

ผลของพลาสมาเย็นต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันในลูกไก่ประดู่หางดำลูกผสม

The effect of non-thermal plasma on DNA methylation-related gene expression in Crossbred Pradu Hang Dam chicks

ศิริภัตสร ถิ่นปา¹, วรศักดิ์ แก้วก่อง², ภาคภูมิ ทรัพย์สุนทร², ชนม์เจริญ แสงรัตน์^{3*},
ธีรวรรณ บุญวรรณ⁴, ถิรนนท์ ศรีภักษ์ชัย^{5,6*}, อภิขญา สกุลไทย⁵, ไพรัตน์ ศรีชนะ⁶, ธิติมา เพ็ชรคง¹ และ
รังสรรค์ เจริญสุข^{1,7*}

Siripatsorn Thinpa¹, Worasak Kaewkong², Pakpoom Subsoontorn²,
Choncharoen Sawangrat^{3*}, Dheerawan Boonyawan⁴, Tiranun Srikanchai^{5,6*},
Apichaya Sakulthai⁵, Pairat Srichana⁶, Thitima Pechrkong¹ and
Rangsun Charoensook^{1,7*}

¹ สาขาวิชาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 6500

¹ Division of Animal Science and Feed Technology, Department of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000

² ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

² Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

³ ภาควิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ Department of Physica and Materials Science, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

⁴ ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

⁴ Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

⁵ สาขาการจัดการเทคโนโลยีฟาร์ม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์ นนทบุรี 11120

⁵ Division of Farm technology management, Faculty of Agroindustry, Panyapiwat Institute of Managements, Nontaburi 11120

⁶ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) กรุงเทพมหานคร 10500

⁶ Charoen Pokphand Foods Public Company Limited (CPF), Bangkok 10500

⁷ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมการเกษตรและปศุสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

⁷ Center of Excellence for Agricultural and Livestock Innovations, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้พลาสมาเย็นต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันในไก่พื้นเมืองลูกผสม การทดลองนี้ทำโดยใช้ไข่ฟักของไก่พื้นเมืองลูกผสม ที่ถูกกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็นที่อายุไข่ฟักวันที่ 4 ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมที่มีการเริ่มพัฒนาของตัวอ่อน โดยใช้พลาสมาเย็น 3 ระดับ คือ 10 20 และ 30 วินาที เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็น เมื่อไก่ฟักออกทำการสุ่มเก็บตัวอย่างตบของไก่ทุกกลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว รวม 32 ตัว เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน คือ DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b ด้วยเทคนิค real-time PCR จากการศึกษาพบว่าไก่พื้นเมืองลูกผสมกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็น ที่ระดับ 10 20 และ 30 วินาที มีการแสดงออกของยีน DNMT3b ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็นอย่างมีนัยสำคัญ (P=0.0014, P<0.0001, P=0.003 ตามลำดับ) ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน DNMT1 และ DNMT3a พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็น

* Corresponding author: rangsunc@nu.ac.th; choncharoen@step.cmu.ac.th; tiranunsri@pim.ac.th

Received: date; September 8, 2022 Accepted: date; July 24, 2023 Published: date;

เห็นว่าพลาสมาเย็นมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวส่งผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน และการควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ ถือได้ว่าเทคโนโลยีสีเขียวนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเกษตรของไทยต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน; ไก่พื้นเมืองลูกผสม; กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน; พลาสมาเย็น

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the effect of Cold plasma on DNA methylation-related gene expression in crossbred Thai native chickens. Fourth day-incubation fertilized eggs, which is the optimal stage for the beginning of embryo development were exposed with cold plasma. Incubated eggs were exposed for 10, 20 and 30 seconds, respectively, compared to the control group. Expression of DNA methylation-related genes (*DNMT1*, *DNMT3a* and *DNMT3b*) was determined in liver tissues derived from 32 a day-old chick (n=8 per group) by real-time PCR techniques. Significant downregulation of *DNMT3b* gene was found in all plasma-treat groups (P=0.0014, P<0.0001, P=0.003, respectively). This study demonstrated that cold plasma technology had affected on DNA methylation-related gene expression, which affects the development of the embryo and the regulation of the expression of other genes related to development of the chicken embryo. This green technology will be saving as the further development strategy for agricultural benefits in Thailand.

Keywords: gene expression; crossbred Thai native chicken; DNA methylation; cold plasma

บทนำ

ไก่พื้นเมืองไทยลูกผสมถือว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากมีเนื้อแน่น รสชาติดี เหมาะกับอาหารไทยหลากหลายชนิด และจัดเป็นอาหารสุขภาพเนื่องจากมีปริมาณไขมันที่ต่ำกว่าไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (Jaturasitha et al., 2008) ส่งผลให้ราคาเนื้อไก่พื้นเมืองสูงกว่าไก่เนื้อทั่วไป 2-3 เท่า โดยเฉพาะในช่วงเทศกาลสำคัญ อาทิเช่น ปีใหม่และตรุษจีน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม ไก่พื้นเมืองไทยมีข้อจำกัดอยู่ที่มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ และใช้เวลาในการเลี้ยงนานกว่า 9-11 สัปดาห์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าที่เลี้ยงในรูปแบบอุตสาหกรรมจะใช้เวลาเพียงแค่ 4-6 สัปดาห์ แม้การเพิ่มระดับโปรตีนในอาหารให้สูงกว่าร้อยละ 20 ก็ไม่ได้ช่วยให้ไก่พื้นเมืองโตเร็วขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมไว้ (อิติมา, 2560) ด้วยเหตุผลต่าง ๆ เหล่านี้จึงทำให้การเลี้ยงไก่พื้นเมืองในระดับอุตสาหกรรมมีต้นทุนการเลี้ยงที่สูง และให้ผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ซึ่งหากมีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ที่ปลอดภัย ไม่มีสารตกค้างและไม่ส่งผลเสียต่อผู้บริโภค และสามารถช่วยให้ไก่พื้นเมืองมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วขึ้น หรือมีประสิทธิภาพการผลิตด้านต่างๆ ที่ดีขึ้น มาประยุกต์ใช้จะเป็นวิธีที่สามารถลดช่วยต้นทุนในการเลี้ยง และเพิ่มการผลิตเนื้อไก่พื้นเมืองได้อย่างมีคุณภาพ ซึ่งหนึ่งในเทคโนโลยีที่กำลังได้รับความนิยม สำหรับภาคการเกษตรก็คือเทคโนโลยีพลาสมาเย็น (ธีรวรรณ และ หมุดตอเล็บ, 2562)

พลาสมาจัดได้ว่าเป็นสถานะที่ 4 ของสสาร เกิดได้โดยการให้สนามไฟฟ้าปริมาณมากแก่ก๊าซที่เป็นกลาง เมื่อพลังงานส่งผ่านไปยังอิเล็กตรอนอิสระมากพอ จะทำให้อิเล็กตรอนอิสระชนกับอะตอม และทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากอะตอม กระบวนการนี้เรียกว่ากระบวนการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้จำนวนอิเล็กตรอนที่หลุดออกมานี้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมาก ซึ่งจะทำให้ก๊าซแตกตัวและกลายเป็นพลาสมา (Jiang et al., 2014) ซึ่งพลาสมาเย็นมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีภายในวัสดุ แต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของผิววัสดุ มีอุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส มีคลื่นความร้อน ไร้สี ไร้กลิ่น ไม่มีกระแสไหลผ่านผิว มีไอออนและอิเล็กตรอนในอัตราส่วนที่เท่ากัน และมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาผสมของอิเล็กตรอน ไอออน อะตอม และโมเลกุล และ reactive species พลาสมาเย็นสามารถเกิดได้หลายวิธี เช่น พลาสมาเจ็ตที่ความดันบรรยากาศ (atmospheric pressure plasma jet) การดีสชาร์จข้ามฉนวนเหนื่อผิวของเหลว ดีสชาร์จข้ามฉนวนในของเหลว และดีสชาร์จไอของเหลว โดยพลาสมาเย็นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นวิธีการดีสชาร์จข้ามฉนวน (Dielectric Barrier Discharge; DBD) หรือพลาสมาแบบไดอิเล็กทริกแบร์เรียร์ดีสชาร์จ (DBD plasma) (ศุภรัตน์ และ สุลาวัลย์, 2555)

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นจะส่งผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ทั้งในพืชและในสัตว์ (ธีรวรรณ และ หมุดตอเล็บ, 2562; Zhang et al., 2018) โดยตั้งสมมติฐานว่าอนุภาคพลาสมาเย็นที่ประกอบไปด้วย

อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้า อนุโมลที่กระตุ้นปฏิกิริยา อะตอมที่ทำปฏิกิริยา (Sakulthai et al., 2023) จะแพร่ซึมผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยาที่มีผลต่อกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีววิทยาหลายอย่าง รวมไปถึงการพัฒนาของตัวอ่อน การควบคุมการแสดงออกของยีน และการรักษาเสถียรภาพของโครโมโซม (Phillips, 2008; Li et al., 2011) ซึ่งกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นกลไกสำคัญของการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับอีพิเจเนติกส์ (epigenetics) ที่ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน โดยการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะเป็นการปรับเปลี่ยนเบส cytosine ให้อยู่ในรูปของ 5-methylcytosine (5mC) โดยการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 5 ของเบส (Bird, 1980) โดยจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) ส่งผลต่อการควบคุมการทำงานของยีน (Lyko, 2018) ซึ่งกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันแบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ การเติมหมู่เมทิลเพื่ออนุรักษ์รูปแบบของการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เรียกว่า Maintenance methylation โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 (DNMT1) (Hermann et al., 2004) และอีกรูปแบบหนึ่ง คือ *De novo* เป็นการเติมหมู่เมทิลที่สูญเสียไปในระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ โดยมีเอนไซม์ DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3a) และ DNA methyltransferase 3 beta (DNMT3b) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่เป็นตัวควบคุมที่สำคัญของการสร้างตัวอ่อนและการเจริญพัฒนาของเซลล์ (Beacon and Davie, 2020)

การเกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันจะมีผลต่อบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนและส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของนิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ Transcription factor ต่างๆ ไม่สามารถเข้าจับกับโปรโมเตอร์เพื่อควบคุมการ transcription เป็นผลทำให้เกิด gene silencing ส่งผลให้มีการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Uysal et al., 2017) จากการศึกษาของ Zhang et al. (2018) ใช้พลาสมาเยนแบบ DBD ในไข่ฟักของไก่พื้นเมืองเกาหลี ที่อายุ 4 วัน ในระดับที่แตกต่างกัน คือ 11.7, 16.4, 22.0 และ 27.6 กิโลโวลต์ และใช้เวลาที่ต่างกันคือ 30 วินาที 1 นาที และ 2 นาที ในทุกระดับ ผลพบว่าการกระตุ้นด้วยพลาสมาเยนส่งผลให้ไก่ในกลุ่มที่ได้รับพลาสมา 22.0 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 1 นาที มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (Average daily gain; ADG) และความยาวของกระดูกแข้งเฉลี่ยยาวที่สุดในช่วงเดือนแรก และที่อายุ 90 วัน พบว่าไก่ในกลุ่มที่ได้รับพลาสมา 11.7 กิโลโวลต์ เป็นเวลา 2 นาที มีค่า ADG และความยาวหน้าแข้งสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น เป็นผลมาจากไก่กลุ่มที่ได้รับพลาสมาเยนมีระดับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในระดับต่ำ นอกจากนี้ยังมีการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ ภายในร่างกายมาทำการศึกษาค้นคว้ามีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมเพิ่มขึ้น และการแสดงออกของยีนเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (Kita et al., 2005) นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าการใช้พลาสมาเยนกระตุ้นการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (Zhang et al., 2017) พบว่าการใช้พลาสมาเยนในระดับที่เหมาะสมส่งเสริมการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองและการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ทั้งนี้เป็นผลจากกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ลดลง (DNA hypomethylation) มีผลทำให้ยีนที่ถูกยับยั้งการแสดงออกมีการแสดงออกได้ตามปกติ (Maeder et al., 2013) และส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้ไก่และเมล็ดถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเยน

อย่างไรก็ตามการศึกษาค้นคว้าผลของการใช้เทคโนโลยีพลาสมาเยนต่อกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตยังมีอยู่อย่างจำกัด และยังไม่เคยมีการศึกษาค้นคว้าการทำงานของยีน *DNMT1*, *DNMT3a* และ *DNMT3b* ในไก่พื้นเมืองไทยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาค้นคว้าผลของการกระตุ้นไข่ฟักด้วยพลาสมาเยนในระยะเวลาดังกล่าว ต่อการแสดงออกของยีน *DNMT1*, *DNMT3a* และ *DNMT3b* ในลูกไก่พื้นเมืองลูกผสมประดู่หางดำ ข้อมูลและองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากจะเป็นการช่วยอธิบายผลในระดับการแสดงออกของยีน จากการใช้เทคโนโลยีพลาสมาเยนในการผลิตสัตว์ปีกแล้ว ยังจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้ได้ดำเนินการที่ ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมการอาหารสัตว์ 3 และ 4 บริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด มหาชน ซึ่งวิธีการที่ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองทั้งหมดได้รับการรับรองโดย คณะกรรมการสถานดูแลและใช้สัตว์ทดลอง (Institutional Animal Care

& Use Committee - IACUC) ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมอาหารสัตว์ บริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด มหาชน เลขที่รับรอง FRIC-ACUP-2008005

สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

ในการศึกษานี้ทดลองโดยนำไขฟักอายุ 4 วัน ของไก่พื้นเมืองลูกผสมประดู่หางดำ จำนวน 1,056 ฟอง แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็น (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็นโดยใช้เครื่องสร้างพลาสมาเย็นที่มีแรงดันไฟฟ้า 6–10 kV ที่ความถี่ 700–900 kHz โดยใช้เวลาที่ต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 10 (P10) 20 (P20) และ 30 (P30) วินาที โดยการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็นทำเพียง 1 ครั้ง ตามวิธีการศึกษาของ Sakulthai et al. (2023) และนำเข้าฟักตามปกติ จากนั้นเมื่อลูกไก่ฟักออกวันแรก (Day Old Chick) สุ่มเก็บตัวอย่างโดยทำการการุณยฆาตกลุ่มละ 8 ตัว รวม 32 ตัว เพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ ขนาด 0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารรักษาสภาพ RNA (RNA later) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการสกัด RNA

การสกัด RNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อตับขนาด 0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol (Ribozol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม tissue lysis buffer 200 ไมโครลิตรและทำการ Homogenization ด้วยปิเปตตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นเติม Choroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าด้วยมือเบาๆ กลับไป-กลับมา นำไป centrifuge 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (หรืออุณหภูมิห้อง) นาน 15 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใสด้านบน (supernatant) ประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ tube ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนส่วนล่างติดมาด้วย เติม Isopropanol อัตราส่วน 1 : 1 (RNA : Isopropanol) นำไป centrifuge 12,000 rpm นาน 15 นาที จากนั้นเท Isopropanol ที่เติม 75 % Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1000 ไมโครลิตร) นำไป vortex และ centrifuge 7,500 rpm นาน 15 นาที เติสสารละลายส่วนของเหลวใสที่ (Ethanol) ออกให้หมด ระวังอย่าให้ตะกอน RNA บริเวณก้นหลอดตกหล่น ปิดฝา tube ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่าจะตะกอนจะใส เติม DEPC water (DNase/RNase free water) ปริมาตร 25 – 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (NanoDrop รุ่น 2000 Thermo Science, USA) ที่มีความยาวคลื่น A260 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-PCR

การสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-PCR โดยเริ่มจากปริมาณ RNA เริ่มต้น 1 ไมโครกรัม โดยใช้ชุดสกัด ReverTra Ace® qPCR RT Master mix with gDNA remover (TOYOBO, Japan) ซึ่งใช้ส่วนผสมคือ 4xDN Master Mix 2 ไมโครลิตร Nuclease – free water 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้มาเติม 5xRT Master Mix II 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง PCR T100™ Thermal Cycle (Bio-Rad) โดยกำหนดสภาวะที่ประกอบไปด้วย 37 องศาเซลเซียส 15 นาที 50 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 98 องศาเซลเซียส 5 นาที (Figure 1)

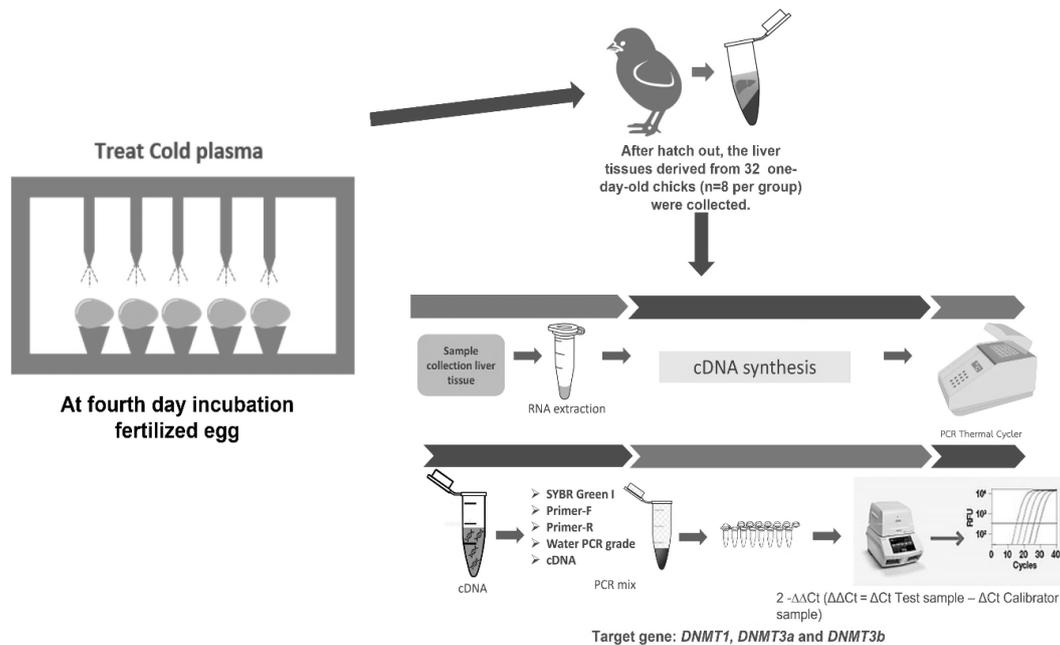


Figure 1 Description of the mechanism of the Non-thermal plasma technology and sample collection of liver tissue for gene expression studies.

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค End-point PCR

นำ cDNA ไปเพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *DNMT1*, *DNMT3a* และ *DNMT3b* โดยใส่ส่วนผสมของ 5x FIREPol® Master Mix Ready to Road (Solis BioDyne, Estonia), และไพรเมอร์ (Table 1) (ความเข้มข้น 10 uM) และ cDNA (ความเข้มข้น 40 µg/µl) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCRT100™ Thermal Cycle (Bio-Rad) โดยกำหนดสภาวะที่ประกอบไปด้วย 95 องศาเซลเซียส 3 นาที แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA เป็นจำนวน 45 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 40 วินาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และสิ้นสุดสภาวะที่ 4 องศาเซลเซียส นำผลปฏิกิริยาที่ได้มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR

นำ cDNA ไปเพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *DNMT1*, *DNMT3a* และ *DNMT3b* โดยใส่ลงในส่วนผสมของ LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Life Science, U.S.), ไพรเมอร์ (Table 1) ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Roche LightCycler (LC-480 Real-Time PCR System; Roche Life Science, U.S.) โดยกำหนดสภาวะที่ประกอบไปด้วย 95 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA เป็นจำนวน 45 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 60 องศาเซลเซียส 10 วินาที 72 องศาเซลเซียส 10 วินาที แล้วทำการเพิ่มอุณหภูมิทีละ 4.4 องศาเซลเซียส/วินาที โดยเริ่มจาก 65 องศาเซลเซียส 1 นาที และไปจนถึง 97 องศาเซลเซียส (Melting curve) และสิ้นสุดสภาวะที่ 40 องศาเซลเซียส 10 วินาที นำค่า Cycle threshold (CT) ที่ได้มาคำนวณ เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยสมการ Relative normalized expression $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Test sample} - \Delta Ct \text{ Calibrator sample}$) ที่ปริมาณสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *β-Actin* (Livak and Schmittgen, 2001)

Table 1 Primers used for amplification of the genes

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Reference
<i>β-actin</i>	GTG CGT GAC ATC AAG GAG AAG C	CCA CAG GAC TCC ATA CCC AAG A	Zhang et al. (2018)
<i>DNMT1</i>	ACA GCC TTC GCC GAT TAC A	CTC TCC ACC TGC TCC ACC AC	Li et al. (2016)
<i>DNMT3a</i>	GGA TAG CCA AGT TCA GCA AAG	GGG AAG CCA AAC ACC CTC T	Li et al. (2016)
<i>DNMT3b</i>	GTG CTG TGC CTT GAA CAT TG	TTC GTA ACT TCG GAA ACC ATT	Li et al. (2016)

* *DNMT1* = DNA methyltransferase 1, *DNMT3a* = DNA methyltransferase 3 alpha, *DNMT3b* = DNA methyltransferase 3 beta and *β-actin* = beta actin (Housekeeping gene)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่า Cycle threshold (CT) ที่ได้มาคำนวณ เพื่อวิเคราะห์การแสดงของยีน *DNMT1*, *DNMT3a* และ *DNMT3b* ด้วยสูตร Relative normalized expression $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ที่ปริมาณสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *β-actin* และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) และวิเคราะห์แบบ Multiple comparison with a Fisher's least significant difference (LSD) test โดยใช้กลุ่มที่ไม่ได้รับพลาสมาเย็นเป็นตัวเปรียบเทียบ (Control)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของยีน *DNMT1* และ *DNMT3a* ในกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมาเย็นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่การแสดงออกของยีน *DNMT3b* ที่ได้รับพลาสมาเย็นทั้ง 3 ระดับคือ 10 20 และ 30 วินาที มีการแสดงออกที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) (Figure 2) ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานและสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang et al. (2018) ที่ใช้พลาสมาเย็นในไข่มุกแล้วพบว่าพลาสมาเย็นมีผลต่อกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยในอนุภาคของพลาสมาเย็นจะมีอนุมูลอิสระในกลุ่มของ Reactive Oxygen Species (ROS) เหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อสารชีวโมเลกุล เช่น การเกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ และโปรตีนคาร์บอนิล (Davies, 1995) เมื่อเกิดความไม่สมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ จะนำไปสู่การเกิด Oxidative Stress ซึ่งส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ เรียกว่าการเปลี่ยนแปลงของเอพิเจเนติกส์ โดยกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันถือเป็นหนึ่งในเอพิเจเนติกส์เช่นกัน (Goldberg, et al., 1997; Cerda and Weitzman, 2007)

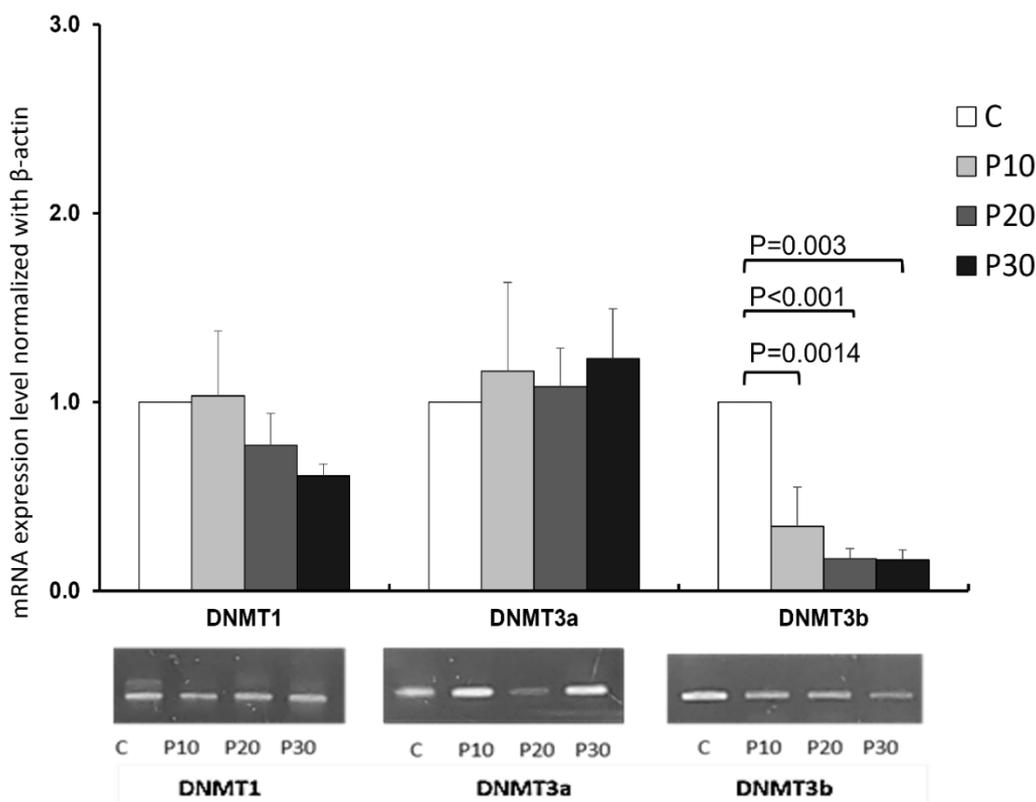


Figure 2 Relative mRNA levels of DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*), DNA methyltransferase 3 alpha (*DNMT3a*) and DNA methyltransferase 3 beta (*DNMT3b*) in liver tissues of 0 day-old in Thai native chicken. Data are presented as mean \pm SD (n=8); n represents an individual Thai native chicken according to the one-way ANOVA with a Fisher's least significant difference (LSD) test.

ยีน *DNMT* มีความสำคัญในระหว่างการพัฒนาตัวอ่อนและกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดย *DNMT1* ถือเป็นเมทิลทรานสเฟอเรสในการบำรุงรักษาที่สำคัญที่สุดในสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีหน้าที่ในการรักษาสถานะของเมทิลเลชันในสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่ในรุ่นลูก (Li et al., 2016) และมีบทบาทสำคัญในการสร้างความแตกต่างของเซลล์ตลอดจนถึงการแบ่งเซลล์ (Egger et al., 2006; Moore et al., 2012) ส่วน *DNMT3a* และ *DNMT3b* เมื่อมีการแสดงออกจะสามารถทำให้เกิดการเติมหมู่เมทิลทั้ง DNA สายเดิม และ DNA สายที่สังเคราะห์ใหม่ (Okano et al. 1999) ด้วยเหตุผลนี้ *DNMT3a* และ *DNMT3b* จึงถูกเรียกว่าเป็น *de novo* methylation (Ge et al., 2004; Riggs and Xiong, 2004) ถึงแม้ว่าทั้ง *DNMT3a* และ *DNMT3b* เป็น *de novo* methylation เหมือนกัน แต่การแสดงออกของยีนทั้ง 2 ในการพัฒนาของตัวอ่อนนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมาก ซึ่งการแสดงออกของยีน *DNMT3a* จะมีการแสดงออกค่อนข้างมาก และจำเป็นต่อการเจริญและการพัฒนาของเซลล์ ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าอนุภาคพลาสมาเย็นไม่มีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของ *DNMT1* ในการทำหน้าที่เพื่อรักษาสถานะของเมทิลเลชันในสายดีเอ็นเอ และการแสดงออกของ *DNMT3a* ในการทำหน้าที่สำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์ ส่วนการแสดงออกของ *DNMT3b* นั้น มีความเกี่ยวข้องอย่างมากในระหว่างการพัฒนาในช่วงต้น (Takeshima et al., 2006; Yen et al., 1992; Xie et al., 1999) ซึ่งมีการศึกษาของ Fernandez et al. (2020) ทำการศึกษาสถานะของเมทิลเลชันในเอ็มบริโอต่อการอยู่รอดของเซลล์ในไก่พบว่าการแสดงออกของยีน *DNMT3b* ที่มากเกินไปมีความสำคัญอย่างยิ่งกับการควบคุมการแสดงออกของยีน *Sox9* และ *Scleraxis* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความแตกต่างของเซลล์ และมีผลต่อการแสดงออกของยีน *Bak1* ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ โดยไก่จะมีลักษณะเฉพาะของการพัฒนาตัวอ่อน ซึ่งการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะแรก การเจริญเติบโต และการแยกออกเป็นเนื้อเยื่อเฉพาะจะเกิดขึ้นได้แม้ในไข่ที่ปฏิสนธิแต่ยังไม่ฟักไข่ (Patten, 1898) เมื่อเริ่มฟัก

ตัวการพัฒนาของตัวอ่อนจะดำเนินต่อไป ตัวอ่อนประกอบด้วยอวัยวะทั้งหมดที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตหลังจากการฟักไข่ (Zusman and Ornoy, 1990; Kavlock and Daston 1997; Hu et al., 1993) และเมื่อ *DNMT3b* มีการแสดงออกมากเกินไปจะส่งผลเสียต่อการพัฒนาของตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนแคระแกรนและตายได้ (Li, 2002; Jin et al., 2011) ซึ่งการศึกษาของ Li et al. (2016) ทำการศึกษาแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันในไก่ พบว่าการเกิดเมทิลเลชันมีระดับของการเกิดเพิ่มมากขึ้นในระยะของการพัฒนาของตัวอ่อนที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในระยะต่างๆ ของการพัฒนาของตัวอ่อนเพื่อจะดำเนินไปเป็นอวัยวะต่างๆ นั้นสำคัญอย่างมาก หากเกิดการเมทิลเลชันขึ้นจะไปยับยั้งการ transcription และนำไปสู่การขัดขวางการพัฒนาของตัวอ่อนได้

จากการศึกษาของ Zhang et al. (2018) พบว่ากระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันก่อนได้รับพลาสมาเย็นจะอยู่ในระดับสูง หรือ Hypermethylation ซึ่งมีผลทำให้การแสดงออกของยีนอยู่ในระดับที่ต่ำ (Jin and Robertson, 2011) และเมื่อมีการนำพลาสมาเย็นมาใช้ในไข่ฟักวันที่ 4 เป็นระยะที่ตัวอ่อนกำลังพัฒนา ทำให้กระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันอยู่ในระดับที่ลดลง หรือ Hypomethylation และส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันในรูปแบบของ global hypomethylation ซึ่งเป็นการลดการเติมหมู่เมทิลลงโดยทั่วไปในจีโนม ประกอบกับผลการศึกษานี้พบว่าการแสดงออกของยีน *DNMT3b* ที่เป็นเอนไซม์ในการเกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีการแสดงออกที่ลดลง อาจส่งผลทำให้กระบวนการเกิดเมทิลเลชันลดลงด้วย (Figure 3) ซึ่งการเกิด global hypomethylation จะกระตุ้นการ transcription ของยีน (Baylin et al., 2001) และในการศึกษาของ Zhang et al. (2018) ยังพบว่าการใช้พลาสมาเย็นมีผลกับการแสดงออกของยีน *TG*, *TPO* และ *THR*s ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพลังงานและการสังเคราะห์โปรตีนภายในร่างกายมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น โดยการควบคุมผ่านระดับ demethylation ที่เป็นการกำจัดหมู่เมทิลออกจากโมเลกุล ซึ่งเมื่อเกิดการ demethylation ก็จะทำให้การเกิดเมทิลเลชันอยู่ในรูปของ global hypomethylation นั้นเอง ก่อนหน้านี้นี้ยังมีการศึกษาการใช้พลาสมาเย็นในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตในระดับที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดการพัฒนาของเซลล์เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Kalghatgi et al., 2010; Kalghatgi et al., 2011; Kaushik et al., 2014) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Sakulthai et al. (2023) ใช้พลาสมาเย็นในไข่ฟักไก่ประดู่หางดำ พบว่าในไก่ที่อายุ 42 และ 63 วัน มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) และอัตราส่วนการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) ที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับพลาสมาเย็น

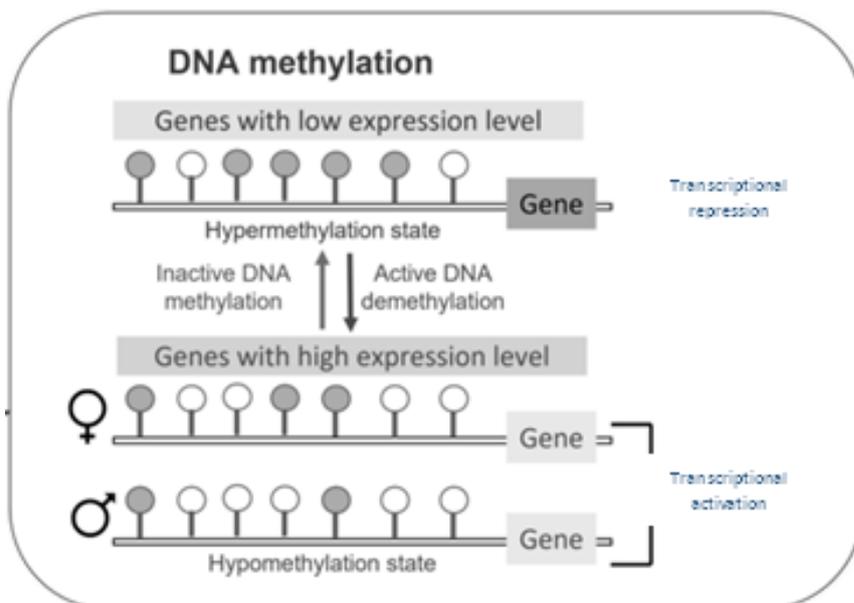


Figure 3 The hypothesis of Non-thermal plasma technology on DNA methylation. ● represent methylated cytosine, and ○ represent unmethylated cytosine (Reference).*ดัดแปลงจากงานของ Zhang et al. (2018)

สรุป

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคโนโลยีพลาสมาเย็นมีผลต่อการแสดงออกของยีน *DNMT3b* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีความสำคัญกับการพัฒนาและการอยู่รอดของตัวอ่อน เมื่อยีนดังกล่าวมีระดับการแสดงออกที่ลดลงทำให้เกิดการเกิดกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันอยู่ในระดับ Hypomethylation ส่งผลให้ Transcription factor ต่างๆ สามารถเข้าจับกับโปรโมเตอร์เพื่อควบคุมการ transcription ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนหรือสร้างได้มากขึ้นตามมา ส่งเสริมให้ตัวอ่อนมีการพัฒนาได้ดีขึ้นทำให้ไก่พื้นเมืองลูกผสมที่รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาเย็นมีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่า โดยเมื่อดูจากระดับการแสดงออกของยีนและแนวโน้มการเจริญเติบโตของลูกไก่แล้วพบว่า การกระตุ้นด้วยอนุภาคพลาสมาเย็นที่ 20 วินาทีส่งผลดีที่สุด ทั้งนี้เพื่ออธิบายกลไกการทำงานของพลาสมาเย็นจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเชิงลึกเพื่อเป็นองค์ความรู้สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาอื่นๆ ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณอุทยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์ ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมอาหารสัตว์ บริษัท ซีพีเอฟ (ประเทศไทย) จำกัด มหาชน และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมกรรมการเกษตรและปศุสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยเหลือ สนับสนุน ให้ความอนุเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (เลขที่สัญญา N41B650190)

เอกสารอ้างอิง

- ธีรวรรณ บุญวรรณ และหมุดตอเล็บ หนิสอ. 2562. พลาสมาเย็น (ว่าที่) เทคโนโลยีเพื่อเกษตรสีเขียวและอาหารปลอดภัย. แหล่งข้อมูล: <http://www.thaiphysoc.org/article/166/>. ค้นเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2563.
- ธิติมา เพ็ชรคง. 2560. ความหลากหลายทางพันธุกรรม การแสดงออกของยีนสมรรถนะการผลิต และคุณภาพเนื้อของไก่พื้นเมืองที่ตอบสนองต่อระดับโปรตีน. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก.
- Baylin, B. S., M. Esteller, R. M. Rountree, E. K. Bachman, K. Schuebel, and G. J. Herman. 2001. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics*. 10: 687–692.
- Beacon, H. T., and R. J. Davie. 2020. The chicken model organism for epigenomic research. *Genome*. 64: 476-489.
- Bird, P. A. 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Research*. 8: 1499–1504.
- Cerda, S., and S. A. Weitzman. 1997. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutation Research*. 386: 141–152.
- Davies, K. J. 1995. Oxidative stress: The paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*. 61: 1–13.
- Egger, G., S. Jeong, G. S. Escobar, C.C. Cortez, W. H. T. Li, Y. Saito, B. C. Yoo, A. P. Jones, and G. Liang. 2006. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(38): 14080–14085.
- Fernandez, S. C., L.C. Lorda-Diez, M. J. Hurlé, and A. J. Montero. 2020. The methylation status of the embryonic limb skeletal progenitors determines their cell fate in chicken. *Communications Biology*. 283.

- Ge, Y. Z., M. T. Pu, H. Gowher, H. P. Wu, J. P. Ding, A. Jeltsch, and G. L. Xu. 2004. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 25447–25454.
- Goldberg, A. D., C. D. Allis, and E. Bernstein. 2007. Epigenetics, a landscape takes shape. *Cell*. 128: 635–638.
- Hermann, A., R. Goyal, and A. Jeltsch. 2004. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 48350–48359.
- Hu, B. L., B. Lucio, and A. K. Schat. 1993. Abrogation of age-related resistance to chicken infectious anemia by embryonal bursectomy. *Avian Diseases*. 37: 157–169.
- Jaturasitha, S., T. Srikanchai, M. Kreuzer, and M. Wicke. 2008. Differences in carcass and meat characteristics between chicken indigenous to northern Thailand (Black-boned and Thai native) and imported extensive breeds (Bresse and Rhode Island Red). *Poultry Science*. 87: 160-169.
- Jiang, B., J. Zheng, S. Qiu, M. Wu, Q. Zhang, Z. Yan, and Q. Xue. 2014. Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chemical Engineering Journal*. 236: 348-368.
- Jin, B., Y. Li, and K. Robertson. 2011. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy. *Genes Cancer*. 6: 607–617.
- Kalghatgi, S., G. Friedman, A. Fridman, and A.M. Clyne. 2010. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Annals of Biomedical Engineering*. 38: 748–757.
- Kalghatgi, S., C. M. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, G. Friedman, and A.C. Jane. 2011. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One*. 2011: 16270.
- Kaushik, N. K, N. Kaushik, D. Park, and E. H. Choi. 2014. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment. *PLoS One*. 9: 103349.
- Kavlock, J. R., and P.G. Daston. 1997. Drug toxicity in embryonic development I: advances in understanding mechanisms of birth defects: morphogenesis and processes at risk. Springer.
- Kita K., K. Nagao, and J. Okumura. 2005. Nutritional and tissue specificity of IGF-I and IGFBP-2 gene expression in growing chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 18: 747–754.
- Livak, L. K., and D.T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*. 3: 662-73.
- Li, Q., N. Li, X. Hu, J. Li, Z. Du, L. Chen, G. Yin, J. Duan, H. Zhang, Y. Zhao, J. Wang, and N. Li. 2011. Genome-Wide Mapping of DNA Methylation in Chicken. *PLoS One*.
- Li, S., Y. Zhu, L. Zhi, X. Han, J. Shen, Y. Liu, J. Yao, and X. Yang. 2016. DNA Methylation Variation Trends during the Embryonic Development of Chicken. *PLoS One*.
- Lyko, F. 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*. 19: 81–92.

- Maeder, L. M., F.J. Angstman, E. M. Richardson, L. S. Linder, M. V. Cascio, Q. S. Tsai, H.Q. Ho, D.J. Sander, D. Reyon, E. B. Bernstein, F. J. Costello, F. M. Wilkinson, and K. J. Joung. 2013. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nature biotechnology*. 31: 1137–1142.
- Moore, L., T. Le, and G. Fan. 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 38: 23–38.
- Okano, K., D. Bell, D. Haber, and E. Li. 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*. 99: 247-257.
- Patten, B.M. 1898. *The Early Embryology of the Chick*. Philadelphia: P. Blakiston's Son and Co.
- Phillips, T. 2008. The role of methylation in gene expression. *Nature Education*. 1: 116.
- Riggs, D. A., and Z. Xiong. 2004. Methylation and epigenetic fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 4-5.
- Sakulthai, A., C. Sawangrat, D. Pichpol, J. Kongkapan, T. Srikanchai, R. Charoensook, P. Sojithamporn, and D. Boonyawan. 2023. Improving the efficiency of crossbred Pradu Hang Dam chicken production for meat consumption using cold plasma technology on eggs. *Scientific Reports*. 13: 2386.
- Takeshima, H., I. Suetake, H. Shimahara, K. Ura, S. Tate, and S. Tajima. 2006. Distinct DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards naked and nucleosomal DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 139: 503-15.
- Uysal, F., S. Ozturk, and O. Akkoyunlu. 2017. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *Journal of Molecular Histology*. 48: 417–426.
- Xie, S., Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. He, K. Okumura, and E. Li. 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 236: 87-95.
- Yen, W. R., M. P. Vertino, D. B. Nelkin, J.J. Yu, W. el-Deiry, A. Cumaraswamy, G.G. Lennonnet, J.B. Trask, P. Celano, and B. S. Baylin. 1992. Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 20: 2287–2291.
- Zhang, J. J., O. J. Jo, L. D. Huynh, K. R. Mongre, M. Ghosh, K.A. Singh, B. S. Lee, S. Y. Mok, P. Hyuk, and K. D. Jeong. 2017. Growth-inducing effects of argon plasma on soybean sprouts via the regulation of demethylation levels of energy metabolism-related genes. *Scientific Reports*. 7: 41917.
- Zhang, J. J., Z. X. Wang, T. Kwon, L. D. Huynh, N. Chandimali, N. Kim, Y.T. Kang, M. Ghosh, M. Gera, B. S. Lee, J.S. Lee, S.W. Lee, B.S. Kim, S.Y. Mok, and K.D. Jeong. 2018. Innovative Approach of Non-Thermal Plasma Application for Improving the Growth Rate in Chickens. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 2301.
- Zhang, J. J., L. H. Do, N. Chandimali, B. S. Lee, S. Y. Mok, N. Kim, B. S. Kim, T. Kwon, and K. D. Jeong. 2018. Non-thermal plasma treatment improves chicken sperm motility via the regulation of demethylation levels. *Scientific Reports*. 8: 7576.
- Zusman, I., and A. Ornoy. 1990. Embryonic resistance to chemical and physical factors: manifestation, mechanism, role in reproduction and in adaptation to ecology. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 65: 1–18.