

การโคลนนิ่งเพื่อขยายพันธุ์ปศุสัตว์ไทย

รศ.ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย^{1*}

ประวัติของการโคลนนิ่ง

โดยปกติการสืบพันธุ์ของคนหรือสัตว์ต้องอาศัยการผสมกันระหว่างตัวผู้กับตัวเมีย หลังจากผสมกันแล้ว จะแบ่งตัวเจริญพัฒนาเป็นตัวอ่อน แล้วคลอดออกมาเป็นสัตว์หรือคน ซึ่งจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพ่อและแม่อย่างละครึ่ง แต่การโคลนนิ่งจะต่างจากการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติ เพราะการโคลนนิ่งเป็นกระบวนการการสร้างสิ่งมีชีวิตให้มีลักษณะทางกายภาพและพันธุกรรมเหมือนกันโดยไม่ใช้เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (อสุจิ) และเพศเมีย (ไข่) มาผสมกัน แต่จะใช้เซลล์จากสัตว์ที่เราต้องการโคลนนิ่งมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ แล้วฉีดเข้าไปในไข่ที่ดัดนิวเคลียสออกแล้ว ทำให้ลูกที่ได้มีลักษณะของเพศและพันธุ์เหมือนกับเซลล์ต้นแบบทุกประการ

การโคลนนิ่งเริ่มครั้งแรกในปี พ.ศ. 2495 โดย โทมัส คิง ได้ทำการทดลองโคลนนิ่งตัวอ่อนกบโดยนำเอานิวเคลียสของตัวอ่อนกบออกมา และนำไปใส่แทนนิวเคลียสของไข่กบที่ยังไม่ปฏิสนธิ ผลปรากฏว่าไข่ดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นลูกอีกทอด ต่อมา โรเบิร์ต บริกกส์ และโทมัส คิง ได้พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า การย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear Transfer) ขึ้นมา และวิธีนี้ยังเป็นที่นิยมใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน

ในช่วงแรกๆของการทำโคลนนิ่งนิยมใช้เซลล์ของตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิตามธรรมชาติเป็นเซลล์ต้นแบบ มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทำการทดลอง

โคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ตัวอ่อนของสัตว์ชนิดต่างๆ เป็นเซลล์ต้นแบบ เช่น แกะ โค หนู เป็นต้น

ต่อมาได้มีการพยายามใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อทำโคลนนิ่ง ซึ่งผู้ที่บุกเบิกได้แก่ ดร.เอียน วิลมุต และคณะ และประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2540 ดร. วิลมุต ได้ทำการโคลนนิ่งแกะโดยใช้เซลล์เต้านมของแกะโตเต็มวัยเป็นเซลล์ต้นแบบสำเร็จเป็นรายแรกของโลก จากนั้นเป็นต้นมานักวิทยาศาสตร์ ทั่วโลกได้ศึกษาวิจัยการนำเซลล์จากส่วนต่างๆของร่างกายสัตว์อีกหลายชนิดมาทำเป็นเซลล์ต้นแบบ จนประสบความสำเร็จดัง แสดงในตารางที่ 1

ในที่นี้จะกล่าวถึงขั้นตอนและวิธีการทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ
2. การเตรียมไข่
3. การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่
4. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบให้ติดกับไข่
5. การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว
6. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว
7. การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่แม่ตัวรับ

ซึ่งจะกล่าวถึงขั้นตอนต่างๆ โดยละเอียด ดังต่อไปนี้

¹ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

* Corresponding author: rangsun@g.su.ac.th

ตารางที่ 1 ผลสำเร็จการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

ชนิดสัตว์	ชนิดเซลล์ต้นแบบ	ลูกสัตว์คลอด	ปี พ.ศ.
แกะ	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2540
แกะ	เซลล์ไตผ่านสัตว์โตเต็มวัย	+	2540
โค	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2541
หนู	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2541
โค	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2541
โค	เซลล์ปอด	+	2541
สุกร	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	-	2542
กระบือ	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	-	2542
กระบือ	เซลล์กระดูก	-	2543
สุกร	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2543
สุกร	เซลล์กระดูก	-	2543
สุกร	เซลล์ไขกระดูก	-	2543
สุกร	เซลล์กล้ามเนื้อ	-	2543
แมว	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2545
ล่อ	เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน	+	2546
ม้า	เซลล์ผิวหนังโตเต็มวัย	+	2546
กวาง	เซลล์ผิวหนังโตเต็มวัย	+	2546

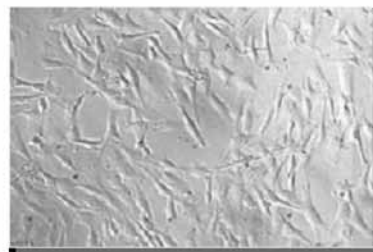
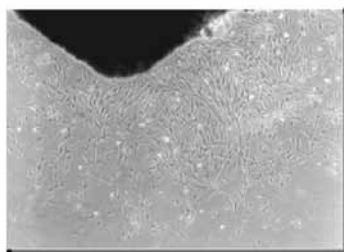
หมายเหตุ + หมายถึง มีลูกเกิด และ - หมายถึง ไม่มีลูกเกิด

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

ทำการคัดเลือกโคพันธุ์ที่ให้ผลผลิตนมหรือเนื้อที่ดี เพื่อนำมาเป็นตัวต้นแบบในการโคลนนิ่ง แล้วทำการเก็บตัวอย่างไขกระดูกโดยทำความสะอาดไขกระดูก แล้วใช้มีดตัดที่ไขกระดูกให้เป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร หรือใช้เครื่องเจาะรูที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 มม. หลังจากนั้นนำชิ้นไขกระดูกที่ได้เก็บไว้ในน้ำยา แล้วนำกลับเข้าห้องปฏิบัติการ

เมื่อถึงห้องปฏิบัติการนำชิ้นไขกระดูกที่ได้มาทำการโกนขนทั้งด้านบนและด้านล่างออกให้หมดก่อน หลังจากนั้นจึงลอกหนังออกจากกระดูกอ่อน แล้วตัดส่วนที่เป็นหนังให้มีขนาดประมาณ 1×1 มิลลิเมตร หลังจาก

นั้นนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลานาน 4 วันจึงนำเซลล์ที่เลี้ยงออกมาส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูการเจริญเติบโต และเปลี่ยนน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ลักษณะของเซลล์ที่เจริญขึ้นมาใหม่จะเป็นรูปกระสวยเรียงติดกัน (รูปที่ 1) เมื่อได้เซลล์จำนวนหนึ่งแล้วจะทำการเพิ่มปริมาณให้ได้เซลล์จำนวนมากขึ้น แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในรูปเซลล์แช่แข็ง เมื่อนำเซลล์ที่ได้มาใช้ ต้องทำการแยกให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ก่อนโดยใช้น้ำย่อย แล้วคัดเลือกเซลล์ที่มีรูปร่างปกติ กลม และมีขนาดเล็กหรือใหญ่เกินไป เพื่อใช้เป็นเซลล์ต้นแบบสำหรับใช้ฉีดเข้าไปในไข่



รูปที่ 1 แสดงการเจริญของเซลล์ออกจากชิ้นไขกระดูก (สีดำ) ที่จะใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ

การเตรียมไข่

ทำการเก็บรังไข่มาจากโรงฆ่าสัตว์ โดยเก็บไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิห้องระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วดูดไข่อ่อนที่อยู่ในถุงไข่ขนาด 3-7 มม. ออกมาด้วยเข็มฉีดยาขนาด 21G ที่ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี (รูปที่ 2 ก) จากนั้นนำไข่ที่ได้มาเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วประมาณ 19 – 20 ชั่วโมง เพื่อให้ไข่มีการเจริญต่อจนเป็นไข่สุก (รูปที่ 2 ข) เมื่อได้ไข่สุกแล้วนำมาทำการดูดนิวเคลียสออกไป (รูปที่ 2 ค) ไข่ที่ได้จะเป็นไข่ที่พร้อมสำหรับการโคลนนิ่ง

การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่

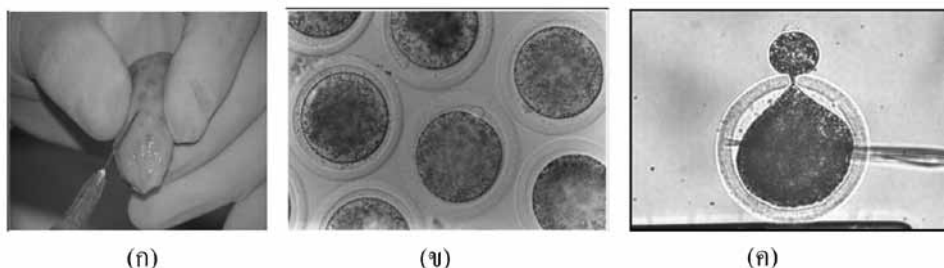
หลังจากที่ได้ไข่ที่ดูดนิวเคลียสออก และเซลล์ต้นแบบที่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ (รูปที่ 3 ก) แล้วก็จะทำการฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์เข้าไปในไข่ โดยการดูดเซลล์ต้นแบบเข้ามาไว้ในหลอดแก้ว แล้วสอดผ่านผนังไข่เข้าไป จากนั้นฉีดปล่อยเซลล์ต้นแบบให้เข้าไปอยู่ชิดกับไข่มากที่สุด (รูปที่ 3 ข)

การเชื่อมเซลล์ต้นแบบกับไข่

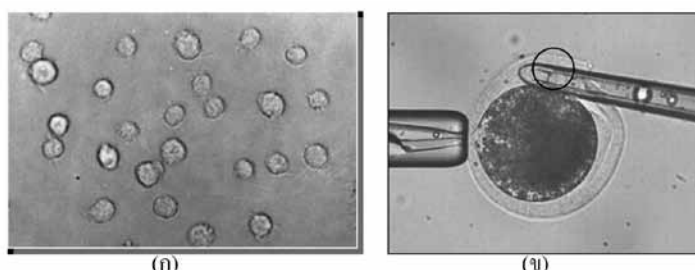
หลังจากฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่แล้ว จำเป็นต้องมีการเชื่อมเซลล์ต้นแบบและไข่ให้ติดกันด้วยกระแสไฟฟ้า เพื่อเป็นการหลอมเซลล์ต้นแบบให้เข้ามาอยู่ภายในเซลล์ของไข่ โดยจัดให้เซลล์ต้นแบบอยู่ในแนวเดียวกับอิเล็กโทรดจ่ายกระแสไฟฟ้าทั้ง 2 ด้าน (รูปที่ 4) แล้วจ่ายกระแสไฟฟ้า 30 V 15 msec 2 ครั้ง เพื่อเชื่อมเซลล์ให้ติดกัน

การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว

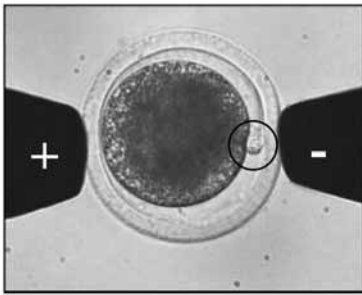
เมื่อเซลล์ต้นแบบเชื่อมติดกับไข่แล้ว ขั้นตอนต่อไปที่ต้องทำคือการกระตุ้นไข่ให้เกิดการแบ่งตัว โดยการนำไปไว้ในน้ำยาที่มี 7% Ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยาที่มี 10 mg/ml cycloheximide และ 1.25 mg/ml cytochalasin D ในตู้บอดีนอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง



รูปที่ 2 (ก) แสดงการดูดไข่โคจากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์, (ข) แสดงไข่โคหลังจากที่เลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 19-20 และ (ค) แสดงการดูดนิวเคลียสของไข่ออก



รูปที่ 3 (ก) แสดงเซลล์ต้นแบบที่ถูกย่อยออกเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยน้ำย่อย และ (ข) แสดงการฉีดเซลล์ต้นแบบ (วงกลม) เข้าสู่ไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว



รูปที่ 4 แสดงการเชื่อมเซลล์ต้นแบบ (วงกลม) กับไข่ด้วยกระแสไฟฟ้า



รูปที่ 5 แสดงตัวอ่อนโครีอะบลาสโตซิสหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว 7 วัน

