# เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค

**ผู้วิจัย/ผู้เสนอ:** ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย
**ตำแหน่ง:** อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
**สาขาวิชา:** เทคโนโลยีชีวภาพ
**สำนักวิชา:** เทคโนโลยีการเกษตร

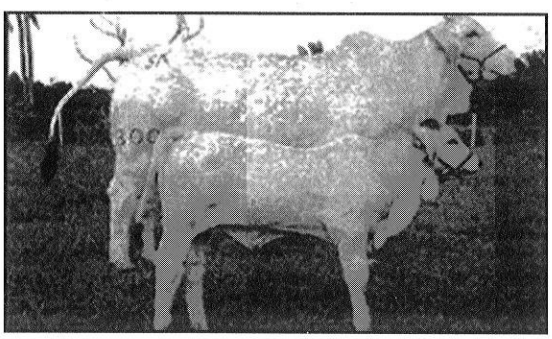
**วัตถุประสงค์** : เพื่อศึกษาถึงการทำโคลนนิ่งโค ผลดี ผลเสีย และผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการโคลนนิ่ง
**การนำไปใช้ประโยชน์** : เป็นการเผยแพร่ความรู้ให้แก่บุคคลที่สนใจ

**ประวัติของการโคลนนิ่ง**

การโคลนนิ่งเริ่มในปี ค.ศ. 1952 โดย Thomas King ได้ทำการทดลองโคลนนิ่งตัวอ่อนกบขึ้นมา โดยนำเอานิวเคลียสของตัวอ่อนกบออกมาและนำไปใส่แทนนิวเคลียสของไข่กบที่ยังไม่ปฏิสนธิ ผลปรากฏว่าไข่ดังกล่าวสามารถเติบโตต่อไปได้ ต่อมา Briggs และ King ได้พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า nuclear transfer (ย้ายฝากนิวเคลียส) ขึ้นมาและวิธีการนี้ยังเป็นที่นิยมใช้อยู่จนถึงปัจจุบัน ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกดัดแปลงประยุกต์และพัฒนาไปใช้อย่างแพร่หลาย

ในช่วงแรกๆ ของการโคลนนิ่ง นิยมใช้เซลล์ต้นแบบ ที่มาจากเซลล์ตัวอ่อน (Embryonic cell) มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทำการทดลองโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ตัวอ่อนของสัตว์ชนิดต่างๆเป็นเซลล์ต้นแบบ

ได้มีการพยายามใช้เซลล์ร่างกาย(Somatic cell) เป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อทำโคลนนิ่ง ซึ่งผู้ที่บุกเบิกได้แก่ Ian Wilmut และคณะ (1997) ได้ทำการโคลนนิ่งแกะโดยใช้เซลล์เต้านมของสัตว์โตเต็มวัยเป็นเซลล์ต้นแบบสำเร็จเป็นรายแรกของโลก จากนั้นเป็นต้นมานักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกได้ศึกษาวิจัยการนำเซลล์ร่างกายจากส่วนต่างๆ ของสัตว์ชนิดต่างๆ มาเป็นเซลล์ต้นแบบจนประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่ง และได้ตัวอ่อนระยะพร้อมย้ายฝาก หรือได้ลูกสัตว์เกิดมา ดังแสดงใน **ตารางที่ 1**



รูปที่ 1. แสดงโคโคลนนิ่ง (ตัวเล็ก) เทียบกับโคต้นแบบ (ตัวใหญ่)

**ตารางที่** 1 การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

| ชนิดสัตว์ | ชนิดเซลล์ต้นแบบ | ตัวอ่อนพร้อมย้ายฝาก | ลูกสัตว์คลอด | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| แกะ | เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน | + | + | Wilmut และคณะ., *Nature. 1997* |
| แกะ | เซลล์เต้านมสัตว์โตเต็มวัย | + | + | Wilmut และคณะ., *Nature. 1997* |
| โค | เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน | + | + | Stice และคณะ., *Science. 1998* |
| หนู | เซลล์คิวมูลัส | + | + | Wakayama และคณะ., *Nature. 1998* |
| โค | เซลล์คิวมูลัส | + | + | Kato และคณะ., *Science. 1998* |
| โค | เซลล์บุท่อนำไข่ | + | + | Kato และคณะ., *Science. 1998* |

| ชนิดสัตว์ | ชนิดเซลล์ต้นแบบ | ตัวอ่อนพร้อมย้ายฝาก | ลูกสัตว์คลอด | เอกสารอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| สุกร | เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน | + | - | Du และคณะ., *Theriogenology. 1999* |
| กระบือ | เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน | + | - | Parnpai และคณะ., *Buffalo J. 1999* |
| กระบือ | เซลล์แกรนูโลซา | + | - | Parnpai และคณะ., *14th ICAR 2000* |
| สุกร | เซลล์ผิวหนังลูกอ่อน | + | + | Onishi และคณะ., *Science 2000* |
| สุกร | เซลล์แกรนูโลซา | + | - | Polejaeva และคณะ., *Nature. 2000* |
| สุกร | เซลล์ใบหู | + | - | Parnpai และคณะ., *Thai J. Agric.Sci.2000* |
| สุกร | เซลล์กล้ามเนื้อ | + | - | Parnpai และคณะ., *Thai J. Agric.Sci .2000* |

**ขั้นตอนและวิธีการทำโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ**

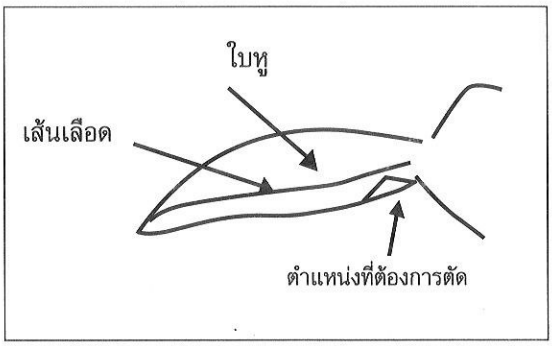
การทำโคลนนิ่งในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคการย้ายฝากนิวเคลียสโดยใช้เซลล์ร่างกายสัตว์โตเต็มวัยเป็นเซลล์ต้นแบบ มีขั้นตอนดังนี้

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

ซึ่งจะกล่าวถึงขั้นตอนต่างๆ โดยละเอียดในหัวข้อต่อไปนี้

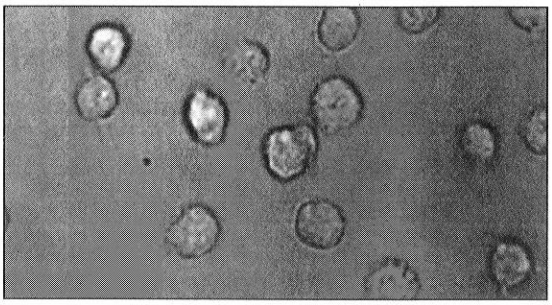
**1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ**

คัดเลือกโคพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตเนื้อหรือนมที่ดีเพื่อใช้เป็นตัวต้นแบบในการโคลนนิ่ง การเก็บตัวอย่างใบหูทำได้โดย ทำความสะอาดใบหูให้สะอาด แล้วใช้มีดตัดที่บริเวณหูให้เป็นรูปสามเหลี่ยมมีขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร หลังจากตัดหูโคได้แล้วนำชิ้นใบหูที่ได้เก็บไว้ในน้ำยา แล้วนำเข้าห้องปฏิบัติการ




รูปที่ 2. แสดงตำแหน่งของบริเวณที่จะทำการตัดใบหู

เมื่อถึงห้องปฏิบัติการจะต้องใช้มีดขูดขนออกจากบริเวณหนังหูด้านบนและด้านล่างออกให้หมดก่อน จากนั้นจึงลอกหนังออกจากกระดูกอ่อน แล้วตัดหนังให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% $CO_2$ in air โดยในช่วง 4 วันแรกของการเลี้ยงเซลล์จะไม่มีการขยับภาชนะที่ใช้เลี้ยงเลย เพื่อให้เซลล์เจริญเกาะติดพื้นภาชนะที่ใช้เลี้ยงได้ดี เมื่อครบ 4 วันแล้วจึงนำเซลล์ที่เลี้ยงออกมาส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตการเจริญเติบโต และตรวจดูว่ามีการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อราหรือไม่ ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์จะเริ่มจากบริเวณที่ใกล้กับชิ้นหนังหูและเพิ่มจำนวนเซลล์ไปเรื่อยๆ จนเต็มภาชนะเลี้ยงเซลล์ ลักษณะของเซลล์จะคล้ายรูปกระสวยที่เรียงติดกันอยู่เป็นจำนวนมาก จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้มากๆ แล้วนำไปเก็บรักษาในรูปเซลล์แช่แข็ง ก่อนใช้นำเซลล์ที่แช่แข็งออกมาเลี้ยงใหม่ จากนั้นย่อยเซลล์ที่เลี้ยงไว้ให้ออกเป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้น้ำย่อย แล้วคัดเลือกเซลล์ที่รูปร่างปกติ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14-16 ไมครอน เพื่อใช้เป็นเซลล์ต้นแบบสำหรับฉีดเข้าในไข่ต่อไป



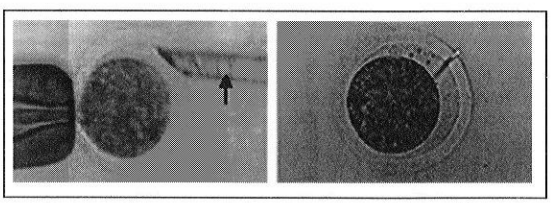
รูปที่ 3. แสดงเซลล์ต้นแบบที่ถูกย่อยออกเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยน้ำย่อย

**2. การเตรียมไข่**

เก็บรังไข่มาจากโรงฆ่าสัตว์แล้วดูดไข่อ่อนที่อยู่ในถุงไข่ออกมาด้วยเข็มเบอร์ 21G จากนั้นนำไข่ที่ได้มาเลี้ยงในน้ำยาประมาณ 19-20 ชั่วโมง เพื่อให้ไข่เจริญเป็นไข่แก่ซึ่งสังเกตได้จาก 1st Polar body เมื่อได้ไข่แก่แล้วจะต้องนำมาดูดนิวเคลียสของไข่ทิ้งไปเสียก่อน ที่จะนำมาใช้เป็นไข่สำหรับการโคลนนิ่ง

**3. การฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่**

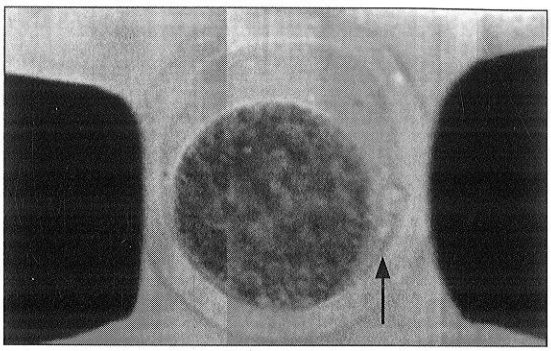
เมื่อได้ไข่ และเซลล์ต้นแบบที่เป็นเซลล์เดี่ยวแล้ว ก็จะทำการฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์เข้าไปในไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว โดยใช้ปิเปตดูดเซลล์ต้นแบบแล้วแทงผ่านเข้าไปในไข่ จากนั้นฉีดปล่อยเซลล์ต้นแบบให้อยู่ตรงบริเวณ Perivitelline space



รูปที่ 4 แสดงการฉีดเซลล์ต้นแบบ (ลูกศรชี้) เข้าสู่ Perivitelling space ของไข่

**4. การเชื่อมเซลล์ต้นแบบกับไข่**

หลังจากฉีดเซลล์ต้นแบบเข้าไปในไข่แล้ว จำเป็นจะต้องมีการเชื่อมเซลล์ต้นแบบและไข่เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า เพราะต้องการหลอมให้เซลล์ต้นแบบเข้ามาอยู่ในไข่ด้วย โดยจัดให้ไข่อยู่ระหว่าง Fusion electrode ซ้าย - ขวา โดยให้เซลล์ต้นแบบอยู่ตรงกับ Fusion electrode ด้านใดด้านหนึ่ง แล้วจ่ายกระแสไฟอ่อนๆ ซึ่งตั้งไว้ที่ DC pulse, 30 V นาน 15$\mu$sec ทำ 2 ครั้งต่อเนื่องกัน



รูปที่ 5. แสดงการเชื่อมเซลล์ต้นฉบับ (ลูกศรชี้) กับไข่ด้วยกระแสไฟฟ้า

**5. การกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว**

เมื่อเซลล์ต้นแบบสามารถเชื่อมต่อกับไข่ได้แล้วขั้นตอนต่อไปที่ต้องทำคือการกระตุ้นไข่ โดยใช้ 7% Ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาพิเศษต่ออีก 5 ชั่วโมง เพื่อควบคุมระดับสารเคมีภายในไข่ให้เหมาะสม

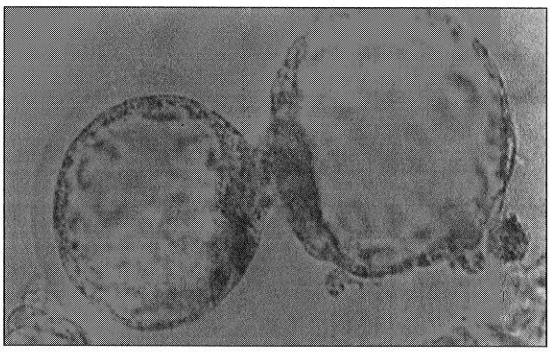
**6. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว**

นำไข่ที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาพิเศษแล้วมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงต่ออีก 5 วัน โดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โค เนื่องจากเซลล์บุท่อนำไข่สามารถหลั่งสารที่จำเป็นต่อการเจริญของตัวอ่อนเพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนให้มากขึ้น รวมแล้วจะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วประมาณ 7 วัน จะได้ตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีส ซึ่งพร้อมจะฝังตัวในมดลูก จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนไปยังแม่โคตัวรับเพื่อให้ตั้งท้องต่อไป

**7. การย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งสู่แม่โคตัวรับ**

ก่อนอื่นต้องมีการคัดเลือกแม่โคตัวรับที่เหมาะสมเสียก่อน โดยคัดเลือกเอาเฉพาะแม่โคที่มีระบบสืบพันธุ์ดี คลอดลูกง่ายมาใช้เป็นแม่โคตัวรับ จากนั้นสังเกตการเป็นสัดของแม่โคตัวรับ หรือฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่โคตัวรับเป็นสัด เมื่อแม่โคตัวรับ

เป็นสัดได้ 7 วัน จึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งเข้าสู่ปีกมดลูกของแม่โค โดยอาจฝากได้ 1-2 ตัวอ่อน/แม่ตัวรับ 1 ตัว จากนั้นนับไปอีก 60 วันจึงล้วงตรวจการตั้งท้องของแม่โค เปอร์เซ็นต์การตั้งท้องของตัวอ่อนโคลนนิ่งในระยะ 2 เดือนแรกจะมีประมาณ 30-40% และเปอร์เซ็นต์การตั้งท้องจนครบกำหนดคลอดมีประมาณ 10%



รูปที่ 6. แสดงตัวอ่อนวัวระยะบลาสโตซีสหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว 7 วัน

จากขบวนการโคลนนิ่งที่กล่าวมา มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านทั่วโลกนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ในการโคลนนิ่งสัตว์หลายๆ ชนิดและประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยของเรา สามารถสร้างลูกโคโคลนนิ่งได้ถึงสองตัวโดยใช้เทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น โดยในวันที่ 6 มีนาคม พ.ศ. 2543 มีลูกโคโคลนนิ่งเพศเมีย พันธุ์แบรงกัส เกิดที่ จ.ราชบุรี นับเป็นลูกโคโคลนนิ่งตัวแรกของเอเชียอาคเนย์ ในปีต่อมาวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2544 ลูกโคเนื้อที่เกิดจากการโคลนนิ่งตัวแรกของโลก พันธุ์อเมริกันบราห์มัน เพศเมีย เกิดที่ จ.ชลบุรี ซึ่งผลงานการโคลนนิ่งทั้งสองครั้งนี้ เป็นความสำเร็จของ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี