บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

คางคก สกุล *Bufo* ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ คางคกบ้าน จงโคร่ง คางคกหัวราบ คางคกแคระ ชนิดละ 10 ตัว เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว

วัสดุอุปกรณ์

1. ไฟส่องสัตว์
2. ขวดดองสัตว์
3. กรรไกรผ่าตัด
4. มีดผ่าตัด
5. ปากคีบ
6. เข็มฉีดยา
7. กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ถาดรองสำหรับผ่าตัด
10. หลอดเลี้ยงเลือด
11. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
12. ถุงมือยาง
13. บีกเกอร์
14. กระบอกตวง
15. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
16. เครื่องกรองสูญญากาศ
17. เครื่องเขย่าผสม
18. เทอร์โมมิเตอร์
19. สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
20. ภาชนะสำหรับผสมสีย้อม

21. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
22. กล้องถ่ายรูป และฟิล์ม
23. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. อีเทอร์ (ether)
2. โคชิชิน (colchicine)
3. เอธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70 เปอร์เซนต์
4. สารละลาย fixative (methy alcohol : acetic acid; 3:1)
5. อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (RPMI 1640 60 เปอร์เซนต์)
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล (1 N NaOH)
7. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล (1 N HCl)
8. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์
9. สารละลายไฟโตเฮแม็คกลูตินิน (phytohaemagglutinin; PHA)
10. ทริปซิน (Trypsin)
11. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Soensen Phosphate buffer)
12. สารละลายสี Giemsa
13. สารละลายฟอร์มาลิน (Formalin)
14. น้ำกลั่น

ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

1. สำรวจและเก็บตัวอย่าง (รายละเอียดในตารางที่ 3 ของบทที่4)
   1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างคางคกในสกุล *Bufo* ในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ดังรายงานการค้นพบของ Taylor (1962) และจารุจินต์ นภีตะภัฏ (2531)
   1.2 ศึกษาสัณฐานวิทยา ตามลักษณะที่อธิบายไว้โดย Taylor (1962)

2. ศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์
   2.1 การเตรียมโครโมโซมจากการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ตามวิธีการของ Nishioka และคณะ, 1994 ดังนี้

1. เจาะเลือดคางคก 0.1-0.2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร RPMI 1640 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 73-75 ชั่วโมง

3. เติมสารละลายโคชิซิน 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

5. เติมสารละลาย 0.075 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

6. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

7. เติมสารละลาย fixative ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นทีละหยด และเขย่าตลอดเวลาจนครบ 5 มิลลิลิตร

8. นำสารละลายไปปั่นที่ 1300 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใสทิ้ง

9. ทำซ้ำขั้นที่ 7 และ 8 อีก 4 รอบ หรือจนกระทั่งได้ตะกอนสีขาว

10. หยดสารละลายเซลล์ที่ได้ลงบนสไลด์ ด้วยความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร เพื่อนำสไลด์ที่ได้ไปย้อมแถบสีต่อไป

2.2 การย้อมแถบสีปกติ (Conventional staining)

ใช้สไลด์ที่หยดเซลล์ไว้แล้วเป็นเวลา 1-3 วัน

1. ย้อมด้วยสารละลายสี Giemsa 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที
2. ล้างออกด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3 การย้อมแถบสีแบบจี (G- Banding)

ใช้สไลด์ที่หยดเซลล์ไว้แล้วเป็นเวลา 10-12 วัน

1. แช่สไลด์ในสารละลายทริปซิน 0.025 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมใหม่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25-40 วินาที

2. ล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3. ย้อมด้วยสารละลายสี Giemsa 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

$$B = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุด}}{2}$$

โครโมโซมขนาดใหญ่ (L) มีค่ามากกว่าค่า A

โครโมโซมขนาดกลาง (M) มีค่าอยู่ระหว่างค่า A และค่า B

โครโมโซมขนาดเล็ก (S) มีค่าน้อยกว่าค่า B

3.3 คำนวณค่าต่างๆ แล้วจัดคาริโอไทป์โดยเรียงลำดับโครโมโซมจากขนาดใหญ่ที่สุดไปยังขนาดเล็กที่สุด

3.4 สำหรับการจัดคู่ของโครโมโซมที่ได้จากการย้อมแถบสีแบบจี นั้นจะยึดรูปแบบของแถบสีเพื่อช่วยในการจัดคู่ของโครโมโซม ส่วนการเรียงลำดับจะยึดตามรูปแบบการจัดคาริโอไทป์ที่ได้จากการย้อมสีแบบปกติ

3.5 สรุปสูตรคาริโอไทป์ (Karyotype Formular) เปรียบเทียบคาริโอไทป์ของคางคกสกุล *Bufo* ทั้ง 4 ชนิด โดยการเขียนอิดิโอแกรม (Idiogram)