ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ วิธีการสร้างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูจากไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ

ผู้เขียน นางสาวอมร สันธิ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ อภิชาติ โอฬารรัตนชัย

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบผลของปัจจัยที่เติมไปในอาหารที่เลี้ยงเซลล์ในแต่ละช่วงของการทดลอง เพื่อให้ได้มาซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู (mouse parthenogenetic embryonic stem cell : m-pES cell) จากบลาสโตซีสที่เกิดด้วยวิธีการ parthenogenesis ปัจจัย 3 ตัวที่ใช้ทดสอบคือ LIF (leukemia inhibitory factor), Park-Davis 98059 (PD98059) และ 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) โดยการเติมปัจจัยตัวเดียวเปรียบเทียบกับการเติมปัจจัยทั้งสามตัวร่วมกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 เริ่มจากการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ระยะ บลาสโตซีส จนเกิดเป็น outgrowth ช่วงที่ 2 เป็นการ เพาะเลี้ยง outgrowth จนเกิด colony ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู โดยวัดผลจากจำนวนครั้ง(cell line) ของ เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูที่ได้ เปรียบเทียบกับจำนวนบลาสโตซีสเริ่มต้น จากการศึกษาพบว่า (1) การเติมปัจจัยหลายตัว(LIF+PD98059+BIO) ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ ทำให้ได้จำนวนครั้ง (cell line)ของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนู มากกว่าการเติมปัจจัยตัวเดียว(LIF) (75.82% และ 20% ตามลำดับ) (2) การเติมปัจจัยหลายตัวจะเกิดประโยชน์ เมื่อมีการเติมในช่วงที่ 1 ของการทดลองเท่านั้น หากเติมในช่วงที่ 2 ของการทดลอง พบว่าจำนวนครั้งของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนหนูไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับผลของการเติมปัจจัยตัวเดียว (77.40% และ 75.82% ตามลำดับ) (3) การประเมินคุณภาพของ outgrowth โดยตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มี pluripotency โดยทดสอบการติดสีของ alkaline phosphatase (AP) และ Oct-4 ใน outgrowth ที่เติมปัจจัยหลายตัว มีการติดสี เป็นบริเวณกว้างกว่าและเข้มกว่า ประมาณ 70-100% เทียบกับการเติมปัจจัยตัวเดียว ซึ่งมีการติดสีประมาณ 0-10%

Thesis Title Methods to Derive Mouse Embryonic Stem Cells From Parthenogenetic Eggs

Author Miss Amorn Santhi

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Associate Professor Apichart Oranratnachai, M.D.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the ability of multiple - factor supplementation to augment derivation of mouse parthenogenetic embryonic stem (m-pES) cells. Three factors, LIF (leukemia inhibitory factor), Parke-Davis 98059 (PD98059) and 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), were added as supplements (individually or in a combination of all three) at two consecutive stages of culture; that were, from the start of blastocyst culture to the outgrowth stage, and from putting disaggregated outgrowth to generation of primary m-pES colonies, respectively. The main outcome measure was the percentage of derivable m-pES cell lines, based on the number of blastocysts initially cultured. The results showed that (1) a combination of all three factors (LIF+PD98059 +BIO) yielded much higher m-pES cell lines than LIF-only culture (75.82% vs. 20%, respectively). (2) The advantages of a combination of multiple factors were manifested only when they were used during the first stage of the culture and not during the second stage; in other word, in the second stage of culture, multiple factors gave comparable result to that of LIF-only (75.82% vs. 77.40%, respectively). (3) The quality of the inner cell mass (ICM) outgrowth obtained from the first-stage culture was studied. After alkaline-phosphatase and Oct-4 staining, which documented pluripotency of the embryonic stem cells, outgrowths cultured in multiple factors stained much stronger and in higher proportion than those obtained after supplementation only with LIF (70-100% vs. 0-10%, respectively).