บทที่ 2
อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษา เก็บจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ 60 คน พ่อผู้ป่วย 60 คน แม่ผู้ป่วย 60 คน คนละประมาณ 3-5 มล. จากโรงพยาบาลราชานุกูล และโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด
   - 2.1 ไซริงค์ขนาด 5 มล.
   - 2.2 เข็มเจาะเลือดเบอร์ 21
   - 2.3 70 % ethyl alcohol
   - 2.4 สารกันเลือดแข็ง (heparin)
   - 2.5 สำลีและกระดาษติดชื่อตัวอย่างเลือด

3. เครื่องแก้ว
   - 3.1 กระบอกตวงขนาดต่าง ๆ เช่น 10 มล.,100 มล.,500 มล.
   - 3.2 volumetric flask ขนาด 100 มล., 500 มล., 1000 มล.
   - 3.3 ปิเปต ขนาด 0.1 มล., 1 มล., 5 มล., 10 มล.
   - 3.4 coplin jar หรือโถแก้ว
   - 3.5 beaker ขนาด 500 มล. และ 1000 มล.
   - 3.7 ขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมฝาปิด ชนิดทนความร้อน
   - 3.8 หลอดแก้วหรือหลอดพลาสติก (test tube) ขนาด 12-15 มล.
   - 3.9 สไลด์ชนิดปลายข้างหนึ่งหยาบ
   - 3.10 pasteur pipette

4. เครื่องมือ
   - 4.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์
   - 4.2 ตู้เลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิพร้อม CO_2 5%

4.3 ตู้อบปรับอุณหภูมิ

4.4 ตู้ปรับอุณหภูมิ

4.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

4.6 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)

4.7 ชุดกรองแบบดูด (suction)

4.8 ตะเกียงแก๊สหรือตะเกียงแอลกอฮอล์

4.9 เครื่องผสมชนิดกดปั่น (vertex mixer)

4.10 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

4.11 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

4.12 เครื่องชั่งแบบละเอียด

4.13 กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ พร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์

4.14 เครื่องอัดขยายรูปขาวดำ

5. สารเคมี

5.1 absolute methanol

5.2 bacto trypsin

5.3 barium hydroxide

5.4 bovine calf serum (flow laboratory)

5.5 colchicine

5.6 citric acid

5.7 developer (kodak HC-110)

5.8 disodium hydrogen orthophosphate ($Na_2 HPO_4 . 2H_2O$)

5.9 fixer (kodak)

5.10 สีย้อม Giemsa

5.11 glacial acetic acid ($CH_3 COOH$)

5.12 glycerol

5.13 Hanks' balanced salt solution

5.14 น้ำยาฆ่าเชื้อ hibiscrub และ savlon

5.15 hydrochloric acid (HCl)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.16 penicillin

5.17 สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ phytohemagglutinin-m (Gibco)

5.18 potassium chloride (KCl)

5.19 potassium dichromate ($K_2 Cr_2 O_7$)

5.20 potassium dihydrogen orthophosphate ($KH_2 PO_4$)

5.21 สีย้อม quinacrine dihydrochloride

5.22 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ชนิดผง (flow labboratory)

5.23 sodium chloride (NaCl)

5.24 sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)

5.25 sodium hydroxide

5.26 disodium hydrogenphosphate

5.27 7x solution (flow laboratory)

5.28 streptomycin

5.29 sulfuric acid (conc.$H_2 SO_4$)

5.30 trisodium citrate ($Na_2 C_6 H_5 O_7 . 2H_2O$)

5.31 น้ำกลั่น

6. วัสดุในการถ่ายถาพและบันทึกภาพ

6.1 ฟิล์มสีและฟิล์มสไลด์ ขนาด 36 รูป

6.2 ฟิล์มขาวดำ (kodak technical pan film) ขนาด 36 รูป

6.3 กระดาษอัดรูปเบอร์ 4 ขนาด 5" x 7"

6.4 ถาดพลาสติคขนาด 5" x 7"

7. เครื่องใช้เบ็ดเตล็ด

7.1 aluminium foil

7.2 กล่องเก็บสไลด์

7.3 กระดาษเช็ดเลนส์

7.4 parafilm paper

7.5 กรรไกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.6 กระดาษนุ่ม

7.7 กระดาษกาว

7.8 ยาทาเล็บชนิดใส

7.9 สำลี

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ประมาณ 60 คน ตัวอย่างเลือดจากพ่อผู้ป่วยประมาณ 60 คน ตัวอย่างเลือดจากแม่ผู้ป่วยประมาณ 60 คน จากโรงพยาบาลราชานุกูล และโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า รวมตัวอย่างเลือดทั้งสิ้นประมาณ 180 คน คนละประมาณ 3.5 มล. เก็บตัวอย่างเลือดโดยวิธีปลอดเชื้อในกระบอกฉีดยา ซึ่งมี heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ของแต่ละคนโดยวิธีปลอดเชื้อ โดยเติมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 มล. fetal calf serum 1 มล., phytohemagglutinin 0.1 มล., Pen-Strep 0.2 มล., เลือด 0.5 มล. ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปิดฝา เขย่าเพื่อให้สารต่าง ๆ ผสมกันเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน คลายฝาเกลียวออกพอหลวม เก็บเข้าตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ 37 °C, CO_2 5% นาน 72 ชั่วโมง

3. การเตรียมสไลด์เพื่อใช้ในการทดลอง

ทำความสะอาดสไลด์โดยแช่ในน้ำยา dichromate cleansing solution ให้ทั่วทั้งแผ่นเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลานาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง แล้วแช่สไลด์ในภาชนะที่มีน้ำกลั่น เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 °C

4. การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

4.1 หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ครบ 72 ชั่วโมงแล้ว เติม colchicine เข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1 มล. ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ เขย่า แล้วทิ้งไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 °C นาน 25 นาที จึงนำมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 1,100 รอบ/นาที นาน 5 นาที

4.2 ดูดของเหลวส่วนที่ใสทิ้งไป เหลือไว้ประมาณ 0.5 มล. แล้วเขย่าหลอด

4.3 เติมสารละลาย 0.075 M KCl ที่ 37 °C ปริมาณ 8 มล. ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที เพื่อให้เซลล์บวม นำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1,100 รอบ/นาที นาน 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนที่ใสทิ้งไป เหลือไว้ประมาณ 1 มล.

4.4 ค่อย ๆ หยด fresh cold carnoy fixative (absolute methanol : glacial acetic acid = 3:1) ทีละหยด ลงในหลอดเลี้ยงเซลล์โดยใช้ปาสเตอร์ปิเปต ในขณะที่หลอดอยู่บนเครื่องกดปั่น จนกระทั่งใส่ fixative ลงไปครบ 5 มล. นำไปปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ความเร็ว 1,100 รอบ นาน 5 นาที

4.5 ดูดของเหลวส่วนที่ใสทิ้งไป แล้วเปลี่ยน fixative ใหม่ทำซ้ำอย่างน้อย 3-5 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษของเม็ดเลือดแดงและโปรตีนออกให้หมด

4.6 เติม fixative ปริมาณ 0.5-1.0 มล. เพื่อผสมกับตะกอนของเซลล์ suspension ที่ได้ นำมาหยดบนสไลด์ที่แช่เย็นด้วยปาสเตอร์ปิเปต สไลด์ละ 3 หยด โดยหยดให้สูง 2-3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตกตัว ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5. การย้อมโครโมโซม

5.1 การย้อมด้วยวิธี G-banding (ดัดแปลงจาก Seabright, 1971)

5.1.1 แช่สไลด์ที่ fix โครโมโซมแล้วใน 0.25% trypsin นาน 45 วินาที เพื่อชักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซม

5.1.2 ล้าง trypsin ออกด้วย phosphate buffer

5.1.3 ย้อมสีโครโมโซมด้วย 20% Giemsa นาน 15 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 การย้อมด้วยวิธี Q-banding (ดัดแปลงจาก Caspersson และคณะ, 1970)

5.2.1 แช่สไลด์ที่ fix โครโมโซมแล้วใน absolute methanol, methanol 74% และ methanol 50% ขั้นละ 5 นาที ตามลำดับ

5.2.2 สไลด์จากข้อ 5.2.1 แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำขึ้นมาล้างด้วย McIlvain buffer

5.2.3 ย้อมสไลด์ ใน quinacrine solution นาน 20 นาที

5.2.4 ล้างด้วย McIlvain buffer 4 ครั้ง

5.2.5 ปิดสไลด์ด้วย cover-glass โดยใช้ buffer เป็นตัวกลาง แล้วใช้ยาทาเล็บ seal ตามขอบ

หมายเหตุ

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการย้อมแถบโครโมโซมแบบ G-banding ในผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ทุกรายที่ทำการศึกษา เพื่อตรวจสอบคาริโอไทป์ ว่าเป็นผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ที่มีคาริโอไทป์ แบบ trisomy 21 หรือไม่ ส่วนการย้อมด้วยวิธี Q-banding นั้น จะทำในรายที่ผู้ป่วยมีคาริโอไทป์เป็น 47,xx +21 หรือ 47, xy + 21 และทำการย้อมในพ่อและแม่ของผู้ป่วยกลุ่มอาการดาวน์ด้วย

6. การตรวจสอบโครโมโซม

6.1 ตรวจสอบโครโมโซมที่ย้อมแล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Nikon microscope) ที่กำลังขยาย 10 x 10 และ 10 x 100

6.2 เลือกดูโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ที่มีแถบ, ขนาดความยาวเหมาะสม และกระจายตัวดี จากสไลด์ตัวอย่างละ 10 เซลล์ หรือจนกว่าจะวิเคราะห์โครโมโซมได้

6.3 เลือกดู Q-band ของโครโมโซมแท่งที่ 21 ของผู้ป่วยพร้อมทั้ง พ่อและแม่

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.4 ถ่ายภาพของเซลล์ที่ศึกษาไว้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4 x100 เท่า ด้วยฟิล์มขาวดำ kodak technical pan film ASA 100 โดยใช้ filter Nikon DM 455 BV-1A

6.5 เลือกเซลล์ที่มีการกระจายของโครโมโซมดี นำมาถ่ายภาพตัวอย่างละ 2-4 เซลล์

6.6 นำฟิล์มมาล้างด้วยน้ำยา HC-110 (kodak) แล้วอัดภาพขยายให้มีความเข้มที่เหมาะสม

6.7 ตรวจสอบโครโมโซม 21 จากลักษณะ polymorphism ของโครโมโซม โดยดูจากความผันแปรของแขนสั้น และลักษณะ sattellite โดยเปรียบเทียบระหว่างโครโมโซมของผู้ป่วยกับโครโมโซมของพ่อและแม่ของผู้ป่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย