

**การศึกษาอิทธิพลของ chicken recombinant SCF และ E-cadherin ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์
ต้นกำเนิด**

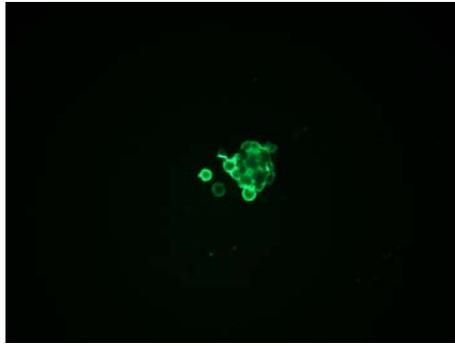
ผลการศึกษาเบื้องต้นดังแสดงในภาพที่ 7 และตารางที่ 2 พบว่า SCF มีแนวโน้มออกฤทธิ์ส่งเสริม การเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด โดยกลุ่มที่เสริม SCF ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 7b) มีขนาดโคโลนี และจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 7a) ซึ่งเมื่อยืนยันผลด้วยการเติม tyrosine kinase/ c-kt inhibitor (STI571) ก็พบว่าโคโลนีมีขนาดลดลง (ภาพที่ 7c) หรือก็คือมีขนาดใกล้เคียง กับช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ เช่นเดียวกันกับเมื่อเติม anti E-cadherin พบว่ามีเพียง การเกาะกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดเป็นกลุ่มเล็กๆ โดยไม่มีการเพิ่มจำนวน และกลุ่มที่พบก็น้อยมากกว่า จำนวนที่ย้ายลงเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 1 อิทธิพลของ SCF และ E-cadherin ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่

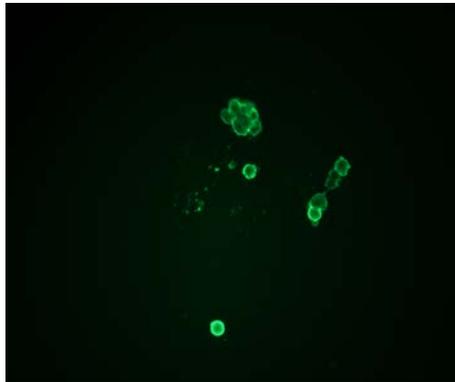
กลุ่มทดลอง	จำนวนเซลล์ PGC เริ่มต้น	จำนวนเซลล์ PGC หลังจาก เพาะเลี้ยง 12 วัน	Doubling time
กลุ่มควบคุม	100	208	11.35
กลุ่มเสริม SCF	100	378	6.25
กลุ่มเสริม SCF และ STI571	100	16	-
กลุ่มเสริม anti E-cadherin	100	23	-



ภาพ a)



ภาพ b)



ภาพ c)



ภาพ d)

ภาพที่ 7 อิทธิพลของ SCF และ E-cadherin ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด แสดงเซลล์สืบพันธุ์ ต้นกำเนิดของไก่ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ ทดสอบ ดังนี้ a) KAv1, b) KAv1 + SCF, c) KAv1 + SCF + STI571 และ d) KAv1 + anti E-cadherin คอลัมน์ซ้ายเป็นภาพ phase contrast และคอลัมน์ขวาเป็นภาพที่ย้อมด้วย anti-SSEA-1 เพื่อยืนยันว่าเป็น เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

การสร้าง germline chimera

การถ่ายฝากเซลล์ภายใต้กล้องสเตอริโอโดยใช้ capillary pipette สอดผ่านช่องหน้าต่างขนาดเล็กที่เปลือกไข่เข้าไปเจาะเส้นเลือด sinus terminalis และฉีดเซลล์เข้าไปอย่างช้าๆ ให้สำเร็จโดยไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อตัวอ่อน เป็นขั้นตอนที่ต้องอาศัยความชำนาญมาก และหากคุณภาพของตัวอ่อนหรือระยะ พัฒนาการที่ไม่เหมาะสม โอกาสสำเร็จจะน้อยลงมาก การทดลองสร้าง germline

chimera ในโครงการ นี้เป็นการถ่ายฝากเซลล์ข้ามสปีชีส์ ซึ่งในปีแรกได้ถ่ายฝากเซลล์ไก่อฟ้าพญาลอปให้ตัวรับที่เป็นไก่เนื้อ ด้วยข้อ จำกัดที่ตัวอ่อนไก่อฟ้าพญาลอปมีจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดในกระแสเลือดน้อยมาก น้อยกว่าที่พบในไก่ถึง ประมาณ 5 เท่า จึงต้องรวมตัวอย่างจากตัวอ่อนหลายตัว และสุดท้ายสามารถถ่ายฝากเซลล์ได้ 4 ตัวอย่าง เท่านั้น ผลการถ่ายฝากเซลล์ได้ลูกไก่อฟ้าพญาลอปออกมาเพียง 1 ตัว ลูกไก่ไม่มีความผิดปกติภายนอก แต่อ่อนแอ กินอาหารน้อย และตายเมื่ออายุ 5 วัน

ในปีที่ 2 ได้ทดลองถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่อฟ้าพญาลอปให้ตัวรับที่เป็นไก่ไข่ โดยสามารถ รวบรวมตัวอย่างเซลล์และถ่ายฝากได้ 6 ตัวอย่าง ได้ลูกไก่อฟ้าพญาลอปเป็นตัว 2 ตัว แข็งแรงสมบูรณ์ แต่เป็นเพศเมีย ทั้งคู่ จึงไม่สามารถทดสอบการเป็น germline chimera ด้วยการผสมพันธุ์ได้ และไม่สามารถใช้การทดสอบ ด้วยการผสมกับไก่อฟ้าพญาลอปได้ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำคัญของการสร้างโคเมอรา ระหว่างสปีชีส์ที่จะใช้การผสมพันธุ์ธรรมชาติกับสัตว์ที่เป็นตัวให้เซลล์ไม่ได้ นอกจากนี้จะใช้การผสมเทียม ซึ่งไม่สามารถทำได้ในกรณีนี้เนื่องจากไม่สามารถรีดน้ำเชื้อไก่อฟ้าพญาลอปได้ การทดลองนี้จึงไม่สามารถพิสูจน์ความสำเร็จของการถ่ายฝากเซลล์ได้ และด้วยข้อจำกัดหลายด้านรวมถึงระยะเวลาของโครงการ ผู้วิจัยจึงปรับแผนการวิจัยเพื่อพิสูจน์เทคนิคการถ่าย ฝากเซลล์ด้วยการสร้าง somatic chimera แทน

การศึกษาลำดับเบส complete d-loop mtDNA

พบว่าสามารถแยกไก่พื้นเมืองและไก่ป่าออกจากกันได้ชัดเจน ด้วยลำดับเบสของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย โดยพบว่าตัวอย่างทั้งหมดแบ่งแยกออกเป็น 25 haplotypes ดังตารางที่ 1 โดยไก่ป่าตุ้มหูขาวมีลำดับ เบสจัดอยู่ใน 6 haplotypes (group 1-6) ไก่อฟ้าพญาลอปแดงจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าดอยตุงจัดอยู่ใน 9 haplotypes (group 7-15) และจากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าอมก๋อยจัดอยู่ใน 5 haplotypes (group 16-20) ส่วนตัวอย่างไก่พันธุ์ประดู่หางดำจัดอยู่ใน 3 haplotypes (group 21-23) และพันธุ์เหลืองหางขาวจัดอยู่ใน 2 haplotypes (group 24-25) โดยไม่มีการซ้อนทับกันของรูปแบบลำดับเบสระหว่างชนิดและสายพันธุ์ของไก่ที่ ศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรียเปรียบเทียบ ระหว่างไก่อฟ้าพญาลอปขาว ไก่อฟ้าพญาลอปแดง ไก่อฟ้าพญาลอปพันธุ์ประดู่หางดำ และพันธุ์เหลืองหางขาว



ภาพที่ 8 Somatic chimera แสดงภาพ somatic chimera จากการถ่ายฝากเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดของไก่ พันธุ์ประดู่หางดำให้ตัวรับที่เป็นไก่พันธุ์ซี เทียบกับลูกไก่พันธุ์ซี (a, c, d) และประดู่หางดำ (a) ไข่ที่ได้รับ การถ่ายฝากเซลล์จะมีช่องหน้าต่างที่เปลือกไข่ (b) ไคเมอร์ามีลักษณะภายนอกของลูกไก่พันธุ์ซีที่มีขนสีดำ แซมและหนังที่ขาไม่มีสีปนดำ เมื่อเทียบกับลูกไก่พันธุ์ซีจะมีขนสีขาวและหนังไม่มีสี ส่วนลูกไก่พันธุ์ประดู่หางดำ จะมีสีดำทั้งตัว