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นให้แบ่งตัวแล้ว มาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.1% BSA ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 , CO_2 , N_2 เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการคัดเลือก ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.3% BSA ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 5 วัน โดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อไข่ของโค เนื่องจากเซลล์บุท่อไข่สามารถหลั่งสารที่สนับสนุนการเจริญของตัวอ่อน โดยรวมแล้วจะทำการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วเป็นนาน 7 วัน ซึ่งจะได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่พร้อมฝังตัวในมดลูก (รูปที่ 5) หลังจากนั้นจึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนไปยังมดลูกแม่โคตัวรับ

การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งให้โคตัวรับ

ทำการคัดเลือกแม่โคตัวรับที่มีความเหมาะสม โดยคัดเลือกเอาเฉพาะแม่โคที่มีระบบสืบพันธุ์ที่ดี คลอดลูกง่าย มาใช้เป็นแม่โคตัวรับ จากนั้นสังเกตการเป็นสัด เมื่อแม่โคตัวรับเป็นสัดได้ 7 วัน จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งเข้าสู่ปีกมดลูกของแม่โค อาจฝากได้ 1 – 2 ตัวอ่อนต่อ 1 แม่โคตัวรับ จากนั้นนับไปอีก 60 วันจึงล้วงตรวจการตั้งท้องของแม่โค อัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะ 2 เดือนแรกจะมีประมาณ 30 – 40% และอัตราการตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดมีประมาณ 10%

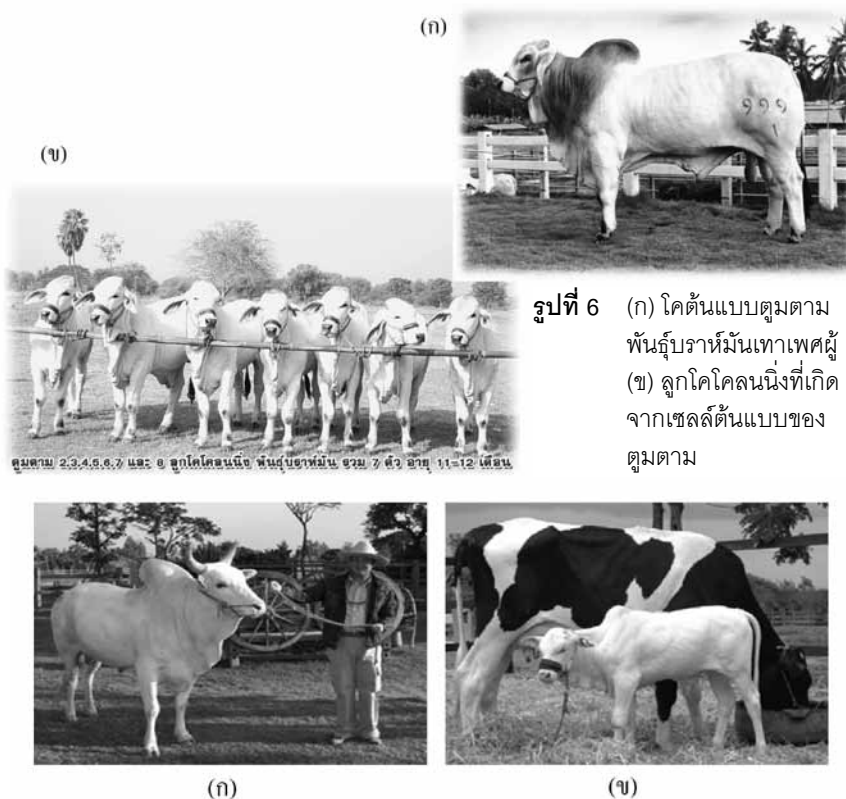
ความสำเร็จในประเทศไทย

จากกระบวนการโคลนนิ่งที่กล่าวมา มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ในการโคลนนิ่งสัตว์ต่างๆจนประสบความสำเร็จอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในประเทศไทยสามารถสร้างลูกโคโคลนนิ่งได้แล้ว 17 ตัว โดยใช้กระบวนการข้างต้นคือ ลูกโคพันธุ์แบรงกัสเทศเมีย ชื่อ **อิง** เกิดเมื่อ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นลูกโคโคลนนิ่งตัวแรกของเอเชียอาคเนย์ และเป็นตัวที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังมีลูกโคพันธุ์บราห์มันเทาเทศเมีย ชื่อ **นิโคล** เกิดมา ทั้งอิงและนิโคล เป็นผลงานของ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และคณะ ขณะปฏิบัติงานอยู่ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้แล้วยังมีการผลิตลูกโคโคลนนิ่งพันธุ์บราห์มันเทาเทศผู้ ชื่อ **ตุ้มตาม** (รูปที่ 6 ก.) โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบของตุ้มตามเกิดมาถึง 7 ตัว เกิดมาระหว่างวันที่ 25 ตุลาคม 2546 ถึง 7 มกราคม 2547 (รูปที่ 6 ข.) นอกจากนี้ยังมี ลูกโคพันธุ์บราห์มันแดงเทศเมีย (จากโคต้นแบบหมายเลข SK 180) เกิดมา 5 ตัว และ ลูกโคนมพันธุ์ไฮลส์ไดน์ฟรีเซียน (จากโคต้นแบบหมายเลข 346) เกิดมา 3 ตัว และลูกโคโคลนนิ่งพันธุ์ขาวลำพูนเทศผู้ชื่อ **ขาวมงคล** (จากโคต้นแบบชื่อดอยอินทนนท์) เกิดมาเป็นรายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มีนาคม 2550 (รูปที่ 7) ซึ่งเป็นผลงานของ ดร. รังสรรค์ พาลพ่ายและคณะ จากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประโยชน์และข้อจำกัดของการทำโคลนนิ่ง

การโคลนนิ่งเป็นประโยชน์ต่อวงการปศุสัตว์เป็นอย่างมาก ในแง่การเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีมากมายที่มีจำนวนไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ยังต้องศึกษาวิจัยกันอีกมากเพื่อหาสาเหตุและหาวิธีการเพื่อลดปัญหาของการแท้งและการตายระหว่างคลอดและหลังคลอดของลูกสัตว์โคลนนิ่ง ซึ่งมีอัตราสูงกว่าสัตว์ที่เกิดมาจากการผสมพันธุ์ปกติหลายเท่าตัว สำหรับในแง่การทดลองทางวิทยาศาสตร์ การโคลนนิ่งเพื่อผลิตสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการทดสอบทางการแพทย์จะสามารถช่วยลดจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการทดลองให้น้อยลงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และช่วยลดความแปรปรวนของผลการทดลอง เนื่องจากสัตว์โคลนนิ่งเป็นสัตว์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน ในทางการแพทย์ได้มีการศึกษาอย่างมากในทั่วทุกมุมโลก เพื่อนำการโคลนนิ่งมาใช้ในการผลิตเซลล์ต้น

กำเนิดตัวอ่อน (Embryonic Stem cell) ด้วยการนำเซลล์ร่างกายของมนุษย์มาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ เมื่อได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์แล้วจะแยกเอาเซลล์ inner cell mass ไปเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ต้นกำเนิดที่มีพันธุกรรมเหมือนกับเจ้าของเซลล์ร่างกาย แล้วนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนที่ได้ไปใช้รักษาโรคในมนุษย์หรือใช้ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะ เพื่อลดปัญหาเรื่องการต่อต้านอวัยวะใหม่ นอกจากนี้ยังมีความพยายามที่จะโคลนนิ่งมนุษย์ให้เกิดมา แต่อย่างไรก็ตามการกระทำดังกล่าวยังไม่เป็นที่ยอมรับเพราะยังติดปัญหาทางด้านจริยธรรม และมีกฎหมายห้ามทำดังนั้นการโคลนนิ่งมนุษย์จึงยังเป็นสิ่งที่ไม่สามารถทำได้ในปัจจุบัน ในปัจจุบันงานทดลองที่เป็นที่ยอมรับและถูกเผยแพร่จึงเน้นไปในทางการโคลนนิ่งสัตว์เศรษฐกิจ สัตว์ใกล้สูญพันธุ์ และการโคลนนิ่งเพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางการแพทย์



รูปที่ 6 (ก) โคต้นแบบตามพันธุ์ราห์มันเทเพศผู้ (ข) ลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ต้นแบบของตุ้มตาม

รูปที่ 7 (ก) โคต้นแบบดอยอินทนนท์ พันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ และ (ข) ขาวมวงคล ลูกโคโคลนนิ่งที่เกิดจากเซลล์ต้นแบบของดอยอินทนนท์