บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

(Materials and Methods)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. อ่างแก้ว สำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลองขนาดยาว 12" กว้าง 8" สูง 9"
2. ผักกาดขาวต้ม ใช้สำหรับเลี้ยงลูกอ๊อด
3. colchicine solution 0.005 %
4. ไข่ของกบชนิด Rana limnocharis limnocharis Gravenhorst ไข่ของอึ่งอ่างชนิด Microhyla ornata Duméril and Bibron และไข่ของคางคกชนิด Bufo melanostictus Schneider

วิธีดำเนินการทดลอง

การเลี้ยงสัตว์ทดลอง

วิธีเลี้ยงสัตว์ทดลอง ดัดแปลงจากวิธีของ ศิริวรรณ โกมารทัต (2514) โดยนำไข่ที่ผสมแล้วของกบชนิด Rana limnocharis limnocharis Gravenhorst อึ่งอ่าง ชนิด Microhyla ornata Duméril and Bibron และคางคกชนิด Bufo melanostictus Schneider จากพ่อแม่คู่เดียวกันมาอย่างละ 300 ใบ ไข่ที่นำมาอยู่ในระยะ 1 เซลล์ทั้งหมด เพื่อศึกษาช่วงเวลาในการแบ่งตัวของ Zygote แต่ละครั้ง การสังเกตว่าไข่มาจากพ่อแม่คู่เดียวกัน สังเกตได้จากไข่ที่เก็บมานั้น จะต้องเป็นแพเดียวกัน และมีการเจริญอยู่ในระยะ 1 เซลล์เหมือนกันหมด ไข่กบ และไข่อึ่งอ่างลอยเป็นแพอยู่บนผิวน้ำ ไข่กบมีสีน้ำตาล ไข่อึ่งอ่างมีสีเทา ขนาดเล็กกว่าไข่กบ ส่วนไข่คางคกมีสีดำไม่เป็นแพ แต่เป็นสายพันอยู่กับกิ่งไม้ใบหญ้าที่ขึ้นอยู่ปริ่ม ๆ น้ำตามชอบสระ (แผ่นภาพที่ 1) เมื่อได้ไข่ที่ต้องการมาแล้ว ต้องเอาน้ำจากที่ ๆ มีไข่ชนิดนั้น ๆ มาด้วย เพื่อสภาพแวดล้อมของไข่จะได้ไม่ เปลี่ยนแปลงมากนัก การที่รู้ว่าไข่ที่นำมาเป็นไข่ของสัตว์ทดลองชนิดไหน ก็โดยการที่เลี้ยงไข่นั้นจนเจริญเติบโตเป็นตัวสำเร็จ คือหางหดหมด แล้วนำมาจำแนกว่าเป็นสัตว์ชนิดไหน (Taylor, 1962)

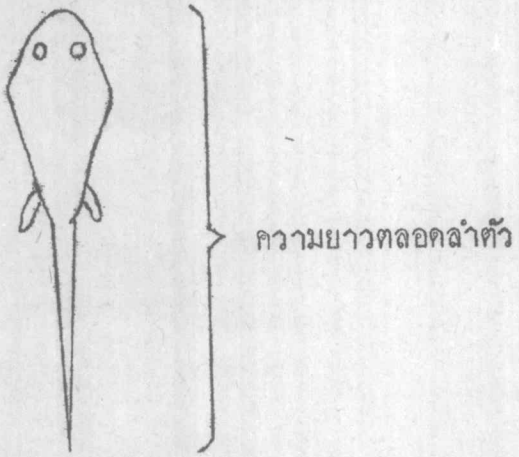
แบ่งไข่ของสัตว์ทดลองแต่ละชนิดใส่อ่างแก้ว 3 อ่าง ๆ ละ 100 ใบ ไข่ในอ่างแก้วที่ 1 และที่ 2 เลี้ยงไว้สำหรับศึกษาการเจริญเติบโต ไข่ในอ่างแก้วที่ 3 สำหรับศึกษา Karyotype ทั้งหมดนี้ทำซ้ำกัน 3 ครั้ง เมื่อนำไข่มาใส่อ่างแก้วครั้งแรกใช้น้ำจากแหล่งน้ำที่นำไข่มาประมาณ $\frac{1}{4}$ ของอ่างแก้ว แล้วเติมน้ำประปาให้เป็น $\frac{3}{4}$ ของอ่างแก้ว น้ำประปาที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองนี้ได้ใส่ไว้ในถังใหญ่ ซึ่งปั๊มอากาศผ่านตลอดเวลา ประมาณ 2 - 3 คืนมาแล้ว ทั้งนี้เพื่อไล่ก๊าซคลอรีนออก และเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนเพื่อให้เหมาะสำหรับนำมาเลี้ยงสัตว์ทดลอง สัตว์ทดลองทั้งหมดเลี้ยงไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 26 - 28 °C และมีแสงไฟจากหลอดไฟ Day light lamp ซึ่งอยู่เหนืออ่างทดลองประมาณ 2 เมตร วันละ 12 ชั่วโมง ในแต่ละอ่าง มีเครื่องปั๊มอากาศผ่านตลอดเวลา การให้อาหารกบ และคางคก ให้หลังจากที่เหงือกภายนอกของตัวอ่อนหลุดหมดแล้ว ตอนนี้ตัวอ่อนมีปากเจริญดีแล้ว เริ่มกินอาหารได้ ให้อาหารคือ ผักกาดขาวต้มวันละ 1 ครั้งเวลาประมาณ 8.00 น. ทุกวันหลังจากทำความสะอาดอ่างแล้ว

การเลี้ยงอึ่งอ่าง ใช้อ่างแก้วขนาดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงกบ และคางคก วิธีการให้อาหารต่างกับของกบ และคางคก อาหารที่ใช้เป็นพวกตะไคร่น้ำที่ได้จากน้ำที่ขัง ไว้ใน อ่างซีเมนต์ใหญ่ ซึ่งถูกแดดในตอนกลางวัน ในการล้างทำความสะอาดอ่างทดลองของสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิด ใช้สายยางดูดเอาเศษอาหารเก่าที่เหลือและของเสียที่สัตว์ทดลองถ่ายออกมาจนน้ำในอ่างทดลองลดลงประมาณ $\frac{1}{3}$ แล้วจึงเติมน้ำที่ใช้เลี้ยงใหม่ลงไป ให้น้ำในอ่างมีปริมาตรเท่าเดิม นอกจากการเปลี่ยนน้ำตามปกติทุกวันแล้ว ทุก ๆ 3 วัน ยังต้องใช้ผ้าเช็ดถูอ่างทดลองด้านในทุกด้าน รวมทั้งก้นอ่างด้วย เพราะมักมีสิ่งสกปรกเกาะติดอยู่ เมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองจนกระทั่งสัตว์ทดลองเจริญเติบโตเป็นตัวสำเร็จ ก็นำสัตว์ทดลองมาดอง ใน alcohol 70 % แล้วจึงนำมาจำแนกว่าเป็นสัตว์ชนิดไหน

<u>การศึกษาการเจริญเติบโต</u>

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของกบ, อึ่งอ่าง และคางคก เริ่มศึกษาตั้งแต่ Zygote อยู่ในระยะ 1 เซลล์ โดยศึกษาจากไข่ของสัตว์ทดลองในอ่างที่ 1 และอ่างที่ 2 ซึ่งมีไข่อ่างละ 100 ใบ จับเวลาดูทุก ๆ ระยะของการแบ่งเซลล์ว่า กินเวลา

เท่าใด จากระยะ 1 เซลล์ ⟶ Cleavage ⟶ Morula ⟶ Blastula ⟶ Gastrula ⟶ Neurula ⟶ Tail bud stage ⟶ Hatching การแบ่งออกเป็นระยะต่าง ๆ นี้ดูเทียบจาก Shumway (1940) ซึ่งศึกษาในกบชนิด Rana pipiens ถ่ายรูปทุก ๆ ระยะเอาไว้ โดยวาง scale เป็นเซนติเมตรไว้ด้วย เพื่อดูขนาดของไข่ทุก ๆ ระยะ ภายหลังจากที่ตัวอ่อนฟักออกมาแล้ว และมีอายุได้ประมาณ 3 วัน นับตั้งแต่เวลาที่เก็บไข่มา จึงเริ่มนำสัตว์ทดลองมาวัดขนาดความยาว โดยสุ่มตัวอย่างซ้อนสัตว์ทดลองจากอ่างที่ 1 และ ที่ 2 มาอ่างละ 25 ตัว นำมาวัดขนาดความยาว โดยวัดความยาวตลอดลำตัว (Total length) ดังแสดงในภาพข้างล่างนี้



การวัด วัดจากปลายด้านหน้าสุด ไปจนถึงปลายของหาง เวลาวัดขนาดความยาว ของสัตว์ทดลองได้เอาสัตว์ทดลองใส่ใน Petri dish ใส่น้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองลงไปเล็กน้อย เพื่อไม่ให้สัตว์ทดลองแห้ง แล้วเอา petri dish วางบนกระดาษกราฟ ดูด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิด Stereozoom ของ Bausch and lomb ที่ขยายได้ถึง 30 เท่า แล้ววัดขนาดความยาวของสัตว์ทดลองจากกระดาษกราฟตามที่เห็นในกล้อง เมื่อวัดได้ครบ 25 ตัวแล้ว นำค่าความยาว ทั้งหมดมาหาค่าความยาวเฉลี่ย ส่วนสัตว์ทดลองที่เอามาวัดความยาว นั้นได้นำกลับคืนอ่างเดิม เพื่อเลี้ยงต่อไป การวัดขนาดความยาวของสัตว์ทดลองนี้ ได้ทำต่อไปอีก โดยวัดทุก ๆ 3 วัน จนกระทั่งสัตว์ทดลองเจริญเติบโตเป็นตัวสำเร็จ คือ หางหดหมด ศึกษาการเจริญเติบโตด้วยวิธีเดียวกันนี้ทั้ง 3 ครั้งที่ไปเก็บไข่ของสัตว์ทดลอง แต่ละชนิดมา ในระหว่างที่สัตว์ทดลองฟักตัวเป็นตัวอ่อน จนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นตัวสำเร็จได้ ตั้งเกตระยะต่าง ๆ ในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะภายนอกของสัตว์ทดลองด้วย D'Angelo

(1941) แบ่งระยะการเจริญเติบโตในสัตว์พวก Amphibian ออกเป็นขั้นต่าง ๆ ดังนี้

ระยะขาหลัง	เรียกว่า	Premetamorphosis
ระยะขาหน้าถึงระยะหางหดสั้น	เรียกว่า	Metamorphosis climax
ระยะตัวสำเร็จ	เรียกว่า	Post - metamorphosis

การศึกษา Karyotype

ในการศึกษา Karyotype ของสัตว์ทดลอง ศึกษาจากการแบ่ง nucleusของเซลล์ที่ปลายหางที่อยู่ในระยะ metaphase โดยทำการทดลองเป็นขั้น ๆ ไป คือ

1. การใช้สาร colchicine

นำสัตว์ทดลองแต่ละชนิดในอ่างที่ 3 ซึ่งมีอยู่ 100 ตัวมาศึกษา Karyotype โดยช้อนเอาสัตว์ทดลองในระยะที่หางกำลังเจริญดี (ระยะ Pre metamorphosis) มาประมาณ 20 ตัว อายุประมาณ 5 - 12 วัน นับจากระยะไข่ 1 เซลล์ มาทำสไลด์ ใช้วิธี squash method ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Becak, Denaro and Becak (1970) และ Nishioka (1972) ใช้ส่วนปลายหางของสัตว์ทดลองแต่ละตัวมาทำสไลด์ 1 แผ่น ก่อนนำสัตว์ทดลองมาทำสไลด์ แช่สัตว์ทดลองที่ยังมีชีวิตอยู่ใน 0.005 % colchicine solution ที่อุณหภูมิห้อง (26 - 28 °C.) เป็นเวลา 15 - 18 ชั่วโมง colchicine เป็นสารที่ไปห้ามการเกิด spindle fiber ในขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัว ทำให้เซลล์หยุดอยู่ใน ระยะ metaphase ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะในการศึกษา chromosome

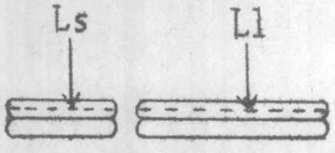
2. วิธีการทาง cytology

หลังจากแช่สัตว์ทดลองใน colchicine แล้ว นำสัตว์ทดลองมาตัดปลายหางออกแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 60 - 90 นาที และแช่ใน 50 % acetic acid อีก 15 นาที แล้วนำปลายหางทั้งหมดมาย้อมสีโดยแช่ใน 1 % orcein ซึ่งละลายใน 45 % acetic acid เป็นเวลา 30 - 60 นาที แล้วใช้เข็มเขี่ยปลายหางทีละอันวางบนแผ่นสไลด์ หยดสี acetic orcein ลงไป 1 - 2 หยด ลนไฟพอร้อน เอา cover glass ปิดลงไป บี้ด้วยยางลบเบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายดี ใช้กระดาษซับวางทับบนแผ่นสไลด์ ใช้นิ้วหัวแม่มือ

บี้อีกที สีส่วนที่เกินออกมาจาก cover glass จะถูกซับออกหมด ใช้ยาทาเล็บทาปิดให้ทั่วขอบของ cover glass เพื่อป้องกันไม่ให้สไลด์แห้งเร็วนำสไลด์ที่ได้ไปศึกษา chromosome โดยใช้กล้องจุลทัศน์ ซึ่งติดเข้ากับกล้องถ่ายรูป (Olympus P. M. 6) นับจำนวน chromosome ของสัตว์ทดลองแต่ละชนิด โดยนับประมาณ 70 เซลล์จากสัตว์ ทดลองประมาณ 20 ตัว แล้วถ่ายรูปเซลล์ที่มี chromosomeกระจายดี และ chromosome ไม่หดสั้นจนเกินไป โดยใช้ฟิล์ม Panatomic-x เลือกถ่ายรูป 25 เซลล์ ในสัตว์ทดลองแต่ละชนิด ในกบและคางคก ได้เซลล์จาก 6 สไลด์ (6 หาง) ส่วนเซลล์ของอึ่งอ่าง ได้มาจาก 9 สไลด์ รูปถ่ายที่ได้ขยายจากของจริงประมาณ 2160 เท่า สไลด์ที่ถ่ายรูปไว้แล้วนี้นำไปทำเป็น สไลด์ถาวรต่อไป โดยลอกเอายาทาเล็บออก แล้วแช่แผ่นสไลด์ในน้ำแข็งแห้งจนเย็นจัด (ประมาณ 30 นาที) ใช้ใบมีดปลายแหลม ค่อย ๆ แกะเอาแผ่น cover glassออก การแช่ ในน้ำแข็งแห้งจนเย็นจัด จะทำให้แผ่น cover glassหลุดออกได้ง่าย และมีเซลล์หลุด ติดไปกับแผ่น cover glassน้อยมาก ส่วนใหญ่จะยังติดอยู่ที่แผ่นสไลด์ ต่อจากนั้น นำทั้งแผ่นสไลด์และ cover glass ไป dehydrate โดยผ่านใน 95 % ethyl - alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 3 - 5 นาที ผ่านใน normal butyl alcoholอีก 3 - 5 นาที และแช่ใน Xylene อีก 5 - 10 นาที แล้ว mount ด้วย Canada balsam

3. การแบ่งหมวดหมู่ของ chromosome

ในการแบ่งหมวดหมู่ของ chromosome จำเป็นต้องวัดขนาดของ chromosome เสียก่อน และเพื่อให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด ควรวัดจากรูปขยายที่ใหญ่มาก ๆแล้วจึงนำฟิล์มที่ถ่ายรูป chromosome ไว้ไปขยายใหญ่ ในที่นี้ขยาย 5070 เท่าจากของจริง วิธีคิดกำลังขยายใช้เทียบกับฟิล์มที่ถ่าย objective micrometerไว้ วาดรูป chromosome ตามที่ขยายจากฟิล์ม แล้วนำมาวัดขนาดความยาวของ chromosomeทั้งหมด ความยาวของแต่ละ chromosome ที่วัดคือ ความยาวของ short arm (Ls) และความยาวของ long arm (Ll) โดยวัดจากตำแหน่ง crntromere ไปยังปลายทั้ง 2 ข้าง



Ll = ความยาวของ long arm

Ls = ความยาวของ short arm

ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อใช้วิธีการเตรียมสไลด์ดังที่กล่าวมาแล้ว พบว่า chromosome ส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 chromatid ฉะนั้น ในการวัดความยาวในแต่ละ chromosome จึงได้ค่า Ll, Ls 2 ค่า และนำมาหาค่าเฉลี่ย จากค่า Ll และ Ls นำมาคำนวณหาค่าความยาวของแต่ละ chromosome LT (ls + Ll), ส่วน Relative length $\left(\frac{\text{ความยาวของแต่ละ chromosome}}{\text{ความยาวของ chromosome ทั้งหมดภายใน 1 เซลล์}}\right)$ หาตามวิธีของ Nishioka (1972) และหาค่า centromeric index $\left(\frac{\text{ความยาวของ long arm}}{\text{ความยาวของ chromosome นั้น}}\right)$ หาตามวิธีของ Lejeune (1965)

ความยาวของแต่ละ chromosome = LT = Ls + Ll

Relative length = R.L. = $\varepsilon \frac{LT}{LT}$

Centromeric index = C.I. = $\frac{Ll}{LT}$

ค่าของ Relative length และ Centromeric index ใช้นำมาจัดคู่ chromosome ได้ เพราะ chromosome ที่เป็นคู่กัน (homologous chromosome) ย่อมมีค่า Relative length และ Centromeric index เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน นำ chromosome ทั้งหมดมาจัด idiogram โดยเรียงลำดับคู่จาก chromosome คู่ที่ยาวที่สุดไปหาคู่ที่สั้นที่สุดตามวิธีของ Hennen (1964), Sato (1965), Ullerich (1966) การจัด Karyotype ของกบ, อึ่งอ่าง และคางคก แสดงไว้ในแผ่นภาพที่ 35, 36 และ 37 ตามลำดับ chromosome ในสัตว์แต่ละชนิดแบ่งเป็น 2 พวก คือ พวกที่มีขนาดใหญ่และพวกที่มี

ขนาดเล็ก ตามวิธีของ Ullerich (1966) โดยถือว่า chromosome คู่ใดมีความยาวเกินครึ่งหนึ่งของ chromosome คู่ที่ยาวที่สุด จัดเป็น chromosome ที่มีขนาดใหญ่ แต่ถ้ามีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของ chromosome คู่ที่ยาวที่สุดจัดเป็น chromosome ที่มีขนาดเล็กนำค่า Relative length และค่า Centromeric index ของ chromosome แต่ละคู่ ทั้ง 25 เซลล์ มาคำนวณหาค่า Mean, Standard deviation, Standard error ของ Mean เพื่อเอาไป plot graph ตามวิธีของ Tymowska and Kobel (1972) graph ที่ได้จะบอกถึงความสัมพันธ์ของ chromosome แต่ละคู่ว่าต่างกันหรือเหมือนกันอย่างไร และเปรียบเทียบ chromosome ของสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิดได้จากค่า Centromeric index ของ chromosome แต่ละคู่ ได้นำมาจัดชนิด chromosome ดังนี้ คือ

ค่า Centromeric index ระหว่าง .50-.55 จัดเป็น Metacentric chromosome
ค่า ———"——— ระหว่าง .56-.62 จัดเป็น Submetacentric chromosome
ค่า ———"——— ระหว่าง .63-.87 จัดเป็น Acrocentric chromosome
ค่า ———"——— ระหว่าง .88-1.00 จัดเป็น Telocentric chromosome