บทที่ 10
การขยายพันธุ์สัตว์เลี้ยงด้วยเทคโนโลยีการสืบพันธุ์อื่น

บทนำ

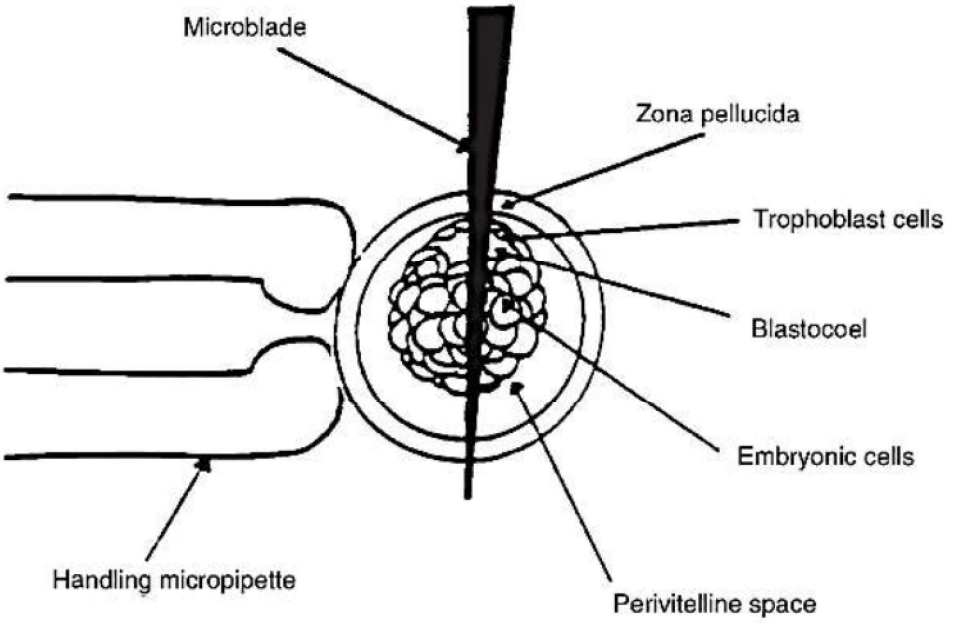
ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการศึกษาและพัฒนาการใช้เทคโนโลยีในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ ซึ่งหมายถึง การคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของสัตว์ ไม่ว่าจะเป็นสัตว์บก สัตว์น้ำ และสัตว์ปีก เช่น โค กระบือ สุกร เป็ด ไก่ และปลา มีการนำเทคโนโลยีด้านการผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน การโคลนนิ่ง พันธุวิศวกรรม หรือเทคโนโลยีขั้นสูงอื่นๆ มาใช้เพื่อปรับปรุงสัตว์ตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

การสร้างสัตว์เหมือน (Cloning)

การโคลนนิ่ง คือการผลิตสัตว์ให้มีลักษณะทางกายภาพ (phenotype) และทางพันธุกรรม (genotype) เหมือนกัน (มงคล, 2543) ตามธรรมชาติการเกิดลูกที่มากกว่า 1 ตัวในโค มีโอกาสเกิดน้อยมาก การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) เหนี่ยวนำให้เกิดลูกแฝดจากการตกไข่มากกว่า 1 ฟอง ลูกที่เกิดออกมาจะไม่เหมือนกัน ก็มักจะได้ผลน้อย มีผู้ใช้เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนทำให้เกิดลูกแฝดที่ไม่เหมือนกันโดยใส่ตัวอ่อนเข้าไป 2 ตัว แต่การที่ทำให้แม่ต้องอุ้มท้องลูกมากกว่า 1 ตัว มีความจำเป็นต้องดูแลตลอดจนการทำคลอดต่างจากการมีลูกเพียงตัวเดียว และยังอาจจะเกิดปัญหาเรื่องฟรีมาร์ดิน (Freemartin) อันจะเป็นผลให้ตัวเมียเป็นหมัน อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ไม่หยุดยั้งที่จะผลิตลูกแฝดออกมาด้วยวิธีการดังนี้ (เทวินทร์, 2542)

1. การตัดแบ่งตัวอ่อน (Splitting of embryo)

เป็นวิธีการต่อเนื่องจากการผลิตตัวอ่อนมาจากตัวแม่เมื่อซะล้างออกมาส่องกล้องตรวจดูคุณภาพ แล้วตัดตัวอ่อนที่อยู่ในระยะมอรูล่าหรือ blastocyst ที่มีคุณภาพดี (มงคล, 2543) นำมาตัดครึ่งด้วยใบมีดขนาดเล็ก (micro manipulator) ที่สะอาดปราศจากเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำตัวอ่อนที่ถูกผ่าแล้วแยกไปฝากให้ตัวรับ ตั้งท้องจนครบกำหนดคลอด ลูกที่ออกมาจะมีหน้าตาเหมือนกัน แต่การผลิตลูกแฝดเช่นนี้มีข้อจำกัดที่สามารถผลิตได้เพียง 2-4 ตัว เนื่องจากหากตัดแบ่งมากเกินไปจะทำให้เซลล์เหลือไม่พอที่จะเจริญเติบโตต่อไป



ภาพที่ 10.1 การตัดแบ่งตัวอ่อนระยะ blastocyst
ที่มา: Gordon (2005)

2. การย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer)

มีการค้นพบการย้ายฝากนิวเคลียสตั้งแต่ปี ค.ศ. 1938 โดย Speeman มีความคิดที่ว่าเซลล์ที่มีในร่างกายไม่ว่าจะเป็นเซลล์ส่วนไหนของร่างกาย เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ตับ เซลล์ไต ฯลฯ จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพ (differentiation) จากเซลล์ดั้งเดิมทั้งสิ้น คือบลาสโตเมียร์ของตัวอ่อน ซึ่งหมายความว่า เซลล์ทุกเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์ชนิดอื่นได้ หรือที่เรียกว่า “topipotent cell” การที่เซลล์มีความสามารถดังกล่าวจึงเรียกว่า “topipotent” ในการทำโคลนนิ่งด้วยการย้ายฝากนิวเคลียสในสัตว์จึงใช้เซลล์ของตัวอ่อน (บลาสโตเมียร์) หรือเซลล์ที่เปลี่ยนสภาพมาจากเซลล์ของตัวอ่อนเป็นนิวเคลียสตัวให้ ตัวอย่างเช่น อินเนอร์เซลล์แมส หรือเซลล์ตัวอ่อนต้นตอ เป็นต้น ทั้งนี้เพราะทุกนิวเคลียสของตัวอ่อนหนึ่งตัวอ่อนมีพันธุกรรมเหมือนกัน เนื่องจากเกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ๆ เดียว แบบไมโทซิสหลังเกิดการรวมตัวระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย (มงคล, 2543)

การย้ายฝากนิวเคลียสเป็นการเพิ่มจำนวนสัตว์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นเหมือนกันจำนวนมากอาจเรียกว่า Embryo Multiplication and Transfer (EMIT) เกิดจากการตัดแยกตัวอ่อนในระยะ blastocyst และนำไข่ที่ฝ่อ (degenerated) มาดูดเอานิวเคลียสออก แล้วผ่าตัดส่วนของตัวอ่อนที่ตัดใส่เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (zona pellucida) ต่อมามีการค้นคิดการปลูกถ่าย

