นย้ายชิ้นเนื้อที่ตัดย่อยแล้วไปเพาะเลี้ยงใน 10 ซม.^{2} Tissue culture flask ใช้ KAv-1 ที่มี Rho-kinase inhibitor Y-27632 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล/ลิตร เพื่อยับยั้ง apoptosis และส่งเสริมอัตราการอยู่รอด Subculture ที่ 90% confluency เซลล์ที่นำมาใช้เป็นพี่เลี้ยงสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเป็น passage ที่ 10 ขึ้นไป

2.3 การคัดเลือกเซลล์พี่เลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสนับสนุนการเจริญและการคงคุณสมบัติของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด จะประกอบด้วย 1) คุณสมบัติทั่วไป คือ เติบโตได้ดี สามารถเพาะเลี้ยงต่อเนื่องได้เป็นเวลานาน เจริญเรียงตัวเป็นชั้นเดียวอย่างเป็นระเบียบ เมื่อสังเกตภายใต้กล้อง inverted microscope จะต้องมีลักษณะเป็นพื้นหลังที่ใสสะอาดเพื่อที่จะไม่รบกวนการสังเกตเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่วางตัวซ้อนทับด้านบน และจะต้องตอบสนองต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์ด้วย mitomycin C ได้ดี 2) ส่งเสริมการเจริญเพิ่มจำนวนโดยที่ยังสามารถคงคุณสมบัติของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดไว้ได้ ในที่นี้ ใช้ลักษณะการแสดงออกของ Stage Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA-1) และการย้อมติดสี Periodic Acid Schiff (PAS) ยืนยันคุณสมบัติของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

2.4 เก็บรักษา Feeder cell ใน passage ต้นๆ เพื่อสำรองสำหรับใช้ในระยะยาวด้วยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ตามขั้นตอนดังนี้

2.4.1 เก็บ Feeder cell ที่ 90% confluency โดย Trypsinization ด้วย 0.1% Tripsin/EDTA หลังจากล้างเซลล์ด้วย KAv-1 แล้ว ย้ายเซลล์ลง Freezing media ที่ประกอบด้วย 10% DMSO ใน Fetal Calf Serum

2.4.2 บรรจุเซลล์แขวนลอยลงใน 2 mL Cryo-vial และลดอุณหภูมิลงโดยย้ายเซลล์ใส่ลงใน Bicell (Nihon Freezer Co., Ltd, Tokyo) ซึ่งเป็นภาชนะสำหรับแช่แข็งที่ช่วยลดอุณหภูมิลงในอัตรา 1 °C/**นาที** โดยเตรียม Bicell ที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C ก่อนจะเก็บและย้ายเซลล์ ลงบรรจุ จากนั้นย้าย Bicell ที่บรรจุหลอดเก็บเซลล์ไปไว้ในตู้แช่แข็ง -80 °C ก่อนจะย้าย ไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจะใช้เซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้ใน 96-well plate โดยเซลล์พี่เลี้ยงนี้จะเกาะอยู่บนพื้นผิวภาชนะ เรียงตัวเป็นชั้นเดียวเต็มพื้นผิว การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การเตรียม 96-well plate

3.1.1 เตรียมคอลลาเจนสำหรับเคลือบพื้นผิวเพาะเลี้ยงเซลล์ ใช้ colloagen type I ที่เตรียมจากเอ็นหางหนู โดยตัดเก็บหางหนู rat ที่โตเต็มวัยแช่ลงใน absulute ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะย้ายไปใส่ใน 70% ethanol ทิ้งไว้ข้ามคืน (หางหนูที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มาจากหนูโตเต็มวัยที่ใช้ในการเรียนการสอน และทำให้เสียชีวิตตามมาตรฐานสวัสดิภาพสัตว์ในการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลอง โดยหลีกเลี่ยงความเจ็บปวดและทรมานด้วยการใช้ยาสลบเกินขนาด) จากนั้นจึงใช้กรรไกรตัดเปิดหนังที่หาง และใช้ forcep คีบดึงเส้นเอ็นออกจากส่วนหาง แช่

เอ็นใน 5% acetic acid ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อสกัด คอลลาเจนให้อยู่ในรูปสารละลาย นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกโปรตีน อื่นออก และเก็บส่วนใสไว้ใช้เคลือบพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์

3.1.2 เคลือบพื้นผิว Flat bottom 96-well tissue culture plate ในตู้ปลอดเชื้อ โดยการ ไปเปตสารละลายคอลลาเจนปริมาตร 100 μL ลงในหลุมแรกของแต่ละแถว จากนั้นดูด ปล่อยสารละลายคอลลาเจนขึ้นลงหลายๆ ครั้ง ก่อนที่จะถ่ายปริมาตรทั้งหมดไปยังหลุมถัดไป ในแถวเดียวกัน ทำต่อเนื่องจนครบจำนวนหลุมที่ต้องการสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (สามารถเคลือบคอลลาเจนไว้ทั้งหมดทุกหลุมแล้วเก็บไว้ใช้ภายหลังได้) จากนั้นวางพักไว้ในตู้ปลอดเชื้อจนกว่า acetic acid จะระเหย แห้งไป จึงพร้อมที่จะนำไปใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ได้

3.2 การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยงใน 96-well plate

3.2.1 เลี้ยงเซลล์จากตัวอ่อนนกกระทาใน 25 ซม.^{2} Tissue culture flask จนเซลล์โตเต็มพื้นที่ จากนั้น ยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยการเติม Mitomycin C ในปริมาณความเข้มข้น 10 μg/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ KAv1 พักไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนถ่ายและเติมสารละลาย mitomycin C ใหม่ พักไว้อีก 1.5 ชั่วโมง จึงล้างเซลล์ด้วย PBS, pH 7.4 ก่อนที่จะเติม 0.1% Trypsin/EDTA เพื่อแขวนลอยเซลล์ ล้างเซลล์แขวนลอยใน PBS, pH 7.4 (ในการศึกษานี้ได้มีการทดลองปรับเปลี่ยนระยะเวลาการยับยั้งการแบ่งเซลล์ด้วย mitomycin C โดยเปรียบเทียบระหว่าง 2, 3, 3.5 และ 4 ชั่วโมง)

3.2.2 นับจำนวนเซลล์และปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้เท่ากับ 2×10^5 cell/mL

3.2.3 ย้ายเซลล์ปริมาตร 100 µL ลงใน 96-well plate ที่เคลือบพื้นผิวด้วยคอลลาเจน พักไว้ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวภาชนะ จากนั้นล้างด้วย KAv-1

3.2.4 ตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้อง Inverted phase contrast microscope หากพบว่ายังมีพื้นที่ว่างที่ไม่มีเซลล์เกาะอยู่ ให้ถ่ายเซลล์ลงเพิ่มเติมและพักให้เซลล์เกาะพื้นผิวเป็นเวลาอีก 1 ชั่วโมง

3.2.5 เมื่อได้เซลล์พี่เลี้ยงที่เกาะเต็มพื้นผิวของ 96-well-plate แล้วจึงล้างเซลล์ด้วย KAv-1 เพื่อขจัดเซลล์ ส่วนเกินที่ลอยหรือเกาะซ้อนทับอยู่ออกให้หมด

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

3.3.1 ย้ายเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่ได้ในข้อ 1.8 ลงใน 96-well plate ที่มีเซลล์พี่เลี้ยงเตรียมไว้ที่ก้นหลุมดังข้อ 3.2.5 บ่มเพาะเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ KAv-1 ที่มี Rho-kinase inhibitor Y-27632 ในความเข้มข้น 100 mg/mL สำหรับเริ่มแรกที่มีการย้ายเซลล์ลงเลี้ยง หลังจากนั้นจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยเปลี่ยนถ่ายออกและเติมทดแทนเพียงครึ่งเดียว อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมใหม่เป็น KAv-1 ที่ไม่มี Rho-kinase inhibitor Y-27632 สังเกตเซลล์ภายใต้กล้อง inverted phase contrast microscope ทุกวัน การศึกษานี้ทดลองเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจากไก่ป่า ไก่ฟ้าพญาลอ ไก่ฟ้าหลังขาว และไก่ฟ้าหลังเทา

3.3.2 subculture เมื่อเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเพิ่มจำนวนเกาะกลุ่มกันมากตั้งแต่ 30 เซลล์ขึ้นไป หรือเมื่อเซลล์พี่เลี้ยงเริ่มลอกหลุดจากพื้นผิวภาชนะ ซึ่งโดยทั่วไปจะเริ่มหลุดร่อนจากขอบ หุลมก่อน การย้ายเซลล์จะใช้ Glass capillary pipette ดูดและเป่ากลุ่มเซลล์เบาๆ เพื่อ ให้กลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดหลุดออกจากการเกาะติดอยู่บนเซลล์พี่เลี้ยง จากนั้นใช้ 0.1 % Trypsin/EDTA เพื่อทำให้เซลล์ต้นกำเนิดที่เกาะกลุ่มกระจายออกเป็นเซลล์เดี่ยวก่อนที่จะย้ายไปเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงใหม่ ซึ่งในครั้งแรกของการย้ายเซลล์ลงเลี้ยงใหม่ (subculture) จะใช้ KAv-1 ที่มี Rho-kinase inhibitor Y-27632 ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

3.3.3 เก็บแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยใช้ 10% DMSO ใน Fetal bovine serum เป็น freezing media และใช้ Bicell เป็นภาชนะบรรจุเพื่อลดอุณหภูมิลงในอัตรา 1 °C ต่อนาที จนถึง -80 °C จากนั้นจึงย้ายลงแช่ในไนโตรเจนเหลว

3.3.4 ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดภายหลังจากการแช่แข็งด้วยการย้อมสี Trypan blue (trypan blue exclusion assay)

4 ***การถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดให้ตัวรับเพื่อสร้างลูกผสมไคเมอร่า*** *(germline chimera)*

การสร้าง germline chimera ในสัตว์ปีก ที่ประสบผลสำเร็จตามที่มีรายงานจะต้องเป็นการถ่ายฝากระหว่างตัวอ่อนเพศเดียวกัน จึงใช้วิธีแยกเพศของตัวอ่อนด้วยการตรวจดีเอนเอ และขั้นตอนการตรวจจะ ต้องได้ผลเร็ว เพื่อจะได้ทราบว่าเซลล์จากตัวอ่อนที่เก็บไว้นั้นจะสามารถถ่ายให้กับตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ฟองใดได้ก่อนที่ตัวอ่อนที่เป็นตัวรับนั้นจะพัฒนาต่อไปจนเกินระยะที่เหมาะสมต่อการถ่ายฝากเซลล์ โครงการนี้ได้ทดลองใช้การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดด้วยการต้ม และ PCR primers ที่ใช้เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอนเอ คือ 2550F (5’-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3’) และ 2718R (5’-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3’) [25]

4.1 นำไข่ของตัวที่จะใช้เป็นตัวให้เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด (donor) และของตัวที่จะเป็นตัวรับ (recipient) เข้าฟักในตู้ฟักไข่ ให้มีระยะเวลาเริ่มเข้าฟักห่างกันประมาณ 2 ชั่วโมง โดยนำไข่ของตัวให้เซลล์ เข้าฟักก่อน

4.2 นำไข่ฟักของตัวให้เซลล์ออกจากตู้ฟักเมื่อถึงระยะฟักประมาณ 52 ชั่วโมง ซึ่งตัวอ่อนของตัวให้เซลล์จะอยู่ในระยะพัฒนาการ 13-14 HH เก็บเลือดจากตัวอ่อนของตัวให้เซลล์ เพื่อแยกเก็บเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดด้วย nycodenz density gradient centrifugation

4.3 ระหว่างที่ดำเนินการแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด ก็นำตัวอ่อนของตัวรับออกจากตู้ฟักซึ่งจะอยู่ในระยะพัฒนาการใกล้เคียงกับระยะ 12-14 HH เจาะเปลือกไข่ด้วยเข็มเบอร์ 18 และใช้ forceps ปลายแหลมเล็มเปิดเปลือกไข่ให้เป็นช่องหน้าต่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซ.ม. จากนั้นส่องตรวจหาตำแหน่งตัวอ่อนภายใต้กล้องเสตอริโอ เมื่อพบตัวอ่อนและจัดวางไข่ให้เส้นเลือดอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมแล้วจึงใช้ glass capillary pipette สอดผ่านช่องหน้าต่างไปเจาะเก็บเลือดปริมาตร 2-3 μL เพื่อไปตรวจวิเคราะห์แยกเพศด้วย PCR หลังจากได้ตัวอย่างเลือดตามต้องการแล้วใช้แถบกาวพลาสติคใสปิดช่องหน้าต่างเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการระเหยของน้ำออกจากไข่ พักไข่ไว้ให้ช่องหน้าต่างหงายอยู่ด้านบนในระหว่างที่รอผลการตรวจเพศและการแยกเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

4.4 เมื่อครบเวลาการปั่นแยกเซลล์ใน nycodenz แล้ว นำตัวอย่างมาดูดเก็บเซลล์แขวนลอยที่อยู่เหนือชั้น 11% nycodenz เพื่อแยกเก็บเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดอีกครั้ง จากนั้นดูดเก็บเซลล์เม็ดเลือดที่ก้นหลอดประมาณ 2 μL เพื่อใช้ตรวจแยกเพศด้วย PCR สำหรับการแยกเก็บเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดด้วยการใช้ glass capillary pipette ดูดเก็บเซลล์ภายใต้กล้อง phase contrast inverted microscope ทีละเซลล์นั้น นอกจากเพื่อแยกเซลล์ให้บริสุทธิ์แล้ว ขณะดียวกันเป็นการขจัดปริมาณบัฟเฟอร์ทำให้เซลล์มีความหนาแน่นมากที่สุด เนื่องจากการถ่ายฝากให้ตัวรับควรมีปริมาตรที่ฉีดเข้าไปในกระแสเลือดประมาณ 2-3 μL เท่านั้น และควรมีจำนวนเซลล์ที่ถ่ายฝากมากกว่า 200 เซลล์

4.5 เมื่อได้ผลการตรวจเพศแล้วจึงเริ่มขั้นตอนถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดระหว่างเพศเดียวกัน โดยนำไข่ที่จะเป็นตัวรับมาวางใต้กล้องสเตอริโอ หาตำแหน่งของตัวอ่อนและจัดวางไข่ให้เส้นเลือดอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมต่อการฉีด โดยใช้ glass capillary pipette ดูดเซลล์ขึ้นมาในปริมาตร 2-3 μL และสอด pipette ผ่านหน้าต่างบนเปลือกไข่ไปเข้าเส้นเลือดในตำแหน่งเดิมที่ใช้เก็บเลือดเพื่อตรวจเพศ เมื่อปลาย pipette อยู่ในเส้นเลือดแล้ว (ตรวจสอบได้จากการดูดเลือดเข้ามาใน pipette) จึงค่อยๆ เป่าเซลล์เข้าไปในกระแสเลือด หลังจากถอน pipette ออกมาแล้วจึงใช้แถบกาวพลาสติค ใสปิดช่องหน้าต่างที่เปลือกไข่เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำและการปนเปื้อนของสิ่งสกปรกและเชื้อจุลินทรีย์ การเก็บตัวอย่างเลือดและการถ่ายฝากเซลล์เป็นขั้นตอนที่ปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อ (Class I biosafety cabinet)

4.6 หลังจากถ่ายฝากเซลล์แล้ว นำไข่เข้าตู้ฟักจนครบกำหนดการฟัก การทดสอบว่าลูกที่ได้รับการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเป็น germline chimera หรือไม่จะต้องรอให้โตเต็มวัยและนำมาผสมพันธุ์เพื่อตรวจสอบว่าสามารถให้ลูกที่เป็นชนิดหรือพันธุ์เดียวกับตัวให้เซลล์หรือไม่

ในโครงการนี้ได้ทดลองถ่ายฝากเซลล์ระหว่างสปีชีส์ คือถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่ฟ้าพญาลอ ให้ตัวรับที่เป็นไก่เนื้อและไก่ไข่

ระหว่างการดำเนินโครงการได้ดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาแนวทางแก้ปัญหาและอุปสรรคภายใต้สถานะการณ์ที่แตกต่างจากการปฏิบัติงานของนักวิจัยในประเทศญี่ปุ่น ดังนี้

การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อแก้ปัญหาหรือพัฒนาเทคโนโลยี

5. ***การศึกษาอิทธิพลของ*** *chicken recombinant SCF* ***และ*** *E-cadherin* ***ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด***

จากการตรวจด้วย Indirect immunofluorescent assay โดยใช้ anti E-cadherin และ anti-c-kit เป็น primary antibody ผู้วิจัยพบว่ามีการแสดงออกของ E-cadherin และ c-kit receptors บนผิวเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในระยะที่อยู่ในกระแสเลือด จึงได้ทดลองศึกษาอิทธิพลของ E-cadherin (self-ligand) และ SCF (c-kit ligand) โดยการศึกษาอิทธิพลของ E-cadherin ใช้วิธีการขัดขวางการยึดเกาะของ E-cadherin ด้วย anti E-cadherin antibody ส่วนการศึกษาบทบาทของ SCF/c-kit ใช้การเสริม chicken recombiant SCF ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีขั้นตอนการทดลอง และแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

เก็บแยกเซลล์จากกระแสเลือดของตัวอ่อนไก่ด้วย glass capillary pipette ภายใต้กล้อง phase contrast inverted microscope และแยกบริสุทธิ์ด้วย nycodenz density gradient จากนั้นเพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจากเซลล์ตัวอ่อนของนกกระทา ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ KAv-1 ที่มี 5% FCS และ 5% chicken serum ใช้ penicillin/streptomycin ป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ตรวจยืนยันชนิดเซลล์ด้วยการตรวจการแสดงออกของ SSEA-1 antigen โดยในการศึกษานี้ได้แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย 1) กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยระบบเพาะเลี้ยงมาตรฐานดังที่รายงานไว้ 2) กลุ่มที่เติม SCF ความเข้มข้น 5 μM ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3) กลุ่มที่เติม 5 μM SCF และ tyrosine kinase inhibitor (STI571) ความเข้มข้น 10 μM ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และ 4) กลุ่มที่เติม anti e-cadherin ลงในอาหาร เลี้ยงเซลล์เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน โดยเปลี่ยนเพียงครึ่งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดในแต่ละ หลุม สังเกตการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดทุกวัน ตรวจนับเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็น เวลา 12 วัน โดยอาศัยการตรวจการแสดงออกของ SSEA-1 เป็นสิ่งยืนยันชนิดของเซลล์

<u>หมายเหตุ</u> เหตุที่ประเมินผลหลังจากเพาะเลี้ยงเพียง 12 วัน แทนที่จะทิ้งระยะให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากๆ เพราะหากเซลล์เจริญมากจะเกาะกลุ่มเป็นโคโลนีซ้อนทับกันเป็นอุปสรรคต่อการนับจำนวนเซลล์ การระบุ ยืนยันชนิดของเซลล์ด้วย Immunofluorescent staining และเซลล์พี่เลี้ยงที่อายุมากจะเริ่มมีขอบเซลล์เป็น สีดำชัดเจนภายใต้ phase contrast microscope ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการสังเกตเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด ที่เกาะอยู่ด้านบน

6. การศึกษา proteome และ secretome ของเซลล์พี่เลี้ยง

เนื่องจากเซลล์พี่เลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกเป็นอย่างมาก ขณะที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในกลุ่มนักวิจัยว่า เซลล์พี่เลี้ยงที่พบว่าให้ผลดีต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดคือ เซลล์ที่เตรียมจากตัวอ่อนของนกกระทา ซึ่งเป็นปัจจัยผันแปรเชิงคุณภาพ ที่สำคัญ แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุกร และ มนุษย์ ที่สามารถใช้ established cell line เช่น STO ที่มีความคงที่กว่าในการเพาะเลี้ยงได้ [26, 27] อย่างไรก็ตาม เซลล์ชนิดดังกล่าวไม่สามารถสนับสนุนการเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของสัตว์ปีกได้ดีเท่าที่ควร แม้ว่าจะมีรายงานว่าสามารถช่วยส่งเสริมการเลี้ยง blastodermal cell ของไก่เมื่อเทียบกับการไม่ใช้เซลล์พี่เลี้ยง [28] ส่วนการเลี้ยงเซลล์จาก hypoblast นักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้พบว่า ต้องอาศัยเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมจาก blastoermal cell ของนกกระทาเพื่อส่งเสริมการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงศึกษา proteome และ secretome เพื่อค้นหาสารสำคัญที่เป็นปัจจัยสนับสนุนการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด โดยหวังว่าจะใช้ประโยชน์ในการพัฒนาระบบการเลี้ยงที่ลดการพึ่งพาเซลล์พี่เลี้ยง

7. ศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอนเอในไมโตคอนเดรียส่วน d-loop (complete d-loop mtDNA sequencing)

ในการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดให้ตัวรับ จะทราบผลว่าตัวรับนั้นเป็น germline chimera หรือไม่ก็โดยการผสมพันธุ์และตรวจสอบลูกที่เกิดขึ้นว่า สามารถให้ลูกที่เกิดจากเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนามาจาก

เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่ได้รับการถ่ายฝากมาหรือไม่ ซึ่งตัว germline chimera นี้จะผลิดเซลล์สืบพันธุ์ ทั้งที่พัฒนาจากเซลล์ต้นกำเนิดของตัวเองและเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับถ่ายฝากมา โดยมีโอกาสสูงที่จำนวนเซลล์สืบพันธุ์จากเซลล์ต้นกำเนิดถ่ายฝากจะมีน้อยกว่ามาก ทำให้โอกาสได้ลูกที่เกิดจากเซลล์ต้นกำเนิดถ่ายฝากอยู่ในระดับต่ำ จึงต้องเลี้ยงไก่ที่เกิดจากการถ่ายฝากเซลล์จำนวนมากและผสมพันธุ์ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งในการทดลองที่ผ่านมาก็ประสบปัญหาในการทดสอบว่าลูกไก่ที่ได้รับการถ่ายฝากเซลล์นั้นเป็น germline chimera หรือไม่ จากข้อจำกัดของพื้นที่เลี้ยงและงบประมาณในการดูแลที่สูง

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงทดลองตรวจวิเคราะห์ เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอนเอในไมโตคอนเดรียของ ไก่ป่า และไก่พื้นเมือง ซึ่งหากพบว่ามีความแตกต่างกันชัดเจน ก็จะใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสนี้เป็นเครื่องมือทดสอบการผลิตลูกผสมไคเมอร่า โดยเฉพาะการทดสอบลูกผสมไคเมอร่าเพศผู้โดยการตรวจสอบดีเอ็นเอใน ไมโตคอนเดรียของเสปิร์มว่ามีทั้งส่วนที่พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดของตัวรับเอง และจากเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้รับการถ่ายฝากมาหรือไม่

<u>ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาและวิธีการเก็บตัวอย่าง</u>

ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างไก่ป่าตุ้มหูขาว (white earlobe red junglefowl, *Gallus gallus gallus*) ไก่ป่าตุ้มหูแดง (red earlobe red junglefowl, *Gallus gallus spadiceus*) และไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์เหลืองหางขาว และประดู่หางดำ เก็บตัวอย่างเลือดด้วยอุปกรณ์ปลอดเชื้อโดยใช้ heparinized needle เจาะเก็บเลือดจาก wing (brachial) vein ปริมาตร 1 มล./ตัว จำนวน 35 ตัวอย่าง/สายพันธุ์ ขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการของ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในสภาพแช่เย็น เมื่อถึงห้องปฏิบัติการจึงแบ่งถ่ายตัวอย่าง เลือดปริมาตร 10 ไมโครลิตร สำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส ของดีเอ็นเอในไมโตรคอนเดรีย เก็บรักษาตัวอย่างที่เหลือโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 40 °C สำหรับการศึกษา อื่นๆ ต่อไป

<u>หมายเหตุ</u> เหตุผลที่เลือกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวและประดูหางดำ ก็เพื่อให้มีการนำผลการ ศึกษาไปใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมแผนการอนุรักษ์และพัฒนาสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยโดยกรมปศุสัตว์ ซึ่งไก่ สองสายพันธุ์นี้ เป็นสายพันธุ์หลักเริ่มต้นที่กรมปศุสัตว์ได้ดำเนินการเก็บรวบรวมและขยายพันธุ์ในศูนย์วิจัยและ บำรุงพันธุ์สัตว์ แหล่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มาจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัด ปราจีนบุรี (ไก่พันธุ์เหลืองหางขาว) และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์หนองกวาง จังหวัดราชบุรี (ไก่พันธุ์ประดู่ หางดำ)

ส่วนตัวอย่างไก่ป่าตุ้มหูแดงเป็นตัวอย่างจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าดอยตุง จังหวัดเชียงราย และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าอมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ และตัวอย่างไก่ป่าตุ้มหูขาวจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า ช่องกล่ำบน จังหวัดสระแก้ว

<u>การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน D-loop ด้วย polymerase chain reaction (PCR)</u>

เตรียมตัวอย่างดีเอนเอจากตัวอย่างเลือดโดยใช้ Phusion blood direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) วิธีการตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ เพิ่มชิ้นส่วน D-loop ด้วย PCR โดยใช้ oligoprimers ดังนี้ 5’ –AGGACTACGGCTTGAAAAGC -3’ และ 5’ –TGCTTAAGGTTAATTACTGCTG -3’ (Nishibori *et al.,* 2001) นำผลผลิตของ PCR ที่ได้มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย GeneJET PCR

purification kit (Thermo Scientific, USA) จากนั้นจึงส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดย 1st BASE sequencing service (Singapore) เพื่อนำมาเปรียบเทียบรูปแบบจำเพาะที่มีความแตกต่างกันระหว่างชนิดและสายพันธุ์

8. การสร้าง Somatic chimera

จากปัญหาการตรวจสอบ germline chimera ที่ต้องรอจนกว่าไก่จะโตเต็มวัย ซึ่งหากเป็นเพศผู้ก็สามารถเก็บน้ำเชื้อตรวจลำดับเบสของไมโตคอนเดรียส่วน d-loop ได้ หรือแม้แต่การใช้วิธีอื่นเช่นการใช้เทคนิค microsatellite ในการวิเคราะห์ส่วนของ nuclear DNA แต่กรณีเป็นเพศเมียที่เซลล์ไข่มีไข่แดงจำนวนมากจึงเป็นอุปสรรคต่อการสกัด DNA และการตรวจ germline chimera ด้วยจุดประสงค์หลักของโครงการนี้คือการถ่ายทอดเทคโนโลยีจากผู้เชี่ยวชาญฝ่ายญี่ปุ่น และเพื่อให้การประเมินความสำเร็จของเทคนิคการถ่ายฝากเซลล์เป็นไปได้มากขึ้น จึงได้ทดลองสร้าง somatic chimera โดยการถ่ายฝากเซลล์จากตัวอย่างเลือดให้ตัวรับ ซึ่งอยู่บนสมมุติฐานว่าเซลล์ในกระแสเลือดตัวอ่อนระยะ 13-14 HH นอกจากประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดแล้ว ยังมีกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดที่สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ร่างกายที่สามารถตรวจสอบได้จากลักษณะภายนอก ซึ่งเป็นลักษณะของ somatic chimera ดังเช่นรายงานการสร้าง somatic chimera จากการถ่ายฝากเซลล์จากไขกระดูก [29] **การศึกษานี้ใช้ไก่พันธุ์ชีเป็นตัวรับ ซึ่งมีลักษณะสีขนเป็นสีขาวตลอด ทั้งตัว ผิวหนังส่วนหน้าแข้งไม่มีสี และใช้ไก่พันธุ์ประดู่หางดำที่มีขนสีเหลือบดำ และมีผิวหนังที่หน้าแข้งสีดำ เป็นตัวให้เซลล์ เก็บตัวอย่างเลือดจากตัวอ่อนไก่พันธุ์ประดู่หางดำในระยะพัฒนาการที่ 13-15 ปริมาตร** 2-4 μL **และถ่ายฝากให้ตัวอ่อนของไก่พันธุ์ชีที่อยู่ในระยะพัฒนาการเดียวกัน จากนั้นนำไข่เข้าตู้ฟักจนครบกำหนด การฟัก ตรวจดูลักษณะภายนอกโดยเฉพาะสีขนหรือสีหน้าแข้งว่ามีการแสดงออกของสีดำบ้างหรือไม่**

9. การศึกษาบทบาทของ SCF ต่อการเหนี่ยวนำการเคลื่อนที่ของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

การสร้างลูกผสมไคเมอร่าอาศัยการถ่ายฝากเซลล์เข้าสู่กระแสเลือดของตัวรับ ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดนี้ต้องสามารถเคลื่อนที่ไปสู่อวัยวะเป้าหมายคือ genital ridges ได้ เนื่องจากมีข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในสัตว์ปีกน้อยมาก จึงได้ศึกษาเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้าง germline chimeara ในอนาคต ข้อมูลขั้นตอนการศึกษา ผลและการอภิปรายผลการศึกษาได้รับการตอบรับตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ รายละเอียดทั้งหมด ดังแนบในภาคผนวก