บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ก.อุปกรณ์เกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างหอยทากบก

1.กล่องเลี้ยงหอยขนาดต่าง ๆ (ดังภาพที่ 2) ซึ่งกล่องทุกใบจะทำการเจาะรูเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก

2.อาหารที่ใช้เลี้ยงหอยทากบก ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง มะเขือเทศ มะเขือยาว มันเทศ เห็ดนางฟ้า

ข.อุปกรณ์และสารเคมีเกี่ยวกับการศึกษาและเตรียมโครโมโซม

1.สัตว์ที่นำมาใช้ในการศึกษา ได้แก่หอยทากบกในอันดับ Stylommatophora ซึ่งเก็บจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2537-เดือนกรกฎาคม 2539

2.อุปกรณ์

- บีกเกอร์ขนาดปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- syringe ขนาดปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- slide และ cover glass
- เครื่องมือผ่าตัด
- coplin jar
- ขวดสำหรับดองสัตว์
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร
- AUTOFLOW CO_2 Water-Jacked Incubator
- Hot air oven
- Laminar Flow Hood
- Phase contrast microscope

- light microscope
- Centrifuge
- filter pore size 0.22 micrometers
- pasteur pipette

3.สารเคมี

- สารละลาย colcemide 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Seromed)
- 0.075 M KCl
- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9%
- Phosphate buffer pH = 7.0
- สี Giemsa (MERCK)
- Weise buffer pH 7.0
- เมธานอล
- เอธานอล
- Glacial acetic acid
- สารละลาย RPMI 1640 (Seromed)
- สารละลาย colchicine 0.01% (Fluka)
- สารละลาย trypsin 0.025%
- สารละลาย HAM F10 (Sigma)
- fetal calf serum (Seromed)
- Streptomycin
- Ampicilin
- Kanamycin
- โซเดียมไบคาร์บอเนต

4.อุปกรณ์ที่เกี่ยวกับการถ่ายภาพ

- กล้องถ่ายรูปชนิดเลนส์เดี่ยวพร้อมเลนซ์ซูม
- กล้องถ่ายรูปชนิดติดกับกล้องจุลทรรศน์
- ฟิล์มสไลด์ ISO 100
- ฟิล์ม negative 100
- เครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม IKAROS 3 Karyotyping ของ Carl Zeiss

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การดำเนินการทดลองแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

ก. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างหอยทากบกในบริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาอ่างฤาไนและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2537- กรกฎาคม 2539 โดยทำการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ในฤดูฝนทั้งเวลากลางวันและกลางคืน บริเวณบนต้นไม้ ตามพื้นดิน ใต้ใบไม้ เปลือกไม้ ตามซอกหิน ตามโพรงดิน โดยจะเก็บหอยทากบกที่พบชนิดละประมาณ 20 ตัว

ข. ขั้นตอนการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์(Identification)

นำหอยทากบกที่เก็บได้มาตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์โดยใช้เอกสารต่อไปนี้ คือ

- Solem (1966)
- Abbott (1989)
- Panha (1996)
- Panha and Thanamitramanee (1997)

นอกจากนั้นหอยทากบกบางสปีชีส์จำแนกโดยรองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญหา เนื่องจากยังไม่มีเอกสารการตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยทากบกในประเทศไทยฉบับใดที่สมบูรณ์

ค. ขั้นตอนการศึกษาโครโมโซม

การศึกษาโครโมโซมในครั้งนี้ศึกษาจากเนื้อเยื่อ ovotestis และ เนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle) โดยผ่านกระบวนการเลี้ยงเซลล์ก่อนเพื่อให้เซลล์มีโอกาสอยู่ในสารละลาย colchicine นานขึ้น ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mevatee(1975), Raghunathan(1976) และ Park(1994) ดังนี้

-วิธีการเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ สารละลาย RPMI 1640 จำนวน 80 มิลลิลิตร ผสมกับ Fetal calf serum 20 มิลลิลิตร และน้ำยาที่ใช้ล้างเซลล์คือสารละลาย HAM F10 ซึ่งส่วน

ประกอบของน้ำยาเลี้ยงเซลล์และน้ำยาล้างเซลล์นี้ต้องเตรียมโดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อ (aseptic technique) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

สารละลาย RPMI 1640 เตรียมโดยละลายผงสำเร็จรูป RPMI 1640 น้ำหนัก 10.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) 2 กรัม เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) 0.03 กรัม และ สเตร็บโตมัยซิน (Streptomycin) 0.1 กรัม กรองน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมได้ด้วย Sterile filter ขนาด 0.22 ไมครอน แยกบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อ ขวดละ 80 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมกานามัยซินลงไป 0.1 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