เซลล์ร่างกายสัตว์ทำให้เกิดเป็นลูกแกะและลูกโค โดยวิลมุท (Wilmut) และคณะ ใน ค.ศ. 1997 เป็นผู้ทดลองผลิตลูกแกะโคลนนิ่งออกมาเป็นครั้งแรกของโลก จากเซลล์ตัวอ่อนแกะพันธุ์โพลดอร์เซท (Poll Dorset) อายุ 9 วัน และใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) จากตัวอ่อนแกะพันธุ์แบลคเวลช์ (Black Welsh) ที่มีอายุ 26 วัน ต่อมาใช้เซลล์จากต่อมน้ำนม (mammary epithelium) ของแม่แกะพันธุ์ฟินน์ดอว์เซท (Finn Dorset) ที่อยู่ในระหว่างการตั้งท้อง นับว่าเป็นลูกแกะตัวแรกที่เจริญเติบโตมาจากเซลล์ร่างกายของสัตว์ที่โตแล้ว (Gordon, 2005)

ปัจจุบันการย้ายฝากนิวเคลียสใช้กระต่ายเป็นสัตว์ทดลองมากกว่าหนูเมาส์เพื่อพัฒนาเทคนิค และได้ให้เหตุผลว่าเนื่องมาจาก (มงคล, 2543)

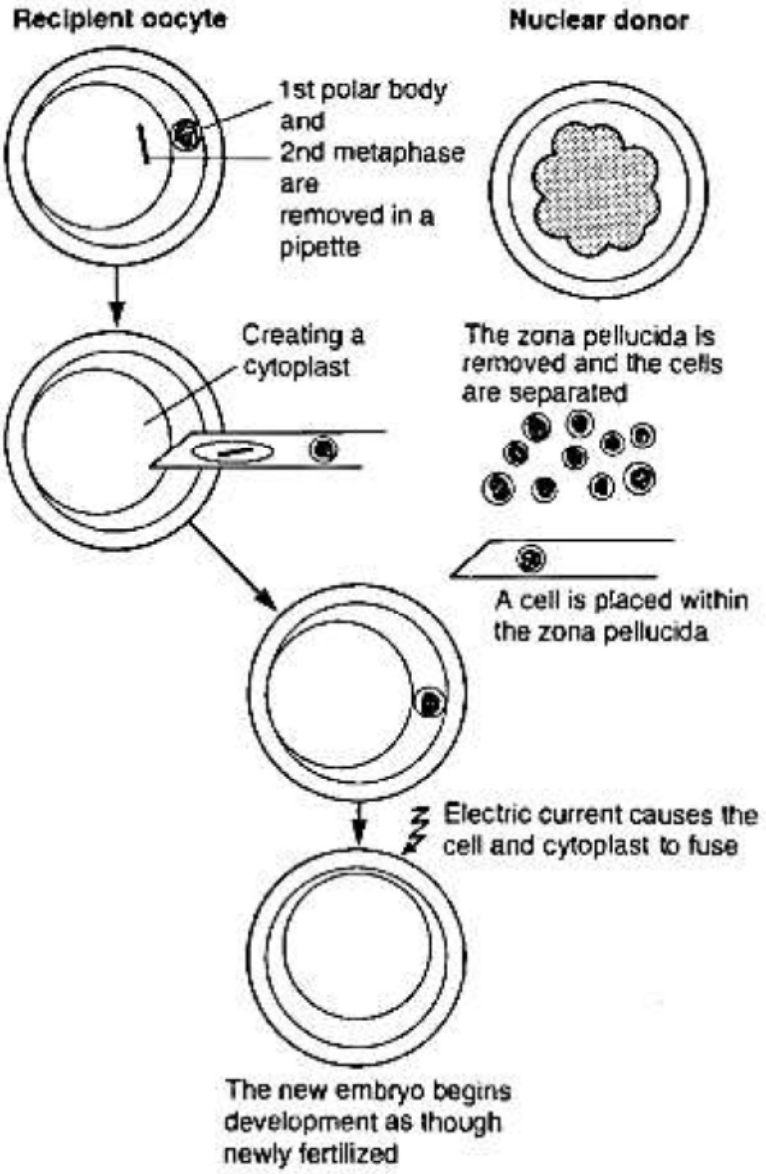
1. กระต่ายเป็นสัตว์ที่ตกไข่เมื่อได้รับการผสมพันธุ์ (induced ovulation) ดังนั้นจึงง่ายต่อการกำหนดเวลาในการตกไข่ โดยเฉพาะการทดลองเรื่องอายุของโอโอไซต์ต่อผลการย้ายฝากนิวเคลียส หรือระยะตัวอ่อนที่แน่นอนที่ต้องการนำเอาเซลล์มาทำเป็นนิวเคลียสตัวให้ เช่น 1-4 เซลล์ พบหลังผสม 24 ชั่วโมง 16-32 เซลล์ พบหลังผสม 48 ชั่วโมง ระยะมอรูล่า พบหลังผสม 56 ชั่วโมง และระยะบลาสโตซีส พบหลังผสม 96 ชั่วโมง

2. การต่ายเป็นสัตว์ที่ผลิตโอโอไซต์หรือตัวอ่อนได้มากในคราวเดียวกัน โดยเฉพาะเมื่อมีการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

3. มีระยะตั้งท้องสั้น ประมาณ 30.5 วัน ทำให้วัดผลการศึกษาได้รวดเร็วกว่าโคถึง 9 เท่า ซึ่งเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดู เป็นที่ประมาณการว่าตัวอ่อนโคจากการปฏิสนธิตามธรรมชาติมีราคาแพงกว่าตัวอ่อนกระต่ายประมาณ 30 บาท

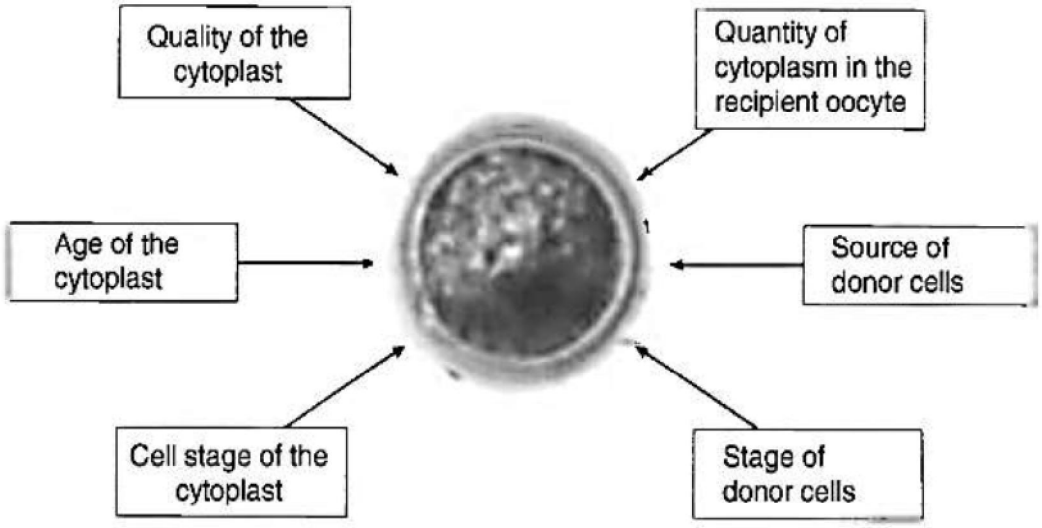
4. ระบบการตรวจสอบการพัฒนาตัวอ่อนของกระต่ายในหลอดทดลองเป็นระบบที่ง่ายและเป็นระบบที่ได้พัฒนามาอย่างดี ตัวอ่อนของกระต่ายเมื่อเลี้ยงในหลอดทดลอง ไม่ต้องอาศัยการเลี้ยงแบบร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (co-culture) แบบในโคเพื่อผ่านระยะหยุดตัว

5. ตัวอ่อนของกระต่ายมีระยะการเปลี่ยนแปลงของการควบคุมทางพันธุกรรมจากตัวแม่ไปยังไซโกต ในระยะเวลาเดียวกันกับตัวอ่อนของสัตว์เศรษฐกิจอื่นๆ



ภาพที่ 10.2 การย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer)

ที่มา: Gordon (2005)



ภาพที่ 10.3 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer)
ที่มา: Gordon (2005)

การคัดแยกเพศอสุจิ

การคัดแยกเพศอสุจิ (X and Y Chromosome-Bearing Sperm Separation)

การแยกเพศตัวอสุจิที่มีโครโมโซม X ออกจากอสุจิที่มีโครโมโซม Y เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยาก ถึงแม้ว่าอสุจิที่มีโครโมโซม X จะมีรูปร่างของส่วนหัวและนิวเคลียสแตกต่างจากอสุจิที่มีโครโมโซม Y และลักษณะการว่ายแตกต่างกัน แต่ในทางปศุสัตว์ค่อนข้างจะแยกออกจากกันได้ยากต่างจากในมนุษย์ หรือแม้กระทั่งความไวต่อการเป็นกรดด่าง ที่สามารถกำหนดเพศในมนุษย์ได้ ก็ยังไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเพศของลูกโดยวิธีการนี้ได้ จนถึงปัจจุบันมีการใช้เครื่อง flow-cytometry ที่ได้รับการวิจัยอย่างในช่วงต้นทศวรรษ 1980 ที่สถาบันวิจัยการแพทย์แห่งชาติในลอนดอนและเกิดสิทธิบัตรมอบให้กับสถาบันนั้นในปี 1986 ครอบคลุมทั้งยุโรปและแคนาดา ในสหรัฐอเมริกา เทคโนโลยีการคัดแยกเพศคิดค้นโดยจอห์นสัน ที่กระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (USDA) การวิจัยของ Beltsville ศูนย์ได้รับการจดสิทธิบัตรในปี 1989 เทคโนโลยีต่อมาได้รับใบอนุญาตจาก USDA สำหรับใช้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในสองประเภท คือ มนุษย์และสัตว์ ในมนุษย์สถาบันพันธุศาสตร์และ IVF ในเมืองแฟร์แฟกซ์ รัฐเวอร์จิเนีย เคยได้รับใบอนุญาตให้ใช้สิทธิบัตรทางการคัดแยกเพศในปี 1994 และเทคโนโลยีนี้ ช่วยการเจริญพันธุ์ของมนุษย์ ใบอนุญาตทางด้านสัตว์ ได้รับในภายหลัง

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศ

เพศในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกกำหนดโดยปริมาณโครโมโซมเพศ ตัวเมีย มีโครโมโซม XX และตัวผู้มีโครโมโซม XY ซึ่งเห็นได้ชัดว่าได้รับอิทธิพลจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม อสุจิที่มีโครโมโซม X และ Y ถูกสร้างออกมาในจำนวนที่เท่ากัน

แนวทางในการแยกน้ำเชื้อที่มีโครโมโซม X และ Y มีความแตกต่างกันดังนี้

1. มวลของอสุจิ
2. ความสามารถในการเคลื่อนที่
3. DNA ที่มีความแตกต่างกัน
4. ประจุไฟฟ้าที่ผิวของอสุจิ
5. คุณสมบัติของ antigen

หลักการแยกเพศของอสุจิ X และ Y ในน้ำเชื้อ ทำได้ดังนี้

1. การแยกอสุจิที่มีโครโมโซม X และ Y โดยอาศัยความแตกต่างของมวลอสุจิและความสามารถในการเคลื่อนที่ โดยการคำนวณว่าโครโมโซม Y ของคน โค และสุกร มีขนาดเล็กกว่าโครโมโซม X ประมาณ 2.8, 4.2 และ 3.6% ตามลำดับ นอกจากนี้มีการคำนวณว่าอสุจิเพศผู้วิ่งเร็วกว่าเพศเมีย 0.15% และตกตะกอนช้ากว่า 1% หลักการดังกล่าวจึงเกิดวิธีการแยกชนิดอสุจิ ดังนี้

Albumin gradient โดยการเทอสุจิลงบนชั้นของ albumin ซึ่งแยกเป็นหลายชั้น โดยเชื่อว่าอสุจิที่มีโครโมโซม Y จะผ่านชั้นต่างๆได้ดีกว่า แต่ก็มีรายงานที่ให้ผลไม่สนับสนุนแนวคิดดังกล่าว เนื่องจากโครโมโซม X และ Y ยังอยู่ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน

Percoll density gradients percoll เป็นเม็ด colloidal solica ที่ห่อหุ้มด้วยโพลี่ไวนิล ไพโรลิโดน ซึ่งสามารถแยกอสุจิที่เคลื่อนไหวออกมาได้ เมื่อทำเป็นชั้นความเข้มข้นก็จะสามารถแยกอสุจิได้ตามความสามารถ โดยเทน้ำเชื้อลงบนพื้นผิว ใช้วิธีการปั่นอสุจิ ตัวอสุจิที่มีน้ำหนักมากจะลงมาข้างล่างได้เร็วกว่า ดังนั้นโดยหลักการแล้ว พบว่าเมื่อทำการปั่น ตัวอสุจิที่เป็นตัวผู้จะอยู่ด้านบน ตัวอสุจิที่เป็นตัวเมียจะอยู่ด้านล่าง

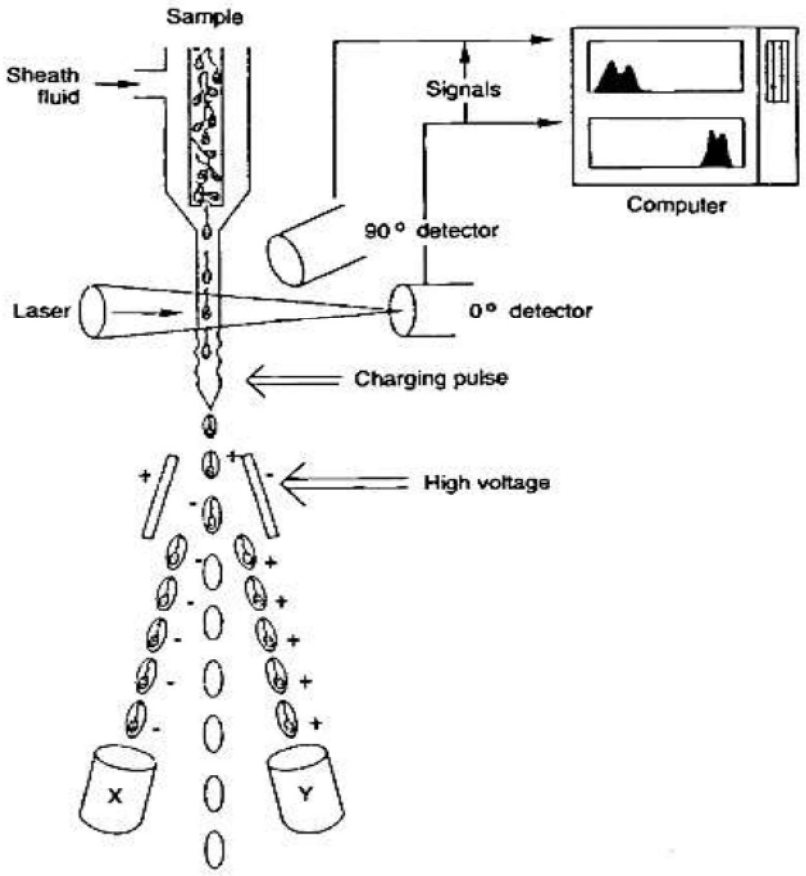
2. การแยกอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่

Laminar flow tructionation โดยอาศัยหลักการว่าอสุจิ Y เคลื่อนที่เร็วกว่าอสุจิ X มีรายงานความสำเร็จในคนจากการตรวจสอบโดยเทคนิค Y-chromosome specific DNA probe โดยในกลุ่มอสุจิ Y มีอสุจิที่เป็น Y ถึง 90-100% ในกลุ่มอสุจิ X จะพบอสุจิที่เป็น X 70-80%

3. การแยกอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ

Flow electrophoresis อสุจิ X และ Y มีประจุไฟฟ้าที่ผนังเซลล์แตกต่างกัน หากนำไปไว้ในสนามไฟฟ้า เช่น electrophoresis plate กลุ่มอสุจิจะแยกไปตามคุณสมบัติทาง

ไฟฟ้า และความแตกต่างของการเคลื่อนที่ พบว่าที่ขั้วบวก จะพบอสุจิที่มีโครโมโซม X เนื่องจากมี neuraminic acid containing glycoprotein ที่ผิวของเซลล์นั้นเอง



ภาพที่ 10.4 แผนภาพแสดงการทำงานของโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)
ที่มา: Gordon (2005)

การคัดแยกเพศจากตัวอ่อน (Embryo sexing)

วิธีการที่ 1 ตรวจดูโครโมโซม โดยการตัดเอาเซลล์จากตัวอ่อนมาเลี้ยงแล้วย้อมสี ตัวอ่อนที่เป็นตัวเมียจะพบโครโมโซม XX นำเอาตัวอ่อนที่ตรวจสอบแล้วไปฝากให้ตัวรับ แต่วิธีการนี้อาจจะมีข้อเสียถ้าตัดเซลล์ออกมามากเกินไป จะมีผลกระทบต่อตัวอ่อนที่จะเจริญต่อไป และจำเป็นต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยงเซลล์นานกว่าจะรู้ผลไม่เหมาะที่จะนำไปย้ายฝากทันที

วิธีการที่ 2 ตรวจแอนติเจนเอช-วาย (Antigen H-Y) ซึ่งเป็นแอนติเจนจำเพาะในตัวผู้ ในโคไม่ค่อยแม่นยำนัก

วิธีการที่ 3 ทำดีเอ็นเอ โพรบ (DNA probe) โดยตัดเซลล์จากตัวอ่อนในระยะมอรูล่าหรือบลาสโตซีสต์มาจำนวนหนึ่ง นำมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยการใช้เครื่องพีซีอาร์ (Polymerase Chain

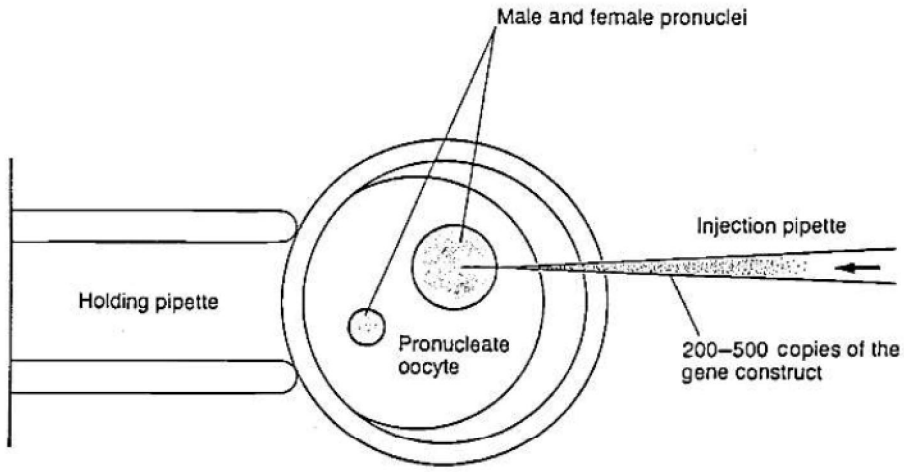
Reaction หรือ PCR) นำไปตรวจสอบเพศโดยวิธี Y-chromosome specific DNA probe แยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส แล้วย้อมด้วยสีเรืองแสง สามารถสรุปว่าเป็นเพศอะไรก่อนการนำไปย้ายฝาก

การย้ายฝากยีน (DNA transfer)

วิธีนี้เป็นวิธีการนำ DNA เข้าไปยัง Pronuclei ของ zygote โดยทำสำเร็จครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม DNA ที่ต้องการย้ายฝาก
2. เตรียมตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์
3. ฉีด DNA เข้าไปในตัวอ่อน และย้ายฝากตัวอ่อน
4. ประเมินคุณลักษณะของตัวอ่อน

ในปัจจุบัน พบว่าการย้ายฝากยีนในตัวอ่อนโค ยังให้ผลสำเร็จค่อนข้างต่ำอยู่



ภาพที่ 10.5 การฉีดไมโครดีเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส
ที่มา: Gordon (2005)

สรุป

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการศึกษาและพัฒนาการใช้เทคโนโลยีในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ ซึ่งหมายถึงการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของสัตว์ เทคโนโลยีที่ใช้ในการขยายพันธุ์สัตว์เลี้ยง คือการสร้างสัตว์เหมือน (Cloning) โดยการตัดแบ่งตัวอ่อน (Splitting of embryo) การย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer) การคัดแยกเพศอสุจิ (X and Y Chromosome-Bearing Sperm Separation) ซึ่งหลักการแยกเพศของอสุจิ X และ Y ในน้ำเชื้อ ทำได้ดังนี้คือ การแยกอสุจิที่มีโครโมโซม X และ Y โดยอาศัยความแตกต่างของมวล

อสุจิและความสามารถในการเคลื่อนที่ Albumin gradient Percoll density gradients percoll การแยกอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ Laminar flow tructionation โดยอาศัยหลักการว่าอสุจิ Y เคลื่อนที่เร็วกว่าอสุจิ X การแยกอสุจิโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ Flow electrophoresis อสุจิ X และ Y มีประจุไฟฟ้าที่ผนังเซลล์แตกต่างกัน การคัดแยกเพศจากตัวอ่อน (Embryo sexing) ทำได้โดย วิธีการที่ 1 ตรวจดูโครโมโซม วิธีการที่ 2 ตรวจแอนติเจนเอช-วาย (Antigen H-Y) ซึ่งเป็นแอนติเจนจำเพาะในตัวผู้ วิธีการที่ 3 ทำดีเอ็นเอ โพรบ (DNA probe) และการย้ายฝากยีน (DNA transfer) วิธีนี้เป็นวิธีการนำ DNA เข้าไปยัง Pronuclei ของ zygote

คำถามท้ายบท

1. จงอธิบายวิธีการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน (Splitting of embryo) มาอย่างละเอียด
2. จงอธิบายวิธีการย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer) มาอย่างละเอียด
3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการย้ายฝากนิวเคลียส คืออะไร
4. จงอธิบายวิธี Percoll density gradients percoll มาอย่างละเอียด
5. จงอธิบายวิธี Laminar flow tructionation มาอย่างละเอียด
6. ให้นักศึกษาอธิบายการทำงานของโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow cytometer)
7. การคัดแยกเพศจากตัวอ่อน (Embryo sexing) โดยการตรวจดูโครโมโซม ทำได้อย่างไร
8. การคัดแยกเพศจากตัวอ่อน (Embryo sexing) โดยการทำดีเอ็นเอ โพรบ (DNA probe) ทำได้อย่างไร
9. การย้ายฝากยีน (DNA transfer) คืออะไร
10. ขั้นตอนของการการย้ายฝากยีน (DNA transfer) สามารถทำได้อย่างไรบ้าง

เอกสารอ้างอิง

เทวินทร์ วงษ์พระลับ. (2542). **การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มงคล เตชะกำพุ. (2543). **เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์.** บริษัท ด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด. ศูนย์หนังสือแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330.

Gordon Ian. (2005). **Reproductive Technologies in Farm Animals.** Department of Animal Science and Production University College Dublin Ireland. CABI Publishing is a division of CAB International.