ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การระบุเซลล์ต้นตอของเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาจากการเพาะเลี้ยง

ผู้เขียน นายเทียนชัย อุ่นบ้าน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สัตวศาสตร์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. เพทาย พงษ์เพียจันทร์ ประธานกรรมการ
ศ. ดร. สนิท มกรแก้วเกรยูร กรรมการ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อทำการเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทา โดยทำการเปรียบเทียบชนิดอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ชนิด เพื่อจำแนกหาเซลล์ต้นตอ (stem cells) ของเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาจากการเพาะเลี้ยง และเพื่อศึกษาการเกิดไก่ chimeras จาก stem cells โดยใช้ไข่ไก่พันธุ์พื้นเมือง และไข่นกกระทาญี่ปุ่น ชนิดละ 32 ฟอง อายุการฟัก 0–7 วัน เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) และ Minimum Essential Medium-Glasgow (MEM-G) เสริมด้วย 10 % fetal calf serum เลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ในตู้เลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5 % คาร์บอนไดออกไซด์ และอิ่มตัวด้วยไอน้ำ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 2 วันแล้วนับหาจำนวนเซลล์เจริญด้วย hemacytometer และนำเซลล์ที่อายุการเลี้ยง 8 วันมาย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase (AP) staining และวัดผลปริมาณ AP activity ด้วย Biotech reagent kit การศึกษาการเกิดไก่ chimeras จะใช้เซลล์ตัวอ่อนนกกระทาญี่ปุ่นอายุ 1 วัน การทดลองที่ 1 ใช้จำนวนเซลล์ 100–40,000 เซลล์ การทดลองที่ 2 ใช้จำนวนเซลล์ 100–3,200 เซลล์ ฉีดไปในไข่ไก่เนื้อสายพันธุ์การค้าอาร์เบอร์เอเคอร์ การทดลองที่ 3 ไข่ตัวรับจะถูกฉายรังสีโคบอลท์ 60 ที่ระดับ 0, 300, 500 และ 1000 rads ก่อนการฉีดเซลล์จำนวน 400–40,000 เซลล์ ดูผลการฟักออกเป็นลูกไก่ ส่วนตัวอ่อนที่ฟักไม่ออกดูผลการพัฒนาเทียบกับแผนภาพการเจริญ สุดท้ายทำการตรวจสอบการเกิดลักษณะไก่ chimeras ด้วยไมโครแซทเทลไลท์มาร์คเกอร์ตำแหน่ง ADL0024 และ ADL0257 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการศึกษาพบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด IMDM ให้ผลการเจริญของเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาดีกว่า MEM-G อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p< 0.001$) เซลล์ตัวอ่อนไก่จากไข่ฟักอายุ 1 วัน และเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาญี่ปุ่นอายุ 1 และ 2 วัน เจริญได้ดีกว่าเซลล์ตัวอ่อนวันอื่นๆ และการจำแนกเซลล์ต้นตอด้วยวิธี alkaline phosphatase (AP) staining และ AP activity เซลล์ตัวอ่อนทั้งสองชนิดจากไข่ฟักวันที่ 0–7 ทุกเซลล์ให้ผลบวกเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงลักษณะการเป็นเซลล์ต้นตอของเซลล์ตัวอ่อน การศึกษาการเกิดไก่ chimeras พบจำนวนเซลล์ตัวให้ 200 เซลล์ เป็นจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการฉีดเพื่อผลิตไก่ chimeras โดยให้ผลการฟักออกเป็นลูกไก่ 33.3 % และระดับการฉายรังสี 500 rads เหมาะสมต่อการพัฒนาของเซลล์ตัวอ่อนตัวรับสามารถฟักออกเป็นตัว 33.3 % และไม่พบลักษณะการเกิดไก่ chimeras เมื่อตรวจสอบด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้งสองตำแหน่ง

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า พบอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทาเป็นชนิด IMDM ในการเพาะเลี้ยง และพบเซลล์ต้นตอ (stem cells) ทั้งในตัวอ่อนไก่และนกกระทา และสามารถใช้แนวทางการผลิต quail-chick chimeras และวิธีการตรวจสอบลักษณะ chimeras โดยไมโครแซทเทลไลท์มาร์คเกอร์ทั้งสองชนิด ในการผลิตไก่ chimeras ในครั้งต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Identification of Cultured Chicken and Japanese Quail Embryonic Stem Cells

Author Mr Tianchai Ounbahn

Degree Master of Science (Agriculture) Animal Science

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Petai Pongpiachan Chairperson

Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon Member

ABSTRACT

The objective of this study was to create stem cells culture of chicken and quail by comparing two culture media. To determine stem cells and chimera, thirty-two fertilized eggs each of native chicken and Japanese quail were incubated in an incubator at 37 °C for 0-7 days. The embryonic cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) and Minimum Essential Medium-Glasgow (MEM-G) containing 10 % fetal calf serum in 24 wells culture plate for 14 days period. The plates were incubated in a carbondioxide incubator at 37 °C, saturated with water vapor and 5 % CO_2. The incubated embryonic cells were collected every 2 days and then counted those cells by hemacytometer. Eight days old of both incubated embryonic cells were stained by alkaline phosphatase staining and quantified alkaline phosphatase activity by Biotech reagent kit. For the first experiment of chimera, 100 - 40,000 embryonic cells of one day-old Japanese quail and the second experiment, 100–3,200 embryonic cells were used to inject into commercial broiler Aber Acres eggs. In the third experiment, recipient eggs were irradiated by cobalt 60 (^{60}CO) at 0, 300, 500 and 1,000 rads before injecting into 400–40,000 embryonic cells. Chick developed chart was used to determine the development of unhatched embryo. Hatchability was determined. Finally, detection of chimera was made by PCR microsatellite (ADL0024 and ADL0257).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The result showed that chicken and Japanese quail embryonic cells cultured in IMDM grew better than those in MEM-G with high statistically different ($p<0.001$). One day-old chicken embryonic cell and one and two day-old Japanese quail had better development than others. Stem cell determination and AP activity were positive in both embryonic cells (0-7 day) when compared with control. For chimeras, two hundred cells was appropiate for injection and the appropiate irradiated recipient eggs was 500 rads. Eggs from both treatment could hatch 33.3 %. But there were no chimeras when detected by the two microsattelites.

It could be concluded that appropiate culture media for embryonic cells of chicken and Japanese quail was IMDM media. Embryonic stem cells were found in both chicken and quail embryos. Use of microsatellite may be a tool to determine chimera and this experiment may be a model for producing quail-chick chimeras.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved