บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยออทิสติคเพศชาย ปริมาตรคนละ 3 มิลลิลิตร จำนวน 86 ราย จากโรงพยาบาลยุวประสาทไวทโยปถัมภ์ จังหวัดสมุทรปราการ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด

   2.1 กระดาษติดชื่อตัวอย่างเลือด
   2.2 เข็มเจาะเลือดเบอร์ 21 ที่ปราศจากเชื้อ
   2.3 ไซริงค์ปราศจากเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร
   2.4 ดินสอสำหรับเขียนชื่อตัวอย่างเลือด
   2.5 สายยางรัดต้นแขน (touniquae)
   2.6 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin)
   2.7 สำลี
   2.8 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

   3.1 กระบอกตวง
   3.2 ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร
   3.3 ขวดพลาสติกสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พร้อมฝาปิด
   3.4 ขวดรูปกรวย (conical flask)
   3.5 โถแก้วสำหรับใส่น้ำยาทำความสะอาด
   3.6 โถแก้วสำหรับใส่สีย้อมโครโมโซม (coplin jar)
   3.7 แท่งแก้วสำหรับคนสาร
   3.8 บีกเกอร์ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
   3.9 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
   3.10 ปาสเตอร์ปิเปต (pasteur pipette)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11 สไลด์ชนิดที่มีปลายข้างหนึ่งหยาบ

3.12 หลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด 10 มิลลิลิตร

3.13 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก

4. เครื่องมือ

4.1 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

4.2 เครื่องชั่ง

4.3 เครื่องชั่งแบบละเอียด

4.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

4.5 เครื่องผสมชนิดกดปั่น (vortex mixer)

4.6 มาตรความเป็นกรด-เบส (pH meter)

4.7 เครื่องอัดขยายรูปขาวดำ

4.8 ตะเกียงบุนเสน

4.9 ตู้ควบคุมอุณหภูมิพร้อม CO_2 5 เปอร์เซ็นต์

4.10 ตู้แช่แข็ง

4.11 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)

4.12 ตู้เย็น

4.13 ตู้อบแห้ง

4.14 ฟิลเตอร์สีเขียว

4.15 หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (autoclave)

4.16 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการกรอง

4.17 pipetting aid

4.18 vacuum pump

4.19 warm plate

5. สารเคมี

5.1 น้ำกลั่น

5.2 น้ำยาฆ่าเชื้อ hibiscrub

5.3 น้ำยาฆ่าเชื้อ savlon

5.4 น้ำยาสำหรับทำความสะอาด 7X

5.5 สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (phytohaemagglutinin-P)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.6 สีย้อม Giemsa เข้มข้น

5.7 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดผง

5.8 absolute ethanol

5.9 absolute methanol

5.10 colchicine

5.11 di-sodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)

5.12 fetal calf serum

5.13 5-fluoro-2′-deoxyuridine (FUdR)

5.14 glacial acetic acid (CH_3COOH)

5.15 glycerol

5.16 Hanks' balanced salt solution (HBSS)

5.17 methotrexate (MTX)

5.18 1 N HCl

5.19 1 N NaOH

5.20 normal saline (0.9% NaCl)

5.21 potassium chloride (KCl)

5.22 potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)

5.23 potassium dihydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)

5.24 sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

5.25 sodium penicillin

5.26 streptomycin

5.27 sulfuric acid เข้มข้น (H_2SO_4 conc.)

5.28 trypsin -

5.29 xylene

6. วัสดุที่ใช้ในการถ่ายและอัดขยายภาพ

6.1 กระดาษอัดรูปขาวดำ เบอร์ 4 ขนาด 5 X 7 นิ้ว

6.2 ฟิล์มขาวดำ (Kodak Technical Pan 2415 film)

6.3 D-19 developer (Kodak)

6.4 dektol developer (Kodak)

6.5 fixer (Kodak)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. เครื่องใช้เบ็ดเตล็ด

7.1 กรรไกร
7.2 กระดาษเช็ดเลนส์
7.3 กระดาษชำระ
7.4 กล่องเก็บสไลด์
7.5 น้ำยาทำความสะอาดเลนส์
7.6 ผ้ากอส
7.7 aluminium foil
7.8 oil immersion
7.9 parafilm

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยออทิสติคเพศชาย จำนวน 86 ราย จากโรงพยาบาลยุวประสาทไวทโยปถัมภ์ ปริมาตรคนละ 3 มิลลิลิตร โดยวิธีปลอดเชื้อและเก็บในไซริงค์ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (heparin) เคลือบอยู่ เขย่าให้ heparin และเลือดผสมกัน

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยวิธีปลอดเชื้อ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Glover (1981) Mattei และคณะ (1981b) Sutherland (1979a) Tommerup และคณะ (1981a) และ Watt และ Stephen (1986) โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ M 199 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งมี fetal calf serum 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมอยู่, penicillin-streptomycin 0.3 มิลลิลิตร, เลือด 0.8 มิลลิลิตร และ phytohaemagglutinin-P 0.15 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ปิดฝาขวดแล้วเขย่าให้สารภายในขวดผสมเข้ากันดี คลายฝาเกลียวพอให้อากาศผ่านเข้าไปได้ นำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง เติมสารละลาย FUdR และ methotrexate ลงไปในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จนมีความเข้มข้น 0.030-0.035 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6.5-7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ก่อนการ harvest 18-20 ชั่วโมง

I16191096

3. การเตรียมสไลด์เพื่อใช้ในการทดลอง

ทำความสะอาดสไลด์โดยการแช่ในน้ำยา dichromate cleaning solution ให้ทั่วทั้งแผ่น เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาเช็ดให้สะอาดด้วยผ้ากอส และนำไปแช่ในน้ำประปา ล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา 3-4 ครั้ง แล้วจึงนำมาแช่ในน้ำกลั่น และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Watt and Stephen, 1986)

4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จนครบ 72 ชั่วโมงแล้ว นำมาเติมสารละลาย colchicine ที่มีความเข้มข้น 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล เป็นการหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะเมตาเฟส เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.2 เทของเหลวทั้งหมดจากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดพลาสติกก้นแหลม นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ของเหลวในหลอดจะแยกชั้นเป็นส่วนเซลล์ซึ่งอยู่ที่ส่วนล่างของหลอด และส่วนน้ำยาซึ่งอยู่ชั้นบน เทส่วนน้ำยาทิ้งไป

4.3 เติมสารละลาย 0.075 M KCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเพื่อให้เซลล์บวมตัว ผสมให้เข้ากัน เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำยาซึ่งอยู่ชั้นบนทิ้งไป

4.4 ค่อย ๆ หยด Carnoy's fixative ที่เตรียมใหม่และเย็น ลงไปในหลอดทีละหยด ในขณะที่หลอดอยู่บนเครื่องผสมชนิดกดปั่น จนครบ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำยาซึ่งอยู่ชั้นบนทิ้งไป ทำเช่นนี้ 3-4 ครั้ง

4.5 เติม fixative ลงไปในหลอด ให้มีปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร เพื่อผสมกับกลุ่มเซลล์เป็น cell suspension

4.6 ใช้ปาสเตอร์ปิเปตหยด cell suspension ลงบนสไลด์แช่เย็นที่สะอาด สไลด์ละ 4-5 หยด ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5. การย้อมสีโครโมโซม

5.1 วิธี conventional staining (ดัดแปลงจากวิธีของ Benn and

Perle, 1986)

5.1.1 เตรียมสี Giemsa 20 เปอร์เซ็นต์

5.1.2 ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง

5.1.3 ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.2 วิธี G-banding (ดัดแปลงจากวิธีของ Seabright, 1971)

5.2.1 หยดทริปซินลงบนสไลด์ที่ย้อมสีแบบ conventional ซึ่งล้างสีออกแล้วให้ทั่วทั้งแผ่น เป็นเวลา 20-45 วินาที เพื่อชักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซม จากนั้นนำมาล้างใน phosphate buffer

5.2.2 ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง

5.2.3 ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

6. การตรวจสอบโครโมโซม

ทำการตรวจสอบโครโมโซมที่ย้อมสีด้วยวิธี conventional staining และ G-banding โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา ที่กำลังขยาย 15 X 10 และ 15 X 100 เท่า เลือกตรวจสอบเซลล์ในระยะเมตาเฟส ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดี จำนวน 50 เซลล์ ต่อ 1 ราย เลือกถ่ายรูปเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมไว้ 1-2 รูป ต่อ 1 ราย จากนั้นนำฟิล์มมาอัดขยายลงบนกระดาษอัดรูปขาวดำ เบอร์ 4 ขนาด 5 X 7 นิ้ว โดยใช้กำลังขยาย 1,750-2,800 เท่า แล้วทำการตัดภาพถ่ายโครโมโซม และจัดเรียงตามขนาดและรูปร่างของโครโมโซมเปรียบเทียบกับ An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1978) และ Standardization in Human Cytogenetics (Paris Conference, 1975)