บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ส่วนประกอบของไข่

ในสัตว์ปีกระบบการสืบพันธุ์มีลักษณะทางกายวิภาคและสรีรวิทยาที่แตกต่างจากระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาก กล่าวคือ มีการปฏิสนธิ (fertilization) ระหว่างไข่ (ovum) กับอสุจิตัวผู้ (sperm) เกิดขึ้นภายในท่อนำรังไข่ตัวเมีย และจะออกไข่มา ไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์แล้วจะถูกฟักภายนอกร่างกาย เจริญเติบโตอยู่ภายในฟองไข่ที่ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อตัวอ่อนอย่างเพียงพอ ส่วนประกอบทางเคมีของฟองไข่ แสดงในตารางที่ 2-1 ซึ่งไข่แดงจะประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ 48.0 % , โปรตีน 17.5 % , ไขมัน 32.5 % , และคาร์โบไฮเดรตเพียงเล็กน้อย 1.0 %

ตารางที่ 2 – 1. แสดงส่วนประกอบทางเคมีของไข่ไก่

ส่วนประกอบ	ไข่รวมเปลือก (%)	ไข่ไม่รวมเปลือก (%)	ไข่แดง (%)	ไข่ขาว (%)	เปลือกและเยื่อเปลือกไข่ (%)
ไข่ทั้งฟอง	100	-	31.0	58.0	11.0
น้ำ	65	75.0	48.0	87.0	2.0
โปรตีน	12	12.0	17.5	11.0	4.5
ไขมัน	11	11.0	32.5	0.2	-
คาร์โบไฮเดรต	1	0.5	1.0	1.0	-
เถ้า	11	1.5	1.0	0.8	93.5

ที่มา : North and Bell (1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การพัฒนาตัวอ่อนหลังการ Fertilization

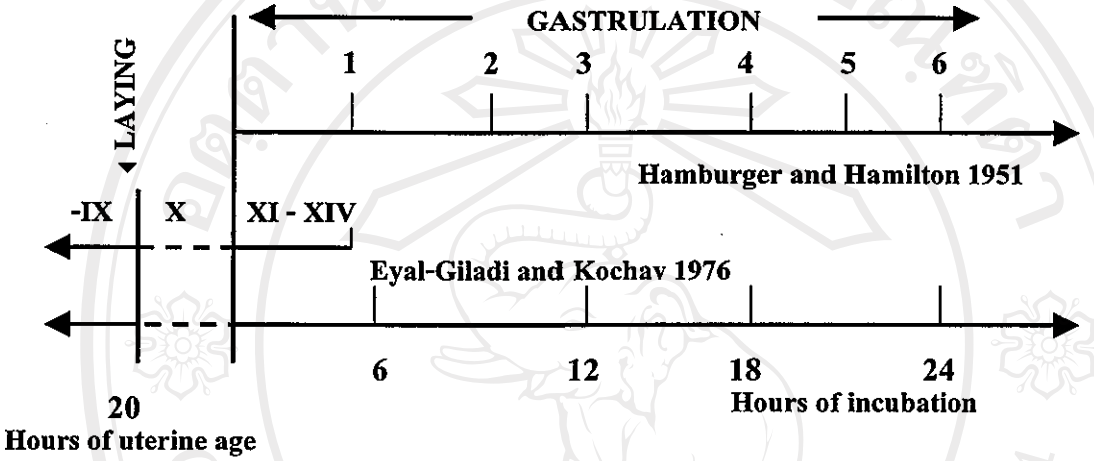
หลังจากไข่แดงตกลงมาในท่อนำไข่ส่วน Infundibulum แล้วประมาณ 15 นาที จะมีการเคลื่อนที่ของไข่แดงมาบริเวณท่อนำรังไข่ส่วน Magnum จะเกิดขบวนการ fertilization กับอสุจิของตัวผู้ เกิดการ fused รวมกันระหว่าง pronuclei ของทั้งสอง เกิดเป็นเซลล์ตัวอ่อนที่เรียกว่า Zygote ที่มีจำนวนเซลล์ 1 เซลล์ หลังจากนั้นภายใน 15 นาทีตัวอ่อนจะเคลื่อนที่เข้าสู่ท่อสร้างเยื่อเปลือกไข่ (Isthmus) ประมาณ 5-6 ชั่วโมงจากนั้น เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ครั้งแรกจากเซลล์ 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์หลังจากที่ ovum ได้รับ albumin และอีกประมาณ 20 นาทีจะเกิดการแบ่งเซลล์เป็นครั้งที่ 2 และ 3 จาก 2 เซลล์เป็น 4 และ 8 เซลล์ตามลำดับ การแบ่งเซลล์ครั้งที่ 4 จะเกิดหลังจากนั้นอีก 1 ชั่วโมง และตัวอ่อนจะเคลื่อนที่จากท่อสร้างเยื่อเปลือกไข่ไปยังท่อสร้างเปลือกไข่ (Uterus) และมีการแบ่งเซลล์เป็น 16 จนได้ 256 เซลล์ จะใช้เวลาในการสร้างเปลือกไข่ (eggshell formation) ประมาณ 22 ชั่วโมง (Petitte *et al.*, 1999)

ระบบการนับระยะการพัฒนาที่ออกแบบโดย Eyal-Giladi and Kochav (1976) ได้แบ่งระยะการพัฒนาของตัวอ่อน ขณะที่ตัวอ่อนอยู่ในระบบสืบพันธุ์ของไก่ (before laying) เป็นระบบตัวเลขโรมัน (Roman numberals) และระบบการพัฒนาของตัวอ่อนหลังจากออกจากตัวไก่แล้ว (after laying) จะนับเป็นระบบตัวเลขอารบิค (arabic numberals) ที่ออกแบบโดย Hamburger and Hamilton (1951) โดยการจัดกลุ่มการเจริญของตัวอ่อนไก่ ใช้ลักษณะที่ปรากฏเป็นพื้นฐาน เพื่ออธิบายลักษณะการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนจาก blastoderm จนกระทั่งฟักออกเป็นตัวลูกไก่แบ่งระยะได้ 46 stage แสดงดังภาพที่ 2–1 และตารางที่ 2–2

ขณะที่ไก่ออกไข่มา สารพันธุกรรมของพ่อแม่จะถ่ายทอดสู่ลูกจะอยู่ภายในโครโมโซมที่อยู่ใน blastodisc แสดงดังภาพที่ 2–2 และภาพที่ 2-3 ซึ่งเกิดจากการก่อตัวขึ้นที่ผิวเมมเบรน เรียก blastodisc นี้ว่า blastoderm ซึ่งจะลอยตัวอยู่บนไข่แดง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. และจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 40,000–60,000 เซลล์ (Burley and Vadehra, 1989; Etches *et al.*, 1997; Naito, 2003) ตัวอ่อนระยะนี้จัดอยู่ใน stage X จะประกอบด้วยจุดศูนย์กลาง (central) เซลล์มีลักษณะโปร่งแสงมี area pellucida ล้อมรอบกั้นส่วนไข่แดง และมีส่วน area opaca เป็นส่วนที่อยู่ระหว่างไข่แดงและ area pellucida เมื่อมีการฟักไข่ ส่วน area pellucida จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiates) เป็นเนื้อเยื่อ 2 ชั้น เรียกกระบวนการนี้ว่า gastrulation ชั้นบนเป็นชั้น epiblast และชั้นล่างๆ จะบางเรียกว่า hypoblast ซึ่งชั้น hypoblast จะกลายเป็นส่วนของชั้น Extraembryonic membrance ขบวนการก่อตัวของ hypoblast จะเกิดขึ้นระหว่างระยะการพัฒนา stage XI - XIII และที่ stage XIV/stage 2 จะมีการเกิดความหนาขึ้นทางด้านบน เกิดการก่อตัวของ primitive streak

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และมองเห็นเป็น 3 ชั้นเซลล์ แสดงดังภาพที่ 2–4 ส่วนของ streak จะขยายให้ hypoblast ยาวขึ้นทางด้าน anterior รวมกลายเป็นชั้นของ endoderm เรียกจุดนี้ว่าเป็น germinal crescent ส่วนนี้จะเห็นได้เป็นจุดแรกเรียก primordial germ cell



ภาพที่ 2 – 1. เปรียบเทียบระยะการพัฒนาของตัวอ่อนในระหว่าง 24 ชั่วโมงแรกของการฟัก (ดัดแปลงจาก : Harrisson *et al.*, 1988).

2.3 การพัฒนาของ Avian Primordial Germ cells (PGCs)

PGCs เป็น embryonic cells ที่พบในตัวอ่อนระยะแรกบริเวณ germinal crescent ซึ่งในขณะมีการพัฒนาของตัวอ่อน PGCs จะเคลื่อนที่จากบริเวณ germinal crescent ไปยัง gonad และพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (Petitte *et al.*, 1999) ดังนั้นการใช้ประโยชน์ทางหนึ่งของ PGCs เป็นการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของอีกสปีชีส์หนึ่งได้ในรูปของ chimeras การพัฒนาของ primordial germ cells เป็นเส้นทางแสดงดังภาพที่ 2–5 เมื่อเริ่มมีการพัฒนาเป็น pre-primitive streak เซลล์จะเคลื่อนที่ไปยัง hypoblast ระหว่าง stage XI -XIV และขณะที่มีการก่อตัวเป็น primitive streak ระยะ stage 3-4 hypoblast จะย้ายไปทางด้านล่างก่อตัวเป็น germinal crescent และในขณะอยู่ใน crescent ระยะ stage 6, 8, 12 และ germ cells จะแพร่ผ่าน (passive) เข้าสู่ระบบหมุนเวียน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

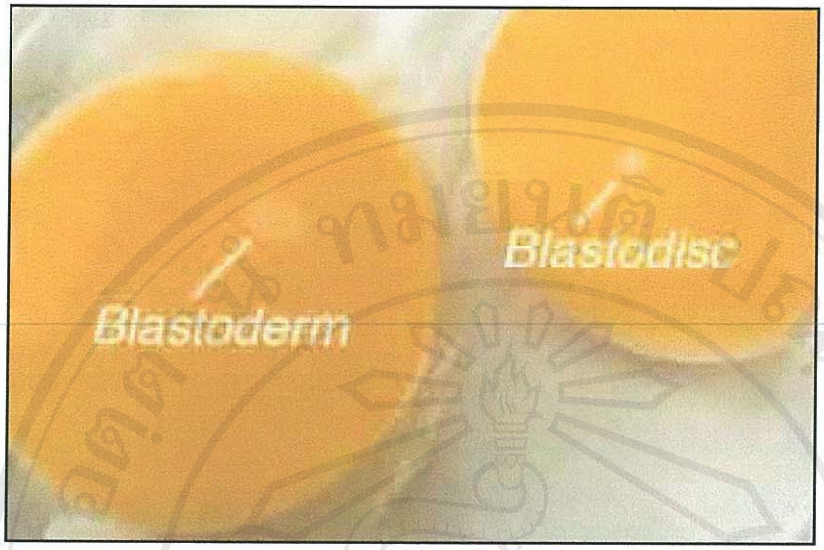
เลือด หลังจากนั้น germ cell จะออกจาก blood vessel ระยะ stage 15 แสดงดังภาพที่ 2–6 และเคลื่อนย้ายไปตลอด dorsal mesentery ของ gonad ในระยะ stage 20 และคงอยู่ใน germinal ridge

