

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างเลือดผู้ป่วยเรติโน بلاสมา และเด็กปกติ (control) คนละ 3 มล. จากแผนกตรวจผู้ป่วยนอก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด
 - 2.1 เข็มเจาะเลือดเบอร์ 21
 - 2.2 ไชริงค์ขนาด 5 มล.
 - 2.3 สายรัดต้นแขน
 - 2.4 สำลี และ 70% ethyl alcohol
 - 2.5 heparin
 - 2.6 ปากกาและกระดาษกาวไว้ติดชื่อผู้ป่วย
3. เครื่องแก้ว
 - 3.1 กระจกตวง
 - 3.2 ปิเปต ขนาด 0.1, 1, 5 และ 10 มล.
 - 3.3 พาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette)
 - 3.4 beaker ขนาด 500 และ 1000 มล.
 - 3.5 ขวดแก้วเลี้ยงเซลล์พร้อมฝาปิด
 - 3.6 ขวดแก้วปากกว้างสำหรับย้อมสไลด์ ขนาด 100 มล.
 - 3.7 volumetric flask
 - 3.8 หลอดทดลองกันแหลมสำหรับปั่นแยกตะกอนขนาด 15 มล.
 - 3.9 สไลด์

4. เครื่องมือ
 - 4.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด
 - 4.2 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter)
 - 4.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
 - 4.4 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)
 - 4.5 ตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อควบคุมอุณหภูมิได้พร้อม CO₂ 5%
 - 4.6 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) สำหรับถ่ายเซลล์
 - 4.7 ตะเกียงแก๊ส สำหรับขบวนการถ่ายเซลล์และอาหารอย่างปลอดเชื้อ
 - 4.8 เครื่องปั่นแยกตะกอน
 - 4.9 เครื่องคुकแยกสารละลาย
 - 4.10 ตู้เย็น
 - 4.11 เครื่องผสมชนิดกบปั่น (vortex mixer)
 - 4.12 กล้องจุลทรรศน์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
 - 4.13 เครื่องอัดขยายรูปขาวดำ
5. สารเคมี
 - 5.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ชนิดผง (seromed)
 - 5.2 สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ phytohemagglutinin M (seromed)
 - 5.3 penicillin-streptomycin
 - 5.4 fetal calf serum (seromed)
 - 5.5 colchicine
 - 5.6 ethidium bromide
 - 5.7 glacial acetic acid (CH₃ COOH)
 - 5.8 absolute methanol
 - 5.9 potassium chloride (KCl) 0.075 M
 - 5.10 sodium chloride (NaCl) 9%
 - 5.11 hydrochloric acid (HCl) 1 N
 - 5.12 sodium hydroxide (NaOH)
 - 5.13 sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃)

- 5.14 potassium dichromate ($K_2 Cr_2 O_7$)
- 5.15 di-sodium hydrogen orthophosphate ($Na_2 HPO_4$)
- 5.16 potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)
- 5.17 trypsin
- 5.18 สีย้อม Giemsa 10%
- 5.19 น้ำกลั่น
- 5.20 7X น้ำยาแช่เครื่องแก้ว
- 5.21 glycerol
- 6. วัสดุในการถ่ายภาพ
 - 6.1 फिल्मขาวดำ ขนาด 36 รูป (Kodak technical pan film)
 - 6.2 กระจกอัดรูป ขนาด 5" x 7"
- 7. เครื่องใช้เปิดเตล็ด
 - 7.1 aluminium foil
 - 7.2 กล่องเก็บสไลด์
 - 7.3 กระจกเปิดเลนส์
 - 7.4 immersion oil
 - 7.5 parafilm
 - 7.6 ผ้าก๊อซ

วิธีการดำเนินการทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการตรวจรักษาในหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ตั้งแต่ช่วงเดือน เมษายน 2533 - มีนาคม 2534 รวมระยะเวลา 1 ปี รวม 40 ราย เปรียบเทียบกับเด็กปกติที่ช่วงอายุเดียวกันจำนวน 30 ราย จัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. ผู้ป่วยเรตินอบลาสโตมา จำนวน 40 ราย อายุเฉลี่ย 3 ปี
2. เด็กปกติ จำนวน 30 ราย อายุเฉลี่ย 2 ปี 5 เดือน

วิธีการทดลอง

1. สอบประวัติครอบครัวเพื่อนำมาทำพงศาวลี (pedigree)
 - 1.1 ค้นประวัติผู้ป่วยจากแฟ้มทะเบียนประวัติผู้ป่วยหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ จากแผนกเวชระเบียน
 - 1.2 รวบรวมข้อมูลประวัติผู้ป่วย และครอบครัว
 - 1.3 สรุปรายชื่อผู้ป่วย