Fetal calf serum แยกจากขวดใหญ่มาบรรจุใส่ขวดเล็กที่ปราศจากเชื้อ ขวดละ 20 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

สารละลาย HAM F10 เตรียมโดยละลายผงสำเร็จรูป HAM F10 น้ำหนัก 9.8 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate) 2 กรัม เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicilin) 0.03 กรัม และสเตร็บโตมัยซิน (Streptomycin) 0.1 กรัม กรองสารละลาย HAM F10 ที่เตรียมได้ด้วย Sterile filter ขนาด 0.22 ไมครอน แยกบรรจุในขวดที่ปราศจากเชื้อขวดละ 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมกานามัยซินลงไป 0.2 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

กานามัยซิน (Kanamycin) ละลายผงกานามัยซิน 1 ขวด ขนาดบรรจุ 1 กรัม ด้วยสารละลาย RPMI 1640 จำนวน 10 มิลลิลิตร เป็น stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0C แล้วเตรียมเป็น working solution โดยใช้ stock solution 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย RPMI 1640 จำนวน 9 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^0C

-วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการเตรียมโครโมโซม

สารละลาย colchicine 0.01% เตรียมได้โดยชั่ง colchicine ผงน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4^0C

สารละลาย colcemide 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้จาก stock solution

สารละลาย trypsin 0.025% เตรียมได้โดย เตรียมเป็น stock โดยชั่ง trypsin 3 กรัม ละลายในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% ปริมาณ 120 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 2.5% และทำการเจือจาง 2.5% trypsin ให้เป็น 0.025% trypsin ด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9% โดยใช้สูตร $m_1v_1 = m_2v_2$

เมื่อ m_1 = ความเข้มข้นของ stock นั่นคือ 2.5% trypsin

v_1 = ปริมาตรของ stock 2.5% trypsin (มิลลิลิตร)

m_2 = ความเข้มข้นที่ต้องการ นั่นคือ 0.025% trypsin

v_2 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ที่ใช้ในการเจือจาง (มิลลิลิตร)

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% เตรียมได้โดย ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย Phosphate buffer pH 7.0 เตรียมได้โดยละลายสารเคมีดังต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4 (anhydrous)	0.92	กรัม
KH_2PO_4 (anhydrous)	0.2	กรัม

สารละลาย Hypotonic solution 0.075 M KCl เตรียมได้โดยละลายผง KCl 5.62 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย Carnoy's fixative เตรียมได้โดยผสม absolute methanol กับ glacial acetic acid ด้วยอัตราส่วน 3:1 และอัตราส่วน 2:1 เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

-การเตรียมสารละลายที่ใช้ย้อมโครโมโซม

สารละลาย Weise buffer pH 7.0 เตรียมได้โดยละลายสารเคมีต่อไปนี้ ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

KH_2PO_4	0.49	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	1.14	กรัม

Giemsa 10% เตรียมได้โดยใช้สี Giemsa stock solution 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Weise buffer pH 7.0 จำนวน 45 มิลลิลิตร ใน coplin jar

-การเลี้ยงเซลล์

ทำการกระเทาะเปลือกหอย หลังจากนั้นตัดเนื้อเยื่อ ovotestis และเนื้อเยื่อแมนเทิล มาล้างด้วยสารละลาย HAM F10 และใช้กรรไกรตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี medium เป็น RPMI 1640 และ 20% fetal calf serum และ antibiotics หลังจากนั้นนำไปใส่ตู้ที่ปรับอุณหภูมิ 30°C

การเตรียมโครโมโซม

เติม 0.5-1.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย colchicine 0.01% หรือ 80-300 ไมโครลิตรของสารละลาย colcemide (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ในชั่วโมงที่ 10 และนำไปเข้าตู้ที่ปรับอุณหภูมิ 30°C เช่นเดิม หลังจากนั้น 45 นาทีถึง 15 ชั่วโมง ดูดเอา medium ที่ เลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ใส่สารละลาย trypsin 0.025% ลงไปให้ท่วมเซลล์ ทิ้งไว้ 1 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลาย trypsin ออก นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปเข้าตู้อบที่ปรับอุณหภูมิ 37 °C อีก 10 นาที ช่วงนี้เซลล์จะเริ่มแยกกันและหลุด จากพื้น ขวด หลังจากนำขวดเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้อบ เติมสารละลาย HAM F10 ประมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ออกจากขวดให้หมดและนำไปใส่หลอดแก้วที่เตรียมไว้แล้วนำไปผ่านขั้นตอนดังนี้

1. นำไปปั่นที่ประมาณ 1000 รอบ/นาที นาน 8-10 นาที แล้วดูดเอาส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป เหลือส่วนล่างทิ้งไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร (การปั่นในขั้นตอนต่อ ๆ ไปทำเหมือนข้อ 1)

2. เติม 0.025% ของสารละลาย trypsin 1 มิลลิลิตร และสารละลาย phosphate buffer 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนของตะกอน นำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที

3. นำออกจากตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C มาปั่น แล้วดูดเอาส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลาย phosphate buffer 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เหลือ นำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

5. เติม 0.075 M KCl (เป็น hypotonic solution) 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เหลือ นำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ 1.5 มิลลิลิตร

6. ทำซ้ำข้อ 5

7. เติม 0.075 M KCl 4 มิลลิลิตร อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนตะกอน นำไปเข้าตู้อบที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลาตั้งแต่ 45 นาที ถึง 3 ชั่วโมง 50 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือส่วนล่างที่เป็นตะกอนไว้ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร

8. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 3:1(methanol 3 ส่วน : acetic acid 1 ส่วน) ซึ่งเตรียมใหม่และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C ประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เป็นตะกอน นำไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป เหลือส่วนที่เป็นตะกอนไว้ 1.5 มิลลิลิตร

9. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 2:1(methanol 2 ส่วน : acetic acid 1 ส่วน) ซึ่งเตรียมใหม่และเก็บไว้ในตู้เย็นที่ -20°C ประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนที่เป็นตะกอน นำไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที

10. นำออกจากตู้เย็นไปปั่น แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือไว้ 1.5 มิลลิลิตร

11. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 3:1 อีกประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีกับส่วนของตะกอน นำไปปั่นแล้วดูดเอาส่วนใสทิ้ง

12. เติมสารละลาย Carnoy's fixative 3:1 3-5 หยด หรือมากกว่า ผสมให้เข้ากันดี และนำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์เพื่อตรวจหาโครโมโซมต่อไป

<u>-ขั้นตอนการทำสไลด์เพื่อตรวจหาโครโมโซม</u>

หยดเซลล์ซึ่งอยู่ในสารละลาย Carnoy's fixative ลงบนแผ่นสไลด์ซึ่งสะอาดและแห้ง 1 หยด แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือเอาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60-65°C หรืออาจจะหยดสารละลาย Carnoy's fixative 3:1 หรือ 2:1 ลงบนแผ่นสไลด์เพิ่มอีก 1-2 หยด หรือมากกว่าก็ได้ แล้วจึงนำเข้าตู้อบ เราจะได้โครโมโซมซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในระยะเมตาเฟสกระจายอยู่เป็นกลุ่ม ๆ บนแผ่นสไลด์ และนำแผ่นสไลด์ไปย้อมด้วยสี Giemsa ในสารละลาย weise buffer (pH=7.0) นาน 45 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปตรวจหาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทำการถ่ายภาพเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์โครโมโซมต่อไป

<u>-การจัดคาริโอไทป์ของหอยทากบก</u>

ทำการจัดคาริโอไทป์โดยดัดแปลงจากวิธีการ Nakamura (1986) โดยคัดเลือกฟิล์มที่มีเมตาเฟส โครโมโซมที่กระจายดีที่สุดในแต่ละสปีชีส์มาสปีชีส์ละ 15-20 เซลล์ มาจัดคาริโอไทป์โดยอัดเป็นภาพขยายขนาด 1980 เท่า และนำภาพเมตาเฟสโครโมโซมที่ได้มาถ่ายรูปอีกครั้งด้วย

ฟิล์มสไลด์ นำฟิล์มสไลด์ที่ได้ไปฉายบนจอภาพ วัดความยาวของแขนสั้น (Length of short arm, LS) และความยาวของแขนยาว (Length of long arm, LL) โดยวัดจากตำแหน่ง centromere ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้าง แล้วจัดคู่โดยอาศัยลักษณะที่คล้ายกันมากที่สุด ประกอบกับค่า A.R. (Arm ratio) และความยาวเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด เรียงลำดับตามความยาว และแบ่งชนิดของโครโมโซม โดยใช้ค่า Arm ratio (A.R.) ประกอบในการพิจารณาโดย

A.R. = LL/LS ดังต่อไปนี้

1.โครโมโซมชนิด metacentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่กลางแท่งพอดี ทำให้แขนยาวและแขนสั้นมีขนาดเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมาก

โครโมโซม ชนิดนี้ A.R. มีค่าระหว่าง 1.00-1.69

2.โครโมโซมชนิด submetacentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่ค่อนไปทางปลายแต่ยังใกล้จุดกึ่งกลางอยู่ทำให้แขนยาวมีความยาวมากกว่าแขนสั้นอย่างเห็นได้ชัด

โครโมโซมชนิดนี้ A.R. มีค่าระหว่าง 1.70-2.99

3.โครโมโซมชนิด subtelocentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่ค่อนไปทางปลายแท่งทำให้แขนสั้นมีขนาดสั้นมาก

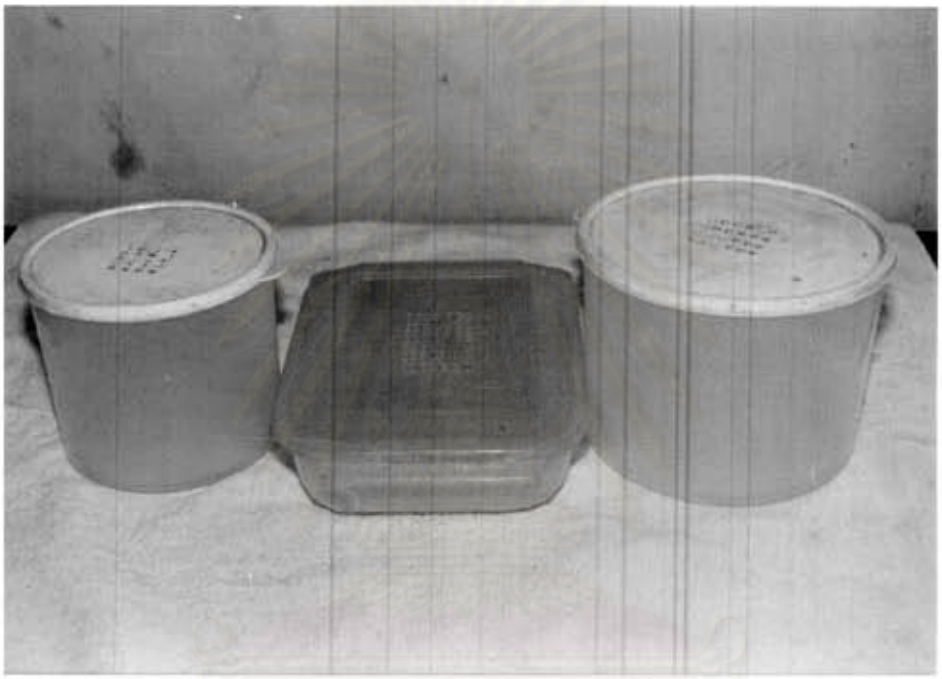
โครโมโซมชนิดนี้ A.R. มีค่าระหว่าง 3.00-6.99

4.โครโมโซมชนิด telocentric คือโครโมโซมที่มีตำแหน่ง centromere อยู่ปลายแท่งพอดี

โครโมโซมชนิดนี้ A.R. มีค่ามากกว่า 7.00

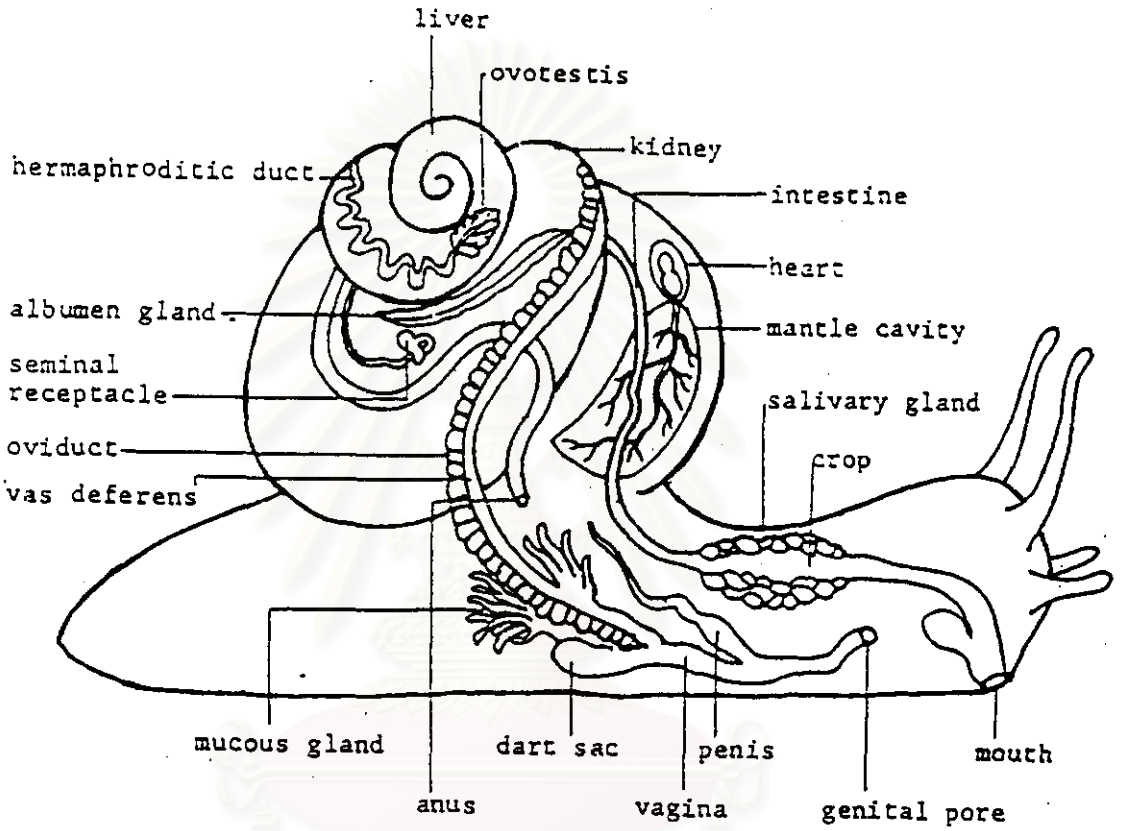
ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานคำนวนโดยใช้สูตร $S.D. = \sqrt{\sum(X_i-X)^2/N}$ (กัลยา วานิชย์บัญชา, 2539)

นอกจากนั้นเมตาเฟสโครโมโซมของหอยทากบกบางชนิดไม่สามารถจัดคาริโอไทป์ได้เนื่องจากไม่สามารถเห็นตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ จากการสรุปของ Inaba (1969) พบว่าโครโมโซมของหอยทากในอันดับ Stylommatophora ที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อ ovotestis มักจะได้โครโมโซมที่มีลักษณะเป็นแท่ง ซึ่งไม่สามารถเห็นตำแหน่งเซนโทรเมียร์ได้ชัดเจนจึงสรุปว่าเป็นลักษณะโครโมโซมของสัตว์ในกลุ่มนี้ การศึกษาครั้งนี้จึงจัดแบ่งขนาดของโครโมโซมเป็น 2 พวก คือ โครโมโซมขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ตามวิธีของ Ullerich (1966) ที่ศึกษาในโครโมโซมของสัตว์ในกลุ่มสะเทินน้ำสะเทินบก โดยที่โครโมโซมขนาดใหญ่มีขนาดความยาวเกินครึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุด ส่วนที่เหลือจัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก



ภาพที่ 2 กล่องเลี้ยงหอยทากบกขนาดต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 แสดงอวัยวะภายในของหอยทากบก

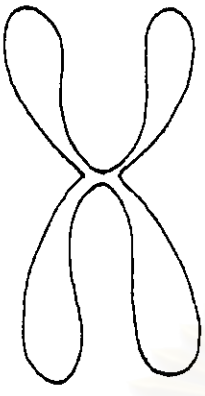
(จาก Hegner, 1961)

ภาพที่ 4 แสดงการเลี้ยงเซลล์ใน laminar flow hood

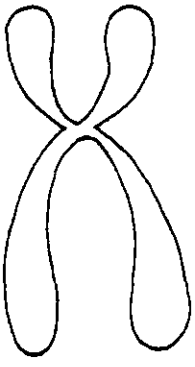
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 5 แสดงขวดสำหรับใช้เลี้ยงเซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

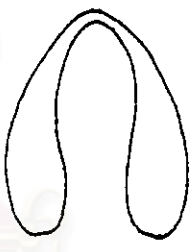


เมตาเซนตริกโครโมโซม
(metacentric chromosome)



ซับเมตาเซนตริกโครโมโซม
(submetacentric chromosome)

ซับเทโลเซนตริกโครโมโซม
(subtelocentric chromosome)



เทโลเซนตริกโครโมโซม
(telocentric chromosome)

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของโครโมโซมชนิดต่าง ๆ ซึ่งกำหนดโดย ตำแหน่งเซนโตรเมียร์ (Nakamura, 1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย