บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ตัวอย่างเลือดของคนปัญญาอ่อนเพศชาย ปริมาตรคนละ 3 มล. จากโรงเรียนราชานุกูล จำนวน 100 คน

2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด

   2.1 เข็มเจาะเลือดเบอร์ 21

   2.2 ไซริงค์ขนาด 5 มล.

   2.3 ล่ายยางรัดต้นแขน

   2.4 สำลี

   2.5 70% ethyl alcohol

   2.6 heparin

   2.7 ปากกาสำหรับเขียนชื่อตัวอย่างเลือด

   2.8 กระดาษติดชื่อตัวอย่างเลือด (lebel)

3. เครื่องแก้ว

   3.1 กระบอกตวง

   3.2 ปิเปตขนาด 0.1, 1, 5 และ 10 มล.

   3.3 ปาสเตอร์ปิเปต (pasteur pipette)

   3.4 beaker ขนาด 500 และ 1,000 มล.

   3.5 volumetric flask ขนาด 1,000 มล.

   3.6 ขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมฝาปิด

   3.7 โถแก้วสำหรับใส่น้ำยาทำความสะอาด

   3.8 โถแก้วสำหรับใส่สีย้อมโครโมโซม (coplin jar)

3.9 plastic centrifuge tube ขนาด 10 มล.

3.10 สไลด์

4. เครื่องมือ

4.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด

4.2 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

4.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

4.4 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)

4.5 ตู้เลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิพร้อม CO_2 5%

4.6 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) สำหรับถ่ายเซลล์ลงขวด

4.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.8 เครื่องปั่น centrifuge

4.9 ตู้เย็น

4.10 เครื่องผสมชนิดกดปั่น (Vortex mixer)

4.11 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ และ green filter

4.12 เครื่องอัดขยายรูปขาวดำ

5. สารเคมี

5.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ M 199 ชนิดผง

5.2 สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ phytohemaglutinin-P(Gibco)

5.3 Hanks' balanced salt solution

5.4 sodium penicillin

5.5 streptomycin

5.6 fetal calf serum (Gibco)

5.7 5-fluoro-2' -deoxyuridine (FUdR)

5.8 sulfuric acid conc. (H_2SO_4)

5.9 น้ำยาฆ่าเชื้อ savlon

5.10 hepes

5.11 colchicine

5.12 glacial acetic acid (CH_3COOH)

5.13 absolute methanol

5.14 potassium chloride (KCl)

5.15 sodium chloride (NaCl)

5.16 hydrochrolic acid (HCl)

5.17 sodium hydroxide (NaOH)

5.18 sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)

5.19 potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)

5.20 di-sodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)

5.21 potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)

5.22 normal saline (0.9% NaCl)

5.23 tri-sodium citrate ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$)

5.24 trypsin

5.25 สีย้อม Giemsa

5.26 น้ำกลั่น

5.27 dektol developer (KODAK)

5.28 D 76 developer (KODAK)

5.29 fixer (KODAK)

5.30 7X (FLOW)

5.31 qlycerol

6. วัสดุในการถ่ายภาพ

6.1 ฟิล์มสี และฟิล์มสไลด์ ขนาด 36 รูป

6.2 ฟิล์มขาวดำ (Kodak technical pan film) ขนาด 36 รูป

6.3 กระดาษอัดรูปเบอร์ 3 ขนาด 5" x 7"

015696

7. เครื่องใช้เบ็ดเตล็ด

7.1 aluminium foil

7.2 กล่องเก็บสไลด์

7.3 กระดาษเยื่อเส็นส์

7.4 น้ำยาเยื่อเส็นส์

7.5 oil immersion

7.6 parafilm paper

7.7 ผ้ากอส

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดคนปัญญาอ่อนเพศชายที่มีโคโมโซมเป็น 46, xy จำนวน 100 คน จำนวนคนละ 3 มล. ซึ่งเป็นนักเรียนอยู่ในโรงเรียนราชานุกูล โดยเก็บในไฮริงค์ที่ปราศจากเชื้อ เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็ง (heparin)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Sutherland, 1979a : Glover, 1981)

เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้วิธีการปลอดเชื้อ เติมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ 4.5 มล. เลือด 0.5 มล. phytohemaglutinin-P 0.1 มล. ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปิดจุกพอแน่นพอที่อากาศสามารถผ่านเข้าไปได้ เขย่าเพื่อให้สารต่าง ๆ ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง เติม 10^{-5} M FUdR ลงไปในขวดเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้น 10^{-7} M (0.1 มล.) เพื่อกระตุ้นให้เห็นตำแหน่งเปราะบนโครโมโซม

3. การเตรียมสไลด์เพื่อใช้ในงานทดลอง

การเตรียมสไลด์ที่สะอาดทำโดยแช่สไลด์ในน้ำยา dichromate cleansing ให้ทั่วทั้งแผ่นเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างน้ำประปาที่ไหลรินตลอดเวลาเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ผ่านน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วจึงแช่สไลด์ในขวดที่มีน้ำกลั่น เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์ (Sutherland and Hecht, 1985)

4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ครบ 72 ชั่วโมงแล้ว นำมาเติมสารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.002 มก./มล. จำนวน 1 มล. ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อทำลายเส้นใยสปินเดิล เป็นการหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะเมตาเฟส เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

4.2 เทของทั้งหมดจากขวดเพาะเลี้ยงลงในหลอด centrifuge ซึ่งเขียนชื่อของตัวอย่างเลือดไว้ตรงกัน ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ของในหลอดจะแยกตัวออกเป็นส่วนเซลล์และน้ำยา ดูดส่วนน้ำยาทิ้งไป

4.3 เติมสารละลาย 0.075 M KCl จำนวน 5 มล. ลงไปเพื่อทำให้เซลล์บวมตัว ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้นาน 15 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วปั่นแยกส่วนน้ำยาทิ้งไป

4.4 ค่อย ๆ หยด cold Carnoy fixative ลงไปทีละหยดในขณะที่หลอด centrifuge นั้นอยู่ในเครื่องกดปั่น จนได้น้ำยาหลอดละ 5 มล. แล้วปั่นแยกส่วนน้ำยาทิ้งไป ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง จนเม็ดเลือดแดงแตกตัวหมด

4.5 เติม fixative ประมาณ 0.5 - 1.0 มล. เพื่อผสมกับกลุ่มเซลล์เป็น cell suspension

4.6 หยด cell suspension ด้วยปาสเตอร์ปิเปตลงบนสไลด์ที่แช่เย็นและนำขึ้นจากน้ำพอหมาดแผ่นละ 2 หยด เพื่อให้เซลล์แตกตัวและโครโมโซมกระจายตัวบนสไลด์ ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5. การย้อมโครโมโซม

5.1 วิธี conventional (ดัดแปลงจาก Patil et al., 1971)

5.1.1 เตรียม 20% Giemsa (Giemsa in phosphate buffer)

5.1.2 ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa นาน 15 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด

5.1.3 ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.2 วิธี G-banding (ดัดแปลงจาก Seabright, 1971)

5.2.1 แช่สไลด์ที่มีโครโมโซมในทริปซิน นาน 45 วินาที เพื่อยักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซม แล้วนำขึ้นมาล้างใน phosphate buffer

5.2.2 ย้อมสีโครโมโซมด้วย 20% Giemsa นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. การตรวจสอบโครโมโซม

การตรวจสอบโครโมโซมที่ย้อมแล้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา กำลังขยาย 10 x 10 และ 10 x 100 เลือกดูโครโมโซมในระยะเมตาเฟสที่กระจายตัวดี และมีขนาดความยาวเหมาะแก่การตรวจสอบ จำนวน 100 เซลล์ ใน 1 คน ถ่ายภาพโครโมโซมที่สีที่สุด 1 เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 10 x 10 โดยฟิล์มขาวดำ