ตารางที่ 2 - 2. แสดง stage ของการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ในระยะ preoviposition และ Incubation

stage		อายุ	การพัฒนาของตัวอ่อน
Preoviposition			
X	24 hr uterine age		ฟอร์ม area pellucuda area opaca
XI	Koller's sickle		ฟอร์ม Koller's sickle
XII	Hypoblast		ฟอร์ม hypoblast ขึ้นทาง anterior
XIII	Complete hypoblast		Hypoblast เกิดสมบูรณ์แยกจาก area opaca
XIV	Posterior bridge		พัฒนาแนวเชื่อมระหว่าง hypoblast - area opaca
Incubation (Hamburger & Hamilton (HH) stage)			
3	Intermediate streak	12 – 13 hr	Streak ยืดไปทาง posterior ของ area pellucida
4	Definitive streak	18 – 19 hr	Primitive streak ยาว 1.8 มม. เกิด primitive groove , primitive pit , hensen's node
5	Head process	19 – 22 hr	Notochord หรือ หัว
7	A somite pair	23 – 26 hr	มี somite 1 คู่ , ระบบประสาท
10	Ten somites	33 – 38 hr	Somite คู่แรกขยายออก มีส่วนโค้งของกระโหลก และมีหัวใจ
12	Sixteen somites	45 – 49 hr	มี 16 somites มี audio pit , หัวใจพัฒนาเป็นตัวเอส
15	Limb bud	50 – 55 hr	เกิด limb primordia
17	Limb and leg buds	52 – 64 hr	มีปีก 2 ข้างและขา , เกิด nasal pit
20	Allantois vesicular	70 – 72 hr	มี allantois vesicular, eye pigmented
30	Feather germ	6.5 d	เกิด 2 แถวของ feather germ, egg-tooth

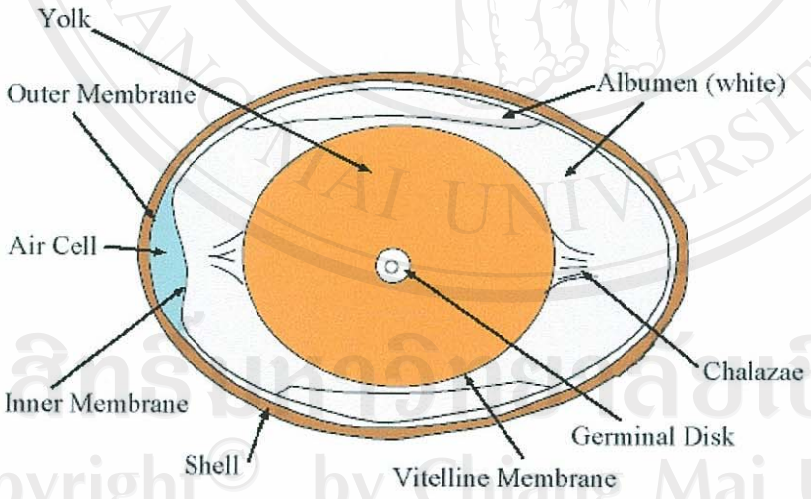
ดัดแปลงจาก : Wentworth *et al.* (1989)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 – 2. แสดง blastodisc หลังจากไก่ออกไข่มาใหม่

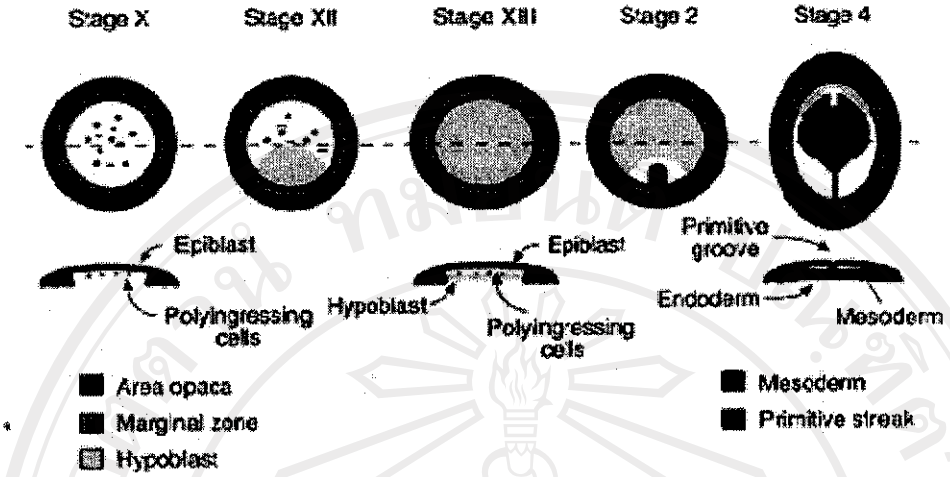
(ที่มา : http://ohioline.osu.edu/b633/b633_10. Html).



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

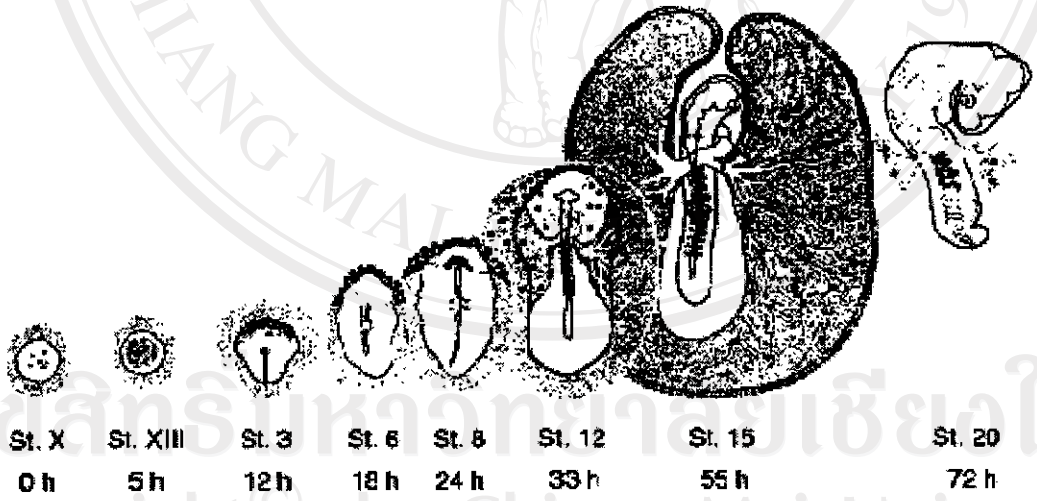
ภาพที่ 2 – 3. แสดงตำแหน่งของ germinal disc บนไข่แดง

(ที่มา : http://ag.ansc.purdue.edu/poultry/images/egg.GIF).



ภาพที่ 2 – 4. การพัฒนาตัวอ่อนระยะหลังการ fertilization

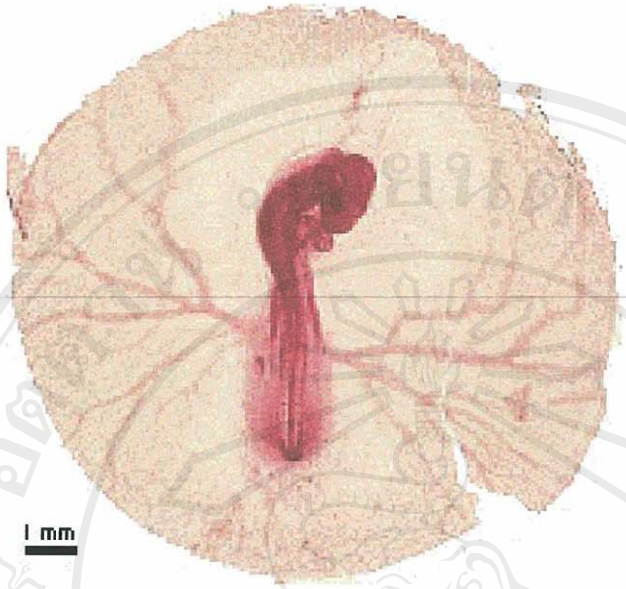
(ที่มา : Petitte *et al.*, 1999).



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 - 5. การพัฒนาของ Avian Primordial Germ Cells (PGCs)

(ที่มา : Petitte *et al.*, 1999).



ภาพที่ 2 – 6. ตัวอ่อนระยะ stage 15 (ที่มา http://anatomy.med.unsw.edu.au/cbl-/embryo/OtherEmb/Chicken.htm).

2.4 Embryonic Stem (ES) Cells

ก่อนการแยก ES cells จากตัวอ่อนระยะแรกก่อนการฝังตัว นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาลักษณะของ stem cells จากคุณสมบัติของเซลล์มะเร็งที่ได้จากการพัฒนา gonadal tomours ของหนู mice ที่เรียกว่า teratocarcinomas ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่เกิดขึ้นได้เอง และเป็นเซลล์ที่ undifferentiated embryonal carcinoma (EC) cells EC เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนและคงอยู่ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร และเมื่อทำการฉีด EC เข้าไปในช่องว่างของเซลล์ blastocyst ของหนู mice ตัวรับ พบว่าสามารถทำให้เกิดการรวมตัวกับเซลล์ของหนูตัวรับ เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อ ที่เกิดเป็นเซลล์มะเร็งได้ ด้วยลักษณะที่คล้ายคลึงกันระหว่างเซลล์ EC กับเซลล์ตัวอ่อนระยะแรก ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้คิดหาวิธีการผลิตเซลล์ที่มีลักษณะที่เหมือนกับเซลล์ EC โดยตรงจากเซลล์ตัวอ่อนระยะแรก โดย Martin (1981) อ้างโดย Anderson (1999) และ Evan and Kaufman (1981) สามารถแยก cell line จากตัวอ่อนหนูมาเพาะเลี้ยงได้ จึงเรียกเซลล์นี้ว่า embryonic stem (ES) cells และยังพบว่า ES cell มีความแตกต่างจาก EC cell คือสามารถอยู่รอดได้ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ระยะเวลานานกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

stem cell ถูกนิยามว่า เป็นเซลล์ที่มีความสามารถเพิ่มจำนวน (proliferation) ได้ด้วยตัวมันเองในสิ่งมีชีวิตที่โตเต็มวัยจะเป็นเซลล์ที่คงอยู่เพื่อทดแทนเซลล์ที่สูญเสีย หรือถูกทำลายไป เช่น เซลล์ผิวหนัง (epithelial cell) เซลล์ที่จำเพาะบางชนิดที่อยู่ระบบย่อยอาหาร เซลล์เม็ดเลือด เซลล์สมอง (olfactory epithelium) รวมไปถึงเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเมีย (Stern, 1996)

Embryonic stem (ES) cells เป็นเซลล์ชนิดหนึ่งซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว (preimplantation embryos) ES cells พบครั้งแรกจากตัวอ่อนของหนู mouse ระยะ blastocysts ที่แยกได้จากส่วนของเซลล์ Inner cell mass (ICM) และ/หรือจาก epiblast (Evan and Kaufman, 1981) stem cells สามารถที่จะแบ่งตัวระหว่างที่มีการพัฒนาเพิ่มขยายจำนวนของเซลล์และเกิดขึ้นในขณะที่มีการผลิตเซลล์ใหม่เข้ามาทดแทนอย่างไม่มีการจำกัด (self-renewal) นอกจากนี้ stem cells ยังมีความสามารถพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์หลายชนิดภายในสิ่งมีชีวิต (pluripotent) คือสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (germ cells) และเซลล์อื่นๆ ที่จะเจริญไปเป็นอวัยวะต่างๆ (somatic cells) (Pain *et al.*, 1996; Kooy and Weiss, 2000; Watt and Hogan, 2000) ES cells เป็นเซลล์ที่จำเพาะต่อการแสดงออกของยีน จึงเป็นเซลล์ที่ได้รับความสนใจในการที่จะนำเอาดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการถ่ายฝากเข้าไปในตัวอ่อน โดยการใช้ ES cells เป็นเซลล์เป้าหมายในการทำดัดแปลงพันธุกรรมอื่นเข้าสู่ตำแหน่งที่จำเพาะในจีโนม (genome) ของ ES cells และสามารถทำได้ดีกว่าเมื่อทำกับเซลล์อื่น พบมีความถี่ต่ำในการเกิด homologus recombinant จึงทำให้เกิดการแทนที่ของยีน และทำให้การแสดงออกของยีนที่แทนที่นั้นได้โดยสมบูรณ์ หรือเรียกว่าเกิดยีน knock out (Anderson, 1999) นอกจากนี้ ES cells ยังมีคุณสมบัติที่จะแบ่งตัวเป็นจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงดังนั้น ES cells จึงมีประโยชน์อย่างมากในการสร้างสัตว์ดัดแปลงพันธุกรรม เช่น มีรายงานใช้ hematopoietic stem cells ในการถ่ายยีน preproinsulin II (rI_2) พบว่าสามารถทำให้เกิดการลอกรหัส (transcription) ในตัวสัตว์ได้ (Shan and Jindal, 1999) เป็นต้น

Pluripotent stem cell ในสัตว์ปีกสามารถแยกได้จากการเพาะเลี้ยง primordial germ cells (PGC) (Perdersen, 1994; Wilmut *et al.*, 1999) PGC สามารถแยกได้จากแหล่งกำเนิดที่เนื้อเยื่อ endoderm ในส่วนที่เรียกว่า germinal crescent และพบ PGC บริเวณตำแหน่งที่มีการเคลื่อนที่ผ่านของ PGCs อีกด้วย จึงสามารถจัดกลุ่ม PGC ได้ 4 กลุ่มตามแหล่งที่พบ (Fujimoto *et al.*,1975; Hong *et al.*,1995; Tajima, 2002) คือ :

1. PGC พบในส่วนต้นกำเนิด germinal crescent
2. PGC พบในระบบหมุนเวียนเลือด (circulating PGC, cPGC)
3. PGC พบในเนื้อเยื่อ mesenchymal tissue (tPGC)
4. PGC พบใกล้กับบริเวณ gonadal primordium (gPGC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 การจำแนกเซลล์ต้นตอ (Embryonic stem cell)

วิธีการจำแนกลักษณะของ primordial germ cells หรือ embryonic stem cells มีการจำแนกได้ 3 วิธีการ คือ

1. การจำแนกตามลักษณะรูปร่างของเซลล์ (morphological) และส่วนประกอบภายในเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ หรือกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน Scan Electron Microscopy (SEM) โดยพบว่า PGC มีรูปร่างกลมใหญ่ ผิว cytoplasm ปกคลุมด้วย microvilli (Matsumura and England, 1993) เซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์เฉลี่ย 14 ไมครอน ถ้าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่จะพบมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ไมครอน และในขณะที่ PGC ที่แยกได้จากระบบหมุนเวียนเลือด พบว่ามีขนาดเซลล์เล็ก โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 ไมครอน PGC จะมีนิวเคลียสกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 8–9 ไมครอน โดยลักษณะของนิวเคลียสเป็นแบบ eccentric nucleus (Fujimoto *et al.*, 1975; Wentworth *et al.*, 1989; Yoshinaga *et al.*, 1993; Petitte *et al.*, 1999) และใน cytoplasm ของ PGC จะประกอบด้วยไกลโคเจน (glycogen) เป็นจำนวนมากในระยะตัวอ่อนระยะแรกจนกระทั่งมีอายุ 4 วัน (Fujimoto, 1975; Wentworth *et al.*, 1989; Ginsburg, 1997)

2. การจำแนกโดยวิธี Immunohistochemical method เป็นวิธีการจำแนกต่อแอนติเจนที่จำเพาะที่แสดงออกมาที่ผิวเซลล์ของ PGC ในระยะ non-differentiated หรือแอนติเจนนิกมาร์คเกอร์ (antigenic marker) โดยจะใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโครงสร้างของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน แสดงดังตารางที่ 2–3

3. การจำแนกวิธี *In vitro* differentiated คือวิธีการที่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างไปในสภาพแวดล้อมที่ไม่มี feeder cell หรือ trophic factor PGC ไม่สามารถยึดจับพื้นผิวของจานอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ ที่เรียกกระบวนการนี้ว่า differentiated ลักษณะของเซลล์ที่ differentiated ไปจะเรียกว่าเป็น Embryoid Body (EB) (Keller, 1995) ลักษณะของ EB ตรวจสอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ endoderm, mesoderm, ectoderm (Pain *et al.*, 1996; Park and Han, 2000) นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลแบบหนึ่งที่เรียกว่า RT-PCR สำหรับใช้ตรวจหา mRNA ของ α-, β-, ε-globin ที่แสดงมาจาก embryoid bodies และ villin ที่จัดเป็น endodermic marker (Pain *et al.*, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 – 3. Immunohistochemical marker สำหรับการจำแนก PGC ของไก่และนกกระทา

มาร์คเกอร์	PGC ใน	ลักษณะการจำแนก/ตำแหน่งที่จำเพาะ
i Den	ไก่	สาย Poly-N-acetyllactosamine
EMA-1	ไก่	Fuccosylated polylactosamine carbohydrate group
SSEA-1	ไก่	Galactose (β1-4) N-acetyl glucosamine (α1-3) fucose
QH1	นกกระทา	จากระยะ unincubated blastoderm – early primitive streak
FC10.2	ไก่	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc/GlcNAcβ1
Sialylate FC10.2	ไก่	SA-Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc/GlcNAcβ1
OLP	ไก่	Ovumucin-like protein
5D4	ไก่	Pentasulphate epitopes of glycosaminoglycan
NC-1/HNK-1	ไก่	สาย Sulphate 3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAc
2C9	ไก่	Carbohydrate
QCR1	นกกระทา	
AGC13	ไก่	
Vasa	ไก่	Chicken vasa homologue protein
c-kit	ไก่	Chicken KIT protein
WFA	นกกระทา	[β(1→4)-D-GlcNAc]$_2$, sialic acid
STA	นกกระทา/ ไก่	[β(1→4)-D-GlcNAc]$_2$
GS-II	ไก่	β-D-GlcNAc = α-D-GlcNAc

ดัดแปลงจาก : Yoshinaga *et al.* (1992); D'Costa *et al.* (2001); Tajima (2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การจำแนกโดยวิธี histochemical หรือ cytochemical method เป็นวิธีการย้อมสีเซลล์ที่จำเพาะ

วิธีการย้อมติดสี periodic acid-schiff (PAS) เป็นการย้อมสีของไกลโคเจน โดยพบว่า primordial germ cells จะมีส่วนประกอบของไกลโคเจนในเซลล์และผิวเซลล์สูง (Meyer, 1960; Fujimoto *et al.*, 1975; Wentworth *et al.*, 1989; Matsumura and England, 1993; Chang *et al.*, 1995; Pettite *et al.*, 1999; Park and Han, 2000; Han *et al.*, 2002; Naito, 2003)

วิธีการย้อมติดสี Alkaline phosphatase (AP) การใช้การย้อมติดสี AP จัดเป็นมาร์คเกอร์ตัวหนึ่งในการจำแนกเซลล์ระยะแรกๆ ของการพัฒนาของตัวอ่อน (Earliest developmental stage) ซึ่งพบว่าในเซลล์ที่ undifferentiated ES, EC จะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่พบจำนวนมาก โดยได้มีรายงานการใช้ AP ในการจำแนก mouse embryonic stem cell (Matsui *et al.*, 1992) ทำนองเดียวกันที่มีรายงานในไก่ (Pain *et al.*, 1996; Etches *et al.*, 1997) จึงเป็นวิธีที่สะดวกและนิยมการย้อมติดสีซับสเตทของ AP ที่ผลิตมาจากภายในเซลล์ของตัวอ่อนเพื่อจำแนก stem cells ในขณะที่เซลล์ยัง undifferentiated

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, Orthophosphoricmonoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1) (Mckenna *et al.*, 1979) ประกอบด้วยกลุ่มไกลโคโปรตีนที่จับอยู่บนผิวเซลล์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของ monophosphate ester ไปเป็นกรดฟอสฟอริค

Swartz (1982) ได้รายงาน alkaline phosphatase activity ใน PGC ในระยะ 2 วันแรกของการ incubated ซึ่งเป็นระยะที่ PGC มีการเคลื่อนที่มาที่ Extraembryonic blood vessel และใน dorsal mesentory

Talbot *et al.* (1993) รายงานว่าการจำแนกเซลล์ epiblast ของสุกรและแกะโดยใช้ AP เป็นมาร์คเกอร์ พบว่ามีการย้อมติดสี AP จำนวนมากในส่วนของเนื้อเยื่อชั้น endoderm ซึ่งอยู่รอบๆ เซลล์ epiblast และ AP จะไม่ได้ผลเมื่อเซลล์ epiblast แก่ตัวไปหรือเกิดการ differentiated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 การเพาะเลี้ยงและผลิต Germline Chimeras ในไก่

การผลิต chimeras โดยการนำเอาเซลล์ ES เข้าไปในเซลล์ตัวอ่อนตัวรับ พันธุกรรมของเซลล์ ES บางส่วนเท่านั้นที่ไปพัฒนาอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดลักษณะไปในรุ่นต่อไป (Germline chimeras) ได้เพื่อให้ได้ลักษณะ Germline chimeras จำเป็นต้องมีการคัดสายพันธุ์โดยการผสมกลับ (back crossing) (Tajima, 2002) ในรายงานที่มีการศึกษาการผลิต germline chimeras มีดังนี้ :

Wentworth *et al.* (1989) ได้ทำการแยก primordial germ cells จากนกกระทาในระยะ blastula จาก stage 7 germinal crescent, stage 17 blood และ stage 30 gonads เพาะเลี้ยงในอาหารชนิด modifed Dulbecco's medium พบมีเปอร์เซ็นต์ของ PGC 2, 0.03 และ 1.5 %, ตามลำดับทำการตรวจด้วยวิธีแอนติบอดีที่จำเพาะ และประสบความสำเร็จในการใช้ PGC เป็น gene transfer ในการผลิต autogenic quail ซึ่งเป็น chimeras ที่มีลักษณะ phenotype ที่แสดงออกเป็น tuxedo quail

Petitte *et al.* (1990) ทำการศึกษาการผลิต somatic และ germline chimeras ในไก่โดยแยกเซลล์ blastodermal cells จาก stage X ของไก่บาร์ พลีมัคร็อคที่มีขนสีดำ เป็นลักษณะด้อย นำไปฉีดในตัวอ่อนของไก่เล็กฮอร์น ระยะเดียวกัน พบว่า 6 ตัวใน 53 ตัวแสดงลักษณะ chimerism จากสีขนที่ปรากฏ และในจำนวนนี้มีตัวผู้ 1 ตัวมีชีวิตรอด จนผสมพันธุ์ เมื่อนำไปผสมกับไก่บาร์ พลีมัคร็อคตัวเมีย พบว่า มี 2 ตัวที่แสดง phenotype เป็นไก่บาร์ พลีมัคร็อค แสดงให้เห็นว่า germline สามารถที่จะถ่ายทอดมาได้จากเซลล์ตัวให้ได้

Carsience *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวไปเป็น germline ของ blastodermal cell จากตัวอ่อนตัวให้ ซึ่งเป็นไก่พันธุ์บาร์ พลีมัคร็อค เป็นพันธุ์ที่มีอัลลีลด้อย (recessive allele) บนตำแหน่ง (locus) I เพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เสริมด้วย 10 % fetal bovine serum แล้วทำการฉีดเซลล์จำนวน 100-400 เซลล์ไปในตัวอ่อนตัวรับ ซึ่งเป็นไก่พันธุ์เล็กฮอร์น ที่มีอัลลีลเด่น (dominant allele) โดยตัวอ่อนตัวรับจะได้รับการฉายรังสีแกมม่าปริมาณ 500-700 rads ที่ stage X ก่อนการฉีดเซลล์ พบว่ามีการพัฒนาของตัวอ่อนผ่านระยะ 14 วันได้ และมีการฟักออกเป็นลูกไก่ กลุ่มที่ฉีดจำนวน blastodermal cells 100 เซลล์ มีการเจริญไปเป็น somatic chimerism ที่มีลักษณะขนสีดำ 58 % กลุ่มที่ฉีด 200-400 เซลล์มี somatic chimerism 64 % และได้นำไก่ somatic chimeras ไปทำการผสมกลับกับไก่บาร์ พลีมัคร็อคที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ พบว่า มี 1 ตัวที่แสดงว่า donor-derived 100 % แสดงให้เห็นว่าการฉายรังสีตัวอ่อนตัวรับก่อนการฉีด blastodermal cells ของตัวให้ มีผลผลิตทั้ง somatic chimeric และ germline chimeric chicken สอดคล้องกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Etches *et al.* (1993) ได้ทำการศึกษาการผลิต chimeric chicken โดยเซลล์ blastodermal cells แยกได้จาก stage X ทำ genetically manipulated โดยใช้ lipofection-mediated gene transfer ก่อนนำไปฉีดในเซลล์ตัวอ่อนตัวรับที่ได้รับการฉายรังสี 490-680 rads ก่อนแล้ว หลังการฟักไปแล้ว 96 ชั่วโมงพบว่ามีการแสดงออกของ genetic modified ใน chimeras ที่ส่วนบริเวณ ectoderm, mesoderm และ endoderm

Thoraval *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษา somatic และ germline chicken chimeras โดยทำการแยก blastodermal cells ที่ stage X จากไข่ไก่เล็กฮอร์นสีน้ำตาลทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Medium199 ก่อนนำไปฉีดในตัวอ่อนของไก่เล็กฮอร์นสีขาวที่ระยะเดียวกันที่ได้รับการฉายรังสีแกมม่า จำนวน 550 rads แล้วพบว่า มีตัวอ่อนจำนวน 7.3 % ที่รอดจนถึงการฟักออก ในจำนวนนี้แสดงลักษณะ melanocyte ของตัวให้จำนวน 44 % เมื่อนำตัวอย่างเลือดไปตรวจวิเคราะห์ ดีเอ็นเอ โดยใช้ probe ที่จำเพาะกับ genome ของตัวให้ ก็ให้ผลสอดคล้องกับ chimeric chicken ที่แสดงลักษณะ melanocyte

Pain *et al.* (1996) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ blastoderm ตัวอ่อนของไก่และนกกระทาในระยะ stage X เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Glasgow-MEM ที่เสริมด้วย 10 % fetal bovine serum และจำแนกลักษณะของ Avian embryonic stem cells ด้วย multiple morphogenetic potentialities พบว่าเซลล์ที่มีลักษณะเป็น putative embryonic stem cells สามารถคงอยู่ได้ในหลอดทดลอง (*In vitro*) เกิดการ proliferation ได้เป็นระยะเวลานานเหมือนกับที่แสดงใน murine ES cells และยังสามารถเกิดการ differentiated ไปเป็นหลายชนิดเซลล์เมื่อทำการตรวจสอบทาง Immunohistochemical method หลายๆ ชนิด

Etches *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาแยก blastodermal cells จากไข่ที่ออกมาใหม่และยังไม่ได้ฟัก พบว่า blastodermal cells สามารถแสดงคุณสมบัติเป็น stem cells เมื่อทำการย้ายฝาก (transfer) จากตัวให้ (donor) ไปยังตัวอ่อนตัวรับสามารถกระจายตัวเจริญไปเป็นทั้ง somatic tissue และ germline และยังพบอีกว่า blastodermal cells ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จะแสดง epitopes ต่อ ECMA-1 และ SSEA-1 เหมือนกับที่แสดงออกใน embryonic stem cells ในหนู mouse

นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิต chimeras โดยใช้ blastodermal cell ข้ามสัตว์ปีกต่างสปีชีส์กันระหว่างนกกระทา และไก่ Ono *et al.* (1994) ใช้เซลล์ blastodermal เซลล์ของไก่เป็นเซลล์ตัวให้ฉีดเข้าไปตัวอ่อนตัวรับของนกกระทา พบลักษณะ chimeras เกิดขึ้นได้เช่นกัน

Naito *et al.* (1991) ได้ทำการศึกษาการผลิต quail-chick chimeras โดยการฉีด quail blastodermal cells จำนวน 1-5 ไมโครลิตร ไปใน subgerminal cavity ของไก่ พบว่า เปอร์เซ็นต์การฟักออกของไก่จะเพิ่มขึ้นจาก 8.6 % ไปเป็น 40.3 % เมื่อลดปริมาตรเซลล์ตัวให้ลง และมีจำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

quail-chick chimeras เกิดขึ้น 7 ตัวใน 86 ตัว โดยแสดงลักษณะที่จำเพาะของสีขนที่เหมือนกับนกกระทา

2.7 การตรวจสอบลักษณะ Quail-Chicken Chimeras

การจำแนกความแตกต่างของการแสดงออกของลักษณะ chimeras สามารถประเมินได้ 2 วิธี คือ

1. การประเมินลักษณะปรากฏ (phenotype) ที่แสดงออกมาที่ปรากฏภายนอกตัวสัตว์ หรือตามอวัยวะต่างๆ เช่น การแสดงลักษณะสีขนของนกกระทาในลูกไก่ที่ฟักออกเป็นตัว เป็นต้น

2. การประเมินทาง genetic ของเซลล์ตัวให้เพื่อผลที่ชัดเจนว่ามีการถ่ายทอดลักษณะของเซลล์ตัวให้ในตัวอ่อนตัวรับในตำแหน่งของอวัยวะต่างๆ (somatic cell) และการสืบทอดทาง germline สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการ Immunohistochemical method ใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะชนิด QCR1, QB2 ที่สามารถจำแนก optic nerves germ cell ของตัวอ่อนนกกระทาที่ระยะการฟักวันที่ 13 และ monoclonal antibody ชนิด 2C9 จำแนกเซลล์ gonads germ cell ของตัวอ่อนไก่วันที่ 6 Ono (2001) นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบลักษณะ Quail-chick chimeras ได้โดยมีการออกแบบ microsatellite primer บนตำแหน่ง LEI0171 locus บน Z chromosome สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอของ germ cell ของไก่และนกกระทาออกจากกัน primer ที่ออกแบบมาจะสามารถ amplified บน genomic DNA ของนกกระทาและไก่ได้แต่มีขนาดที่แตกต่างกัน (458 bp ในนกกระทา และขนาด 923 bpในไก่) Ono (2001)

นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ใช้ microsatellite primer ของไก่มาใช้ amplified DNA ของนกกระทาได้ Kayang *et al.* (2003) รายงาน 11 microsatellite loci ของไก่จาก 28 microsatellite สามารถ amplified DNA ของนกกระทาได้

Pang *et al.* (1999) รายงาน 11 microsatellite loci ของไก่จาก 48 microsatellite สามารถนำมา amplified DNA ของนกกระทาได้ในตำแหน่งที่แตกต่างไปจากของไก่ และจากจำนวน 11 microsatellite loci นี้ มี 3 loci คือ ADL0023, ADL0024, ADL0257 ที่เป็น monomorphic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved