

ผลของความเครียดจากความร้อนต่อการแสดงออกของยีน HSP70
ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
เมษายน 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

ผลของความเครียดจากความร้อนต่อการแสดงออกของยีน *HSP70*
ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

เมษายน 2562

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของความเครียดจากความร้อนต่อการแสดงออกของยีน HSP70
ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง

ของ ธรรมนุญ ธานี

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทศพล มุลมณี)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญงค์ดี อินตะวิธา)

.....กรรมการ

(ดร.พันธภรณ์ สุภักคกาญจน์กุล)

.....กรรมการ

(ดร.สุรีย์พร แสงวงศ์)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์รัตนา อัดตปัญญา)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

เมษายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้งบประมาณในการสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พยุงค์กิติ อินตะวิชา ประธานกรรมการที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล, ดร.สุรีย์พร แสงวงศ์, ดร.พันธภรณ์ สุภักดาญจน์กุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทศพล มุลมณี ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลากรุณาให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ รวมไปถึงความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอนเพื่อให้การเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นไปอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศุภย์วิชัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และศุภย์วิชัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน และสนับสนุนสัตว์ทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างนำมาศึกษา ทำให้งานวิจัยนี้ดำเนินต่อไปได้อย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่สนับสนุนสถานที่ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ และอุปกรณ์ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ ผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สละเวลาช่วยกันทำงานวิจัยครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์เล่มนี้คงเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชนต่อไป

ธรรมบุญ ธานี

เรื่อง: ผลของความเครียดจากความร้อนต่อการแสดงออกของยีน *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคเนื้อ
โคผสมพื้นเมือง

ผู้วิจัย: ธรรมนุญ ธาณี, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (สัตวศาสตร์), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2562

ประธานที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญงค์ศักดิ์ อินตะวิชา, **กรรมการที่ปรึกษา:** รองศาสตราจารย์.
ดร.โชค โสรัจกุล, ดร.สุรียพร แสงวงศ์

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีนฮีตช็อคโปรตีน 70, ภายใต้อุณหภูมิร้อน, เซลล์ไฟโบรบลาสต์, โคลูกผสมชาวลำพูน

บทคัดย่อ

ยีนฮีตช็อคโปรตีน 70 (*HSP70* gene) มีบทบาทสำคัญในการปรับตัว และการตอบสนองต่อความร้อน วัตถุประสงค์เพื่อทราบถึงอัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีน *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากโคพื้นเมืองชาวลำพูน โคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ ภายใต้อุณหภูมิร้อน โดยเก็บตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหู นำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส การศึกษาที่ 1 อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับความร้อนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ของกลุ่มโคพื้นเมืองชาวลำพูนสูงกว่า (ร้อยละ 97.73±0.16 และ 93.33±1.90) กลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส (ร้อยละ 96.36±0.35 และ 88.88±1.31) และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ (ร้อยละ 96.70±0.44 และ 89.16±1.37) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การศึกษาที่ 2 การแสดงออกของยีน *HSP70* ด้วยเทคนิค Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยนำเซลล์หลังจากฮีตช็อค อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มาสกัด total RNA แล้วนำ total RNA ที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA และทำการเพิ่มปริมาณยีน *HSP70* และยีน β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุม พบว่า เซลล์ทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน *HSP70* ที่แตกต่างกันในแต่ละระยะเวลาที่ได้รับความร้อน เมื่อเปรียบเทียบกับยีน β -actin แสดงให้เห็นถึงกลไกการตอบสนองต่อความร้อนระดับเซลล์ของโคทั้ง 3 กลุ่ม สรุปว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมืองชาวลำพูน เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่าโคลูกผสม และแสดงถึงกลไกการทำงานระดับเซลล์ของโคเนื้อ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพในเขตร้อนชื้นของประเทศไทยได้

Title: EFFECT OF THEMAL STRESS ON *HSP70* GENE EXPRESSION IN FIBROBLAST CELLS OF THAI-NATIVE AND CROSSBRED BEEF CATTLE

Author: Thammanoon Thanee, Thesis: M.S. (Animal Science), University of Phayao, 2019

Advisor: Assistant Professor Dr.Payungsuk Intawicha, **Co–advisor:** Associate Professor Dr.Choke Sorachakula, Dr.Sureeporn Saengwong

Keywords: *HSP70* gene expression, Under hyperthermia, Cell fibroblast, White Lamphun Crossbred beef cattle

ABSTRACT

Heat shock proteins (*HSP70*) gene plays an important role in adaptation of survival and heat response of cell. The purpose of this study was to determine the effect of hot temperature on survival rate and gene expression in fibroblast cells from White Lamphun cattle, crossbreed White Lamphun Angus cattle and White Lamphun Charolais cattle. Fibroblast cells were cultured in 5% CO₂ incubator at 38.5 °C. *Study 1:* The survival rate of fibroblast cells was determined after culture under hyperthermal conditions at 42 °C for 24 and 48 hours, White Lamphun cattle fibroblast cell (97.73±0.16 and 93.33±1.90%) showed viability rate higher than in crossbreed White Lamphun Angus cattle (96.36±0.35 and 88.88±1.31%) and White Lamphun Charolais (96.70±0.44 and 89.16±1.37%; P < 0.05). *Study 2:* *HSP70* gene expression after fibroblast cells exposed to high temperature at 42 °C for 6 hour, 12 hour, and 24 hour were evaluated using the RT-PCR method. We found that *HSP70* gene was expressed in all groups. It demonstrated the mechanism of cellular heat response of both native and crossbred cattle. In conclusions, the growth rate of fibroblast cells was increased during *in vitro* culture. The survival rate of fibroblast cell under hyperthermal conditions from White Lamphun cattle was higher than of crossbred cattle. Fibroblast cells of White Lamphun and crossbred cattle have an *HSP70* gene expression, which present cell can tolerate heat and adapting to the tropical environment of Thailand.

อักษรย่อ

ABAM	=	Antibiotic–antimycotic
AEC	=	Asean Economic Community
DI	=	Deionization
DMEM	=	Dulbecco’s Modified Eagle Media
FBS	=	Fetal bovid serum
HSE	=	Heat shock elements
HSFs	=	Heat shock factors
HSPs	=	Heat shock protein
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	polymerase chain reaction
มก.ฉ	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร



สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ทฤษฎีและแนวคิด	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ศักยภาพของประเทศไทยในการผลิตและส่งออกโคเนื้อ	6
การพัฒนาระบบการผลิตโคเนื้อ.....	7
การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทย	7
โคเนื้อพันธุ์ดีสำหรับผลิตเป็นโคเนื้อคุณภาพเชิงการค้า	8
ข้อจำกัดของโคเนื้อลูกผสมเชิงการค้า	8
ความเครียดจากความร้อน (Heat stress)	11
ผลของความเครียดจากความร้อน	11
กลไกการตอบสนองต่อความร้อนของร่างกาย.....	12
การตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
แผนการทดลอง ขั้นตอน และวิธีการในการเก็บรวบรวมข้อมูล.....	18
แผนการทดลอง.....	19
แผนภาพการดำเนินงาน.....	20
วิธีการทดลอง	20
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)	
สถานที่ทำการทดลอง.....	29
ระยะเวลาการทดลอง.....	29
4 ผลการทดลอง.....	30
การศึกษาที่ 1 อัตราการแบ่งตัว และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสมพื้นเมือง	30
การทดลองที่ 2 ศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม	40
5 บทสรุป	42
สรุปผลการวิจัย	42
อภิปรายผลการวิจัย.....	42
ข้อเสนอแนะ	44
บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	53
ภาคผนวก ข แสดงขั้นตอนการปฏิบัติสำหรับกระบวนการเลี้ยงเซลล์ การ Subculture cell การแช่แข็งเซลล์ (cell freezing) และการตรวจนับจำนวนเซลล์	57
ภาคผนวก ค แสดงให้เห็นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง ขาวลำพูนโคขาวลำพูนแองกัส และโคโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 1 วัน และ 2 วัน	59

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก ง แสดงให้เห็นอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน โคชาวลำพูนแองกัส และโคชาวลำพูน ชาร์โรเลส์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	60
ภาคผนวก จ แสดงตาราง ANOVA สำหรับการวิเคราะห์อัตราแบ่งตัวของเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน โคชาวลำพูนแองกัส และโคชาวลำพูนชาร์โรเลส์	61
ภาคผนวก ฉ แสดงตาราง ANOVA สำหรับการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตรอด ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน โคชาวลำพูน แองกัส และโคชาวลำพูนชาร์โรเลส์	62
ภาคผนวก ช ขั้นตอนและสูตรการตรวจนับเซลล์โคพื้นเมือง และลูกผสมพื้นเมือง	63
ภาคผนวก ซ รูปภาพโครงสร้างของฮีทช็อคโปรตีน 70	65
ภาคผนวก ฌ รูปภาพอุปกรณ์และสารเคมีทดลองงานวิจัย	66
ประวัติผู้วิจัย	75

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงผลการศึกษาความเครียดจากความร้อน	12
2 แสดงตำแหน่งภายในเซลล์และหน้าที่ของกลุ่มฮีทช็อคโปรตีนในสัตว์ เลี้ยงลูกด้วยนม	13
3 แสดงผลการศึกษาการแสดงออกของ HSP70 ในโคเนื้อลูกผสม.....	17
4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับทำ RT-PCR	28
5 แสดงขั้นตอนและวิธีการในการดำเนินการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล	28
6 แสดงอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม หลังจากเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	30
7 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมืองและโคลูกผสม พื้นเมืองหลังจากฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง.....	33
8 แสดงองค์ประกอบของสารละลาย <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) สำหรับ ชะล้างตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์	53
9 แสดงองค์ประกอบของอาหาร <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) สำหรับเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์	54
10 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีสำหรับตรวจนับจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์	54
11 แสดงองค์ประกอบของสารสำหรับสกัด Total RNA โดยใช้ RNA extraction kit (Real Genomics YRB50).....	54
12 แสดงองค์ประกอบของสารสำหรับการสังเคราะห์ first-strand cDNA	55
13 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีสำหรับพีซีอาร์ polymerase chain reaction (PCR) ของยีน <i>HSP70</i>	55
14 แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองขาวลำพูน 3 ตัว.....	59
15 แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูนแองกัส 3 ตัว	59
16 แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ 3 ตัว	59
17 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองขาวลำพูน 3 ตัว	60
18 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูนแองกัส 3 ตัว.....	60

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
19	แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ 3 ตัว	60
20	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม สำหรับวันที่ 0	61
21	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม สำหรับวันที่ 1.....	61
22	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม สำหรับวันที่ 2.....	61
23	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม สำหรับชั่วโมงที่ 0.....	62
24	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม สำหรับชั่วโมงที่ 24.....	62
25	แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม สำหรับชั่วโมงที่ 48.....	62

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงทฤษฎีและแนวคิดโครงการวิจัยในการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์.....	4
2 แสดงรูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อในเขตภาคเหนือตอนบน.....	7
3 แสดงผลจากการที่สัตว์เพศผู้และสัตว์เพศเมียที่ได้รับความเครียดจากความร้อนทำให้ส่งผลทำให้ในสัตว์เพศผู้มีปริมาณอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิ ปริมาณการกินอาหารลดลง และส่งผลทำให้สัตว์เพศเมียมีอัตราการผสมติด อัตราการตั้งท้อง การพัฒนาตัวอ่อนระยะ blastocyst อัตราการผลิตน้ำนมลดลง...	10
4 แสดงกลไกการส่งสัญญาณที่กระตุ้นการแสดงออกของ HSPs	16
5 แสดงแผนการดำเนินงานของงานวิจัย	20
6 แสดงการคัดเลือกโคเนื้อสำหรับเก็บตัวอย่างที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา (A) และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ (B)	21
7 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง	22
8 แสดงลักษณะรูปร่าง (Morphology) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส.....	31
9 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยย้อมด้วย Trypan blue.....	32
10 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างช่วงโมเมนต์ที่เพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน.....	34
11 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างช่วงโมเมนต์ที่เพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส	35
12 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างช่วงโมเมนต์ที่เพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์	36
13 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างช่วงโมเมนต์ที่ฉีดเชื้อกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน.....	37
14 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างช่วงโมเมนต์ที่ฉีดเชื้อกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส	38

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
15 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างช่วงโมเมนต์ที่ฮีสซ็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์.....	39
16 แสดงการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>HSP70</i> ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมืองและโคลูกผสมหลังจากฮีสซ็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	40
17 แสดงการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน β -actin ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมืองและโคลูกผสมหลังจากฮีสซ็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	41
18 แสดงแผนที่โครงสร้างของฮีสซ็อคโปรตีน 70	65
19 แสดงอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (1).....	66
20 แสดงอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (2)	67
21 แสดงอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (3).....	68
22 แสดงอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (1)	69
23 แสดงสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์	70
24 แสดงอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (2)	71
25 แสดงอุปกรณ์สำหรับการตรวจหาการมีอยู่ของยีน	72
26 แสดงอุปกรณ์สำหรับการตรวจหาการมีอยู่ของยีน (1).....	73
27 แสดงอุปกรณ์สำหรับการตรวจหาการมีอยู่ของยีน (2)	74

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยถือได้ว่าเป็นผู้นำด้านการผลิตโคเนื้อในกลุ่ม AEC (Asean Economic Community) เพราะมีสายพันธุ์ที่ดีสามารถเลี้ยงได้ในประเทศ เช่น โคพันธุ์บราห์มัน ทำให้ประเทศไทยมีโอกาสที่จะส่งโคเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากโคเนื้อที่มีคุณภาพดี และมีราคาสูง ไปยังต่างประเทศในกลุ่ม AEC มากขึ้น นอกจากนี้โคพันธุ์บราห์มัน ที่มีการพัฒนาทั้งภาครัฐและเอกชน ประเทศไทยยังมีโคเนื้ออีกหลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นโคเนื้อพันธุ์ดีที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทยผลิตออกมาเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาด และระบบการเลี้ยงของคนไทยโดยเฉพาะ เช่น โคพันธุ์กำแพงแสน โคพันธุ์กบินทร์บุรี และโคพันธุ์ตาก นอกจากนี้ การนำโคเนื้อจากต่างประเทศเข้ามาปรับปรุงพันธุ์ให้ได้เนื้อที่มีคุณภาพดี และเป็นที่ต้องการของตลาด โคเนื้อลูกผสมที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ โคลูกผสมซาโรเลส์ และโคลูกผสมแองกัส ตามลำดับ (เรืองยศ พิลาจันท์ และวันชัย อินทิแสง, 2559) อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับโคเนื้อที่นำมาปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากโคที่มีสายเลือดยุโรปสูง เมื่อนำมาเลี้ยงในสภาพอากาศร้อนชื้นส่งผลทำให้โคนั้นมีการกินอาหาร การเจริญเติบโต และประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ลดลง

จากข้อมูลเบื้องต้นของศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยาทำให้ทราบว่า โคพื้นเมืองสายพันธุ์ภาคเหนือ หรือโคขาวลำพูน เป็นโคพื้นเมืองที่เกษตรกรไทยในเขตภาคเหนือเลี้ยงสืบทอดกันมาเป็นเวลานาน อยู่คู่กับวิถีชีวิตของเกษตรกรไทยล้านนามาตั้งแต่ในอดีต โดยส่วนใหญ่เลี้ยงไว้ใช้แรงงานในไร่นา และใช้เทียมเกวียน มากกว่าที่จะเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นโคเนื้อสู่ตลาด เนื่องจากมีต้นกำเนิดที่จังหวัดลำพูน จึงเรียกโคพันธุ์นี้ว่า “โคขาวลำพูน” โคขาวลำพูนเป็นโคที่มีขนาดใหญ่กว่าโคพื้นเมืองทั่วไป รูปร่างสูงโปร่ง ลำตัวสีขาว พูหางยาวเป็นพวงสีขาว และมีรูปทรงเขาเป็นรูปเขี้ยวที่สวยงาม ซึ่งเป็นลักษณะเด่นประจำพันธุ์ มองดูมีสง่า และสวยงามมาก จากคุณสมบัติที่มีลักษณะเด่น จึงเป็นลักษณะเฉพาะพันธุ์ ดังนั้น โคขาวลำพูนจึงได้รับการคัดเลือกเพื่อใช้ในพระราชพิธีจรดพระนังคัลแรกนาขวัญ ดังเช่น พระโคเพชร และพระโคพลอย ในปี 2537 พระโครุ่ง และพระโคโรจน์ ในปี 2538 พระโคเทิด และพระโคทูน ในปี 2547 เป็นต้น นอกจากนี้โคขาวลำพูนยังสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เลี้ยงง่าย และมีความสมบูรณ์พันธุ์สูง (ผสมติดง่ายให้ลูกทุกปี) เกษตรกรจึงนิยมนำแม่พันธุ์โคขาวลำพูนไปผสมข้ามกับโคเนื้อสายพันธุ์ต่างประเทศ (เพทาย พงษ์เพ็ญจันทร์, 2547)

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูนเป็นแม่พื้นฐานสำหรับผลิตโคลูกผสมพื้นเมือง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ โคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ เพื่อให้ได้ลูกเพศเมียที่มีลักษณะสมบูรณ์พันธุ์สูง เจริญเติบโตดี และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศร้อน มีรายงานว่า เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจากความร้อน (heat stress) จะส่งผลด้านลบต่อความสมบูรณ์ของสุขภาพ ประสิทธิภาพการผลิต และความสามารถในการสืบพันธุ์ (Dobson and Smith, 2000) ในโคนมที่ได้รับความเครียดจากความร้อนส่งผลให้ปริมาณน้ำนม (Ravagnolo, et al., 2000) และความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง (Sartori, et al., 2004) ในสุกรส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของลูกสุกรลดลง (Wegner, et al., 2014)

การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า ผิวหนังเป็นส่วนที่ช่วยปกป้องโครงสร้างอวัยวะภายในจากสภาพแวดล้อมภายนอก ในผิวหนัง พบว่า มีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นองค์ประกอบซึ่งอยู่ในส่วนของหนังแท้ (Fanny, 2004) การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในหลอดทดลองมีรายงานว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากชั้นเนื้อบริเวณใบหูของสุกร สามารถมองเห็นได้ 5-10 วัน หลังจากเซลล์แบ่งตัวออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ และยังพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง จนถึง $97.8\% \pm 1.21\%$ และ $94.9\% \pm 0.52\%$ ตามลำดับ นอกจากนี้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ตรวจพบโดยการย้อมสี Trypan Blue เหลืออยู่ที่ 90% (Changqing, et al., 2014) เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผิวหนัง มีบทบาททางสรีรวิทยา (Singh, et al., 2014) และการตอบสนองต่อการปรับตัวทางชีวเคมีของเซลล์ (Fujita, 1999) เมื่อเซลล์ในร่างกายได้รับความเครียดจากความร้อน ส่งผลให้เซลล์มีการแสดงออกของยีนในกลุ่มของฮีตช็อคโปรตีน เพื่อผลิตฮีตช็อคโปรตีนที่มีกลไกป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน (protein aggregation) (Csermely, et al., 1998) และรักษาโครงสร้างของโปรตีนที่เสียหายกลับมาหมุนพับตัวสู่สภาพปกติ (Basirico, et al., 2011) โดยกลุ่มฮีตช็อคโปรตีน (heat shock protein, HSPs) มีอยู่ 6 ชนิดตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weights) ได้แก่ HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 HSP40 และ HSP27 ซึ่งมีหน้าที่แตกต่างกันไป โดย HSP70 เป็นตัวแรกที่มีการตอบสนองเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นโดยความเครียดจากความร้อน (Kregel, 2002)

อย่างไรก็ตามการศึกษากการแสดงออกของยีน HSP70 ในโคชาวลำพูนและโคลูกผสมดังกล่าว ยังไม่มีรายงาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีนฮีตช็อคโปรตีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโคชาวลำพูน โคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ ภายใต้อุณหภูมิร้อน เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกโคเนื้อคุณภาพที่สามารถเลี้ยงในสภาพอากาศร้อนของเมืองไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง
2. เพื่อเปรียบเทียบการทนร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับจากโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง
3. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ RNA ของยีน *Heat shock protein 70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง

สมมติฐานของการวิจัย

1. เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมพื้นเมืองหนึ่งสายพันธุ์สามารถทนต่อความเครียดจากความร้อน
2. เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมพื้นเมืองหนึ่งสายพันธุ์มีการแสดงออกของยีนเพื่อช่วยให้กลไกระดับเซลล์ในร่างกายของโคมีการตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ขอบเขตทางด้านสถานที่

จัดแบ่งพื้นที่ดำเนินงานเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่

1.1 พื้นที่ดำเนินการภาคสนาม

ดำเนินการจัดเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อใบหูของโคพื้นเมือง จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และโคลูกผสมพื้นเมือง จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่

1.2 พื้นที่ปฏิบัติการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้พื้นที่ห้องปฏิบัติการของคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยวางแผนปฏิบัติการ ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ และศึกษาการแสดงออกของยีนฮีทช็อคโปรตีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากโค 3 สายพันธุ์ โคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส โคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ และโคขาวลำพูน ภายใต้อุณหภูมิร้อน ที่สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์-และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ทำการวิเคราะห์ข้อมูลค่าเฉลี่ยของความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

2. ขอบเขตทางด้านเวลา

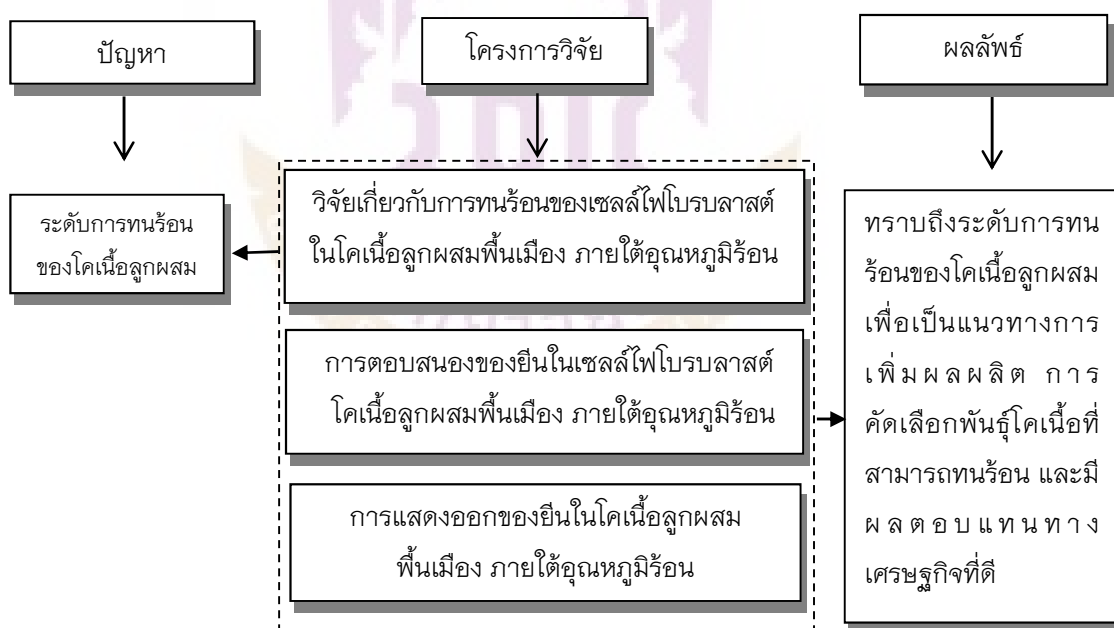
เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2560 สิ้นสุดการทดลอง เดือนเมษายน พ.ศ. 2561

3. ขอบเขตด้านงานวิจัย

ทำการศึกษาอัตราการแบ่งตัว อัตราการมีชีวิตรอด และการแสดงออกของยีนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคเนื้อผสมพื้นเมืองภายใต้ความเครียดจากความร้อน

ทฤษฎีและแนวคิด

จากปัญหากลุ่มเครื่องข่ายเกษตรกรในสหกรณ์โคขุนดอกคำใต้ จำกัด ยังไม่สามารถเลือกพันธุ์โคเนื้อที่มีสมรรถภาพการเจริญเติบโต และทนร้อนได้ดี สำหรับส่งเสริมให้เกษตรกรนำไปเลี้ยง ดังนั้น งานวิจัยนี้จะศึกษาต่อเนื่องจากการเปรียบเทียบสมรรถภาพการเจริญเติบโตของโคเนื้อผสม (กสิกรรม, 2550) มียีนที่ตอบสนองต่อความร้อนจากสายแม่ขาวลำพูนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งหญ้าของเกษตรกรในภาคเหนือ โดยอาศัยหลักการมีส่วนร่วมระหว่างมหาวิทยาลัยพะเยา ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ เพื่อให้ได้พันธุ์โคเนื้อที่เหมาะสมรองรับยุทธศาสตร์การผลิตโคขุนของจังหวัดพะเยา และประเทศไทย ในชื่อตราสินค้า “โคขุนดอกคำใต้” จังหวัดพะเยา ซึ่งมีกิจกรรมภายใต้โครงการวิจัยดังแสดง **ภาพ 1**



ภาพ 1 แสดงทฤษฎีและแนวคิดโครงการวิจัยในการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

นียมคัพทเฉพาะ

การแสดงออกของยีนฮีตช็อคโปรตีน 70, ภายใต้อุณหภูมิร้อน, เซลล์ไฟโบรบลาสต์,
โคลูกผสมขาวลำพูน

HSP70 gene expression, Under hyperthermia, Cell fibroblast, White Lamphun
Crossbred beef cattle

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงการตอบสนองและการแสดงออกระดับยีนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์
ในโคลูกผสมภายใต้ความร้อน
2. สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางการคัดเลือกโคลูกผสมที่ทนร้อน
สำหรับส่งเสริมเกษตรกรต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศักยภาพของประเทศไทยในการผลิตและส่งออกโคเนื้อ

ประเทศไทยถือได้ว่าเป็นผู้นำด้านการผลิตโคเนื้อในกลุ่ม AEC (Asean Economic Community) โดยโคเนื้อที่ผลิตขึ้นในประเทศมีการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ เช่น ประเทศมาเลเซีย กัมพูชา เวียดนาม และจีน จากสถิติกรมศุลกากรปี 2553 มีการส่งออกโคมีชีวิตจำนวน 254,601 ตัว เนื้อโคแปรรูปและผลิตภัณฑ์ 1,438.7 ตัน หนังโค 46,078 ตัน (ส่วนใหญ่ ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย ฮองกง และเวียดนาม) ปี 2554 มีการส่งออกโคมีชีวิตจำนวน 110,381 ตัว ส่งออกเนื้อโคแปรรูป และผลิตภัณฑ์ 9,069 ตัน ส่งออกหนังโค 38,815.5 ตัน (ส่วนใหญ่ ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย ฮองกง และเวียดนาม) ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของประชากรโคเนื้อลดลงประมาณ 3.38 ล้านตัว เปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณประชากรโคเนื้อประมาณ 7.79 ล้านตัว (กรมปศุสัตว์, 2559) เนื่องจากมีความต้องการบริโภคเนื้อโคในแต่ละปีเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้สาเหตุที่มีปริมาณประชากรโคเนื้อลดลงเกี่ยวข้องกับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อยังประสบปัญหาหลายอย่าง ได้แก่ ขาดความรู้ในด้านการจัดการการเลี้ยงดูโคเนื้อ ขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ทำให้โคได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ การปรับปรุงพันธุ์ ปัญหาโรคระบาดสัตว์ เช่น โรคปากและเท้าเปื่อย โรคพยาธิ ซึ่งเป็นผลทำให้การผลิตโคเนื้ออย่างไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศ โดยเฉพาะเนื้อโคคุณภาพสูง (premium grade) (กรมปศุสัตว์, 2559) ในปี 2560-2565 คาดการณ์ว่าการผลิตเนื้อโคจะมีปริมาณ 61.32 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจาก ปี พ.ศ. 2559 ร้อยละ 1.38 ผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีการผลิตเพิ่มขึ้น ได้แก่ สหรัฐอเมริกา บราซิล จีน และอินเดีย ซึ่งผลิตเพิ่มขึ้น ร้อยละ 3.68, ร้อยละ 2.00, ร้อยละ 0.72 และร้อยละ 2.35 ซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพและความสามารถสูง เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศต่าง ๆ ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ASEAN) มีความสามารถจะผลิตโคเนื้อส่งออกจำหน่ายต่างประเทศได้ และยังเป็นการสร้างอาชีพการเลี้ยงโคเนื้อ สร้างรายได้เสริมให้กับเกษตรกรนอกจากการทำไร่ทำนาได้เป็นอย่างดี (สำนักส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561, สื่อบอนไลน์)

การพัฒนากระบวนการผลิตโคเนื้อ

การผลิตโคเนื้อเชิงการค้าต้องมีการวางแผนการผลิตให้สอดคล้องตามความต้องการของตลาดตามธุรกิจที่กำหนดไว้ว่า ผลผลิตโคตอบสนองความต้องการของตลาดระดับใด ต้องการเนื้อโคตามเกณฑ์มาตรฐานอย่างไร เป็นโคสายพันธุ์อะไร อายุเท่าไร จัดการเลี้ยงดูแบบใด และปริมาณความต้องการโคเป็นอย่างไร ซึ่งต้องมีการวางแผนการผลิตและกำหนดวิธีแนวทางปฏิบัติให้สอดคล้องกันในแต่ละกลุ่มการผลิตทั้งระบบ ในปัจจุบันการปรับโครงสร้างการผลิตสามารถจัดกลุ่มสำหรับการการผลิต ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ การเลี้ยงแม่โคเพื่อผลิตลูก กลุ่มเลี้ยงโครอขุน กลุ่มเลี้ยงโคขุน และกลุ่มแปรรูปจำหน่ายเนื้อโคและทำผลิตภัณฑ์ (สำนักส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2561, สื่อบอนไลน์)

การเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทย สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่หนึ่ง คือ กลุ่มโคต้นน้ำ ซึ่งเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อจะผลิตลูกโคจำหน่าย โดยจะจำหน่ายลูกโคที่มีอายุตั้งแต่หย่านม 1 ปีขึ้นไป กิจกรรมที่สำคัญ ได้แก่ การผสมพันธุ์ และการให้อาหาร รวมถึงการดูแลด้านสุขภาพของโคอนุบาล

กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มโคกลางน้ำ ซึ่งเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อจะรับซื้อโคจากกลุ่มต้นน้ำโดยตรงเพื่อนำมาเลี้ยง และส่งไปยังขั้นตอนต่อไป กิจกรรมที่สำคัญ ได้แก่ การจัดการด้านอาหาร

กลุ่มที่สาม คือ กลุ่มโคปลายน้ำ ซึ่งกลุ่มนี้จะรับโคเข้ามาจากกลุ่มกลางน้ำ เพื่อนำมาขุนให้ได้น้ำหนัก และเนื้อที่มีไขมันแทรก เป็นระยะเวลาประมาณ 10 เดือน กิจกรรมที่สำคัญ ได้แก่ การต้อน การจัดการด้านอาหาร โดยให้กินอาหารข้นอย่างเต็มที่ (เอกชัย บุญจันทร์, 2554, สื่อบอนไลน์) ดังภาพ 2



ภาพ 2 แสดงรูปแบบการเลี้ยงโคเนื้อในเขตภาคเหนือตอนบน

ที่มา: เอกชัย บุญจันทร์, 2554, สื่อบอนไลน์

โคเนื้อพันธุ์ดีสำหรับผลิตเป็นโคเนื้อคุณภาพเชิงการค้า

การปรับปรุงการเลี้ยงโคเนื้อที่จะทำกำไรได้ดี จะต้องเริ่มตั้งแต่เลือกพันธุ์ที่เลี้ยงให้เหมาะสมกับระบบ หรือวิธีการจัดการเลี้ยงดู การให้อาหารที่เหมาะสมกับความต้องการของโคระยะต่าง ๆ ซึ่งการเลี้ยงโคเนื้อที่จะให้ผู้เลี้ยงได้กำไรตอบแทนมาก จะต้องเริ่มตั้งแต่การเลือกพันธุ์โค ซึ่งในปัจจุบันจึงมีการนำโคเนื้อจากต่างประเทศเข้ามา เช่น โคเนื้อพันธุ์ชาร์โลเลส์ (Charolais) โคเนื้อพันธุ์บราห์มัน (Brahman) โคเนื้อพันธุ์ซิมเมนทัล (Simmental) และโคเนื้อพันธุ์วากิว (Japanese Black) นอกจากนี้ ในส่วนของภาคเอกชนบางรายมีการนำโคเนื้อจากต่างประเทศหลายสายพันธุ์เข้ามาเลี้ยงเพื่อปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้โคพื้นเมืองที่มีอยู่ในประเทศไทยเป็นแม่พื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ (อัจฉรินทร์ สุวรรณภักดี, 2546) ที่สามารถเลี้ยงได้ในประเทศ และเหมาะที่เป็นแม่พื้นฐาน เช่น พันธุ์อเมริกันบราห์มัน ซึ่งทำให้ประเทศไทยมีโอกาสที่จะส่งโคเนื้อและผลิตภัณฑ์จากโคเนื้อที่มีคุณภาพสูง และราคาที่สูง ไปยังต่างประเทศในกลุ่ม AEC มากขึ้น

นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีโคเนื้ออีกหลายสายพันธุ์ ซึ่งเป็นโคเนื้อพันธุ์ดีที่พัฒนาขึ้นโดยคนไทย ได้แก่ โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน (Kamphaeng Saen Beef Cattle) โคเนื้อพันธุ์ตาก (Tak Beef Cattle) โคเนื้อพันธุ์กบินทร์บุรี (Kabinburi Beef Cattle) และโคเนื้อพันธุ์ภูพาน (Phupan Beef Cattle) ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของโคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน โคเนื้อพันธุ์ตาก โคเนื้อพันธุ์กบินทร์บุรี และโคเนื้อพันธุ์ภูพาน คือ 1.04, 1.40, 1.19 และ 0.738 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน ตามลำดับ (นันทนา ช่วยชูวงศ์ และคณะ, 2540; ชำนาญบุญมี และคณะ, 2555; ศุภชัย อุดชาชน และคณะ 2557; 2558) ปัจจุบันกรมปศุสัตว์ยังมีการพัฒนาพันธุ์โคลูกผสมพื้นเมืองกับแองกัสที่มีคุณภาพเนื้อดี เป็นที่ต้องการของตลาด คือ มีไขมันแทรกในเนื้อสูง เนื้อมีความนุ่ม เหมาะสำหรับนำไปทำสเต็กคุณภาพสูงได้ สามารถเลี้ยงง่ายภายใต้สภาพแวดล้อมของไทย มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง

ข้อจำกัดของโคเนื้อลูกผสมเชิงการค้า

โคเนื้อลูกผสมในทางเชิงการค้าที่มีสายเลือดยุโรปสูง เมื่อนำมาเลี้ยงในเขตร้อนชื้นหรือเขตกึ่งร้อน มักประสบกับปัญหาเกี่ยวกับความทนทานต่อสภาพอากาศร้อนชื้น รวมทั้งโรคและแมลงกวนสัตว์ (เวียงยศ พิลาจันทร์ และคณะ, 2559) ซึ่งผลกระทบจากอากาศร้อนส่งผลให้สัตว์นั้นไม่สามารถระบายความร้อนออกจากร่างกายได้อย่างเหมาะสม ทำให้อุณหภูมิภายในร่างกายนั้นสูงขึ้น และยังส่งผลกระทบต่าง ๆ ต่อร่างกาย ทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนี้

1. ผลกระทบโดยตรง

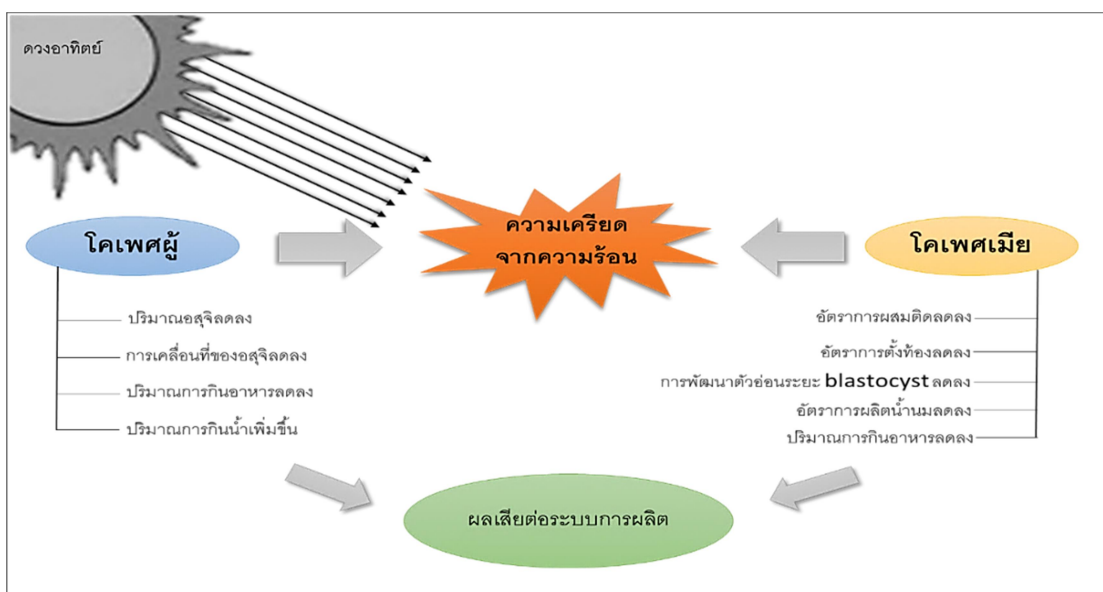
1.1 ผลต่อพฤติกรรมกรรมการแทะเล็ม โดยยุโรปซึ่งคุ้นเคยกับอากาศหนาวเมื่อนำมาเลี้ยงในเขตอากาศร้อน โคจะแสดงพฤติกรรมหยุดแทะเล็มหญ้าในช่วงกลางวัน เนื่องจากความร้อนของอากาศ แต่จะแสดงพฤติกรรมกรรมการแทะเล็มหญ้าในช่วงเวลาเช้าและตอนเย็น ในวันที่อากาศร้อนจัดมาก โคมักจะหลบเข้าร่วมหยุดการแทะเล็ม ดังนั้น ในช่วงฤดูร้อน โคที่เลี้ยงปล่อยแทะเล็มหรือปล่อยไล่ทุ่งหากินเองตามธรรมชาติ จะมีน้ำหนักลดเนื่องจากได้กินอาหารที่ไม่เพียงพอ (พิพัฒน์ สมภาร, 2555)

1.2 ผลต่อการกินและการใช้ประโยชน์จากอาหาร สภาพอากาศร้อนส่งผลกระทบต่ออาการกินอาหารอย่างเห็นได้ชัด ถ้าอากาศร้อนเกิน 24 องศาเซลเซียสขึ้นไป จะทำให้สัตว์กินอาหารลดลง และอุณหภูมิแวดล้อมเพิ่มสูงขึ้นเกิน 40 องศาเซลเซียส โดยยุโรปจะหยุดกินอาหารและหยุดการเคี้ยวเอื้อง ซึ่งสัตว์เกิดความเครียดอย่างรุนแรง อาจทำให้สัตว์นั้นถึงแก่ความตาย (Gaughan, et al., 2009)

น้ำดื่มนอกจากจะมีความสำคัญต่อการทำงานของร่างกาย ยังช่วยระบายความร้อนแก่สัตว์ ในโคที่มีสายเลือดยุโรปสูงจะมีพฤติกรรมการกินน้ำมากขึ้น เมื่อเผชิญกับภาวะอากาศร้อน ซึ่งมีผลทำให้สัตว์กินอาหาร และให้ผลผลิตลดลง (บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2542)

1.3 ผลต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากอากาศร้อนมีผลทำให้สัตว์ไม่อยากกินอาหารหรือกินอาหารได้น้อยลง ดังนั้นจึงส่งผลกระทบต่อทำให้สัตว์โตช้า และมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตลดลง (บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2542)

1.4 ผลต่อการสืบพันธุ์ อากาศร้อนมีผลทำให้สัตว์เพศเมียมีรอบการเป็นสัดไม่แน่นอน รวมทั้งส่งผลกระทบต่อให้อัตราการผสม อัตราการตั้งท้อง ความสมบูรณ์พันธุ์ การพัฒนาตัวอ่อนในช่วงแรก อัตราการผลิตน้ำนมลดลง นอกจากนี้ ความร้อนยังส่งผลกระทบต่อในสัตว์เพศผู้ มีปริมาณการกินอาหาร ปริมาณอสุจิ และการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง 48% (Hansen, 2009) นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของต่อมไร้ท่อ คือ การลดลงของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ฮอร์โมนเอสโตรเจน และฮอร์โมนไทรอยด์ (Walsh, 2011) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของต่อมไร้ท่ออาจนำไปสู่ความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ มดลูกและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหลังคลอด ดังภาพ 3



ภาพ 3 แสดงผลจากการที่สัตว์เพศผู้และสัตว์เพศเมียที่ได้รับความร้อนทำให้ส่งผลทำให้ในสัตว์เพศผู้มีปริมาณอสุจิ การเคลื่อนที่ของอสุจิ ปริมาณการกินอาหารลดลง และส่งผลทำให้สัตว์เพศเมียมีอัตราการผสมติด อัตราการตั้งท้อง การพัฒนาตัวอ่อนระยะ blastocyst อัตราการผลิตน้ำนมลดลง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hansen, et al., 2009

2. ผลกระทบทางอ้อม

2.1 ผลต่อคุณภาพอาหาร สภาพอากาศร้อนหรือแห้งแล้ง อาจส่งผลให้พืชบางชนิดบางประเภท สะสมสารที่เป็นพิษต่อสัตว์ เช่น ไนเตรท เป็นต้น (บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2542)

2.2 ผลต่อโรคและพยาธิ อากาศร้อนขึ้นส่งเสริมการขยายพันธุ์ของพยาธิภายนอกและภายในของสัตว์ เชื้อราและพาหะนำโรค เช่น แมลงจะเพิ่มจำนวนได้ดีในสภาพอากาศร้อน ดังนั้น สัตว์ที่เลี้ยงในสภาพอากาศร้อนจะเสี่ยงต่อการเจ็บป่วยมากกว่าสัตว์ที่เลี้ยงในเขตอากาศหนาว (บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2542)

ความเครียดจากความร้อน (Heat stress)

ในสภาพอุณหภูมิสูงสัตว์จะลดกิจกรรมต่าง ๆ ลง เพื่อลดปริมาณความร้อนที่สร้างขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งผลกระทบจากอากาศร้อนส่งผลให้สัตว์นั้นเกิดสภาวะความเครียดจากความร้อน (Heat stress) ความเครียดจากความร้อน คือ สภาวะที่สัตว์ไม่สามารถระบายความร้อนออกจากร่างกายได้ สัตว์จะแสดงอาการออกมาโดยสังเกตได้จากพฤติกรรมของสัตว์ เช่น การแสดงอาการหายใจทางปาก เป็นต้น ความร้อนที่ทำให้เกิดเครียดมี 2 สาเหตุหลัก ๆ ได้แก่ ความร้อนจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดดในช่วงฤดูร้อน อุณหภูมิสูงขึ้น และความร้อนภายในตัวสัตว์ เช่น กระบวนการ metabolism ซึ่งโคที่กินอาหารในปริมาณมากกว่าปกติ กระเพาะรูเมนจะเกิดการหมักย่อยอาหาร จึงทำให้เกิดความร้อนภายในร่างกาย (วุฒิไกร บุญคุ้ม และคณะ, 2553) ซึ่งความเครียดที่เกิดจากความร้อนเป็นปัญหาสำคัญในประเทศเขตร้อนขึ้นเนื่องจากส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพสัตว์ ลดประสิทธิภาพการผลิต และลดความสามารถในการถ่ายทอดพันธุกรรม (Dobson and Smith, 2000)

ผลของความเครียดจากความร้อน

ผลของความเครียดจากความร้อน (Heat stress) ทำให้สัตว์นั้นไม่สามารถระบายความร้อนออกจากร่างกายได้อย่างเหมาะสม ในโคนม พบว่า ส่งผลให้ปริมาณน้ำนม (Ravagnolo, et al., 2000) และความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง (Sartori, et al., 2004) ในสุกร พบว่า ลดความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่สุกรสาว และอัตราการรอดชีวิตของลูกสุกร (Wegner, et al., 2014) ดังนั้น ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอุณหภูมิ จึงมีความสำคัญต่อการจัดการฟาร์ม พบว่า ผลของความเครียดเนื่องจากความร้อนจะรุนแรงมากขึ้น หากเกิดร่วมกับความชื้นในอากาศสูง (Wegner, et al., 2016) การศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Hansen, et al. (2009) ได้ทำการศึกษาความเครียดจากความร้อนต่อการสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่า ผลกระทบของความเครียดที่เกิดจากความร้อนส่งผลทำให้ปริมาณอสุจิลดลงถึง 53% ซึ่งผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Meyerhoeffer, et al. (1985) ได้ศึกษาเกณฑ์การประเมินระบบสืบพันธุ์ของโคเนื้อเพศผู้เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น พบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงถึง 48% นอกจากนี้ Sakatani, et al. (2004) ได้ทำการศึกษาผลของความเครียดจากความร้อนต่อการพัฒนาตัวอ่อนของโคในหลอดทดลอง พบว่า ความเครียดจากความร้อนส่งผลทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนในระยะ blastocyst ลดลงถึง 40% ซึ่งส่งผลเสียต่อระบบการผลิต ดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงผลการศึกษาความเครียดจากความร้อน

Effects	percentage	Reference
ปริมาณอสุจิลดลง	53%	Hansen, et al. (2009)
การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง	48%	Meyerhoeffer, et al. (1985)
การพัฒนาระยะ blastocyst ลดลง	40%	Sakatani, et al. (2004)

ที่มา: Meyerhoeffer, et al., 1985; Sakatani, et al., 2004; Hansen, et al., 2009

กลไกการตอบสนองต่อความร้อนของร่างกาย

สัตว์มีความสามารถในการทนร้อน และการตอบสนองทางสรีรวิทยาแตกต่างกัน ซึ่งการวัดอุณหภูมิในร่างกายเป็นตัวบ่งบอกถึงการตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อน และรักษาสมดุลร่างกาย (Hansen, 2009) เมื่อสัตว์เผชิญกับความร้อนหรือความชื้นจากสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ส่งผลทำให้สัตว์ต้องพยายามรักษาสมดุลอุณหภูมิในร่างกาย (ทัตพร ศิริภักดิ์ และสุภร กตเวทิน, 2557) การตอบสนองต่อความร้อนของสัตว์นั้น จะมีอัตราการเต้นของหัวใจที่เร็ว และการหายใจที่เพิ่มขึ้น เพื่อกระตุ้นให้เลือดสูบฉีดไปยังเส้นเลือดฝอยมากขึ้น รวมถึงการขับเหงื่อเพื่อระบายความร้อนออกจากร่างกาย ในด้านระดับเซลล์ ผิวหนังเป็นอวัยวะใหญ่สุดของร่างกาย ที่ช่วยปกป้องโครงสร้างอวัยวะภายในจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น มลพิษจากการกระทำของมนุษย์ อุณหภูมิความชื้นจากสภาพภูมิอากาศ และการแผ่รังสี นอกจากนี้ ผิวหนังยังช่วยควบคุมน้ำ และการระบายความร้อนออกจากร่างกาย (วิชาภรณ์ เลิศวีรพล, 2560) ผิวหนัง ประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) ชั้นหนังแท้ (Dermis) และชั้นไขมัน (Subcutis) ในผิวหนัง พบว่า มีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งอยู่ในส่วนของหนังแท้ (Fanny, 2004) ถึงแม้ว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผิวหนัง แต่ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับไฟโบรบลาสต์และการตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อนในสัตว์ยังมีน้อย ความเข้าใจที่สำคัญเกี่ยวกับบทบาททางสรีรวิทยาของผิวหนังจะช่วยแก้ไขการทนร้อน และกลไกต่าง ๆ ภายใต้สภาวะความเครียดที่แตกต่างกัน (Singh, et al., 2014)

การตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์

การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อความร้อนที่รายงานก่อนหน้านี้ในเซลล์ของโค หู และมนุษย์ ชี้ให้เห็นถึงระดับของ HSP (Heat shock protein) ในยีน และโปรตีนภายใต้ความเครียดจากความร้อน (Collier, et al., 2006) สภาวะเครียดจากความร้อน พบว่า เซลล์มีการสร้างโปรตีนกลุ่มแชเพอโรน (Chaperones) ที่เรียกว่า ฮีทช็อกโปรตีน (Heat shock protein, HSPs)

1. Heat shock protein (HSPs)

ในสภาวะปกติภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า แชพโรนโปรตีน ทำหน้าที่ช่วยให้โปรตีนอื่น ๆ ที่เซลล์สร้างขึ้น มีการทำงานได้ตามหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิดได้อย่างเหมาะสม (Ellis, 1987; Hartl, 1996; Haslbeck, 2002) และสามารถพบแชพโรนโปรตีนในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ทั้งโปรแคริโอตและยูแคริโอต (Robert, 2003) โดยแชพโรนโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลระหว่างการสร้างและกำจัดโปรตีนภายในเซลล์ เมื่อเซลล์เผชิญกับสภาวะเครียด เช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ การขาดออกซิเจน (hypoxia) การขาดเลือด (ischemia) การได้รับรังสี (radiation) การอักเสบ (inflammation) และการติดเชื้อจุลชีพ (microbial infection) จะส่งผลทำให้เซลล์มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดเหล่านี้ โดยการสร้างแชพโรนโปรตีนหลายชนิดเพิ่มขึ้น เพื่อช่วยรักษาการคงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ ช่วยให้โปรตีนในเซลล์ที่เสียหายให้กลับมาสู่สภาพปกติ และดำรงชีวิตต่อไปได้ในสภาวะแวดล้อมนั้น (Sejerkilde, et al., 2003) และช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ (apoptosis) (Basirico, et al., 2011) เนื่องจากมีการค้นพบการทำงานของแชพโรนโปรตีน (Chaperones protein) จากเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อน จึงเรียกแชพโรนโปรตีนเหล่านี้ว่า HSP โดย HSP ที่พบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อาจแบ่งได้ออกเป็น 8 ประเภท โดยแบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weights) ดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงตำแหน่งภายในเซลล์และหน้าที่ของกลุ่มฮีทช็อคโปรตีนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

กลุ่ม Heat shock protein	ตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์	หน้าที่
1. HSP27 (sHSP)	ไซโตซอล, นิวเคลียส	ทำให้ไมโครฟิลาเมนต์มีความเสถียรภาพ, ป้องกันการตายของเซลล์
2. HSP60	ไมโทคอนเดรีย	ป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน
3. HSP70 family:		กลุ่มป้องกันการตายของเซลล์
4. HSP72 (Hsp70)	ไซโตซอล, นิวเคลียส	ป้องกันการตายของเซลล์
5. HSP73 (Hsc70)	ไซโตซอล, นิวเคลียส	โมเลกุลของแชพโรน
6. HSP75 (mHSP70)	ไมโทคอนเดรีย	โมเลกุลของแชพโรน
7. HSP78 (GRP78)	เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม	โมเลกุลของแชพโรน
8. HSP90	ไซโตซอล, เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม, นิวเคลียส	ควบคุมตัวรับฮอร์โมนสเตียรอยด์, ควบคุมการขนส่งโปรตีน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kregel, 2002

ซึ่งเซลล์ที่สร้าง HSP ในปริมาณมากจะแสดงถึงการทนต่อความร้อนได้ดี ในกลุ่มของ HSP ทั้งหมด พบว่า HSP70 ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากที่สุด (Kregel, 2002) ดังนั้นสามารถใช้ระดับการแสดงออกของยีน *HSP70* จากเซลล์เป็นตัวชี้วัด (biomarker) การทนต่อความร้อนของโคเนื้อ (Basirico, et al., 2011) เพราะ HSP70 มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (Kregel, 2002) โดยเฉพาะสภาพภูมิอากาศที่มีอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง HSP70 (inducible Hsp70) ในเซลล์มากขึ้น เพื่อให้เซลล์มีความสามารถทนต่อความร้อน (thermotolerance) โดยการลดโพลีเปปไทด์ที่มีความเสียหาย และผิดปกติภายในเซลล์ (Parsell, et al., 1993) นอกจากนี้ HSP70 ยังทำงานร่วมกับโปรตีนชนิดอื่น เช่น โปรตีน Bcl-2 โดยมีการศึกษาที่พบว่า HSP70 มีผลต่อการถอดรหัส (transcription) ของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมกระบวนการตายของเซลล์ (Wang, et al., 2014)

2. Heat shock protein 70 (HSP70)

อีทซ็อคโปรตีนชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่งมีโครงสร้างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเสถียรภาพสูงมาก เมื่อสิ่งมีชีวิตเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น การชะลอกระบวนการสร้างโปรตีนทั่วไป และโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ ตลอดจนสายโพลีเปปไทด์ที่อยู่ระหว่างการม้วนพับตัว เกิดความผิดปกติซึ่งนำไปสู่การม้วนพับกลายเป็นโมเลกุลที่ผิดปกติ หรือเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนของโปรตีน ในสภาวะความเครียดเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะกระตุ้นให้สังเคราะห์ HSP โดยเฉพาะ HSP70 เพิ่มมากขึ้น เพื่อช่วยในกระบวนการรักษาโมเลกุลโปรตีนให้เกิดการม้วนพับตัวที่ถูกต้อง ช่วยป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน ช่วยซ่อมแซมป้องกันเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจากความร้อนให้สามารถกลับมาทำหน้าที่ได้ถูกต้องเหมือนเดิม และทำให้เซลล์สามารถมีชีวิตต่อไปได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง (วิชาการณ์ เลิศวีรพล, 2560)

3. โครงสร้าง HSP70

โครงสร้างของโมเลกุล แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ 1) ATPase domain (ABD) เป็นบริเวณที่อยู่ด้าน N-terminal ของโปรตีน มีขนาดประมาณ 40 kDa 2) Peptide binding domain (PBD) เป็นบริเวณที่อยู่ด้าน C-terminal ของโปรตีน มีขนาดประมาณ 25 kDa ทั้งสองถูกแบ่งด้วย Hinge region โดยปลายด้าน N-terminal จับกับ ATP ส่วนปลายด้าน C-terminal หรือ Carboxyl terminal โดย EEVD domain จับกับซับสเตรท (substrate binding/refolding) แล้วปลายด้าน N-terminal จะถูกกระตุ้นให้เกิด ATP hydrolysis จากนั้นแชเพอโรนอื่น (co-chaperones) อีก 3 ประเภท จะเข้ามาจับและควบคุมการทำงานของ HSP70 ได้แก่ 1) J-domain คือ HSP40 ทำหน้าที่ในการนำสายโพลีเปปไทด์มายังโมเลกุล HSP70 แล้วจับกับส่วนปลายด้าน N-terminal

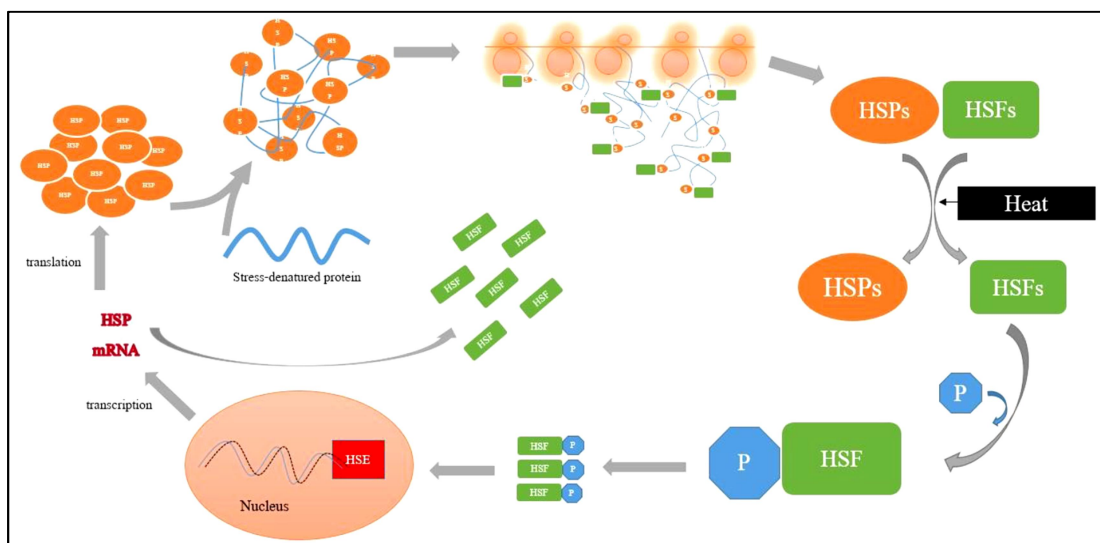
หรือ ATPase domain ใน HSP70 และส่งต่อสายโพลีเปปไทด์มายัง Peptide binding domain ที่อยู่ปลายด้าน C-terminal ของ HSP70 2) Nucleotide exchange factors ได้แก่ GrpE, Bag-1, HSP110 และ HSPBP1 เป็นโปรตีนที่จับกับ HSP40 และ ADP ทำหน้าที่ดึงเอา HSP40 และ ADP ออกจาก HSP70 ทำให้ HSP70 cycle เกิดขึ้นสมบูรณ์ 3) Tetratricopeptide repeat protein ได้แก่ Hop, Hip, Hdj-1 และ CHIP ทำหน้าที่ในการหมุนพับสายโพลีเปปไทด์ใหม่ให้ถูกต้อง (วิชาการณ์ เลิศวีรพล, 2560)

4. การทำงานของ HSP70

การทำหน้าที่ของ HSP70 ในเซลล์จะมีประสิทธิภาพต้องอาศัยปัจจัย 3 อย่าง ได้แก่ 1) การเพิ่มจำนวน (amplification) และความหลากหลาย (diversification) ของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ HSP70 2) ให้แชเพอโรนโปรตีนอื่นช่วยคัดเลือก HSP70 ที่สามารถทำงานได้อย่างเต็มที่ 3) การทำงานประสานกันระหว่างแชเพอโรนโปรตีนชนิด HSP70 และแชเพอโรนอื่น เพื่อให้ทำงานได้กว้างขึ้น (broad spectrum) ดังนั้น ประสิทธิภาพการทำงานของแชเพอโรนโปรตีนชนิด HSP70 จึงขึ้นกับการทำงานของแชเพอโรนโปรตีนอื่น และขึ้นกับการประสานงานของแชเพอโรนโปรตีนอื่น (co-chaperones) (วิชาการณ์ เลิศวีรพล, 2560)

5. กลไกการตอบสนองของ HSP70 จากความร้อน

การแสดงออกของ HSP70 (HSP70 expression) ในเซลล์ โดยในไซโทพลาซึม มี Heat shock factors (HSFs) จะจับกับ heat shock proteins (HSPs) ซึ่งอยู่ในสภาพไม่ทำงาน (inactive state) เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นความเครียดจากผู้ให้ความเครียด (stressors) เช่น สภาพอากาศร้อน สภาพอากาศเย็น จากสภาวะแวดล้อม จะส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดปัจจัยที่ทำให้เกิดฮีทช็อค (HSFs) ให้อยู่ในสภาพทำงาน (active state) และเกิดการแยกตัวจาก HSPs จากนั้น HSFs ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตกลุ่ม (phosphorylated, P) เกิดเป็น HSF trimer complexes โดย HSF trimer complexes เหล่านี้จะเข้าสู่นิวเคลียส และจับกับ heat shock elements (HSE) ที่ตำแหน่ง promoter region ของยีน HSP เพื่อเริ่มกระบวนการ Transcription ไปเป็น mRNA ของ HSP แล้วแปลรหัส (translation) ไปเป็น HSP ตัวใหม่ จากนั้น HSP ตัวใหม่เหล่านี้จะจับกับโปรตีนที่ถูกความร้อนทำลาย (Stress-denatured protein) ให้กลับมาอยู่ในสภาพสามารถช่วยซ่อมแซมโมเลกุลภายในเซลล์ที่เสียหายได้ ดังภาพ 4



ภาพ 4 แสดงกลไกการส่งสัญญาณที่กระตุ้นการแสดงออกของ HSPs

ที่มา: Kregel, 2002

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ Morphogens (กระบวนการทำให้เซลล์ที่แบ่งตัวสามารถจัดระเบียบช่วงของการเจริญเติบโต) และ Mitogens (สารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวอยู่ในรูปของโปรตีน) ปัจจัยเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต (Agha, et al., 2016) และเป็นสารสำคัญที่หลั่งออกมาจากเซลล์ต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อ และยังคงควบคุมการขยายตัวของเซลล์ การส่งสัญญาณ และการแบ่งตัวของเซลล์ (Schuldiner, et al., 2000) มีรายงานว่า การแบ่งตัวของเซลล์ คือ การเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นโปรคาริโอต (Prokaryote) หรือยูคาริโอต (Eukaryote) การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต จะมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ในการแบ่งเซลล์มี 2 กระบวนการ เกิดสลับกันไป คือ การแบ่งตัวของนิวเคลียส (Karyokinesis) และการแบ่งตัวของไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) โดยปกติเมื่อสิ้นสุดการแบ่งตัวของนิวเคลียสแล้ว จะเริ่มการแบ่งตัวของไซโทพลาสซึมทันที (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์, 2547) จากข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdian, et al. (2015) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้ตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (Human dermal fibroblasts; HDFs) เป็นเซลล์ชนิด dermis ที่มีต้นกำเนิดพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมด ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวที่ดี และสามารถเลี้ยงได้ง่ายในหลอดทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร 10% FBS-DMEM ประกอบด้วย ยาปฏิชีวนะ (penicillin / streptomycin 1%) พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์

ที่ทำการเลี้ยงในหลอดทดลอง มีการเจริญเติบโตถึง 80%–90% นอกจากนี้ Changqing, et al. (2014) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากชิ้นเนื้อไขกระดูกพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องจนถึง 97.8%±1.21% และ 94.9%±0.52% ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wu, et al. (2017) ได้ศึกษาเซลล์ fibroblast ที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน (HS) ในโคเขตร้อน (*Bos indicus*) และโคเขตหนาว (*Bos taurus*) ต่อการแสดงออกของ HSP70 ที่ 42 องศาเซลเซียส พบว่า ชั่วโมงที่ 12 ในโคพันธุ์ Hostein อยู่ที่ 4.5% และโคพันธุ์ Taiwan yellow อยู่ที่ 6.5% ผลสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าของ Sheikh, et al. (2016) ทำการศึกษาการเสริมแร่ธาตุสังกะสี (zinc) ในหลอดทดลองของเซลล์เม็ดเลือดขาวในโค พบว่า มีการแสดงออกของ HSP70 ในโคพันธุ์ Sahiwal (*Bos indicus*) และ โคพันธุ์ Frieswal (*Bos taurus*) อยู่ที่ 6.05% และ 4.81% ตามลำดับ ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงผลการศึกษากการแสดงออกของ HSP70 ในโคเนื้อลูกผสม

Reference	Education	HSP70 Expression/%
Wu, et al. (2017)	ในเซลล์ fibroblast (HS) 42 องศาเซลเซียส ที่ 12 ชั่วโมง ของโค Hostein และโค Taiwan yellow	4.5%, 6.5%
Sheikh, et al. (2016)	การเสริม zinc ในหลอดทดลองของเซลล์เม็ดเลือดขาวในโค Sahiwal และโค Frieswal	6.05%, 4.81%

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sheikh, et al., 2016; Wu, et al., 2017

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

แผนการทดลอง ขั้นตอน และวิธีการในการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. หมายเลขเซลล์ทดลอง

เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ UP-AE60-01-01-001

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

- 2.1 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ
- 2.2 เครื่องกรองน้ำระบบดีไอ (Deionization system)
- 2.3 เครื่องซังสาร ทดนิยม 2 ตำแหน่ง
- 2.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge)
- 2.6 เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ ขวดแก้ว Duran ขนาด 1000 ml และขนาด 200 ml
- 2.7 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 MM (CELL T.C. DISH 60x15 MM)
- 2.8 ตู้อบ (hot air oven)
- 2.9 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Laminar air flow cabinet)
- 2.10 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator, CO₂)
- 2.11 มีดผ่าตัด ปากคีบ (forceps) และตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2.12 Pasteur pipette drop size 3 ml
- 2.13 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave machine)
- 2.14 พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 2.15 พาสเจอร์ปีเปต (Pasture pipette)
- 2.16 ชุดเครื่องมือผ่าตัด
- 2.17 อุปกรณ์นับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer)

3. สารเคมีและสารตั้งต้น

Material	company	Catalog number
3.1 DMEM media	Sigma-Aldrich	31600-034
3.2 Fetal bovid serum	Gibco-Invitrogen	10270-106
3.3 Antibiotic-antimycotic (ABAM)	Gibco-Invitrogen	15240-062

3.4 Phosphate buffer saline (PBS)	Gibco-Invitrogen	21600-010
3.5 Trypsin-EDTA (0.05%)	Gibco-Invitrogen	25200-056
3.6 Trypan Blue Stain (0.4%)	Gibco-Invitrogen	15250-061

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโมเลกุล

- 4.1 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสแตอริโอ
- 4.2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction: PCR)
- 4.3 เครื่อง gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล
- 4.4 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5. สัตว์ทดลอง

ทำศึกษาในโคเนื้อเพศเมียโดยจัดการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) โดยมี 3 กลุ่มการทดลอง (Treatment) แต่ละกลุ่มการทดลอง มี 3 ซ้ำ (Replication) จะใช้โคทั้งหมด 9 ตัว ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 โคขาวลำพูนพันธุ์แท้ เพศเมีย	จำนวน 3 ตัว
กลุ่มที่ 2 โคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส เพศเมีย	จำนวน 3 ตัว
กลุ่มที่ 3 โคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ เพศเมีย	จำนวน 3 ตัว

ทั้ง 3 กลุ่มการทดลองจะถูกฮีสซ็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ความชื้นในอากาศ 7% CO₂ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ

- 6 ชั่วโมง (42 องศาเซลเซียส)
- 12 ชั่วโมง (42 องศาเซลเซียส)
- 24 ชั่วโมง (42 องศาเซลเซียส)
- 48 ชั่วโมง (42 องศาเซลเซียส)

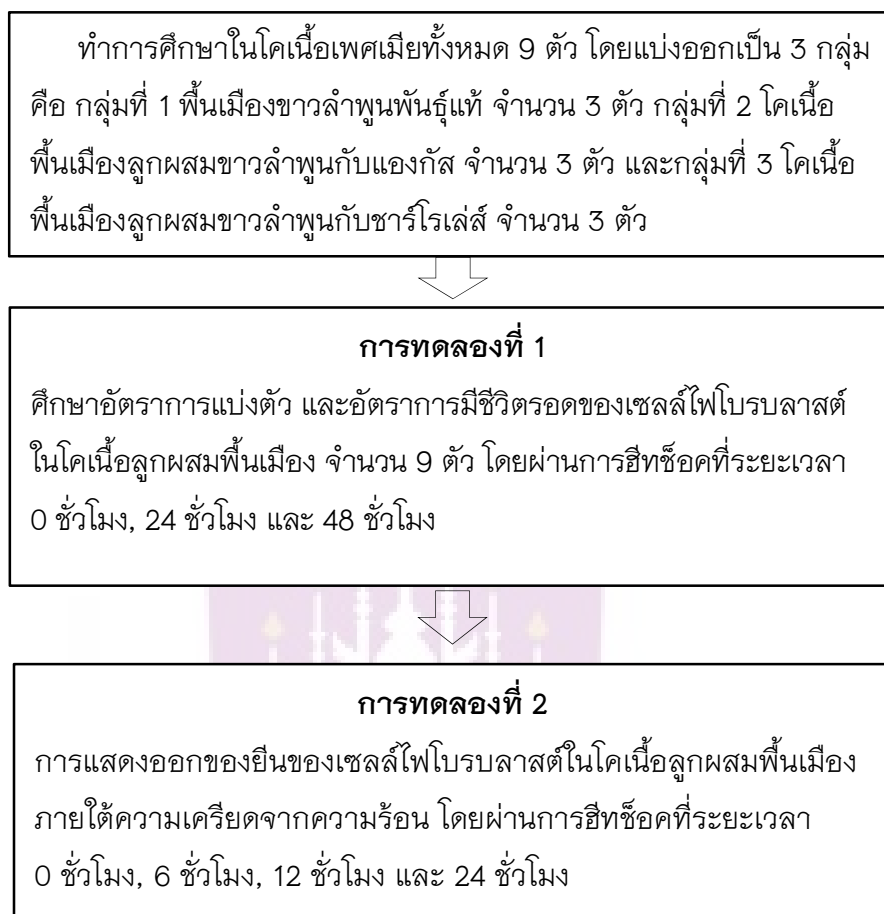
แผนการทดลอง

การศึกษาฮีสซ็อคโปรตีน 70 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคเนื้อพื้นเมืองและโคเนื้อลูกผสมพื้นเมือง แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ทำการศึกษาอัตราการแบ่งตัว และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) ในโคเนื้อ 3 สายพันธุ์

การทดลองที่ 2 ทำการศึกษาการตอบสนองของยีนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคเนื้อพื้นเมืองพันธุ์แท้ และลูกผสมพื้นเมือง ภายใต้ความเครียดจากความร้อน

แผนภาพการดำเนินงาน



ภาพ 5 แสดงแผนการดำเนินงานของงานวิจัย

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราการแบ่งตัว และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง

1. การเก็บและการเพาะเลี้ยงเซลล์ของโคที่จะนำมาทำการศึกษา

1.1 อุปกรณ์

- 1.1.1 มีดผ่าตัด
- 1.1.2 ปากคีบ (forceps)
- 1.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.1.4 จานเพาะเชื้อ Petri dish

1.1.5 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 MM

1.1.6 แอลกอฮอล์ (95%)

1.1.7 พาสเจอร์ปีเปต ขนาด 3 มิลลิลิตร

1.1.8 ปีเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร

1.1.9 Phosphate buffer saline

1.1.10 10% FBS+DMEM media

1.2 วิธีการดำเนินงาน

ดำเนินการติดต่อประสานงานไปยังศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ เพื่อขออนุมัติสำหรับคัดเลือกโคเนื้อและเก็บตัวอย่าง ดังภาพ 6



ภาพ 6 แสดงการคัดเลือกโคเนื้อสำหรับเก็บตัวอย่างที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา (A) และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่ (B)

เมื่อคัดเลือกโคได้แล้วทำการเก็บเซลล์ไข่มุมของโคจากกลุ่มการทดลอง โดยนำโคเข้าชองบังคับ แล้วทำความสะอาดบริเวณไข่มุมด้วยสำลีชุบ 70% (V/V) ethanol ตัดเซลล์ไข่มุมขนาด 1 เซนติเมตร นำมาเก็บไว้ในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) เพื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการของสาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ดังภาพ 7



ภาพ 7 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากโคพื้นเมือง และโคลูกผสมพื้นเมือง

หมายเหตุ: A: ทำการคัดเลือกและบังคับโคเข้าซอง

B: ทำความสะอาดบริเวณใบหูของโค

C: เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากใบหู

D: นำตัวอย่างชิ้นเนื้อมายังห้องปฏิบัติการ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

จากนั้นนำเซลล์มาทำความสะอาดอีกรอบแล้วใช้มีดตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ในสภาพปลอดเชื้อ แล้วล้างปั่นตกที่ความเร็ว 3,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไปทำการล้างแบบเดิมด้วย PBS อีก 2 รอบ จากนั้นย่อยด้วย trypsin (0.025% (W/V) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มาล้าง Trypsin ออกโดย 10% FBS-DMEM โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที แล้วเติม culture medium แล้วนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนนำไปเก็บรักษาโดยการแช่แข็งตามวิธีของ

Intawicha, et al. (2009) และนำไปตรวจสอบการตอบสนองของยีนและการแสดงออกของยีน (Intawicha, et al., 2013; Lo, et al., 2015)

2. การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสม

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1.1 Phosphate buffer saline
- 2.1.2 10% FBS+DMEM media
- 2.1.3 Trypsin-EDTA (0.25%)
- 2.1.4 Trypan Blue Stain (0.4%)
- 2.1.5 ปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร
- 2.1.6 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 2.1.7 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ
- 2.1.8 หลอดทดลอง Eppendorf tube

2.2 วิธีการดำเนินงาน

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์สำเร็จ ทำการวางแผนการทดลองสำหรับประเมินอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ โดยกำหนดการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกพื้นเมืองและโคกผสมพื้นเมือง ที่ระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ โดยนำตัวอย่างเซลล์มาทำความสะอาดด้วย Phosphate buffer saline จำนวน 2 รอบ แล้วดูดออก จากนั้นเติมเอนไซม์ Trypsin-EDTA (0.25%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (CELL T.C. DISH 60x15 MM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38.5 (5% CO₂ in air) องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม เติม 10% FBS+DMEM media เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ Trypsin-EDTA (0.05%) จากนั้นดูดตัวอย่างใส่หลอดทดลอง eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,300xg เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เหลืองทิ้งให้เหลืองตะกอน เติม 10% FBS+DMEM media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ขั้นตอนการตรวจนับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยการย้อมสี Trypan Blue Stain (0.4%) โดยสูบลูกตัวอย่างในหลอด eppendorf ที่ประกอบด้วยเซลล์ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสม (mix) กับน้ำยา Trypan Blue Stain (0.4%) อัตราส่วน 20:20 จากนั้นเตรียมฮีโมไซโตมิเตอร์ สำหรับตรวจนับในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยฉีดตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการย้อมสีด้วย Trypan blue stain (0.4%) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในฮีโมไซโตมิเตอร์ และดำเนินการนับจำนวนบันทึกผล

3. การฮีทช็อคเซลล์ไฟโบรบลาสต์

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ตู้ Incubate CO₂

3.1.2 ตัวอย่างเซลล์

3.2 วิธีดำเนินการ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะถูกนำมาฮีทช็อค ตามวิธีของ Lee et al. (2016) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เก็บแช่แข็งไว้จะถูกนำมาละลาย (thawed) ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาเพาะเลี้ยงในจานอาหาร ที่มี 10% FBS DMEM ที่อุณหภูมิ 38.5 (5% CO₂ in air) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (passage 2) จากนั้นเติม Trypsin ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เพื่อนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยง (1×10⁶ /ml) ในจานอาหารที่มี 10% FBS DMEM (passage 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น สภาวะการเพาะเลี้ยง เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ฮีทช็อค จะมีอุณหภูมิอยู่ที่ 38.5 องศาเซลเซียส ความชื้นในอากาศ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (control group) โดยการทดลองมีเงื่อนไขการฮีทช็อค ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ความชื้นในอากาศ 7% CO₂ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ

Control group (38.5 องศาเซลเซียส)

6 h (42 องศาเซลเซียส)

12 h (42 องศาเซลเซียส)

24 h (42 องศาเซลเซียส)

48 h (42 องศาเซลเซียส)

การสกัด RNA สามารถทำได้หลังจากนำตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ผ่านการฮีทช็อคมาแล้ว ตามวิธีของ Lee, et al. (2016)

4. การตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสม

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 Phosphate buffer saline

4.1.2 10% FBS+DMEM media

4.1.3 Trypsin-EDTA (0.05%)

4.1.4 Trypan Blue Stain (0.4%)

4.1.5 ปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร

4.1.6 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)

4.1.7 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ

4.1.8 หลอดทดลอง eppendorf tube

4.2 วิธีดำเนินการ

เมื่อเซลล์ผ่านการสีที่ช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างเซลล์แต่ละกลุ่มการทดลองมาทำความสะอาดด้วย Phosphate buffer saline จำนวน 2 รอบ แล้วดูดออก จากนั้นเติมเอนไซม์ Trypsin-EDTA (0.25%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (CELL T.C. DISH 60x15 MM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38.5 (5% CO₂ in air) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มเติม 10% FBS+DMEM media เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ Trypsin-EDTA (0.25%) จากนั้นดูดตัวอย่างใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นตกตะกอน 1,300xg เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนที่เหลือทิ้งให้เหลือตะกอน เติม 10% FBS+DMEM media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ขั้นตอนการตรวจนับเซลล์ด้วยการย้อมสี Trypan Blue Stain (0.4%) โดยสูบลูกตัวอย่างในหลอด eppendorf ที่ประกอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสม (mix) กับน้ำยา Trypan Blue Stain (0.4%) อัตราส่วน 20:20 จากนั้นเตรียมฮีโมไซโตมิเตอร์สำหรับตรวจนับในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยฉีดตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการย้อมสีด้วย Trypan blue stain (0.4%) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในฮีโมไซโตมิเตอร์ และดำเนินการตรวจนับจำนวนเซลล์และบันทึกผล โดยเซลล์ที่มีการย้อมติดสีฟ้า จะเป็นเซลล์ที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ

การทดลองที่ 2 ศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสม

1. การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (Total RNA) โดยใช้ RNA extraction kit (Real Genomics YRB50)

1.1 อุปกรณ์

- 1.1.1 ชุดสกัด RNA (Real Genomics YRB50)
- 1.1.2 ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 1.1.3 ปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร
- 1.1.4 ปิเปต ขนาด 10 ไมโครลิตร
- 1.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated centrifuge)
- 1.1.6 หลอดทดลอง eppendorp

1.2 วิธีดำเนินการ

นำตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการสีที่ช็อคมาล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม Trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง (Falcon dish) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% FBS+DMEM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

และนำไปปั่นตกตะกอน 1,300xg เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์มาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ RNA extraction kit (Real Genomics YRB50) โดยเติม RBC Lysis Buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม RB Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบกำหนดดูดสารใส่ในหลอด Filter column set และนำไปปั่นตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนที่กรองเสร็จเติมใน RB column set จากนั้นเติมเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 2 นาที

จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วสวม RB column set กลับเข้าไปใหม่ เติม R-W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นสารละลายใส่ทิ้งแล้วสวม RB column set กลับเข้าไปใหม่ เติม R-Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนซ้ำ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นสารละลายใส่ทิ้ง จากนั้นสวม RB column set กลับเข้าไปอีกครั้ง นำไปปั่นตกตะกอนให้ระเหยจนแห้ง โดยใช้ระยะเวลา 3 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที จะได้อาร์เอ็นเอ ที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ และคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยเครื่อง Spectrophotometer

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 2.1.2 ภาชนะใส่สาร (Cuvette)
- 2.1.3 น้ำ (Deionized water)
- 2.1.4 Total RNA

2.2 วิธีดำเนินการ

การปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาว 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) เครื่อง Spectrophotometer ซึ่งปริมาณอาร์เอ็นเอ ที่ได้ในแต่ละครั้ง ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้จะมีค่าใกล้เคียงกับ 2 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์

3. สังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วย Tetro cDNA Synthesis Kit (BIOLINE)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 ชุด Tetro cDNA Synthesis Kit
- 3.1.2 ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 3.1.3 ปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร
- 3.1.4 ปิเปต ขนาด 10 ไมโครลิตร
- 3.1.5 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction: PCR)
- 3.1.6 หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

3.2 วิธีดำเนินการ

ทำการสังเคราะห์ first strand cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ug/ml เติมสาร 10mM dNTP mix, 5x RT Buffer, RiboSafe RNase, Tetro Reverse Transcriptase 200 Uni/reaction, น้ำ DEPC และเติมไพรเมอร์ Random Hexamer (*or* GSP) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ต่อมาบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ต่อมาบ่มที่ 85 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาด้วยความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณของปฏิกิริยา PCR ต่อไป

4. การศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสม

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction: PCR)
- 4.1.2 หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
- 4.1.3 ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 4.1.4 ปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร
- 4.1.5 น้ำ DI (ผ่านการฆ่าเชื้อโดยเครื่อง Autoclave)

4.2 วิธีดำเนินการ

นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากการฮีทช็อคมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) ตามวิธีการของ Intawicha et al. (2009) ในการตรวจหาการแสดงออกของยีน โดยทำการสกัด total RNAs โดยใช้ RNA extraction kit (Real Genomics YRB50) โดยนำ cytoplasmic RNAs from ของโคเนื้อเพื่อหา first strand cDNA โดยการใส่ 20 μ g of total RNA จากนั้นเติม 2 μ l of DNase I, 3 μ l DNase I 10x buffer, 0.25 μ l of RNasin, 4.75 μ l of ddH₂O ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นหา PCR homologous cDNA จากฐานข้อมูลของ

GenBank และตรวจดู PCR product ใน 1.5% agarose ที่ย้อมด้วย ethidium bromide ภายใต้แสง UV light

ตาราง 4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับทำ RT-PCR

SL. no.	Gene	Primer sequence	Fragment size (bp)	NCBI/Reference
1	<i>HSP70</i>	F: AACATGAAGAGCGCCGTGGAGG R: GTTACACACCTGCTCCAGCTCC	171	(Bhanuprakash, et al., 2016)
2	β - <i>ACTIN</i>	F: AGGCATCCTGACCCTCAAGTA R: GCTCGTTGTAGAAGGTGGT	95	(Singh, et al., 2014)

ที่มา: Singh, et al., 2014; Bhanuprakash, et al., 2016

ตาราง 5 แสดงขั้นตอนและวิธีการในการดำเนินการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล

แผนงาน	ปี พ.ศ. 2560												ปี พ.ศ. 2561				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	
1. เตรียมอุปกรณ์	■	■	■														
2. เก็บตัวอย่างเซลล์				■	■	■	■	■	■	■	■	■					
3. เพาะเลี้ยงเซลล์				■	■	■	■	■	■	■	■	■					
4. ศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์				■	■	■	■	■	■	■	■	■					
5. การตอบสนองของยีนของเซลล์ ไฟโบรบลาสต์										■	■	■	■	■	■	■	■
6. วิเคราะห์การตอบสนองของยีน										■	■	■	■	■	■	■	■
วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนรายงาน																■	■

จรรยาบรรณสัตว์ทดลอง

การใช้สัตว์ทดลองของงานวิจัยนี้จะปฏิบัติตามข้อกำหนดในจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทดลองทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ และภายใต้คำแนะนำของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่ UP-AE60-01-01-001

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ถูกนำมาวิเคราะห์แบบ (One-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม R (version 3.5.1) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ โดยวิธีดันทันแคน (Duncan New Multiple Range Test, DMRT) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% (p -value < 0.05) แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ข้อมูลการประเมินอัตราการมีชีวิตรอดเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจากถูกฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ชั่วโมง (Control), 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ถูกนำมาวิเคราะห์แบบ (One-way ANOVA) ด้วยโปรแกรม R (version 3.5.1) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ โดยวิธีดันทันแคน (Duncan New Multiple Range Test, DMRT) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% (p -value < 0.05) แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

สถานที่ทำการทดลอง

1. ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา
2. ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์แพร่
3. ห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2560 สิ้นสุดการทดลอง เดือนเมษายน พ.ศ. 2561

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาที่ 1 อัตราการแบ่งตัว และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์
ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสมพื้นเมือง

1. อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคขาวลำพูนแองกัส และโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ที่เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง หลังจากเริ่มนับเซลล์ครั้งแรก เท่ากับ 0.42 ± 0.06 , 0.47 ± 0.05 และ 0.44 ± 0.08 ตามลำดับ ($P > 0.05$) อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคขาวลำพูนแองกัส และโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นร้อยละ 23.37 ± 0.53 , 23.59 ± 0.87 และ 24.08 ± 1.47 ตามลำดับ ($P > 0.05$) อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคขาวลำพูนแองกัส และโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ที่เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นร้อยละ 70.65 ± 0.69 , 71.04 ± 0.81 และ 71.97 ± 2.15 ตามลำดับ ($P > 0.05$) ดังตาราง 6

ตาราง 6 แสดงอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม
หลังจากเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

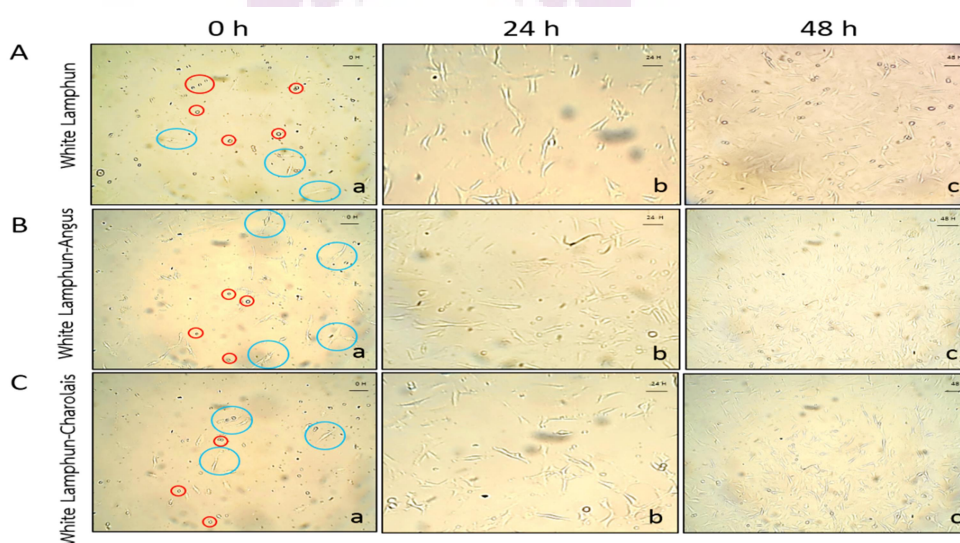
ชั่วโมงที่เพาะเลี้ยง (เซลล์/มิลลิลิตร)	% อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์			P-value
	WL (n = 3)	WL-AG (n = 3)	WL-CHA (n = 3)	
2 h after SCC, (cell/ml)	0.42 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.08	0.711
24 h, (cell/ml)	23.37 ± 0.53	23.59 ± 0.87	24.08 ± 1.47	0.702
48 h, (cell/ml)	70.65 ± 0.69	71.04 ± 0.81	71.97 ± 2.15	0.526

หมายเหตุ: WL = โคขาวลำพูน, WL- AG = โคขาวลำพูน-แองกัส, WL- CHA = โคขาวลำพูน-ชาร์โรเลส์

SCC: Start counting cell = เริ่มนับจำนวนเซลล์

2. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblasts cell) เป็นเซลล์ที่พบมากสุดในเนื้อเยื่อ ซึ่งมีรูปร่างของเซลล์ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่พบ อาจมีรูปร่างคล้ายกระสวยยาว รูปแฉก และมีส่วนยื่นยาว ทำหน้าที่สร้างเส้นใยชนิดต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในโคพื้นเมืองขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ที่อุณหภูมิตั้งที่ 38.5 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ 0 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เกาะติดกับจานอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีรูปร่างเป็นรูปกระสวย (วงกลมสีฟ้า) และมีบางส่วนมีลักษณะทรงกลมลอยอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ (วงกลมสีแดง) ดังภาพ 8 (Aa, Ba, Ca) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า รูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการแบ่งตัวเกิดขึ้นเป็น 2 เท่าของเซลล์เริ่มต้น โดยมีลักษณะเกาะติดกับจานอาหารเลี้ยงเซลล์ และมีรูปร่างเป็นกระสวย ดังภาพ 8 (Ab, Bb, Cb) จากนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงจนถึง 48 ชั่วโมง พบว่า การแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพิ่มมากขึ้น และเกาะติดกับจานอาหารเลี้ยงเซลล์เต็มจานเพาะเลี้ยง ดังภาพ 8 (Ac, Bc, Cc)

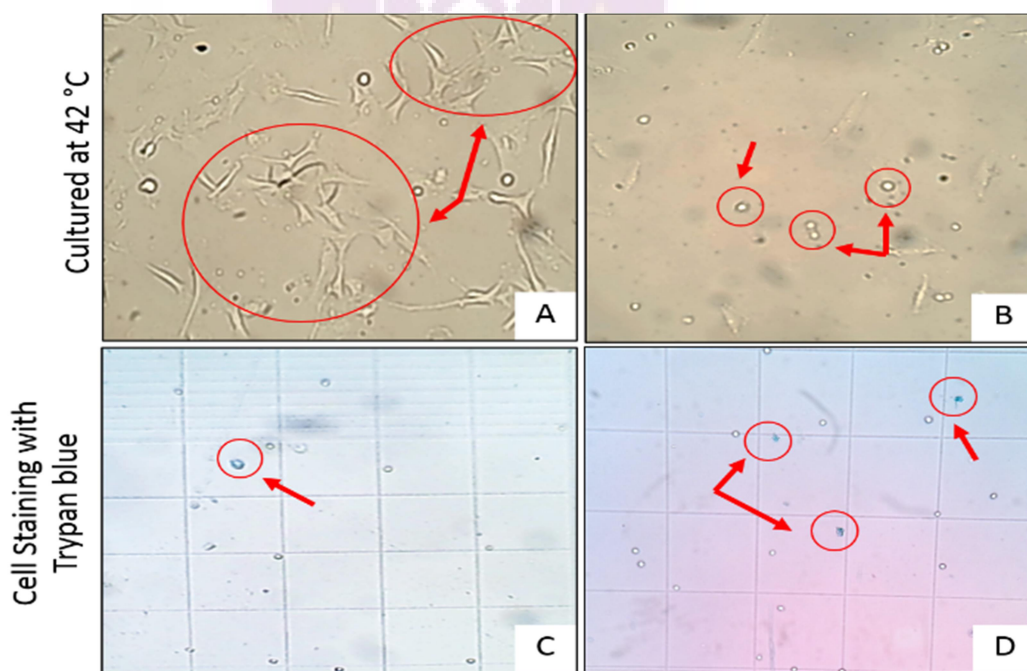


ภาพ 8 แสดงสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: A: สัณฐานวิทยาของโคขาวลำพูน ระยะเวลา 0 (Aa), 24 (Ab) และ 48 (Ac) ชั่วโมง
 B: สัณฐานวิทยาของโคขาวลำพูนแองกัส ระยะเวลา 0 (Ba), 24 (Bb) และ 48 (Bc) ชั่วโมง
 C: สัณฐานวิทยาของโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ระยะเวลา 0 (Ca), 24 (Cb) และ 48 (Cc) ชั่วโมง

3. ลักษณะสัณฐานวิทยาการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมชาวลำพูน

หลังจากฮีทช็อคเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจดูการรอดชีวิต โดยใช้ยาย้อมสี Trypan blue พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมชาวลำพูนเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง มีลักษณะเกาะติดกับจานซึ่งมีรูปร่างเป็นกระสวยตามลูกศรสีแดง (ภาพ 9A) หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์มีลักษณะลอยมีรูปร่างทรงกลมตามลูกศรสีแดง (ภาพ 9B) ซึ่งเซลล์ที่มีลักษณะลอยเป็นเซลล์ที่มีการรอดชีวิตต่ำ เมื่อนำตัวอย่างเซลล์มาตรวจนับและประเมินการมีชีวิตรอดด้วยยาย้อมสี Trypan blue พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมชาวลำพูน เพาะเลี้ยงระยะเวลา 0 ชั่วโมง ย้อมติดสีน้ำเงินน้อยกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตามลูกศรสีแดง ซึ่งเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำเงินเป็นเซลล์ตาย และเซลล์มีลักษณะทรงกลมใสเป็นเซลล์ที่รอดชีวิตสูง โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ และนำเสนอในรูปแบบร้อยละ (ภาพ 9C, D)



ภาพ 9 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมชาวลำพูนเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยย้อมด้วย Trypan blue

หมายเหตุ: A: สัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ก่อนฮีทช็อค

B: สัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังจาก heat shock

C-D: ลักษณะเซลล์ตายหลังจากย้อมด้วย Trypan blue

4. อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคชาวลำพูนและโคลูกผสมชาว

ลำพูน

จากการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง และลูกผสมพื้นเมือง ก่อนฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มโคชาวลำพูน กลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ มีอัตราการมีชีวิตรอด ร้อยละ 99.86 ± 0.06 , 99.73 ± 0.33 และ 99.92 ± 0.01 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$; ตาราง 7) หลังจากฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มโคชาวลำพูน มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงสุด ร้อยละ 97.73 ± 0.16 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ มีอัตราการมีชีวิตรอด ร้อยละ 96.36 ± 0.35 และ 96.70 ± 0.44 ตามลำดับ ($P < 0.01$) เมื่อทำการฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มโคชาวลำพูน มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงสุด ร้อยละ 93.33 ± 1.90 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และกลุ่มโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ มีอัตราการมีชีวิตรอด ร้อยละ 88.88 ± 1.31 และ 89.16 ± 1.37 ตามลำดับ ($P < 0.05$) ดังตาราง 7

ตาราง 7 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมือง

และโคลูกผสมพื้นเมืองหลังจากฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส
ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา ในการบ่ม (ชั่วโมง)	% อัตราการมีชีวิตรอด			P-value
	WL (n = 3)	WL-AG (n = 3)	WL-CHA (n = 3)	
0 h, (cell/ml)	99.86 ± 0.06	99.73 ± 0.33	99.92 ± 0.01	0.504
HS 24 h, (cell/ml)	97.73 ± 0.16^a	96.36 ± 0.35^b	96.70 ± 0.44^b	<0.001
HS 48 h, (cell/ml)	93.33 ± 1.90^a	88.88 ± 1.31^b	89.16 ± 1.37^b	<0.05

หมายเหตุ: ^{ab} คือ ตัวอักษรที่แสดงถึงความแตกต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

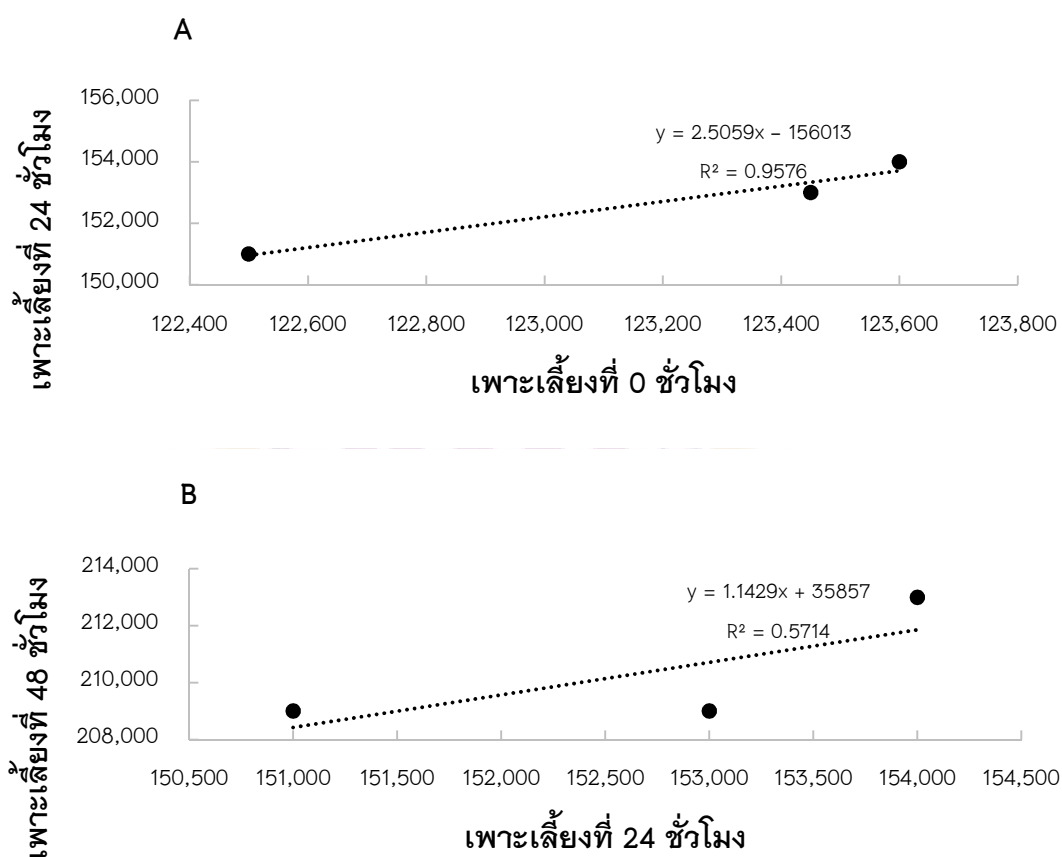
WL = โคชาวลำพูน; WL-AG = โคชาวลำพูน-แองกัส; WL-CHA = โคชาวลำพูน-ชาร์โรเลส์

NHS = ไม่ฮีทช็อค; HS = ฮีทช็อค

5. การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation analysis)

5.1 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์และอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคชวลำพูน พบว่า โคชวลำพูนที่เพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.132$; ภาพ 10A) ในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.454$; ภาพ 10B)

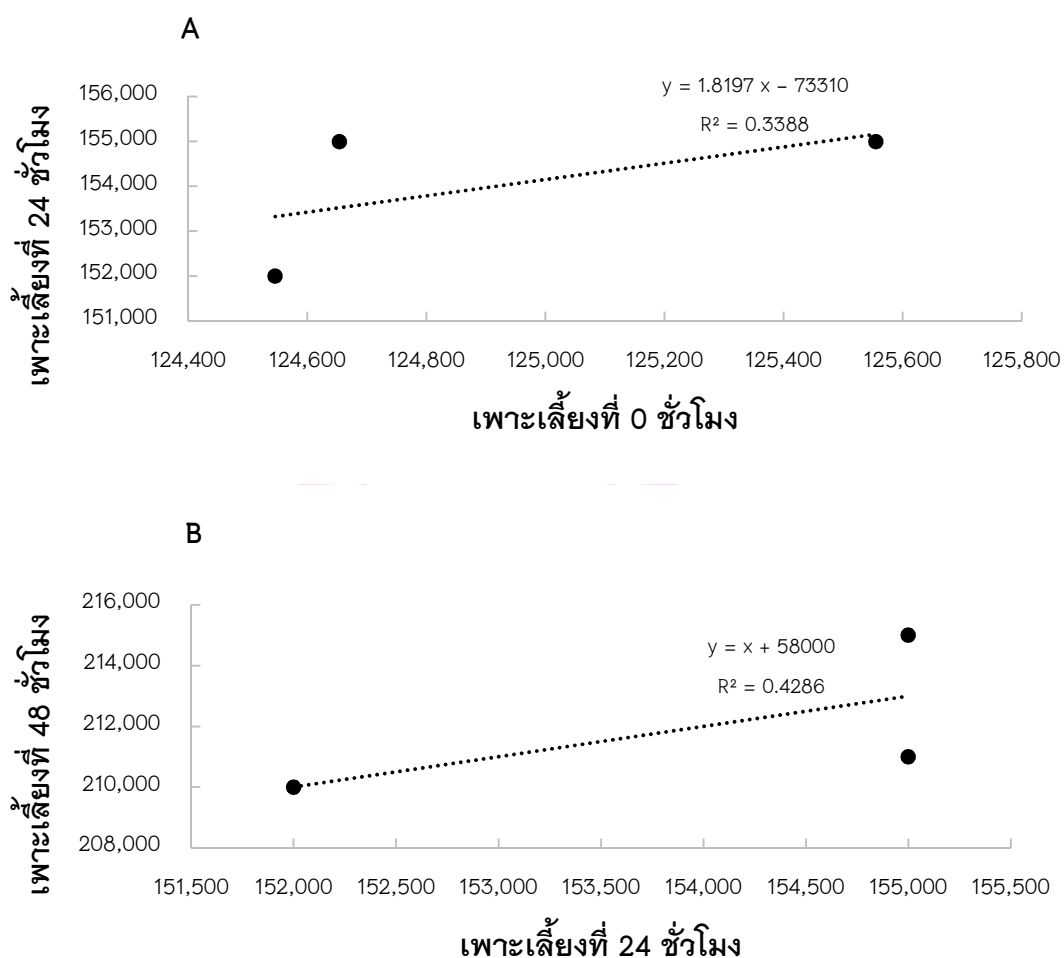


ภาพ 10 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่เพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคชวลำพูน

หมายเหตุ: A: ค่าความสัมพันธ์ระหว่างที่ 0 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง

B: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง

ความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขารำปูนแองกัส พบว่า การเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.604$; ภาพ 11A) ในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.545$; ภาพ 11B)

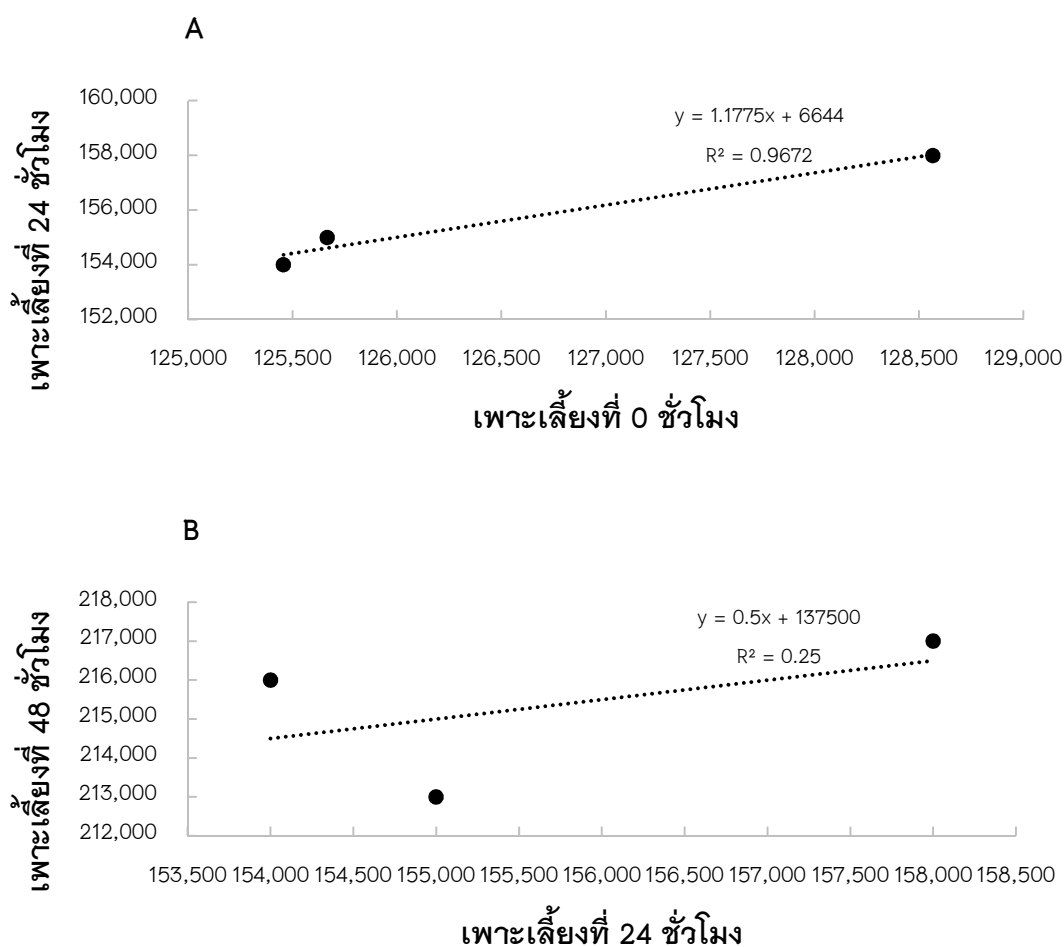


ภาพ 11 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่เพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขารำปูนแองกัส

หมายเหตุ: A: ค่าความสัมพันธ์ระหว่างที่ 0 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง

B: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง

ความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ พบว่า การเพาะเลี้ยงในชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ชั่วโมง ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.116$; ภาพ 12A) ในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ระหว่างชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.666$; ภาพ 12B)



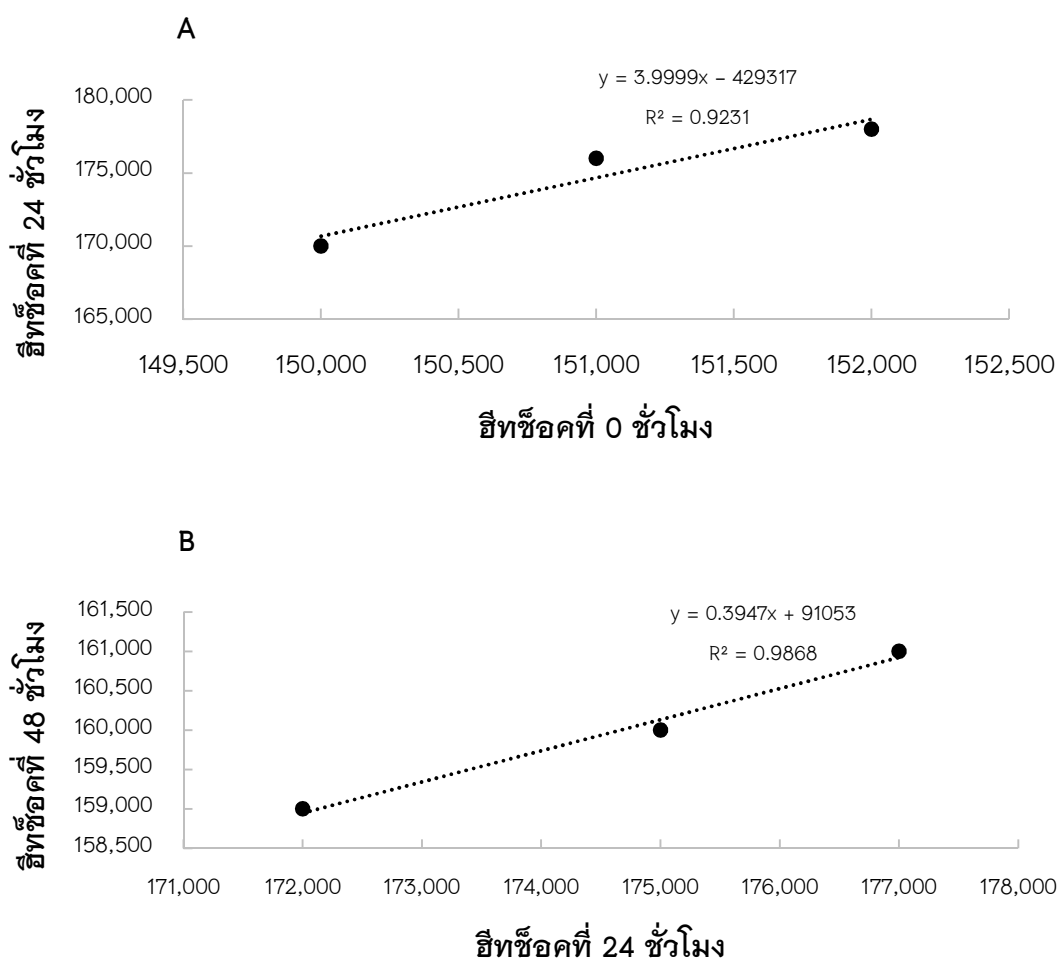
ภาพ 12 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่เพาะเลี้ยงกับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์

หมายเหตุ: A: ค่าความสัมพันธ์ระหว่างที่ 0 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง

B: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง

5.2 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเวลาที่อีทช็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่อีทช็อค และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน พบว่า การอีทช็อคที่ 0 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง ระหว่างชั่วโมงอีทช็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.178$; ภาพ 13A) ในการอีทช็อคที่ 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ระหว่างชั่วโมงอีทช็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.073$; ภาพ 13B)

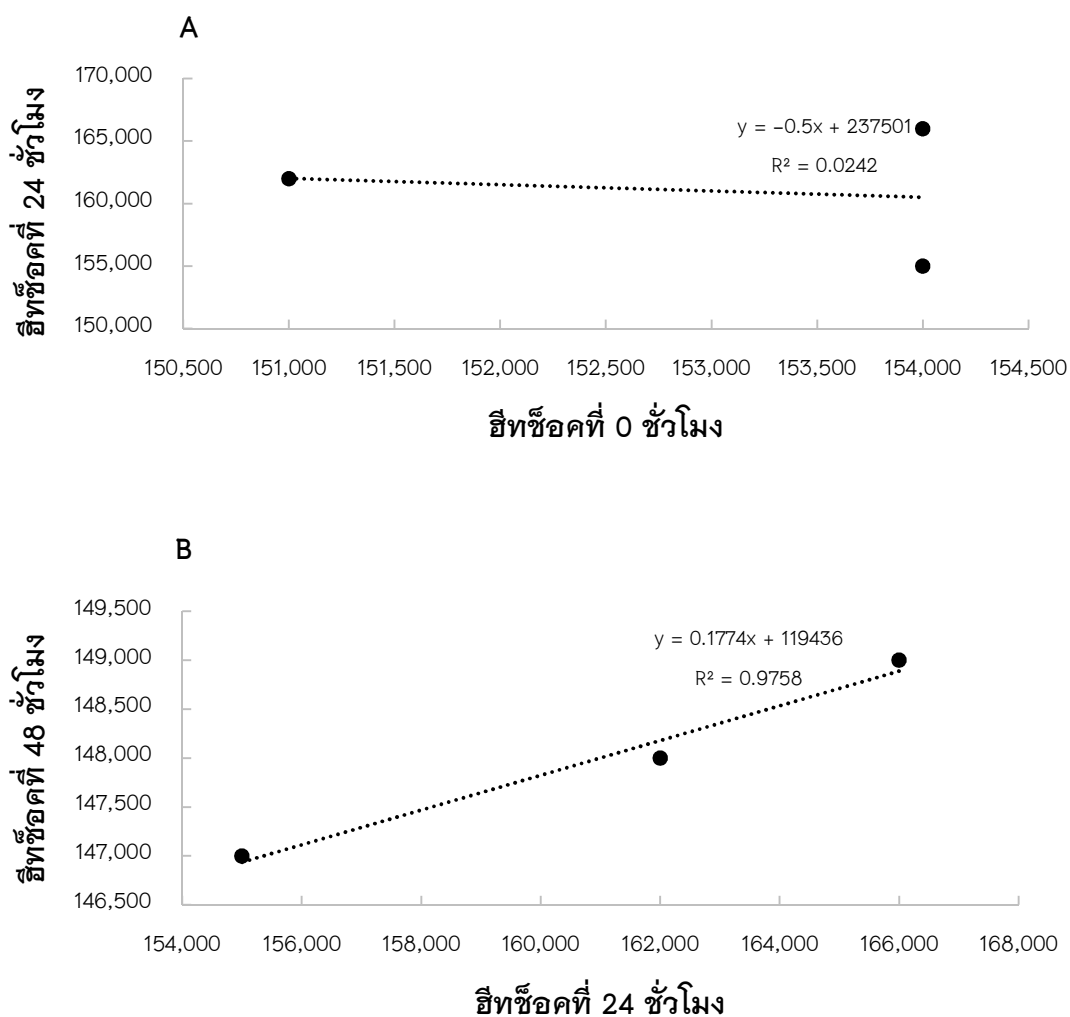


ภาพ 13 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่อีทช็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน

หมายเหตุ: A: ค่าความสัมพันธ์ระหว่างที่ 0 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง

B: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง

ความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่ฮีทช็อค และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาวลำพูนแองกัส พบว่า การฮีทช็อคที่ 0 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง ระหว่างชั่วโมงฮีทช็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงลบ ($P = 0.900$; ภาพ 14A) ในการฮีทช็อคที่ 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าระหว่างชั่วโมง Heat shock กับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.099$; ภาพ 14B)

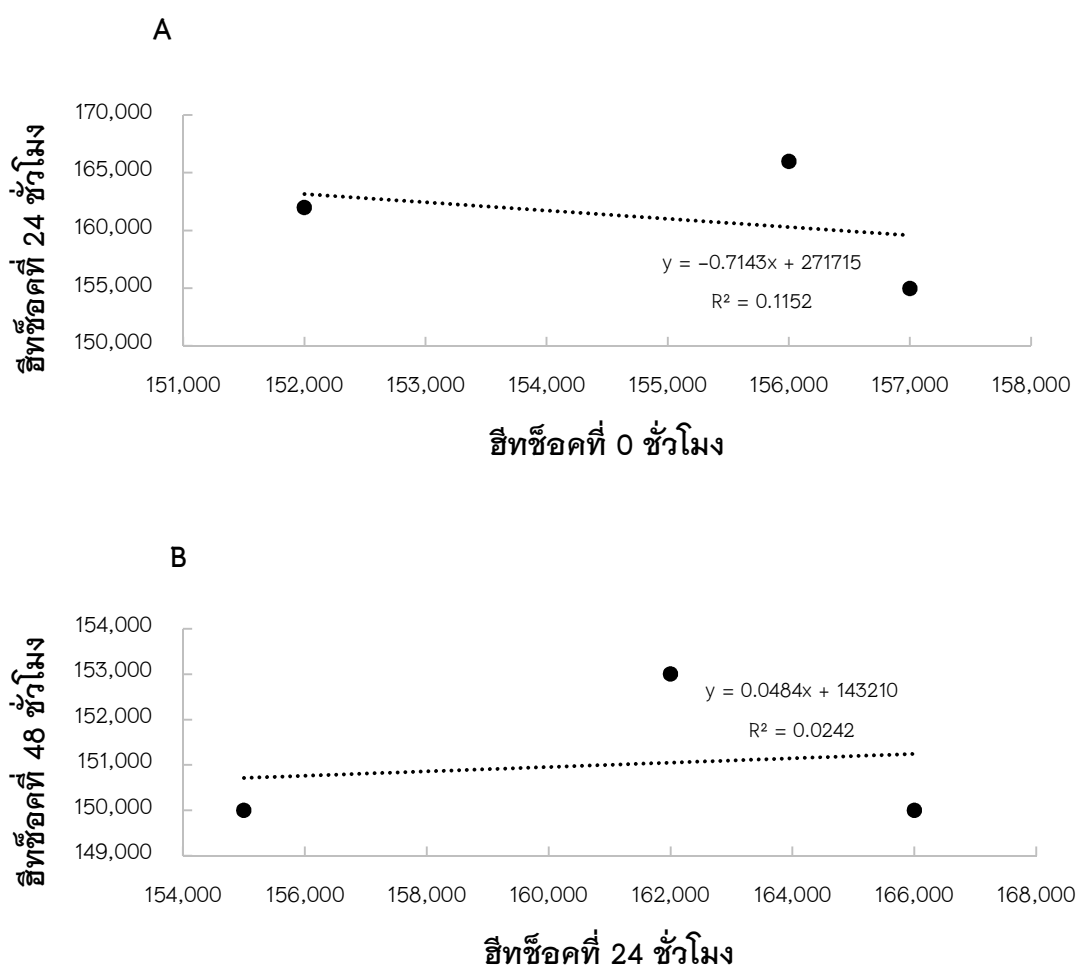


ภาพ 14 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่ฮีทช็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาวลำพูนแองกัส

หมายเหตุ: A: ค่าความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่ 0 กับ 24 ชั่วโมง

B: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง

ความสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่ฮีทซ็อค และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ พบว่า การฮีทซ็อคที่ 0 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง ระหว่างชั่วโมงฮีทซ็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงลบ ($P = 0.779$; ภาพ 15A) ในการฮีทซ็อคที่ 24 ชั่วโมง ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ระหว่างชั่วโมงฮีทซ็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีความสัมพันธ์กันในทิศทางเชิงบวก ($P = 0.900$; ภาพ 15B)



ภาพ 15 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างชั่วโมงที่ฮีทซ็อคกับอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์

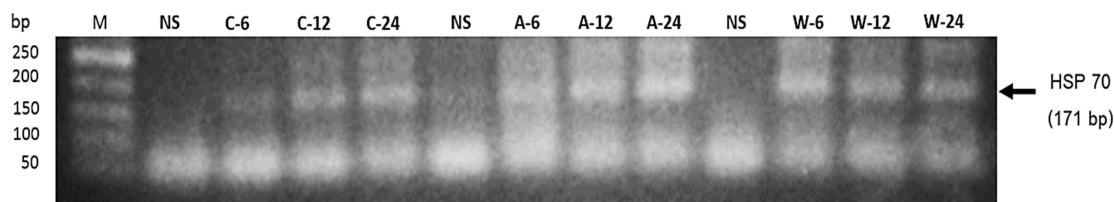
หมายเหตุ: A: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง ที่ 0 ชั่วโมง กับ 24 ชั่วโมง

B: ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 24 ชั่วโมง กับ 48 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 ศึกษาการตอบสนองของยีนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม

1. ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *HSP70* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

จากการศึกษาการตอบสนองของยีน *Heat shock 70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *HSP70* โดยให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *HSP70* ขนาด 171 คู่ หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Electrophoresis ในอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบ พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ หลังจากฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ หลังจากฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 0 ไม่มีการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน *HSP70* (ภาพ 16) เมื่อฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคทั้ง 3 พันธุ์ มีการแสดงออกต่อยีน *HSP70* (ภาพ 16)



ภาพ 16 แสดงการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมืองและโคลูกผสมหลังจากฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: C: ฮีทช็อคกลุ่มโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ระยะเวลา 6 (C-6) ชั่วโมง, 12 (C-12) ชั่วโมง และ 24 (C-48) ชั่วโมง

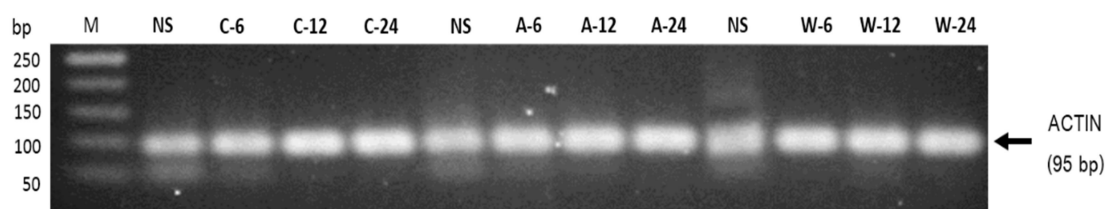
A: ฮีทช็อค กลุ่มโคขาวลำพูนแองกัส ระยะเวลา 6 (A-6) ชั่วโมง, 12 (A-12) ชั่วโมง และ 24 (A-48) ชั่วโมง

W: ฮีทช็อคกลุ่มโคขาวลำพูน ระยะเวลา 6 (W-6) ชั่วโมง, 12 (W-12) ชั่วโมง และ 24 (W-48) ชั่วโมง

M = Marker, NS = Non Heat Shock

2. ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนที่ β -actin ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction)

จากการศึกษาการตอบสนองของยีนฮีตช็อคโปรตีน β -actin ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน β -actin โดยให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ β -actin ขนาด 95 คู่เบส หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Electrophoresis ในอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูน โคลูกผสมขาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมขาวลำพูนชาร์โรเลส์ หลังจากฮีตช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง มีการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีน β -actin (ภาพ 17)



ภาพ 17 แสดงการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน β -actin ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคพื้นเมือง และโคลูกผสมหลังจากฮีตช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: C: ฮีตช็อคกลุ่มโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ ระยะเวลา 6 (C-6) ชั่วโมง, 12 (C-12) ชั่วโมง และ 24 (C-48) ชั่วโมง

A: ฮีตช็อค กลุ่มโคขาวลำพูนแองกัส ระยะเวลา 6 (A-6) ชั่วโมง, 12 (A-12) ชั่วโมง และ 24 (A-48) ชั่วโมง

W: ฮีตช็อคกลุ่มโคขาวลำพูน ระยะเวลา 6 (W-6) ชั่วโมง, 12 (W-12) ชั่วโมง และ 24 (W-48) ชั่วโมง

M = Marker, NS = Non Heat Shock, β -actin = เป็นยีนในกลุ่มควบคุม

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษา พบว่า อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส มีอัตราการแบ่งตัวที่เพิ่มสูงขึ้นในโคกผสมขาลำพูนชาร์โรเลส์ โคกผสมขาลำพูนแองกัส และโคพื้นเมืองขาลำพูน เฉลี่ยอยู่ที่ 71.97 ± 2.15 , 71.04 ± 0.81 และ 70.65 ± 0.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบว่า อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โคขาลำพูน มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ (99.86 ± 0.06 , 97.73 ± 0.16 และ 93.33 ± 1.90) สูงกว่ากลุ่มโคกผสมขาลำพูนชาร์โรเลส์ มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ (99.92 ± 0.01 , 96.70 ± 0.44 และ 89.16 ± 1.37) และโคกผสมขาลำพูนแองกัส มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ (99.73 ± 0.33 , 96.36 ± 0.35 และ 88.88 ± 1.31)

การแสดงออกของยีน *HSP70* ต่อความร้อนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่า การฮีตช็อคเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคกผสมขาลำพูน ทั้ง 3 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *HSP70* แตกต่างกันในแต่ละระยะเวลาที่ได้รับความร้อน เมื่อเปรียบเทียบกับยีน β -actin และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางการคัดเลือกโคกผสมที่ทนร้อน สำหรับส่งเสริมเกษตรกรต่อไป

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะรูปร่าง (Morphology) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาลำพูน โคกผสมขาลำพูนแองกัส และโคขาลำพูนชาร์โรเลส์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdian, et al. (2015) ที่ได้ทำการทดลองโดยใช้ตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากมนุษย์ (Human dermal fibroblasts: HDFs) เป็นเซลล์ชนิด dermis ที่มีต้นกำเนิดพบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมด ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการแบ่งตัวที่ดี และสามารถเลี้ยงได้ง่ายในหลอดทดลอง โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 10% FBS-DMEM ประกอบด้วย ยาปฏิชีวนะ (penicillin/streptomycin 1%) เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตถึง 80%-90% ทำการแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มที่มีอาหาร bFGF และไม่มีอาหาร bFGF) พบว่า หลังจากการเพาะเลี้ยง HDFs อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพิ่มขึ้น

ทุก 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า ช่วงระยะเวลาที่ 24 ถึง 120 ชั่วโมง HDFs ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี และไม่มี bFGF มีอัตราการแบ่งตัวตามปกติ โดยมีการเพิ่มจำนวนสูงขึ้น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ มีต้นกำเนิดมาจากสารสำคัญที่หลั่งออกมาจากเซลล์ต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อ ซึ่งสารเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อกระบวนการควบคุมการขยายตัวของเซลล์ การส่งสัญญาณ และการแบ่งตัวของเซลล์ (Schuldiner, et al., 2000) นอกจากนี้ การแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ชนิด ได้แก่ Morphogens (กระบวนการทำให้เซลล์ที่แบ่งตัวสามารถจัดระเบียบ ช่วงของการเจริญเติบโต) และ Mitogens (สารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว อยู่ในรูปของโปรตีน) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของสัตว์ และในทางการแพทย์ ยังชี้ให้เห็นว่า ปัจจัยการแบ่งตัวของเซลล์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ทดลองสำหรับหลายโรค ของมนุษย์ (Agha, et al., 2016)

การศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของกลุ่มโคลูกผสม โดยนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ทำการเพาะเลี้ยงก่อนหน้านี้ มาบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบว่า โคพื้นเมืองชาวลำพูน มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่ากลุ่มโคลูกผสมพื้นเมืองชาร์โรเลส์ และกลุ่มโคลูกผสมพื้นเมืองแองกัส ตามลำดับ ($P < 0.05$) จากผลการทดลองได้สอดคล้องกับ Deb, et al. (2014) ซึ่งทำการศึกษาผลของความเครียดจากความร้อนในโคสายพันธุ์ Sahiwal (*Bos indicus*) และโคสายพันธุ์ Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) พบว่า โคสายพันธุ์ Sahiwal มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าโคสายพันธุ์ Frieswal ซึ่งคล้ายคลึงกันกับงานวิจัยของ Wu, et al. (2017) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทนร้อนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคสายพันธุ์ Thiwan yellow (*Bos indicus*) และโคสายพันธุ์ Holstein (*Bos taurus*) พบว่า โคสายพันธุ์ Thiwan yellow สามารถทนร้อนดีกว่าโคสายพันธุ์ Holstein

การรายงานก่อนหน้านี้ของ อุทัย โคตรटक และคณะ (2549) ทำการศึกษาเปรียบเทียบ กลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการทนร้อนระหว่างโคเขตร้อน (*Bos indicus*) และโคเขตหนาว (*Bos taurus*) พบว่า เมื่อ Temperature humidity index (THI) สูงขึ้น โคพื้นเมืองมีอุณหภูมิร่างกาย โดยวัดจากทวารหนัก ต่ำกว่าโคไฮลส์ไตน์ฟรีเซียน ซึ่งสอดคล้องกับ Guaghan, et al. (1999) พบว่า โคเขตร้อนมีอุณหภูมิต่ำกว่าโคเขตหนาว เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะอากาศร้อน ทั้งนี้ยังพบว่า โคเขตร้อน มีความสามารถในการควบคุมอุณหภูมิทวารหนักได้ดีกว่าโคเขตหนาว นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใต้สภาวะอากาศร้อน อัตราการหายใจของโคไฮลส์ไตน์ฟรีเซียนสูงกว่าโคพื้นเมือง เนื่องจาก โคจะใช้กลไกสรีรวิทยาขจัดความร้อนออกจากร่างกายผ่านทางเดินหายใจ ในขณะที่โคพื้นเมือง ใช้การขับเหงื่อเป็นช่องทางการระบายความร้อนออกจากร่างกายแทนการหายใจ (อุทัย โคตรटक และคณะ, 2549)

การศึกษาการตอบสนองของยีนฮีตช็อคโปรตีน *HSP70* ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคลูกผสมชาวลำพูน โคลูกผสมชาวลำพูนแองกัส และโคลูกผสมชาวลำพูนชาร์โรเลส์ หลังจากฮีตช็อคที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *HSP70* การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Collier, et al. (2006) รายงานว่า สาเหตุที่โคกลุ่ม *Bos indicus* มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่าโคกลุ่ม *Bos taurus* เนื่องจาก ระดับของ *HSP70* ในยีน ซึ่งพบว่า เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะความเครียดเนื่องจากความร้อน ทำให้เซลล์สร้างโปรตีนกลุ่มแชเพอโรน (chaperones) ที่เรียกว่า ฮีตช็อคโปรตีน (Heat shock protein, *HSP*) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ช่วยรักษาสภาพโปรตีนภายในเซลล์ (Basirico, et al., 2011) โดยทำงานร่วมกับยีน *HSP70* ซึ่งเซลล์ที่สร้างฮีตช็อคโปรตีนในปริมาณมากจะแสดงถึงการทนต่อ ความร้อนได้ดี (Kregel, 2002) ดังนั้น สามารถใช้ระดับการแสดงออกของยีนฮีตช็อคโปรตีน 70 จากเซลล์เป็นตัวชี้วัด (biomarker) ความทนต่อความร้อนของโคเนื้อได้ (วิชาการณ์ เลิศวีรพล, 2560)

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการแสดงออกของยีน *HSP70* ในโคพื้นเมือง และโคลูกผสม ภายใต้อุณหภูมิความร้อน อย่างไรก็ตามการศึกษาคั้งนี้ทราบถึงการแสดงออกของยีน แต่ยังไม่ทราบข้อมูลปริมาณของยีน และโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดสำหรับศึกษาต่อยอด โดยหาปริมาณของยีน *HSP70* โดยใช้วิธี Real-time PCR และการหาระดับโปรตีน โดยใช้วิธี Western blotting เพื่อเป็นฐานข้อมูล และเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิต โดยการพัฒนา การปรับปรุง และคัดเลือกพันธุ์ของปศุสัตว์ได้ในอนาคต



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กรมปศุสัตว์. (2559). **สรุปแผนยุทธศาสตร์การพัฒนาโคเนื้อ ปี 2555-2559**. กรุงเทพฯ: กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กัญญากรสิทธิ์. (2550). “ไทย-แบล็ค” ลูกผสมไทย-แองกัส ตอบตลาดเนื้อโคคุณภาพสูง. **เทคโนโลยีชาวบ้าน**, 416, 54
- ชำนาญ บุญมี, ฐาตาภรณ์ คงดี, สมชาย ศรีพูล, และชาญวิทย์ วัชรพุกก์. (2555). **การจัดการด้านอาหารที่มีผลต่อสมรรถภาพการผลิตและระดับความเครียดของโคพันธุ์ตากในเขตร้อนชื้นของประเทศไทย**. นครสวรรค์: สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.
- ทัศนพร ศิริภักดิ์ และสุภร กตเวทิน. (2557). การตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อความเครียดเนื่องจากความร้อน ในโคนมที่มีจีโนไทป์ที่แตกต่างกันของยีน *HSP70-2*. **แก่นเกษตร**, 42(1), 20-25.
- นันทนา ช่วยชูวงศ์, ชัยณรงค์ คันทพนิต และปรารธนา พฤกษ์ศรี. (2540). **การศึกษาเปรียบเทียบสมรรถภาพการขุน คุณภาพผลผลิต และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของโคเนื้อ 5 พันธุ์ที่มีอยู่ในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล. (2542). **พื้นฐานสัตวศาสตร์** (พิมพ์ครั้งที่ 2). เชียงใหม่: ธนบรรณ.
- พิพัฒน์ สมภาร. (2555). การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศกับสวัสดิภาพของสัตว์. **แก่นเกษตร**, 40, 107-108.
- เพทชาย พงษ์เพ็ญจันทร์. (2547). **โครงการอนุรักษ์โคขาวลำพูน ในเขตจังหวัดลำพูนและเชียงใหม่เพื่อการผลิตโคเนื้อ**. เชียงใหม่: ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตวน้ำ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เรืองยศ พิลาจันท์ และวันชัย อินทิแสง. (2559). สมรรถภาพการผลิตของโคลูกผสมพื้นเมือง x โคน์ไลน์แองกัสระดับสายเลือดต่าง ๆ เมื่อได้รับฟางข้าวและกากแป้งมันสำปะหลังหมัก. **แก่นเกษตร**, 44(1), 425-431.
- ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. (2547). **ชีววิทยาของเซลล์**. กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พรีนติ้ง เฮ้าส์.

- วิชาการณ์ เลิศวีรพล. (2560). บทบาทของยีนฮีทช็อคโปรตีน 70 ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของปศุสัตว์. **เชียงใหม่สัตวแพทยศาสตร์**, 15(1), 1-14.
- วุฒิไกร บุญคุ้ม, มนต์ชัย ดวงจินดา, วิโรจน์ ภัทรจินดา, ศรเทพ ธัมวาสร, จุรีรัตน์ แสนโกชน และสายัณห์ บัวบาน. (2553). จุดวิกฤติของดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์และระดับเลือดโคเนมไฮลอสไตน์ที่มีผลต่อผลผลิตน้ำนมและค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมภายใต้สภาวะเครียดเนื่องจากความร้อน. **แก่นเกษตร**, 38, 275-284.
- ศุภชัย อุดชาชน, วรณา อ่างทอง, พิลัย วงศ์พาณิชย์ และอุดม ชัยนนท์. (2558). ผลของการใช้กากมันสำปะหลังหมักยีสต์ทดแทนอาหารชั้นในสูตรอาหารโคขุนพันธุ์กบีนทร์บุรีต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและลักษณะซาก. **แก่นเกษตร**, 43(1), 44-49.
- ศุภชัย อุดชาชน, วรณา อ่างทอง, อธิศักดิ์ ศิริบุรี และรำไพโร นามสีลี. (2557). การศึกษาเบื้องต้นของสมรรถนะการเจริญเติบโต และลักษณะซากของโคเนื้อภูพานลูกผสมพื้นเมือง. **แก่นเกษตร**, 42(1), 204-209
- สำนักส่งเสริมและพัฒนาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2561). **ยุทธศาสตร์โคเนื้อ 2561-2565**. สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2561, จาก <http://planning.dld.go.th/th/index.php/th/plan-menu/497-2561-2565>.
- อัจฉรัตน์ สุวรรณภักดี. (2546). ความรู้พื้นฐานทางด้านการผลิตสัตว์. **เอกสารประกอบการสอน ทก. 201. การผลิตสัตว์เบื้องต้น**. สงขลา: คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- อุทัย โคตรดก, สุภร กตเวทิน, สุจินต์ ลิมาธิ์, มนต์ชัย ดวงจินดา และยุพิน ผาสุข. (2549). ทำการศึกษาเปรียบเทียบกลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับการทนร้อนระหว่างโคเขตร้อนและโคเขตหนาว. **แก่นเกษตร**, 34(4), 347-354.
- เอกชัย บุญจันทร์. (2554). **การจัดการฟาร์มโคเนื้อ: Thai livestock**. สืบค้นเมื่อ 25 มกราคม 2561, จาก http://www.thailivestock.com/columnist_corner/การจัดการฟาร์มโคเนื้อ-ตอน-1-จากอดีตถึงปัจจุบัน.
- Abdian, N., Dehkordi, P. G., Chaleshtori, M. H., Arjenaki, M. G., Doosti, A. and Amiri, B. (2015). Comparison of human dermal fibroblasts (HDFs) growth rate in culture media supplemented with or without basic fibroblast growth factor (bFGF). **Cell Tissue Bank**, 16, 487-495.

- Agha, E. E., Kosanovic, D., Schermuly, R. T. and Bellusci, S. (2016). Role of Fibroblast Growth Factors in Organ Regeneration and Repair. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 53, 76–84.
- Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N., Nardone, A. and Bernabucci, U. (2011). Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. **Cell Stress Chaperones**, 16, 441–448.
- Bhanuprakash, V., Singh U., Sengar G., Sajjanar B., Bhusan B., Raja T. V., et al. (2016). Differential effect of thermal stress on HSP70 expression, nitric oxide production and cell proliferation among native and crossbred dairy cattle. **Journal of Thermal Science**, 59, 18–25.
- Changqing, L., Guo Y., Taofeng, L., Xiangchen, L., Weijun, G. and Yuihui, M. (2014). Establishment and genetic characteristics analysis of *in vitro* culture a fibroblast cell line derived from Wuzhishan miniature pig. **Cryobiology**, 68, 281–287.
- Collier, R. J., Dahl, G. E. and VanBaale, M. J. (2006). Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 89, 1244–1253.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohaszka, Z. and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications a comprehensive review. **Pharmacol Therapeut**, 79, 129–168.
- Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Singh, R., Sengar G., et al. (2014). Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* × *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. **Gene**, 536, 435–440.
- Dobson, H. and Smith, R. F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction. **Animal Reproduction Science**, 60–61, 743–752.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. **Nature**, 328, 378–379.
- Fanny, D. (2004). The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. **Perspectives in Biology and Medicine**, 47, 339–356.

- Fujita, J. (1999). Cold shock response in mammalian cells. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 1, 243–255.
- Gaughan, J. B., Lacetera, N., Valtorta, S. E., Khalifa, H. H., Hahn, L. and Mader T. (2009). Response of domestic animals to climate challenges. In: Ebi, K.L., Burton, I., McGregor, G.R. (Eds.), *Biometeorology of Adaptation to Climate Variability and Change*. **Springer Science**, Heidelberg, Germany, 131–170.
- Gaughan, J. B., Mader, T. L., Holts, S. M., Josey, M. J. and Rowan, K. J. (1999). Heat tolerance of Boran and Tuli crossbreed steer. **Journal of Animal Science**, 17, 2398–2405
- Hansen, P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Biological Science**, 364(1534), 3341–3350.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**. 381, 571–579.
- Haslbeck, M. (2002). sHsps and their role in the chaperone network. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 59, 1649–1657.
- Intawicha, P., Wang, S. H., Hsieh, Y. C., Lo, N. W., Lee, K. H. and Huang, S. Y. (2013). Proteomic profiling of rabbit embryonic stem cells derived from parthenotes and fertilized embryos. **Plos One**, 8, e67772.
- Intawicha, P., Ou, Y. W., Lo, N. W., Zhang, S. C., Chen, Y. Z. and Lin, T. A. (2009). Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand Khao Rabbit embryos. **Cloning and Stem Cells**, 11, 27–38.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, 92, 2177–2186.
- Lee, J. W., Li, H., Wu, H. Y. and Liu, S. S. (2016). Improved cellular thermotolerance in cloned Holstein cattle derived with cytoplasts from a thermotolerant breed. **Theriogenology**, 85, 709–717.

- Lo, N. W., Intawicha, P., Chiu, Y. T., Lee, K. H., Lu, H. C., Chen, C. H., et al. (2015). Leukemia Inhibitory Factor and Fibroblast Growth Factor 2 Critically and Mutually Sustain Pluripotency of Rabbit Embryonic Stem Cells. **Cell Transplantation**, 24, 319–338.
- Meyeroheffer, D. C., Wettemann, R. P., Coleman, S. W. and Wells, M. E. (1985). Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal Animal Science**, 60(2), 352–357.
- Parsell, D.A., Taulien, J. and Lindquist, S. (1993). The role of heat–shock proteins in thermotolerance. *Philos Trans R Soc Lond B: Biological Science*, 339, 279–285.
- Ravagnolo, O., Misztal, I. and Hoogenboom, G. (2000). Genetic Component of Heat Stress in Dairy Cattle, Development of Heat Index Function. **Journal of Dairy Science**, 83, 2120–2125.
- Robert, J. (2003). Evolution of heat shock protein and immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, 27, 449–464.
- Sakatani, M., Kobayashi, S. I. and Takahashi, M. (2004). Effects of Heat Shock on in Vitro Development and Intracellular Oxidative State of Bovine Preimplantation Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 67(1), 77–82.
- Sartori, R., Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. and Wiltbank, M. C. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, 87, 905–920.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Eldor, J. I., Melton, D. A. and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **PNAS**. 97, 11307–11312.
- Sejerkilde, M., Sorensen, J. G. and Loeschcke, V. (2003) Effects of cold– and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, 49, 719–726.

- Sheikh, A. A., Aggarwal, A. and Aarif, O. (2016). Effect of in vitro zinc supplementation on HSPs expression and Interleukin 10 production in heat treated peripheral blood mononuclear cells of transition Sahiwal and Karan Fries cows. **Journal of Thermal Biology**, 56, 68–76.
- Singh, A. K., Upadhyay, R. C., Malakar, D., Kumar, S. and Singh, S. V. (2014). Effect of thermal stress on HSP70 expression in dermal fibroblast of zebu (Tharparkar) and crossbred (Karan–Fries) cattle. **Journal of Thermal Biology**, 43, 46–53.
- Walsh, S. W., Williams, E. J. and Evans, A. C. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 123, 127–138.
- Wang, X., Chen, M., Zhou, J. and Zhang, X. (2014). HSP27, 70 and 90, anti–apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review). **International Journal of Oncology**, 45(1), 18–30.
- Wegner, K., Lambertz, C., Das, G., Reiner, G. and Gauly, M. (2014). Climatic effects on sow fertility and piglet survival under influence of a moderate climate. **Animal**, 8(9), 1526–1533.
- Wegner, K., Lambertz, C., Das, G., Reiner, G. and Gauly, M. (2016). Effects of temperature and temperature–humidity index on the reproductive performance of sows during summer months under a temperate climate. **Journal of Animal Science**, 87(11), 1334–1339.
- Wu, H. Y., Peng, S. Y., Li, H., Lee, J. W., Kesorn, P., Wu, H. H., et al. (2017). Ear fibroblast derived from thaiwan yellow cattle are more heat resistant than those from Hostein cattle. **Journal of Thermal Biology**, 66, 56–62.



ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS)

เตรียมสารละลาย PBS (บริษัท Gibthai) จำนวน 1 ซอง เพื่อเติมลงในขวด Duran ที่มีน้ำ DI ปริมาตร 1 ลิตร โดยมีอัตราส่วน PBS 1 ซอง: น้ำ DI 1 ลิตร เมื่อเตรียมอุปกรณ์เสร็จแล้ว นำสารละลาย PBS เทลงในขวด Duran จากนั้นผสม (Mix) ให้เข้ากันจนเข้าที่ และนำไปผ่านการฆ่าเชื้อโดยเครื่อง Auto clave เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการฆ่าเชื้อ นำ PBS (Mix) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ดังตาราง 8

ตาราง 8 แสดงองค์ประกอบของสารละลาย Phosphate Buffered Saline (PBS)

สำหรับชะล้างตัวอย่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์

สารเคมี	ปริมาณ
Phosphate Buffered Saline	1 ซอง
Demineral Water	1 ลิตร

2. การเตรียม Stock อาหารเลี้ยงเซลล์

เตรียมสารละลาย DMEM (บริษัท Gibthai) จำนวน 1 ซอง เพื่อเติมลงในขวด Duran ที่มีน้ำ DI ปริมาตร 1 ลิตร โดยมีอัตราส่วน DMEM 1 ซอง: น้ำ DI 1 ลิตร เมื่อเตรียมอุปกรณ์เสร็จแล้ว นำสารละลาย DMEM เทลงในขวด Duran ตามด้วยสารละลาย NaHCO_3 ปริมาตร 3.7 กรัม ผสม (Mix) ให้เข้ากันจนเข้าที่ จากนั้นเติม ABAM ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ดังตาราง 9

3. การเตรียม 10% FBS + DMEM

เมื่อต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS + DMEM ที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สามารถจัดเตรียมได้ดังนี้ นำขวด Duran ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม DMEM ปริมาตร 980 มิลลิลิตร จากนั้นเติม FBS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในสารละลายในขวด Duran และผสม (Mix) ให้เข้ากัน นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ดังตาราง 9

ตาราง 9 แสดงองค์ประกอบของอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) สำหรับเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์

สารเคมี	ปริมาณ
DMEM medium	1 ซอง
NaHCO ₃	3.7 กรัมต่อลิตร
FBS (Fetal bovine serum)	10 มิลลิลิตร
ABAM (antibiotic-antimycotic)	10 มิลลิลิตรต่อลิตร
Demineral Water	1 ลิตร

ตาราง 10 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีสำหรับตรวจนับจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์

สารเคมี	ปริมาณ
10% FBS+DMEM	100 มิลลิลิตร
Phosphate Buffered Saline	100 มิลลิลิตร
1% Trypsin-EDTA	10 มิลลิลิตร
Trypan blue	10 มิลลิลิตร

ตาราง 11 แสดงองค์ประกอบของสารสำหรับสกัด Total RNA โดยใช้ RNA extraction kit (Real Genomics YRB50)

สารเคมี	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
RBC Lysis Buffer	100 ul
RB Buffer	400 ul
70% ethanol	400 ul
R-W1 Buffer	400 ul
R-wash Buffer	600 ul
RNase	50 ul

ตาราง 12 แสดงองค์ประกอบของสารสำหรับการสังเคราะห์ first-strand cDNA

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (ไมโครลิตร)
Total RNA (up to 5ug) or mRNA (up to 5ug)	5
Random Hexamer (or GSP)	1
10mM dNTP mix	1
5x RT Buffer	4
RiboSafe RNase Inhibitor	1
Tetro Reverse Transcriptase (200u/ul)	1
DEPC-treated water*	7
Total	20

4. การสังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วย Tetro cDNA Synthesis Kit (BIOLINE)

เติมส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอด PCR tube นำตัวอย่างหลอดทั้งหมด เข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลา ดังนี้

Stage ที่ 1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Stage ที่ 2 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Stage ที่ 3 อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

Stage ที่ 4 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส chill

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการจัดเก็บ cDNA Produce ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตาราง 13 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีสำหรับพีซีอาร์ polymerase chain reaction (PCR) ของยีน HSP70

สารเคมี	ปฏิกิริยาที่ใช้ (ไมโครลิตร)
Template	2
primer HSP70-F	0.5
primer HSP70-R	0.5
My Taq Red Mix, 2x	12.5
Water (ddH ₂ O)	10
Total	25

การทำปฏิกิริยา PCR นำส่วนผสมต่าง ๆ ใส่ในเครื่อง Biometra รุ่น: T professional gradient โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลา ดังนี้

สำหรับยีน *HSP70* และยีน β -actin

Heating	50 องศาเซลเซียส	2	นาที	
Pre-denaturing	95 องศาเซลเซียส	10	นาที	
Denaturing	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที	} 40 รอบ
Annealing	58 องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	30	วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	5	นาที	
Chili	4 องศาเซลเซียส			



ภาคผนวก ข แสดงขั้นตอนการปฏิบัติสำหรับกระบวนการเลี้ยงเซลล์ การ Subculture cell การแช่แข็งเซลล์ (cell freezing) และการตรวจนับจำนวนเซลล์

วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมพื้นเมือง

1. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อไปหุที่เก็บจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา และศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์แพร่ มาทำความสะอาดในห้องปฏิบัติการสาขาสัตวศาสตร์ สภาพปลอดเชื้อและปฏิบัติในตู้ Laminar air flow cabinet
2. นำตัวอย่างชิ้นเนื้อมาทำความสะอาด ด้วย PBS จำนวน 2 รอบ และนำไปฆ่าเชื้อด้วย Ethyl Alconol 95% จากนั้นนำมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปลอกบริเวณหนังกำพร้าออกจนหมด ให้เหลือแต่ส่วนหนังกำพร้า
3. ทำการสับชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 60x15 MM (CELL T.C. DISH 60x15 MM) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 10%FBS+DMEM พร้อมเขียนชื่อ วัน/เดือน/ปีที่ปฏิบัติการ
4. นำจานอาหาร 10% FBS+DMEM ที่มีตัวอย่างชิ้นเนื้อ ไปเพาะเลี้ยงที่ตู้ 5% CO₂ in air ระยะเวลา 2 เดือน

วิธีการ Subculture เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมพื้นเมือง

แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

Step 1

1. ดูดชิ้นเนื้อที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยง ใส่ใน Tube 15 มิลลิลิตร ทั้ง 2 จานเลี้ยงเซลล์
2. ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วดูด 10% FBS DMEM เก่าออกจาก Tube 15 มิลลิลิตร
3. เติม 10% FBS DMEM ใหม่เข้าไป ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
4. แบ่งใส่จานเพาะเลี้ยงใหม่ทั้งหมด 4 จาน แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ CO₂ ต่อไปจนเกิดการแบ่งเซลล์

Step 2

1. ยังคงมีจานเพาะเลี้ยง PO ที่ยังคงเหลืออยู่หลังจากดูดเนื้อเยื่อออก
2. ให้นำ PBS ปริมาณ 1 ml ฉะล้างในจานอาหารดังกล่าว แล้วดูดออกโดยชะล้าง 2 รอบ
3. จากนั้นเติม Trypsin ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้นนำ Trip ดูด trypsin ส่วนหนึ่ง ขูดในจานอาหาร
4. นำจานอาหารที่ผ่านการขูดไปป้อน CO₂ ระยะเวลา 5 นาที

5. เมื่อครบเวลานำจานอาหารมาส่องดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
6. จากนั้นเติม DMEM ลงในจานอาหารเพื่อทำการหยุด Trypsin
7. นำเซลล์ดังกล่าวไป Centrifuge ที่ 1300 รอบ 3 นาที
8. ดูดสารออกให้หมดให้เหลือแต่เซลล์ที่ตกตะกอน แล้วทำการเติม 10% FBS DMEM หลอดละ 1 ml ทุกหลอด แล้วนำไปใส่ในจานเพาะเลี้ยงใหม่
9. เขียน ชื่อ/วันที่/เดือน/ปีที่ทำ บนจานเพาะเลี้ยงใหม่ แล้วนำไปป่ม CO₂ ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส

วิธีการแช่แข็ง (cell freezing) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของโคลูกผสมพื้นเมือง

1. นำตัวอย่างเซลล์มาล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ เพื่อให้ตัวอย่างสะอาด
2. เติม Trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อจาน
3. นำไปป่มในตู้ CO₂ ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. เมื่อครบเวลานำจานเพาะเลี้ยงมาตรวจดูลักษณะของเซลล์
5. ทำการหยุด Trypsin โดยเติมสาร 10% FBS DMEM ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร
6. ดูดสารและตัวอย่างใส่ eppendorf tube 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 1100 g เป็นเวลา 3 นาที
7. เตรียม DMSO และ FBS ใส่ใน tube เปลา 15 มิลลิลิตร อัตราส่วน 0.4:3.6 มิลลิลิตร (DMSO: FBS)
8. เมื่อบั่นเหวี่ยงเสร็จดูดเอา 10% FBS DMEM ออก แล้วเติม DMSO ที่ผ่านการผสมมาแล้วเติมใน eppendorf ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
9. ดูดสาร ขึ้น-ลง ซ้ำ ๆ และนำไปใส่ใน หลอด Cryovial 1.8 มิลลิลิตร
10. นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำไปแช่ใน liquid nitrogen

ภาคผนวก ค แสดงให้เห็นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน
โคชาวลำพูนแองกัส และโคชาวลำพูนชาร์โรเลส์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ
38.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 1 วัน และ 2 วัน

ตาราง 14 แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน 3 ตัว

ลำดับ/ตัว	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)		
	0 วัน	1 วัน	2 วัน
1	122,000	151,000	209,000
2	123,000	152,000	209,000
3	123,000	151,000	210,000
เฉลี่ยรวม	122,667	151,333	209,333

ตาราง 15 แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคชาวลำพูนแองกัส 3 ตัว

ลำดับ/ตัว	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)		
	1 วัน	2 วัน	3 วัน
1	124,000	152,000	213,000
2	124,000	154,000	211,000
3	125,000	155,000	214,000
เฉลี่ยรวม	124,333	153,667	212,667

ตาราง 16 แสดงการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคชาวลำพูนชาร์โรเลส์ 3 ตัว

ลำดับ/ตัว	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)		
	1 วัน	2 วัน	3 วัน
1	125,000	155,000	217,000
2	125,000	157,000	216,000
3	128,000	157,000	217,000
เฉลี่ยรวม	126,000	156,333	216,667

ภาคผนวก ง แสดงให้เห็นอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมือง
 ขาวลำพูน โคขาวลำพูนแองกัส และโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ เพาะเลี้ยง
 ที่อุณหภูมิ 42.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

ตาราง 17 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคพื้นเมืองขาวลำพูน 3 ตัว

ลำดับ/ตัว	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1	151,801	168,000	151,001
2	152,701	173,322	150,998
3	150,901	170,800	146,001
เฉลี่ยรวม	151,801	170,707	149,333

ตาราง 18 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูนแองกัส 3 ตัว

ลำดับ/ตัว	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1	150,000	149,996	125,001
2	153,900	152,001	118,011
3	153,860	149,001	134,012
เฉลี่ยรวม	152,587	150,333	125,675

ตาราง 19 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในโคขาวลำพูนชาร์โรเลส์ 3 ตัว

ลำดับ/ตัว	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)		
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1	151,870	147,501	133,001
2	156,890	149,101	127,001
3	155,900	160,801	123,341
เฉลี่ยรวม	154,887	152,468	127,781

ภาคผนวก จ แสดงตาราง ANOVA สำหรับการวิเคราะห์อัตราแบ่งตัวของเซลล์
ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน โคชาวลำพูนแองกัส และโคชาวลำพูน
ชาร์โรเลส์

ตาราง 20 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง
และโคลูกผสม สำหรับวันที่ 0

แหล่งของ ความแปรปรวน	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Treatment	2	0.003289	0.001644	0.361	0.711
Residuals	6	0.027333	0.004556		
Total	8	0.030622			

ตาราง 21 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ในโคพื้นเมือง
และโคลูกผสม สำหรับวันที่ 1

แหล่งของ ความแปรปรวน	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Treatment	2	0.809	0.4043	0.376	0.702
Residuals	6	6.457	1.0762		
Total	8	7.266			

ตาราง 22 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์
ในโคพื้นเมืองและโคลูกผสม สำหรับวันที่ 2

แหล่งของ ความแปรปรวน	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Treatment	2	2.774	1.387	0.717	0.526
Residuals	6	11.607	11.607		
Total	8	14.381			

ภาคผนวก ฉ แสดงตาราง ANOVA สำหรับการวิเคราะห์อัตราการผลิตของเซลล์
ไฟโบริบลาสต์ในโคพื้นเมืองชาวลำพูน โคชาวลำพูนแองกัส และโคชาวลำพูน
ชาร์โรเลส์

ตาราง 23 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการผลิตของเซลล์ไฟโบริบลาสต์ในโคพื้นเมือง
และโคลูกผสม สำหรับชั่วโมงที่ 0

แหล่งของ ความแปรปรวน	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Treatment	2	0.06096	0.03048	0.77	0.504
Residuals	6	0.23753	0.03959		
Total	8	0.298			

ตาราง 24 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการผลิตของเซลล์ไฟโบริบลาสต์ในโคพื้นเมือง
และโคลูกผสม สำหรับชั่วโมงที่ 24

แหล่งของ ความแปรปรวน	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Treatment	2	3.0307	1.5153	12.85	0.00678
Residuals	6	0.7077	0.1179		
Total	8	3.738			

ตาราง 25 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการผลิตของเซลล์ไฟโบริบลาสต์ในโคพื้นเมือง
และโคลูกผสม สำหรับชั่วโมงที่ 48

แหล่งของ ความแปรปรวน	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Treatment	2	37.38	18.692	7.764	0.0217
Residuals	6	14.45	2.408		
Total	8	51.830			

ภาคผนวก ข ขั้นตอนและสูตรการตรวจนับเซลล์โคพื้นเมือง และลูกผสมพื้นเมือง

Step: I (Sub cell culture)

1. นำเซลล์ที่ทำการเลี้ยงก่อนหน้านี้ออกมาเพื่อทำการทดลองนับเซลล์
2. นำจานอาหารมาชะล้างด้วย PBS จำนวน 2 รอบ แล้วดูดออกเพื่อทำความสะอาด
3. เติม Trypsin ปริมาตร 1 ml ในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการขูดเพื่อทำให้เซลล์ที่เกาะจานหลุด
4. หลังจากขูดเสร็จนำจานอาหารเลี้ยงเซลล์ไป บ่ม CO₂ ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
5. เมื่อครบกำหนดเวลานำจานอาหารเลี้ยงเซลล์ไปตรวจเซลล์
6. ทำการ stop Trypsin โดยเติม 10% FBS + DMEM ในปริมาตร 1 ml
7. จากนั้นดูดตัวอย่างเซลล์ในจานอาหารใส่ในหลอด Ependrop
8. นำตัวอย่างในหลอด Ependrop ไป centrifuge 1100 X 3 g
9. เมื่อเสร็จขั้นตอนทำการดูดเอาสารที่อยู่ข้างบนออกจากนั้นเติม 10% FBS + DMEM ปริมาตร 1 ml

Step: II (Dilution)

1. ทำการ Dilution เซลล์ในอัตราส่วน 25:5 (Trypan blue: cell) เพื่อให้ได้ Final volume 30
2. จากนั้นนำตัวอย่างที่ Dilution เสร็จ มาคิดลงในตารางนับเซลล์ ข้างละ 10 ul
3. นำไปส่องกล้องเพื่อนับเซลล์ตามขั้นตอน

Step: III (Record Data)

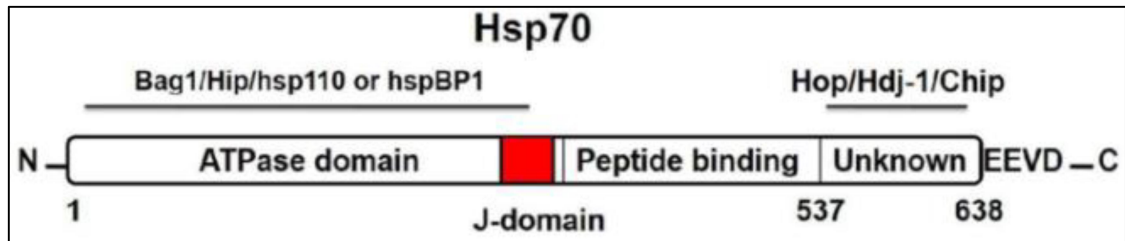
1. เซลล์มีชีวิตทั้งหมด (Total viable cell); เซลล์ตายทั้งหมด (Total nonviable cell):
 - 1.1 เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต (percentage of viable cell)
$$= \frac{\text{\# of viable cell}}{\text{total \# of cell}} \times 100$$
 - 1.2 ค่าเฉลี่ยเซลล์ต่อตาราง (Average # of cell /square)
$$= \frac{\text{viable}}{\text{squares}}$$
2. Dilution factor
$$= \frac{\text{Final volume}}{\text{volume of cell}}$$

3. Concentration (viable cell/ml)

$$= \text{Average \# of (cell/square)} \times \text{Dilution factor} \times 10^4$$



ภาคผนวก ซ รูปภาพโครงสร้างของฮีทช็อคโปรตีน 70

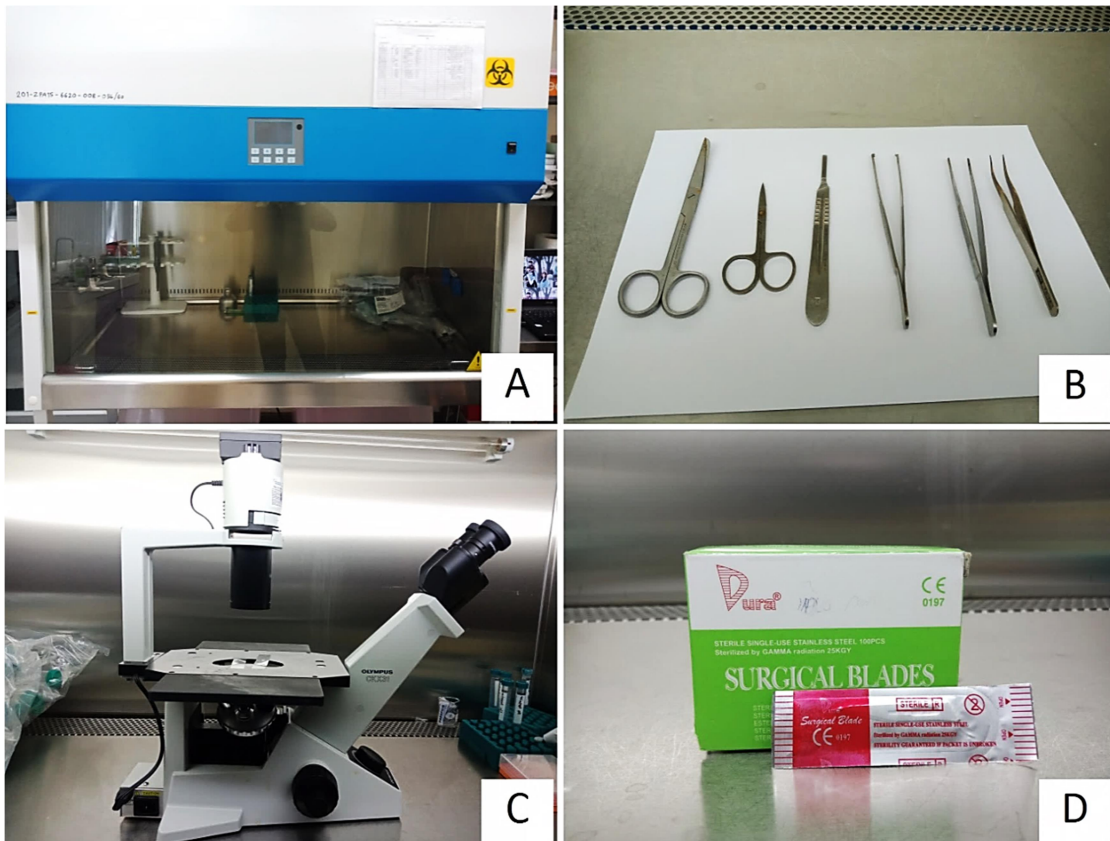


ภาพ 18 แสดงแผนที่โครงสร้างของฮีทช็อคโปรตีน 70



ภาคผนวก ฅ รูปภาพอุปกรณ์และสารเคมีตลอดงานวิจัย

ส่วนที่ 1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์



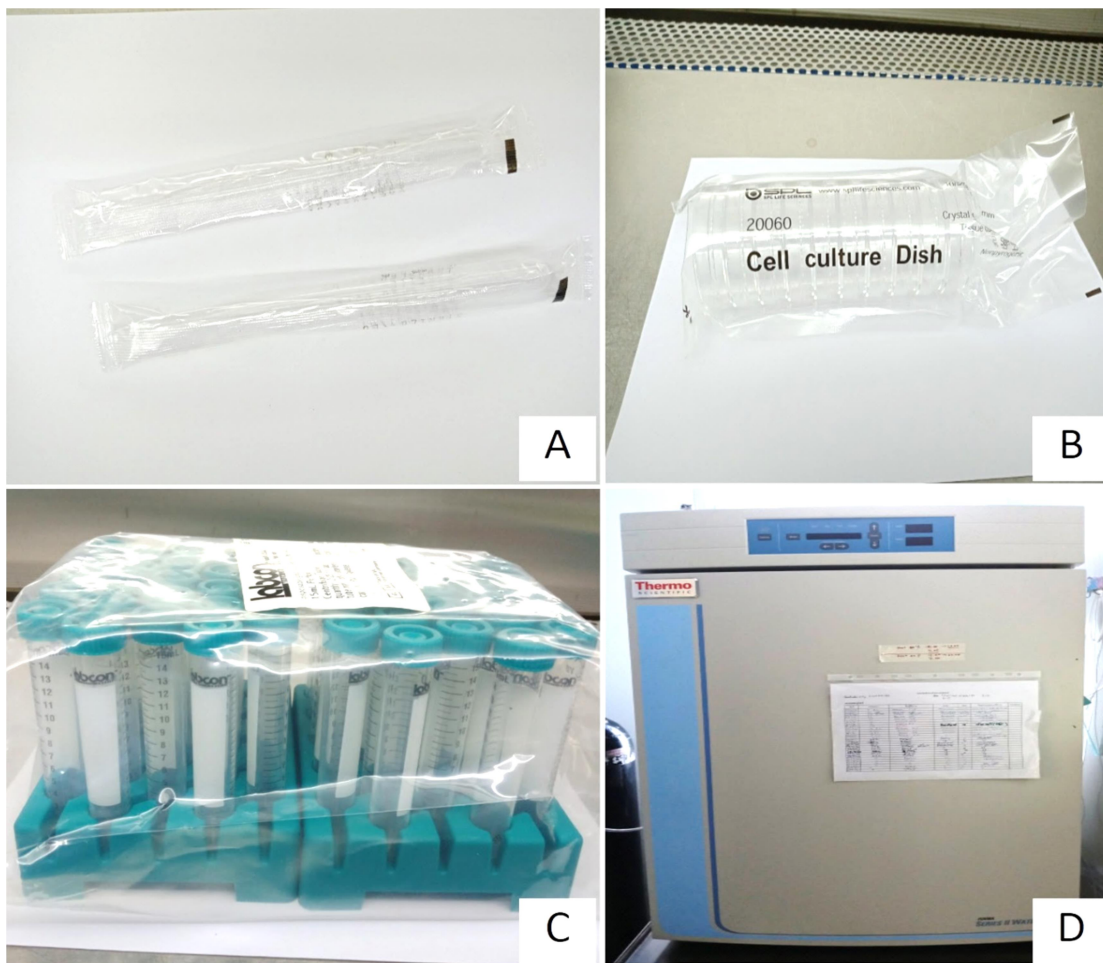
ภาพ 19 แสดงอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (1)

หมายเหตุ: A: ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)

B: ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

C: กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ

D: มีดผ่าตัด เบอร์ 21



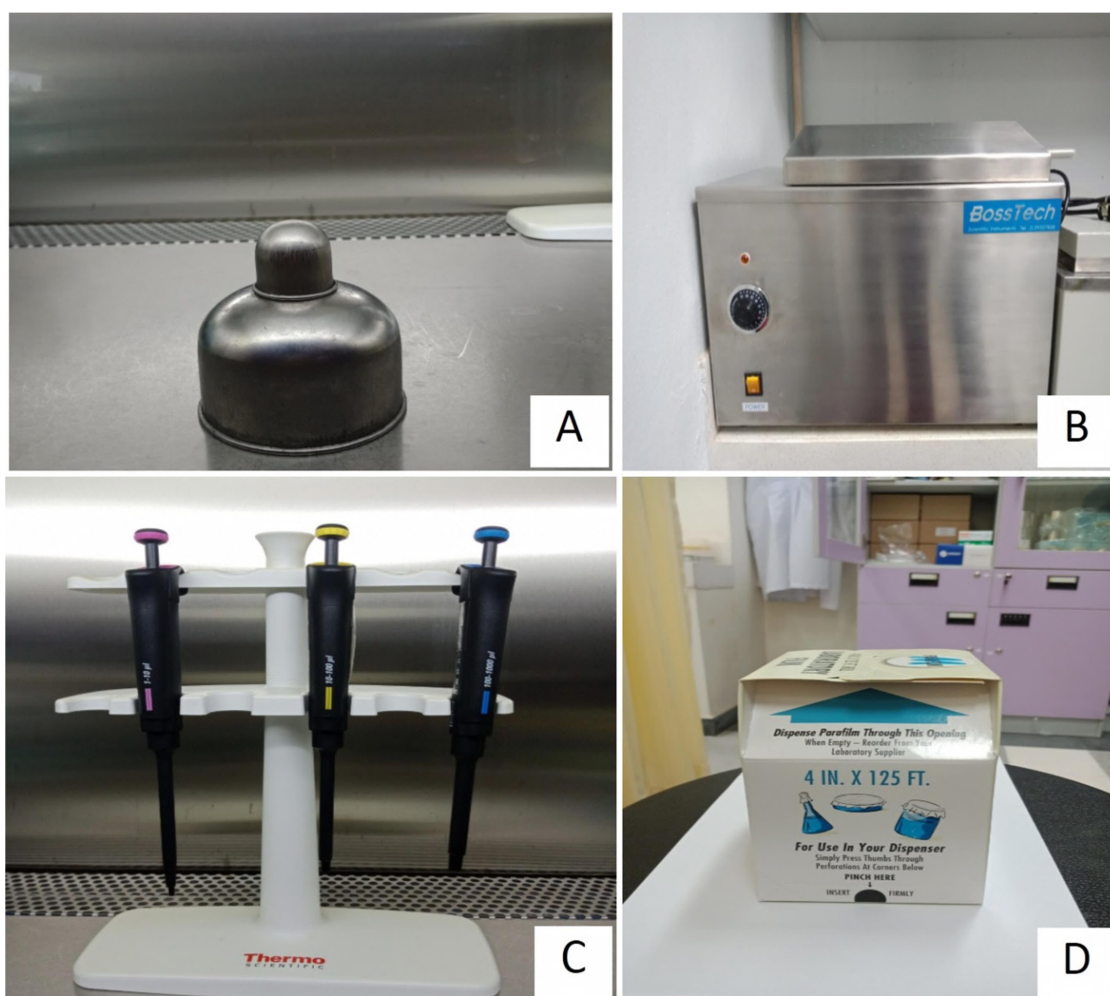
ภาพ 20 แสดงอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (2)

หมายเหตุ: A: Pasteur pipette drop size 3 ml

B: จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 MM (CELL T.C. DISH 60x15 MM)

C: หลอด 15 ml Centrifuge Tube

D: ป่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator, CO₂)



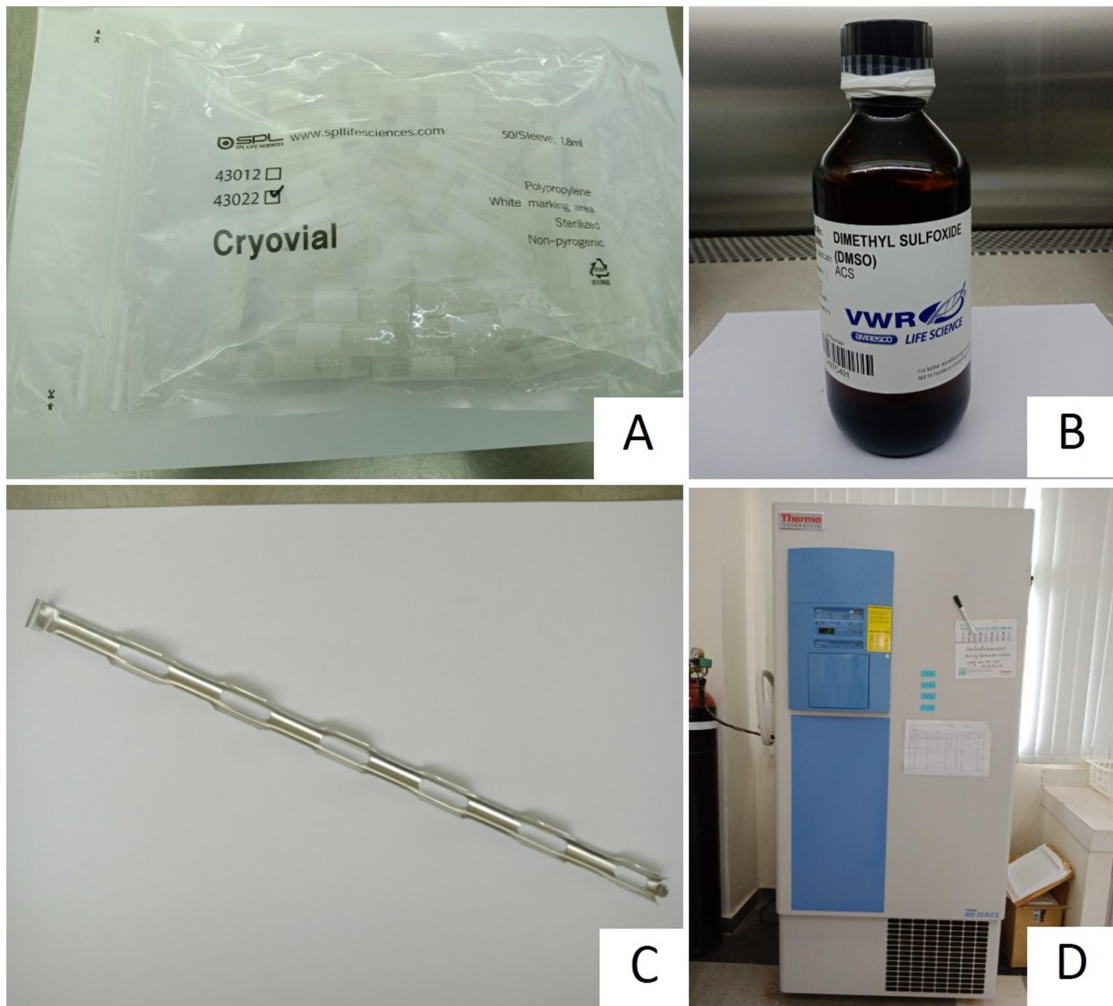
ภาพ 21 แสดงอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (3)

หมายเหตุ: A: ตะเกียงแอลกอฮอล์

B: Laboratory water bath

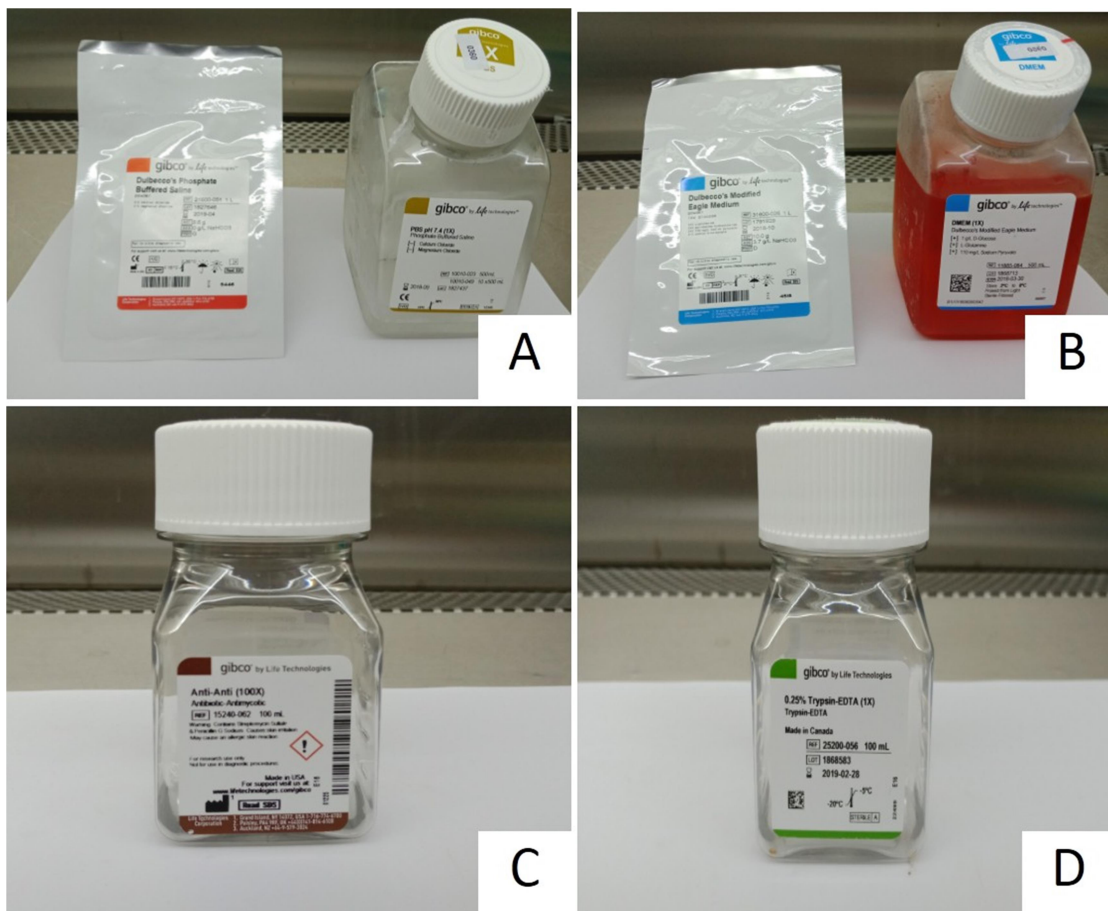
C: ปิเปต ขนาด 1-10 มิลลิลิตร, 10-100 มิลลิลิตร และ 100-1000 มิลลิลิตร

D: พาราฟิล์มขนาดไซส์ M



ภาพ 22 แสดงอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (1)

- หมายเหตุ: A: หลอด Cryovial
 B: น้ำยาสาร Dimethyl Sulfoxide; DMSO
 C: แท่งใส่หลอด Cryovial
 D: ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ (Freezer)



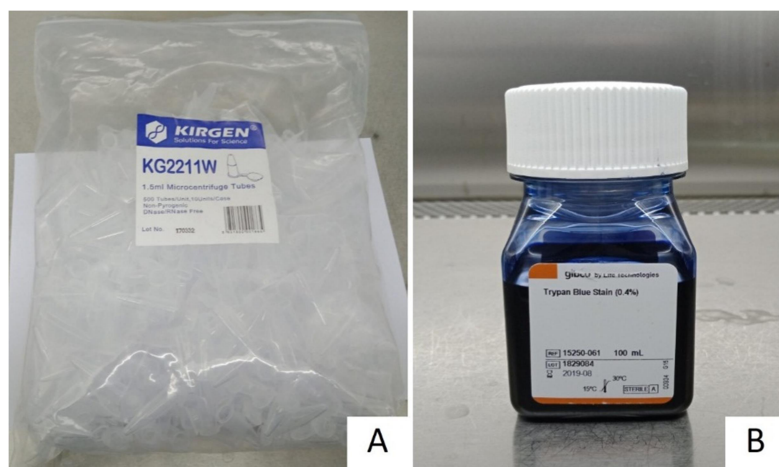
ภาพ 23 แสดงสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

หมายเหตุ: A: สารเคมี Phosphate buffer saline (PBS)

B: สารเคมี DMEM media

C: สารเคมี Antibiotic-antimycotic (ABAM)

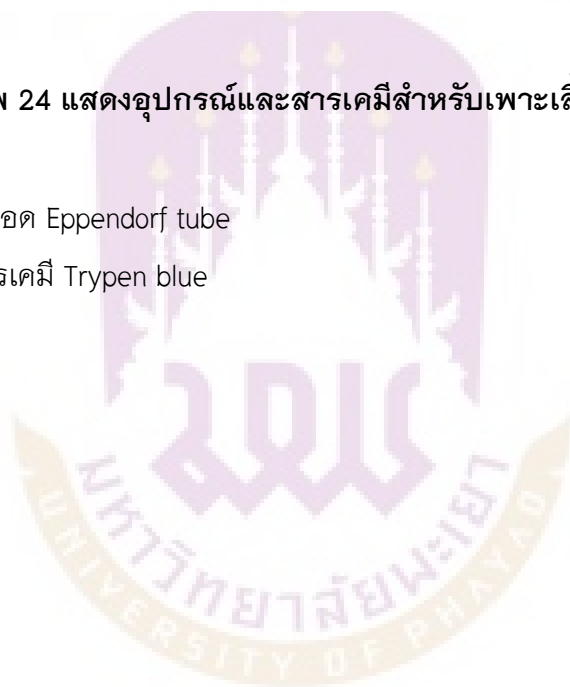
D: สารเคมี Trypsin-EDTA (0.05%)



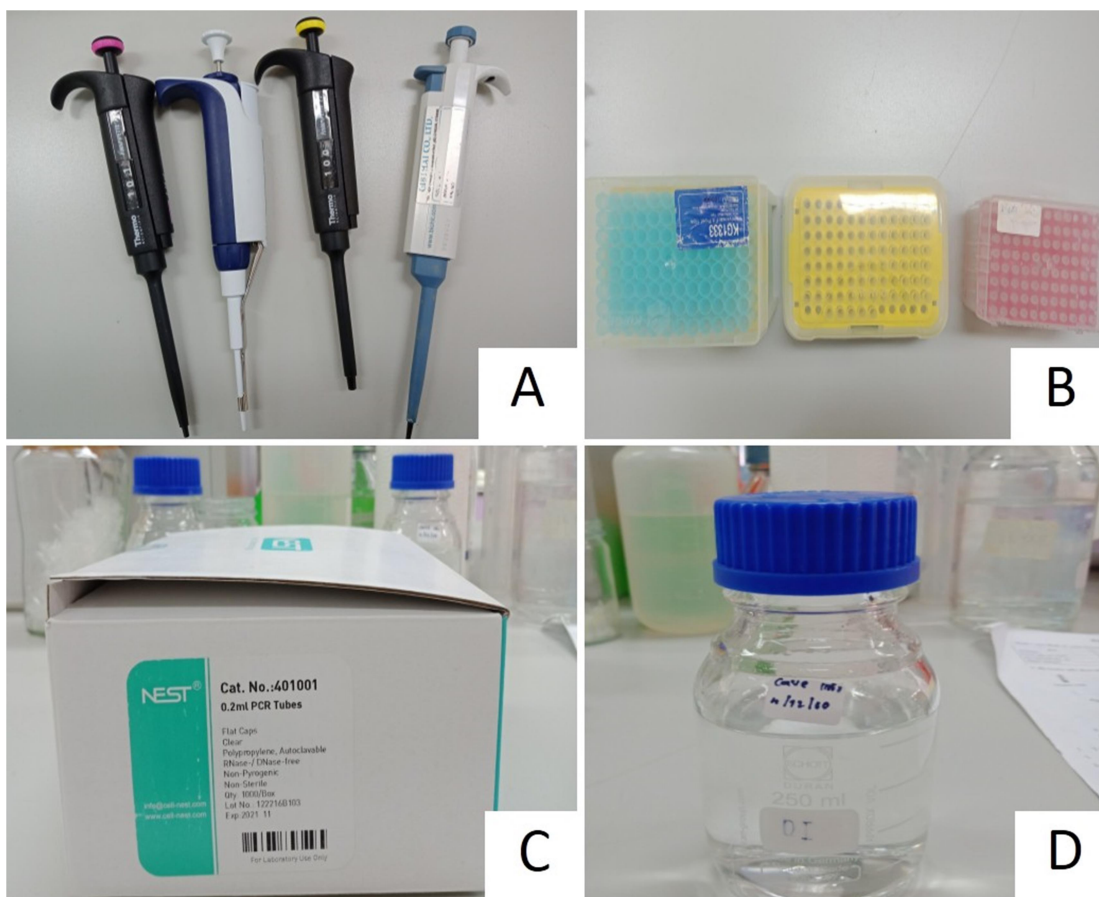
ภาพ 24 แสดงอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ (2)

หมายเหตุ: A: หลอด Eppendorf tube

B: สารเคมี Trypan blue



ส่วนที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับปฏิบัติการตรวจการมีอยู่ของยีนฮีทช็อค-
โปรตีน 70



ภาพ 25 แสดงอุปกรณ์สำหรับการตรวจหาการมีอยู่ของยีน

หมายเหตุ: A: ปิเปตขนาด 0.1-1.0, 1.0-10, 10-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร

B: Tip ขนาด 1, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

C: Eppendorf PCR Tubes

D: น้ำ DI ผ่านการฆ่าเชื้อ



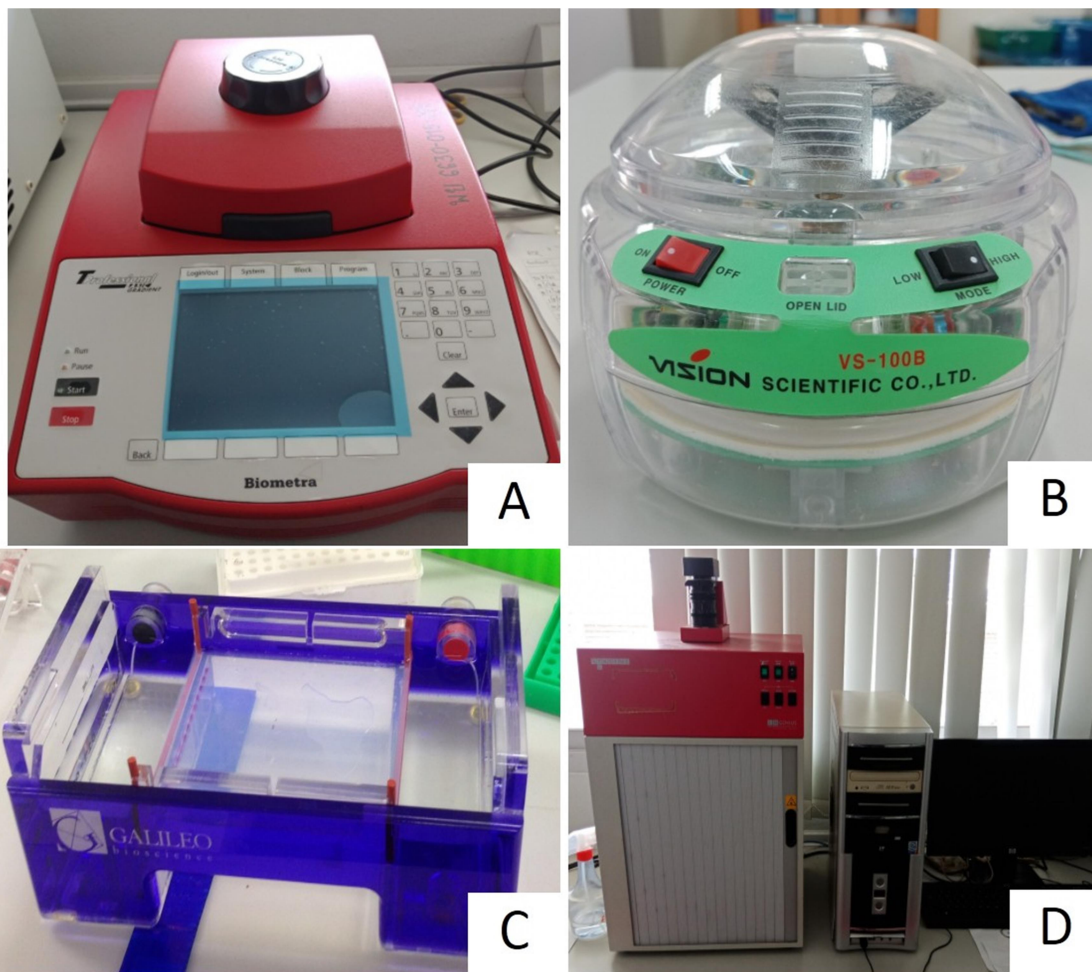
ภาพ 26 แสดงอุปกรณ์สำหรับการตรวจหาการมีอยู่ของยีน (1)

หมายเหตุ: A: ชุดสกัด RNA

B: ชุดสร้าง cDNA

C: เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ

D: เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)



ภาพ 27 แสดงอุปกรณ์สำหรับการตรวจหาการมีอยู่ของยีน (2)

หมายเหตุ: A: เครื่องพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR)

B: เครื่องปั่นเหวี่ยง Eppendorf ขนาด 1.5 ml

C: ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

D: เครื่อง gel documentation system พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล