

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฎ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	ท
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	
2.1 ส่วนประกอบของไข่	3
2.2 การพัฒนาตัวอ่อนหลังการ Fertilization	4
2.3 การพัฒนาของ Avian Primordial Germ Cells (PGCs)	5
2.4 Embryonic Stem (ES) Cells	9
2.5 การจำแนกเซลล์ต้นตอ (Embryonic stem cells)	11
2.6 การเพาะเลี้ยงและผลิต Germline Chimeras ในไก่	14
2.7 การตรวจสอบลักษณะ Quail-Chicken Chimeras	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์การทดลอง	17
3.2 สัตว์ทดลอง	21
3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่และนกกระทา	21

## สารบัญ (ต่อ)

3.4 การตรวจหา Stem cells ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining	22
3.4.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ adipose ของไก่	22
3.4.2 เซลล์ myoepithelial cell ของต่อมน้ำนมหนู	23
3.4.3 ขั้นตอนการย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining	23
3.5 การวัดผล alkaline phosphatase activity	23
3.6 การฉีดเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาเข้าไปในไข่ไก่ฟักพันธุ์อาเบอร์ เอเคอร์	23
3.6.1 การเตรียมเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา	23
3.6.2 การเตรียมไข่ไก่ฟักตัวรับ (recipient)	23
3.6.3 การฉีดเซลล์ตัวอ่อนให้เข้าไปในไข่ตัวรับ	26
3.7 การวัดผลการเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนไก่	28
3.8 การตรวจสอบการเกิดลักษณะ chimeras ด้วยไมโครแซทเทลไลท์	28
3.8.1 การเก็บตัวอย่างเลือด	28
3.8.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด	28
3.8.3 การหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ	29
3.8.4 การเพิ่มขยายชิ้นส่วนด้วยปฏิกิริยาถูทโซ โพลีเมอเรส	29
3.8.5 การหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว	30
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล	31
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่	32
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนนกกระทา	38
4.3 การตรวจหา stem cells ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining	39
4.4 ผล alkaline phosphatase activity (AP activity)	47
4.5 ผลการฉีดเซลล์ตัวอ่อนเจริญนกกระทาไปในไข่ไก่ตัวรับเพื่อผลิตไก่ chimeras	49

สารบัญ (ต่อ)

4.6 ผลการเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ เทียบกับแผนภาพการพัฒนาตัวอ่อนไก่	58
4.7 การตรวจสอบการเกิดลักษณะ chimeras ด้วยไมโครแซทเทลไลท์	59
บทที่ 5 วิจัยรณัผล และสรุปลผลการทดลอง	
5.1 วิจัยรณัผลการทดลอง	66
5.2 สรุปลผลการทดลอง	72
5.3 ชื้อเสนอแนะ	73
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียน	82

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2 - 1. แสดงส่วนประกอบทางเคมีของไข่ไก่	3
2 - 2. แสดง stage ของการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ใน ระยะ preoviposition และ Incubation	6
2 - 3. Immunohistochemical marker สำหรับการจำแนก PGC ของไก่และนกกระทา	12
3 - 1. แสดงลักษณะของ ไมโครแซทเทลไลท์ ที่ทำการศึกษา	29
3 - 2. สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส	30
4 - 1. แสดงการย้อมติดสีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และแอกติวิตี เอนไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ของเซลล์ตัวอ่อนไก่ที่เพาะเลี้ยงได้ 8 วัน	45
4 - 2. แสดงการย้อมติดสีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และแอกติวิตี เอนไซม์ อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ของเซลล์ตัวอ่อนนกกระทาที่เพาะเลี้ยงได้ 8 วัน	46
4 - 3. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การฟักออกเป็นลูกไก่ และการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ จากการทดลองที่ 1 เมื่อเทียบกับแผนภาพการพัฒนา	50
4 - 4. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การฟักออกเป็นลูกไก่ และการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ จากการทดลองที่ 2 เมื่อเทียบกับแผนภาพการพัฒนา	51
4 - 5. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การฟักออกเป็นลูกไก่ และการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ จากการทดลองที่ 3 เมื่อเทียบกับแผนภาพการพัฒนา	52
4 - 6. เปรียบเทียบค่าการวัดการพัฒนาของตัวอ่อนไก่ที่ไม่มีการฟักออก เป็นตัวในแต่ละการทดลอง	58
4 - 7. ผลไมโครแซทเทลไลท์ของไก่ที่ใช้ตรวจสอบลูกไก่จากการทดลองที่ 1	62
4 - 8. ผลไมโครแซทเทลไลท์ของไก่ที่ใช้ตรวจสอบลูกไก่จากการทดลองที่ 2	64
4 - 9. ผลไมโครแซทเทลไลท์ของไก่ที่ใช้ตรวจสอบลูกไก่จากการทดลองที่ 3	65

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1. เปรียบเทียบระยะการพัฒนาของตัวอ่อนในระหว่าง 24 ชั่วโมงแรกของการฟัก	5
2-2. แสดง blastodisc หลังจาก ไข่่ออกไข่มาใหม่	7
2-3. แสดงตำแหน่งของ germinal disc บนไข่แดง	7
2-4. การพัฒนาตัวอ่อนระยะหลังการ fertilization	8
2-5. การพัฒนาของ Avian Primordial Germ Cells (PGCs)	8
2-6. ตัวอ่อนระยะ stage 15	9
3-1. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ adipose ของไก่	22
3-2. ขั้นตอนการย้อมสีเซลล์ด้วยวิธี alkaline phosphatase staining	24
3-3. แสดงขั้นตอนการเตรียม ไข่ฟักตัวรับ	25
3-4. แสดงขั้นตอนการฉีดเซลล์ตัวอ่อนเข้าไปใน ไข่ฟักตัวรับ	27
4-1. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 0	34
4-2. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 1	34
4-3. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 2	35
4-4. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 3	35
4-5. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 4	36
4-6. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 5	36
4-7. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 6	37
4-8. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนไก่จาก ไข่ฟักวันที่ 7	37
4-9. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกระทาจาก ไข่ฟักวันที่ 0	40
4-10. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกระทาจาก ไข่ฟักวันที่ 1	40
4-11. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกระทาจาก ไข่ฟักวันที่ 2	41
4-12. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกระทาจาก ไข่ฟักวันที่ 3	41
4-13. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกระทาจาก ไข่ฟักวันที่ 4	42

4 - 14. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกกกระทาจากไข่ฟักวันที่ 5	42
4 - 15. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกกกระทาจากไข่ฟักวันที่ 6	43
4 - 16. การเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนนกกกระทาจากไข่ฟักวันที่ 7	43
4 - 17. การย้อมติดสีอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์ตัวอ่อนไก่, นกกกระทา, เซลล์ต่อมน้ำนมหนู, เซลล์ไขมันไก่	44
4 - 18. ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จากน้ำเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนไก่วันที่ 8	48
4 - 19. ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส จากน้ำเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนนกกกระทา	48
4 - 20. เพอร์เซ็นต์ลูกไก่ฟักออกเป็นตัว	56
4 - 21. เพอร์เซ็นต์ลูกไก่ฟักออกเป็นตัว	56
4 - 22. เพอร์เซ็นต์ลูกไก่ฟักออกเป็นตัว	57
4 - 23. แสดงตัวอย่างรูปถ่ายลูกไก่ที่เกาะจากไข่ฟักหลัง 21 วัน	59
4 - 24. ตัวอย่างไมโครแซทเทลไลต์บนตำแหน่งอัลลีล ADL0024	60
4 - 25. ตัวอย่างไมโครแซทเทลไลต์บนตำแหน่งอัลลีล ADL0257	61

## อักษรย่อและสัญลักษณ์

%	เปอร์เซ็นต์
° ฟ	องศาฟาเรนไฮน์
ซม.	เซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
AP	Alkaline Phosphatase
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CNTF	Ciliaryneutrophic factor
cPGC	circulating Primordial Germ Cells
EB	Embryoid Body
EC	Embryonal Carcinoma
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
gPGC	gonadal Primordial Germ Cells
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-11	Interleukin-11
IL-6	Interleukin-6
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JAK	Janus-associated kinase
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MEM-G	MEM-Glasgow
OSM	Oncostatin M
PAS	Periodic acid-Shiff
PBS-G	Phosphate Buffer Saline-Glucose
PGC	Primordial Germ Cells
SCF	Stem Cell Factor
SEM	Scan Electron Microscopy
tPGC	mesenchymal tissue Primordial Germ Cells