2. ศึกษาโครโมโซมของผู้ป่วย และเด็กปกติ
 - 2.1 เก็บตัวอย่างเลือด
 - 2.1.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากเด็กที่ป่วยเป็นโรคเรติโน بلاสโตมา ที่เข้ารับการตรวจโรคที่หน่วยตรวจโรคผู้ป่วยนอก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาล รามาธิบดี โดยใช้วิธีรีดที่ปราศจากเชื้อ และเคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัว (heparin) เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่แขนผู้ป่วย รายละเอียด 3-5 มล. จำนวน 40 คน
 - 2.1.2 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 ในกลุ่มเด็กปกติ 30 คน
 - 2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Yunis ปี 1977)

เมื่อได้ตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยและเด็กปกติแล้ว นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์โดยวิธีปลอดเชื้อในอาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI 1640) 5 มล. ผสมกับเลือดผู้ป่วยรายละเอียด 10 หยดสารกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัว (phytohemagglutinin) 0.1 มล. และสารป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (penicillin & streptomycin) 0.1 มล. ผสมเบา ๆ ให้เซลล์กระจายในอาหารเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แต่ละ 1 ตัวอย่างเลือดจะทำการเพาะเลี้ยง 2 แบบ

 - 2.2.1 ในขวดที่ 1 เพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง เติม colchicine $10^{-7}M$ 0.1 มล.

2.2.2 ในขวดที่ 2 เพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง เติม ethidium bromide + colchicine $10^{-7}M$ 0.1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่ตู้เพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที

2.3 การเตรียมโครโมโซม

2.3.1 ถ่ายสารทั้งหมดจากขวดที่เพาะเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดแก้วก้นแหลม (centrifuge tube) ปั่นแยกเซลล์จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 6 นาที แล้วดูดสารในส่วนบนทิ้ง เก็บตะกอน ส่วนล่างไว้

2.3.2 เติมสารละลาย hypotonic solution ความเข้มข้น 0.075 M ซึ่งใช้ KCL (potassium chloride) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 มล. เพื่อให้เซลล์พองตัว โดยทิ้งไว้ในตู้ 37 องศา นาน 20 นาที แล้วจึงนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 6 นาที

2.3.3 นำตะกอนที่ได้มาผสมกับสาร fixative; methanol: acetic acid 3:1 โดยค่อยๆ เติม fixative ที่เป็นทีละน้อย จนครบ 3 มล. แล้วนำไปปั่นแยกเซลล์เหมือนเดิม ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง จนได้ตะกอนขาวใส ดูดสารละลายใส่ทิ้งจนเหลือประมาณ 1-2 มล. เตรียมทำสไลด์ต่อไป

2.4 การเตรียมสไลด์

2.4.1 เตรียมสไลด์ให้สะอาดปราศจากไขมันโดยแช่สไลด์ในน้ำยา dicromate cleaning solution นาน 24 ชม. แล้วล้างในน้ำประปาที่ไหลผ่านนาน 1 ชม. ต่อจากนั้นผ่านน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วเก็บแช่ในน้ำกลั่น ในตู้เย็นพร้อมใช้งาน

2.4.2 นำสไลด์ที่ได้มาหยดเซลล์ โดยเอาเซลล์ที่เตรียมได้จาก 2.3.3 มาทำให้เซลล์กระจาย แล้วใช้ Pasteur pipette ดูดเซลล์หยดจากที่สูงประมาณ 1-2 ฟุต เพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี เพียง 1-2 หยดบนสไลด์ที่เปียก แล้วทิ้งไว้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การย้อมโครโมโซม

2.5.1 conventional staining

2.5.1.1 เตรียม 10% Giemsa stain (Giemsa in phosphate buffer)

2.5.1.2 ย้อมโครโมโซมด้วยสี Giemsa นาน 5-10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด ตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ก่อนส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x และ 100x

2.5.2 G-banding staining

2.5.2.1 จุ่มสไลด์ซึ่งผ่านการอบแห้งแล้ว ลงในสารละลายทริปซิน (trypsin) นาน 15-20 วินาที เพื่อชักนำให้เกิดแถบบนแท่งโครโมโซม แล้วล้างใน 9% NaCl

2.5.2.2 ย้อมสไลด์ด้วย 10% Giemsa นาน 5 นาที

2.5.2.3 ตากสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.6 การตรวจสอบโครโมโซม

เมื่อย้อมโครโมโซมตามแบบ 2.5.1 และ 2.5.2 แล้ว

2.6.1 ตรวจสอบจำนวนโครโมโซมของผู้ป่วย และเด็กปกติทุกรายๆ ละ 25 เซลล์

2.6.2 ตรวจสอบแถบบนโครโมโซมแท่งที่ 13 ในระยะ mid metaphase และระยะ early metaphase ของผู้ป่วยทุกรายๆ ละ 5 เซลล์

2.6.3 ศึกษา polymorphism ของโครโมโซมคู่ที่ 13 ของ
ผู้ป่วยทุกราย เทียบกับเด็กปกติ

3. เขียนพงศาวลีของครอบครัวผู้ป่วยเรติโน بلاสโตมา 2-3 ชั่วอายุ

