บทที่ 5

วิจารณ์ผลและสรุปผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทา ที่แยกมาจากไข่ฟักมีเชื้อ จากวันที่ 0–7 นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด คือ IMDM และ MEM-G อาหารชนิด IMDM เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ myeloma cell ในห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาและเรดิโออิมมูโนแอสเซ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ส่วนอาหารชนิด MEM-G Pain *et al.* (1996) รายงานว่าใช้ในการเพาะเลี้ยง blastodermal cell ได้เป็นระยะเวลานาน

ในการศึกษาในครั้งนี้เซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาจากไข่ฟักแต่ละวัน นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดดังกล่าวเติม 10 % fetal calf serum และ antibiotic นับจำนวนเซลล์เริ่มต้น และทุกๆ วันของการเลี้ยงตลอดระยะเวลา 14 วัน อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMDM ให้ผลการเจริญของทั้งตัวอ่อนไก่และนกกระทาที่ดีกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM-G เนื่องมาจากองค์ประกอบของสูตรอาหารทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบส่วนประกอบต่างๆ ในสูตรอาหารทั้งสองชนิดพบว่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM-G ไม่มีส่วนประกอบของ non-essential amino acid บางชนิดคือ L-Aspartic acid, Glycine, L-Serine และ L-Proline non-essential amino acid แม้จะไม่ใช่ amino acid ที่จำเป็นอันดับต้นๆ ของเซลล์แต่ก็มีความสำคัญ L-serine เป็นตัวหนึ่งที่เซลล์มีความต้องการใช้มีความถี่สูง เพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์ (Han and Mckeehan, 1979) L-serine มีรายงานของ Savoca *et al.* (1995) พบว่ามีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์หลายชนิด รวมทั้ง neuronal chicken cell ที่ใช้ความเข้มข้นของ L-serine 100 ไมโครโมลในการเพาะเลี้ยง ทำนองเดียวกัน Proline, Glycine และ aspartic acid ก็มีความจำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ให้เป็นปกติ (Han and Mackeena, 1979) ในบางกรณีที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มี non-essential amino acid หรือมีในสัดส่วนที่น้อย จะมีการใช้ essential amino acid มาทดแทน เพื่อลดการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เป็นไนโตรเจนมาก ที่เกิดจากการใช้ non-essential amino acid และนอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีส่วนประกอบของไวตามิน คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Biotin และ vitamin B12 ซึ่งไวตามินทั้งสองชนิดดังกล่าวมีผลต่อการเจริญของตัวอ่อน โดย Wilson (1997) ได้รายงานว่า Biotin เป็นไวตามินที่จำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อนให้ดำเนินไปเป็นปกติ แต่เมื่อขาดจะทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนได้สูงที่สุดก่อนวันที่ 5 ของการพัฒนา และ vitamin B12 ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน คือการขาดจะทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนสูงขึ้นในระยะ 2 สัปดาห์แรก ด้วยองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMDM ที่ส่งเสริมการเจริญและจำเป็นที่มากกว่าต่อเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทา ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMDM จึงให้ผลการเจริญที่ดีกว่า

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเซลล์ตัวอ่อนจากไข่ฟักวันที่ 0 ทั้งสองชนิดมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่สูงกว่า 40,000 – 60,000 เซลล์ ในระยะ stage X หลังจากไข่ออกจากตัวแม่ไก่ (Burley and Vadehra, 1989; Etches *et al.*, 1997; Naito, 2003) อาจเนื่องมาจากไข่ฟักมีการสัมผัสกับอุณหภูมิที่สูงขึ้นขณะที่มีการขนส่งจากฟาร์มมาสู่ห้องปฏิบัติการจึงให้เป็นการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว จึงทำให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นของตัวอ่อนไก่และนกกระทาสูง และเมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มการเจริญของเซลล์ตัวอ่อนทั้งสองชนิด พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากที่เริ่มต้นเลี้ยงจนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง แล้วค่อยๆ ลดลงตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าเซลล์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้น แต่พื้นในการเลี้ยงคือ หลุมของ culture plate มีบริเวณจำกัด อีกทั้งปริมาณอาหารในหลุมก็มีจำกัดคงที่ 1 มิลลิลิตรตลอดการทดลอง จำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น แต่อาหารมีปริมาณจำกัด จึงเกิดการแก่งแย่งอาหารกันเพื่อการเจริญ เซลล์ที่ได้รับอาหารก็มีการเจริญต่อไปได้ แต่เซลล์ที่ไม่มีโอกาสได้อาหารก็จะตายไป ทำให้สัดส่วนเซลล์ที่รอด มีจำนวนเซลล์ลดลงด้วย และปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนอีกด้านหนึ่งที่ส่งผลให้จำนวนเซลล์ลดลง อาจเกิดจากปัจจัยที่เกิดจากเซลล์ตัวอ่อนเองที่มีการผลิตสารที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากขบวนการภายในเซลล์ คือพวก Intrinsic cellular metabolism เช่น แอมโนเนียม ซึ่งจะเกิดผลเป็นพิษต่อเซลลที่อยู่บริเวณใกล้เคียงทำให้เซลล์ที่สัมผัสเกิดการตายได้ (Garder and Lane, 2000) และนอกจากนี้ยังอาจเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมที่เซลล์ได้รับมีสภาพที่ไม่ได้รับการส่งเสริมให้เกิดการเจริญได้ตามปกติ เพราะในอาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาในงานทดลองครั้งนี้ไม่ได้เสริมพวก growth factor หรือ cytokine ที่พบว่าสารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของเซลล์ตัวอ่อนทำให้เกิดการ proliferation หรือเกิดการ differentiated ของ ES cell ไปได้โดยมีรายงานการเสริม growth factor ในอาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนซึ่งใช้ growth factor ชนิด basic fibroblast growth factor (bFGF) (Matsui and Hogan, 1992; Chang *et al.*, 1995; Keller, 1995; Uchida *et al.*, 1995; Pain *et al.*, 1996; Etches *et al.*, 1997; Park and Han, 2000; Han *et al.*, 2002), leukemia inhibitory factor (LIF) (Matsui and Hogan, 1992; Chang *et al.*, 1995; Keller, 1995; Uchida *et al.*, 1995; Pain *et al.*, 1996; Park and Han, 2000; Han *et al.*, 2002), stem cell factor (SCF) (Matsui

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and Hogan, 1992; Pain *et al.*, 1996; Etches *et al.*, 1997; Karcgenc and Petitte, 2000; Park and Han, 2000; Han *et al.*, 2002), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Chang *et al.*, 1995; Pain *et al.*, 1996; Etches *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2002), interleukin-11 (IL-11) (Pain *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2002), cilialyneutrophic factor (CNTF) (Pain *et al.*, 1996; Karcgenc and Petitte, 2000), interleukin-6 (IL-6) (Pain *et al.*, 1996), oncostatin M (OSM) (Pain *et al.*, 1996) ส่งผลให้เซลล์ตัวอ่อนไก่คงสภาพและสามารถเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน ผลของ growth factor และ cytokine เหล่านี้ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ undifferentiated จะเป็นแบบ self-renewal โดยจะมีผลผ่านทาง signal transducer ที่บริเวณผิวเมมเบรนจะมี receptor ที่จำเพาะต่อ LIF และ LIF (family-OSM, IL-6, CNTF) จะจับกับ LIF receptor ส่วน cytokine ตัวอื่นจะจับกับ glycoprotein 130 (gp130) receptor เมื่อจับกันกับ receptor แล้วจะเกิดการกระตุ้น Janus-associated (JAK) tyrosine kinase แล้ว JAK ไปมีผลกระตุ้น signal transducers and activated of transcription 3 (STAT3) เกิด tyrosine phosphorylation ทำให้เกิดการ transcription ของ factor STAT3 เพิ่มขึ้นจะไปมีผลทำให้เกิด self-renewal ของเซลล์ undifferentiated และกรณีที่ไม่มี LIF family ก็จะเกิดอีก pathway ที่ตรงกันข้ามโดยการทำงานจะผ่าน signal transducer ไปกระตุ้น Gab1 ซึ่งจะไปจับกับ SHP2 adapter แล้วไปกระตุ้น ERK activation Erk1/2 จะให้ผลยับยั้งการเกิด self-renewal (Smith, 2001; Burdon *et al.*, 2002; Donovan and de Miguel, 2003)

ในกรณีที่เซลล์ตัวอ่อนสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ในระยะ 4 วันแรกจนจำนวนเพิ่มสูงที่สุดในสภาพที่ปริมาตรอาหารมีจำนวนจำกัด และในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มีการเสริม growth factor หรือ cytokine ที่จำเป็นเช่น LIF เป็นต้นนั้น แสดงว่าตัวเซลล์เองก็มีการหลั่ง growth factor หรือ express matrix-associated form of LIF ออกมามีผลแบบ autocrine และ paracrine ตัวเซลล์เองจึงเป็น trophic factor ทำให้เกิด self-renewal ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ (Mountford *et al.*, 1998; Janowska-Wieczorek *et al.*, 2001; Smith, 2001) ทั้งนี้ผลของ signal ที่เกิดขึ้นทำนองนี้จะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของเซลล์ (cell density) เมื่อจำนวนของเซลล์มากขึ้นหรือหนาแน่นเกินไป จำนวนของเสียจากเซลล์ก็เป็นพิษต่อเซลล์ (Garder and Lane, 2000) ทำให้จำนวนเซลล์ลดลง

การศึกษาการจำแนกเซลล์ต้นตอ (stem cell) โดยการย้อมติดสีเซลล์ alkaline phosphatase และการวัด alkaline phosphatase activity ให้ผลบวกในทุกเซลล์ตัวอ่อนจากไข่ไก่และนกกระทามีเชื้อฟักจากวัน 0 - 7 ซึ่งผลสอดคล้องกับ (Swartz, 1982; Matsui *et al.*, 1992; Pain *et al.*, 1996; Etches *et al.*, 1997) เนื่องจากไม่มีเซลล์ ES จากแหล่งที่ยืนยันชัดมาเป็นเซลล์ควบคุมดังนั้น ในการย้อมสีเซลล์กลุ่มควบคุมจึงใช้เซลล์ myoepithelial cell จาก mammary gland ของหนู rat เป็น positive control ซึ่งเป็นที่ยืนยันแล้วว่าเซลล์ที่มีการผลิต alkaline phosphatase ออกมามากบนส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

basal, lateral membrane ของ secretory epithelial cell และส่วน endothelial cell (Soloff, 1982; Leung *et al.*, 1989) และใช้เซลล์ adipose tissue ซึ่งเป็นเซลล์แก่ของไก่เป็น negative control ผลการย้อมติดสี AP ของ positive cell (myoepithelial cell) ติดสีดำเข้มบริเวณผิวเซลล์ และเซลล์ adipose tissue จะติดสีจางๆ การย้อมติดสีของ negative control ซึ่งเป็นเซลล์แก่นั้นอาจเนื่องมาจากภายในเซลล์อาจยังมีกระบวนการเซลล์เพื่อแบ่งเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายไป เอนไซม์ alkaline phosphatase จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ที่มีขบวนการ undifferentiation Talbot *et al.* (1993) จึงทำให้มีการผลิตเอนไซม์ alkaline phosphatase มาที่ผิวเซลล์อยู่บ้างจึงเกิดการย้อมติดสีจางๆ ของเซลล์ negative control จากการวัดผล alkaline phosphatase activity จะเห็นได้ว่าค่า activity ของ negative control ก็ยังมีค่าน้อยอยู่ สอดคล้องกับผลการย้อมติดสี alkaline phosphatase อยู่เล็กน้อย เมื่อเทียบกับ positive control หรือกลุ่มเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาที่เลี้ยงในทั้งสองชนิดอาหาร

ในการศึกษาผลการฉีดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาไปในไข่ไก่ตัวรับเพื่อผลิตไก่ chimeras แบ่งเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 และ 2 ไข่ตัวรับไม่ได้รับการฉายรังสีโคบอลท์ 60 แต่จำนวนเซลล์ที่ฉีดจะแตกต่างกัน โดยใช้เซลล์ตัวอ่อนนกกระทาจำนวน 100–40,000 เซลล์ จำนวนลูกไก่ฟักออกเป็นตัวสูงสุด 33.3 % และ 16.7 % จากการฉีดจำนวนเซลล์ 200 และ 1,600 เซลล์ ในการทดลองที่ 1 และ 2 ตามลำดับ คล้ายคลึงกับ Speksnijder and Ivarie (2000) ฉีดจำนวนเซลล์ 500 – 1,000 เซลล์ แล้วมีเปอร์เซ็นต์ฟักออก 32.3 % จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การฟักออกเป็นลูกไก่จะมีความแปรปรวนจากจำนวนเซลล์ที่ฉีด ถ้าจำนวนเซลล์ที่ฉีดมากกว่า 3,200 เซลล์จะไม่มีการพัฒนาเป็นลูกไก่เลย แต่ก็มีรายงานของ Etches *et al.* (1990) ที่ใช้ blastodermal cell จำนวน 200–500 เซลล์ฉีดไปในตัวอ่อนไก่ตัวรับเพื่อผลิตไก่ chimeras แต่พบเปอร์เซ็นต์การฟักออกต่ำ (7.5 %) ในการทดลองที่ 3 ไข่ไก่ตัวรับจะได้รับการฉายรังสีโคบอลท์ 60 ที่ระดับ 0, 300, 500 และ 1000 rads และไม่ได้รับการฉีดเซลล์เลย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การฟักออกเป็นลูกไก่ 50 %, 28.6 %, 33.3 %, 0 % ตามลำดับ ระดับการฉายรังสีมีผลต่อการฟักออก ระดับการฉายรังสีที่มากกว่า 500 rads จะทำตัวอ่อนตายหมด สอดคล้องกับ Carsience *et al.* (1993) ที่ระดับการฉายรังสี 898 rads จะไม่พบเปอร์เซ็นต์การฟักออกเลย และระดับรังสี 552 rads จะมีเปอร์เซ็นต์ฟักออก 36.1 % และรายงานของ Thoraval *et al.* (1994) ระดับการฉายรังสี 700–800 rads ไม่มีการพัฒนาของตัวอ่อนเลย นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Maeda *et al.* (1998) การฉายรังสีและการฉีดเซลล์จะมีผลต่อการตายของตัวอ่อน 52 % ในขณะที่การฉีดเซลล์อย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อน 41 % และในการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 3 การทดลองมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูงทั้งกลุ่มที่ไม่เปิดหน้าต่าง หรือกลุ่มที่ทำการเปิดหน้าต่าง ในกลุ่มที่ไม่เปิดหน้าต่าง การปนเปื้อนอาจเกิดจากการติดเชื้อจากตู้ฟักที่ไม่ได้อยู่ในสถานที่ปลอดเชื้อถึงแม้จะทำการฆ่าเชื้อก่อนการนำไข่เข้าฟักแล้ว แต่โอกาสที่เชื้อจากอากาศจะเข้าไปปนเปื้อนในไข่ก็มีสูงด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่นกัน ในกลุ่มที่เปิดหน้าต่างจะพบเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนและการปนเปื้อนสูงกว่า เนื่องมาจากการจัดการกับ inner shell membrane ของตัวอ่อนขณะทำการเปิดหน้าต่าง ถ้าเครื่องมือที่ใช้ไม่ปลอดเชื้อจริง โอกาสที่จะนำเชื้อเข้าไปสู่ตัวอ่อนมีสูงด้วย อีกปัจจัยหนึ่งการจัดการกับไข่ขณะทำการเปิดหน้าต่างของไข่ จะทำให้ไข่ได้สัมผัสกับบรรยากาศและอากาศจากภายนอกที่เข้าไป จึงเกิดความเครียดโดยตรงกับตัวอ่อน และเมื่อปิดหน้าต่างด้วย artificial air cell จะเป็นการเติมอากาศให้กับของเหลวภายในไข่ จึงเกิดอันตรายกับตัวอ่อน (Etches *et al.*, 1997; Speksnijder and Ivarie, 2000) เมื่อพิจารณาผลการเกิดลักษณะ somatic chimeras ในลูกไก่ที่ฟักออกแล้ว ไม่พบในการทดลองในครั้งนี้ อาจมีผลมาจากปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จ คือ ปัจจัยในด้านการจัดการฟองไข่เมื่อทำการเปิดหน้าต่าง Speksnijder and Ivarie (2000) รายงานว่าการหยด Phosphate buffer saline ไปบน inner shell membrane เพื่อกำจัดอากาศระหว่างการเปิดหน้าต่าง ก่อนจะตัดเมมเบรมจะทำให้การเกิด somatic chimeras เพิ่มขึ้นจาก 36.8 % จากการไม่หยดเป็น 46.3 % ปัจจัยของตำแหน่งของการฉีดก็มีผล Maeda *et al.* (1997) รายงานว่าตำแหน่งการฉีดเซลล์ควรอยู่ที่ระดับความลึกประมาณ 200 ไมครอน ซึ่งจะเป็นตรงตำแหน่งระหว่าง epiblast กับไข่แดง ซึ่งโอกาสที่จะประสบผลสำเร็จต่ำเนื่องมาจากการฉีดเซลล์ไปในตำแหน่งที่ลึกลงไปจนถึงไข่แดงเป็นส่วนมาก และวิธีการฉีดที่ประสบผลสำเร็จมากขึ้นนั้น Bednrczyk *et al.* (2000) รายงานว่าการตั้งไข่ไว้ในตำแหน่ง point end down ทิ้งไว้ 5–7 วันก่อนการเจาะหน้าต่างทางด้านป้านของไข่แทนจะเพิ่มโอกาสให้เปอร์เซ็นต์การฟักออกเป็นลูกไก่สูง 41 % เทียบกับวิธีการที่ทำทั่วๆ ไป 9.8 % ตามลำดับ

การศึกษาผลการเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ที่ไม่มีการฟักออก เมื่อเคาะเทียบกับแผนภาพการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ปกติ ทั้ง 3 การทดลอง มีระยะการพัฒนาเฉลี่ยของตัวอ่อน, ขนาดความกว้าง ความยาวลำตัวเฉลี่ยที่ใกล้เคียงกัน ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาคือ การจัดการฟองไข่เพื่อเปิดหน้าต่าง (Etches *et al.*, 1997; Speksnijder and Ivarie, 2000) ทำให้เกิดความเครียดต่อตัวอ่อนและส่งผลต่อการพัฒนาทำให้ไม่สามารถฟักออกเป็นตัวได้ แต่ระยะการพัฒนาเฉลี่ยในการทดลองที่ 3 มีแนวโน้มที่ต่ำกว่าการทดลอง 1 และ 2 เป็นไปได้จากการได้รับการฉายรังสีโคบอลท์ 60 จะทำให้มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนได้ช้ากว่าตัวอ่อนปกติประมาณ 24 ชั่วโมง (Carsience *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1998) สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 3 นี้

การศึกษาผลไมโครแซทเทลไลท์ของไก่ เพื่อตรวจสอบการเกิดลักษณะ chimeras ที่เกิดจากการฉีดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ตำแหน่ง ADL0024 Pang *et al.* (1999) รายงานว่าสามารถ amplified DNA ของนกกระทาได้ขนาด 206 คู่เบส และของไก่ได้ 145 คู่เบส ในไก่ทดลองทั้ง 3 การทดลองพบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 9 อัลลีล ขนาดตั้งแต่ 147–163 คู่เบส โดยความถี่อัลลีลที่พบมาก คือ 157 คู่เบส และในไก่ควบคุมพบอัลลีลที่ขนาด 153 คู่เบส นก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระทาพบที่ขนาด 286 คู่เบส พบว่าในไก่ควบคุมและไก่ทดลองมีขนาดใกล้เคียงกับรายงาน และไมโครแซทเทลไลท์ตำแหน่ง ADL0257 สามารถ amplified DNA ของนกกระทาได้ขนาด 118 คู่เบส และของไก่ได้ 187 คู่เบส ตามรายงานของ Pang *et al.* (1999) ในการศึกษาพบว่าในไก่ควบคุมมีขนาด 171 คู่เบส และนกกระทาพบ 125 คู่เบส ในไก่ทดลองทั้ง 3 การทดลองพบอัลลีล 16 ตำแหน่ง ขนาดตั้งแต่ 167–285 คู่เบส โดยอัลลีลที่มีความถี่มาก คือ 167 คู่เบส จะเห็นได้ว่ามีขนาดแตกต่างกับที่รายงานไว้ อาจเนื่องมาจากไก่และนกเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างกันที่ใช้ในรายงาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทา ชนิด IMDM เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม เพราะให้ผลการของเซลล์ตัวอ่อนทั้งสองดีกว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM-G

2. เซลล์ตัวอ่อนไก่จากไข่มีเชื้อฟักวันที่ 1 ให้ผลการเจริญดีกว่าเซลล์ตัวอ่อนวันอื่นๆ

3. เซลล์ตัวอ่อนนกกระทาจากไข่มีเชื้อฟักวันที่ 1 และ 2 ให้ผลการเจริญดีกว่าเซลล์ตัวอ่อนวันอื่นๆ

4. การจำแนกเซลล์ต้นตอ (ES) โดยวิธี alkaline phosphatase staining สามารถจำแนกเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาที่แยกได้จากไข่มีเชื้อฟักวันที่ 0 – 7 จากการเพาะเลี้ยงได้ โดยให้ผลเป็นบวกทุกเซลล์ และจากการวัดผล alkaline phosphatase activity ประกอบกับการย้อมติดสี เซลล์ตัวอ่อนไก่จากไข่มีเชื้อฟักวันที่ 0 และ 1 ให้ผลการเป็น ES มากกว่าเซลล์วันอื่นๆ และในเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาพบว่าเซลล์จากไข่มีเชื้อฟักวันที่ 5 ให้ผลการเป็น ES มากเมื่อพิจารณาจากค่า alkaline phosphatase activity

5. การศึกษาการผลิตไก่ chimeras

- จำนวนเซลล์ตัวให้ที่เหมาะสมใช้ฉีดให้กับเซลล์ตัวอ่อนตัวรับ คือ 200 เซลล์ จะให้ผลการฟักออกเป็นลูกไก่สูงที่สุด 33.3 %
- การฉายรังสีโคบอลท์ 60 สำหรับไข่ตัวรับก่อนการฉีดเซลล์ตัวให้ ระดับการฉายรังสีที่เหมาะสม คือ 500 rads ที่สามารถให้ผลการพัฒนาของตัวอ่อนไปจนฟักออกเป็นตัวลูกไก่สูงสุด 33.3 %

6. การใช้ไมโครแซทเทลไลท์มาร์คเกอร์ตำแหน่ง ADL0024 และ ADL0257 เป็นมาร์คเกอร์ในการตรวจสอบลักษณะการเกิดไก่ chimeras ที่จะเกิดจากการฉีดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาเข้าไปในเซลล์ตัวอ่อนไก่ สามารถนำมาจำแนกความแตกต่างระหว่างเซลล์ไก่และนกกระทาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อเสนอแนะ

1. การแยกเซลล์ blastodermal cell จากไข่ โดยการใช้ filter paper จะเป็นวิธีที่จะลดการปนเปื้อนของไข่แดงที่ปนมากับเซลล์ได้ เพราะในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไซริงค์พลาสติกเป็นตัวดูดเซลล์ จะมีไข่แดงปนมามาก ต้องใช้ระยะเวลาในการล้างจำนวนมากครั้ง

2. ควรพิจารณาเสริม growth factor เช่น LIF, bFGF, SCF ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพราะเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ตัวอ่อน ทำให้เซลล์ตัวอ่อนเกิดการ proliferation และคงอยู่ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นระยะเวลานานจนกระทั่งจะมีการนำเซลล์ไปใช้งาน

3. การเจาะหน้าต่าง เพื่อป้องกันความเครียดของตัวอ่อนจากการสัมผัสกับอากาศภายนอก การหยด phosphate buffer saline ก่อนเพื่อกำจัดอากาศที่เข้าไปในฟองไข่ อาจปรับปรุงการผลิตไก่ chimeras ได้ดีขึ้น

4. การฉีดเซลล์ตัวอ่อนเข้าไปเซลล์ตัวอ่อนตัวรับ ควรมีการพิจารณาระดับความลึกของการฉีดที่ประมาณ 200 ไมครอน และการตั้งไข่ในแนว point end down ทิ้งไว้ 5–7 วันก่อนการฉีด จะเพิ่มโอกาสให้ประสบผลสำเร็จในการผลิตไก่ chimeras ให้สูงขึ้นได้

5. การจำแนกเซลล์ต้นตอ ด้วยมาร์คเกอร์ มากกว่า 1 ชนิดจะทำให้เพิ่มความเชื่อมั่นและมีความจำเพาะมากกว่าในการเลือก primordial germ cell มาใช้ในการผลิตไก่ chimeras ซึ่งโอกาสจะประสบความสำเร็จมากกว่าการใช้เซลล์ blastodermal cell

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved