สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบาญตาราง	ฎ
สารบาญภาพ	ฏ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ AMC-K46 และ AC-F2	4
2.2 เซลล์น้ำคร่ำเป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิด	4
2.3 การตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์น้ำคร่ำ	5
2.4 การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์	6
2.5 การตรวจสอบความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์มะเร็ง ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ	9
2.5.1 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด	10
2.5.2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นมะเร็ง	10
2.5.2.1 *SKI*	11
2.5.2.2 *TGF-β1*	11
2.5.2.3 *hTERT*	11
2.5.3 ยีนควบคุม	11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	
3.1 เซลล์เชื้อสายที่ใช้ในการทดลอง	13
3.1.1 เซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำมนุษย์ (human amniocytes cell lines)	13
3.1.2 เซลล์เชื้อสายมะเร็ง (cancer cell lines)	13
3.1.3 เซลล์น้ำคร่ำปกติของมนุษย์ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (normal human amniocytes)	13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

	หน้า
3.2 Immunocytochemistry	14
3.2.1 การเตรียมเซลล์ในลักษณะแขวนลอย (cell suspension)	14
3.2.2 การเตรียมสไลด์และเทคนิค cytospin	15
3.2.3 การย้อมด้วยแอนติบอดี	15
3.3 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ	
3.3.1 การเตรียมเซลล์เพื่อสกัดอาร์เอ็นเอ	16
3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอ	16
3.3.3 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ	17
3.3.4 การตรวจสอบปริมาณซีดีเอ็นเอ	18
3.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	18
3.4.1 Semi-quantitative reverse transcriptase PCR	19
3.4.2 Real-time PCR	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การตรวจสอบเซลล์น้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2	
ด้วยวิธี immunocytochemistry	23
4.1.1 การตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์	23
4.1.1.1 Cytokeratin AE1&AE3	23
4.1.1.2 Vimentin	23
4.1.1.3 AFP	24
4.1.2 การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์	24
4.1.2.1 Cyclin D1	24
4.1.2.2 Ki-67	29
4.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน	
4.2.1 Semi-quantitative reverse transcriptase PCR	32
4.2.2 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน	
ด้วยโปรแกรม Quantity One V.4.4.1	33
4.2.3 Real-time PCR	35

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้า

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย

5.1 การตรวจสอบต้นกำเนิดของเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 38

5.2 การตรวจหาเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดหรือเซลล์มะเร็ง ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2

5.2.1 การตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ 39

5.2.2 ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม stem cell related genes ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 41

5.2.3 ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม cancer related genes ในเซลล์เชื้อสายน้ำคร่ำ AMC-K46 และ AC-F2 43

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 46

เอกสารอ้างอิง 47

ภาคผนวก ก อุปกรณ์และสารเคมี 56

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 61

ภาคผนวก ค เทคนิคในการทดลองและการคำนวณ 64

ภาคผนวก ง ข้อมูลทางตัวเลขจากการทดลอง 69

ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 85

ประวัติผู้เขียน 93

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 รายชื่อ marker ที่ใช้ตรวจสอบแหล่งที่มาหรือต้นกำเนิดของเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนของมนุษย์ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี PCR และ immunocytochemistry	7
3.1 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	20
3.2 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละคู่และอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing	21
3.3 สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	21
3.4 อุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR	22
4.1 ผลการทดลองย้อมเซลล์ด้วย protein marker ที่จำเพาะต่อต้นกำเนิดของเซลล์	25
4.2 ผลการทดลองย้อมเซลล์ด้วย protein marker เพื่อตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของเซลล์	29
4.3 ขนาดของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ของยีนแต่ละคู่	33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

รูป	หน้า
2.1 แสดงวัฏจักรของเซลล์	8
4.1 ผลจากการย้อมด้วย cytokeratin AE1&AE3	26
4.2 ผลจากการย้อมด้วย vimentin	27
4.3 ผลจากการย้อมด้วย AFP	28
4.4 ผลจากการย้อมด้วย cyclin D1	30
4.5 ผลจากการย้อมด้วย Ki-67	31
4.6 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis	32
4.7 ขนาดของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์แต่ละคู่เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน	32
4.8 แผนภูมิแท่งแสดงสัมประสิทธิ์การแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายแต่ละชนิด จากการศึกษาด้วยเทคนิค semi-quantitative reverse transcriptase PCR	34
4.9 แผนภูมิแท่งแสดงระดับการแสดงออกของยีนในเซลล์เชื้อสายแต่ละชนิด จากการศึกษาด้วยเทคนิค real-time PCR	36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์

A	Adenosine
AC-F2	Human aminotic cell line derived from female
AFP	Alpha-feto protein
AMC-K46	Human amniotic cell line derived from male
ANOVA	Analysis of variance
bp	Base pair
C	Cytosine
C32	Amelanotic melanomas cell line
^{o}C	Degree celsius
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CO_2	Carbon dioxide
cm	Centimeter
cm^2	Square centimeter
CRD	Complete randomized design
C_T	Threshold cycle
DEPC	Diethylpyrocarbonate
df	Degree of freedom
dH_2O	Distilled water
DMEM	Dulbecco's Modification Eagle's MEM
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	1, 4, Dithio theritol
dNTP	Deoxynucleoside 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
FBS	Fetal bovine serum
g	Gravity force
G	Guanine
GAPDH	Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

HCl	Hydrochloric acid
Hep2	Pharynx carcinomas cell line
HRP	Horse radish peroxidase
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
INT	Intensity
ITGA6	Integrin alpha 6
ITGB1	Integrin beta 1
KCl	Potassium chloride
L	Liter
N/A	Not available
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NCBI	National center for biotechnology information
ng	Nanogram
nm	Nanometer
ml	Milli liter
mm	Millimeter
mm^2	Square millimeter
mM	Millimolar
mol	Molar
OD	Optical density
OMG-1/100	Ocular micrometer grid type 1/100
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chian reaction
RE	Relative expression
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

RQ	Relative quantity
RT-PCR	Reverse trancriptase polymerase chain reaction
SD	Standard deviation
SE	Standard error
Sig.	Significant
SKI	Homo sapiens v-ski sarcoma vial oncogene homolog
SKY	Spectral karyotype
T	Thymidine
TAE	Tris-Acetate-EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
U	Unit
UV	Ultraviolet
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume
µl	Micro liter
µg	Micro gram
µm	Micrometer
p	Level of significant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved