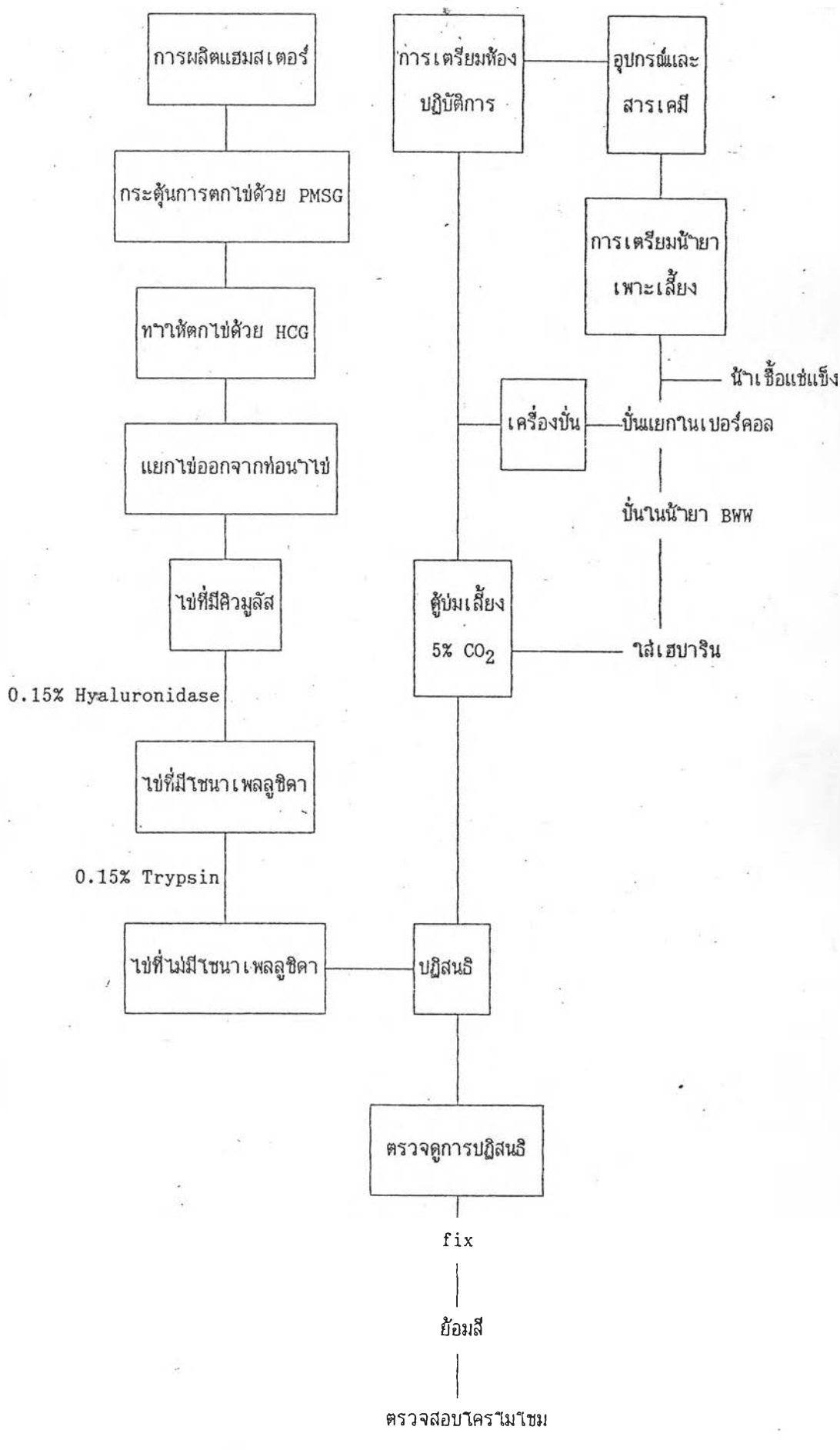
บทที่ 4

วิธีดำเนินการศึกษา

ในการศึกษานั้น จำเป็นต้องวางแผนการทดลองให้รัดกุม เนื่องจากต้องเตรียมสัตว์ทดลอง สารเคมี ตลอดจนอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้เพียงพอ นอกจากนี้ช่วงเวลาในการเตรียมอสุจิและไข่ จะต้องสัมพันธ์กัน เพื่อที่จะนำมาปฏิสนธิได้ตรงตามเวลาที่ต้องการ ขั้นตอนการทดลองโดยสังเขป แสดงไว้ในรูปที่ 4.1 และรายละเอียดของช่วงเวลาในการทดลองแต่ละครั้ง แสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษา

ตารางที่ 4.1 แสดง วัน เวลา การปฏิบัติงานในการทดลองแต่ละครั้ง

วันของการปฏิบัติงาน	เวลา	กิจกรรม
1	8.00-11.00	ตรวจการเป็นสัดของแฮมสเตอร์ และฉีด PMSG
2	ตามความสะดวก	ตรวจสอบความพร้อมของอุปกรณ์และสารเคมี
3	16.00-19.00	ฉีด HCG
	ตามความสะดวก	เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง
4	8.00	เตรียมสารละลายเปอร์คอล และสารละลายเฮปาริน
	10.00	หยดน้ำยาเพาะเลี้ยงลงในจานเพาะเลี้ยงปิดทับด้วย mineral oil นำเข้าตู้บ่มที่ 5% CO_2 38° C
	12.00	ฆ่าแฮมสเตอร์ และเตรียม zona-free hamster egg นำเข้าตู้บ่มรอไว้
	12.30	ละลายอสุจิแช่แข็ง และปั่นอสุจิ
	13.00	ทำการคาพาซิเตทอสุจิด้วยเฮปาริน
	13.20-14.20	ทำการปฏิสนธิในหลอดแก้ว
	15.20-16.20	ล้างอสุจิส่วนเกินออก และย้ายไข่ไปเลี้ยงในน้ำยา Ham's F-10
	23.20-24.00	ตรวจดูโปรนิวเคลียส และย้ายไข่ไปเลี้ยงในน้ำยา Ham's F-10 ที่มี podophyllotoxin และ vinblastine อย่างละ 0.06 ไมโครกรัม/มล.
5	8.00	เตรียมสไลด์
	10.00	เตรียม hypotonic solution และ fixative
	11.20-12.20	นำไข่ไปใส่ใน hypotonic solution และทำการ fix ไข่บนสไลด์
6	ตามความสะดวก	นำสไลด์ไปย้อมสี Giemsa ทำการตรวจสอบโครโมโซม บันทึกข้อมูลและถ่ายรูป

4.1 สัตว์ทดลอง

แฮมสเตอร์สีทอง (Mesocricetus auratus Waterhouse) เพศเมีย อายุ 6-12 สัปดาห์ จำนวนครั้งละ 6 ตัว ซึ่งนำพ่อและแม่พันธุ์มาจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจากหน่วยเลี้ยงสัตว์ทดลอง วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า มาเลี้ยงในห้องปรับอากาศของห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง โครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิห้องประมาณ 70-75 องศาฟาเรนไฮซ์ และให้ได้รับแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06.00-20.00 น.) ความมืด 10 ชั่วโมง (20.00-06.00 น.) ให้กินน้ำและอาหารสัตว์ทดลองสำเร็จรูป (CP 082) ตลอดเวลา การให้อาหารและช่วงแสงดังกล่าวจะช่วยให้หนูให้ปริมาณไข่มาก หลังจากที่ทำการกระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมน ก่อนนำมาใช้ทำการทดลองจะตรวจวงรอบการเป็นสัดให้แน่นอน

แฮมสเตอร์อยู่ใน order Rodentia Family Cricetidae แบ่งเป็น 3 ชนิดด้วยกัน คือ แฮมสเตอร์สีทอง ไชนีสแฮมสเตอร์ (Chinese hamster; Cricetulus griseus M.E.) และ ยูโรเปียนแฮมสเตอร์ (Cricetus cricetus L.) แฮมสเตอร์สีทองเป็นสัตว์ประเภทเดียวกับหนูขาว หนูถีบจักร และหนูตะเภา แฮมสเตอร์สีทองมีวงรอบการเป็นสัด 4 วัน แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังแสดงในตาราง 4.2 การตกไข่จะเกิดขึ้นระหว่าง 24.00-01.00น. ในตอนกลางคืน ซึ่งจัดเป็นวันที่ 1 ของวงรอบการเป็นสัด แฮมสเตอร์จะเกิด heat และจะพบว่าที่ปากช่องคลอดมีของแข็งสีขาวเหนียวข้นและมีกลิ่นในตอนเช้า เมื่อเอามือกดบริเวณท้องในแต่ละข้างของปากช่องคลอด ในวันที่ 2 อาจจะพบของเหลวสีเหลือง ในวันที่ 3 และ 4 อาจพบของเหลวสีเหลืองนี้เล็กน้อย หรืออาจไม่พบเลย (Martin, 1983) จำนวนไข่ที่ตกทั้ง 2 ข้าง เฉลี่ยครั้งละประมาณ 10 ใบ ภายหลังจากการตกไข่ประมาณ 3 ชั่วโมง ไข่จะไปอยู่ในส่วนของ ampulla ของท่อนำไข่ (Strauss, 1956)

ตารางที่ 4.2 แสดงวงรอบการเป็นสัดของแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย

วันที่ของวงรอบการเป็นสัด	ระยะ	ช่วงเวลา	ลักษณะที่พบ
1	oestrus	เช้า	พบเยื่อมูกที่มีลักษณะเหนียวสีขาวข้น มีกลิ่น ตัวเมียจะยินยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้ ถ้าทำ vaginal smear จะพบ oval epithelial cells
	meta oestrus		
	early dioestrus	บ่าย	ยังพบเยื่อมูกปากมดลูก แต่ตัวเมียจะไม่ยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้ เมื่อทำ vaginal จะพบ leucocytes และ oval epithelial cells
2	middle dioestrus	เช้า	ช่วงนี้เมื่อทำ vaginal smear จะพบ leucocytes เป็นส่วนใหญ่ และ squamous epithelial cells บางเล็กน้อย
3	late dioestrus	เช้า	ลักษณะเซลล์ที่พบเหมือนวันที่ 2 จำนวนของ leucocytes เริ่มลดลง ตัวเมียจะไม่ยอมให้ตัวผู้ผสมพันธุ์
	proestrus	บ่าย	
4	late dioestrus	เช้า	มี leucocytes เล็กน้อย
	proestrus	บ่าย	เป็นระยะก่อนเกิด heat ช่วงสั้น ๆ ภายในรังไข่ จะมี mature follicles จำนวนมาก
	oestrus		ตัวเมียจะเกิด heat ในตอนกลางคืน และมักจะมีการตกไข่หลังเที่ยงคืน

4.1.1 การผลิตแฮมสเตอร์

นำพ่อแม่พันธุ์แฮมสเตอร์ที่สมบูรณ์ ผสมพันธุ์ครั้งละ 30 คู่ ให้ตัวผู้อยู่ร่วมกับตัวเมีย 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะแยกเอาตัวผู้ออก และนำไปผสมกับตัวเมียชุดใหม่ต่อไป ตัวเมียที่ตั้งท้องจะแยกไปเลี้ยงต่างหาก ตัวเมียที่ผสมไม่ติดจะคัดทิ้ง แฮมสเตอร์อุ้มท้องประมาณ 19 วัน ก็จะคลอด ก่อนคลอดประมาณ 4 วัน จะย้ายตัวเมียไปใส่ในกรงที่ใหญ่ เมื่อแฮมสเตอร์คลอดลูกแล้วไม่ควรรบกวน เนื่องจากแฮมสเตอร์ชอบกินลูก เมื่อเลี้ยงลูกครบ 1 เดือน จะหย่านม และคัดเพศ ตัวเมียจะนำไปเลี้ยงต่อจนถึงอายุ 6 สัปดาห์ จึงนำไปทำการทดลอง และคัดบางส่วนไว้เป็นแม่พันธุ์ ตัวผู้จะคัดไว้เป็นพ่อพันธุ์บางส่วน ที่เหลือจะฆ่าทิ้ง โดยเฉลี่ยจะได้แฮมสเตอร์เพศเมียประมาณ 1-3 ตัว ต่อแม่พันธุ์ 1 ตัว

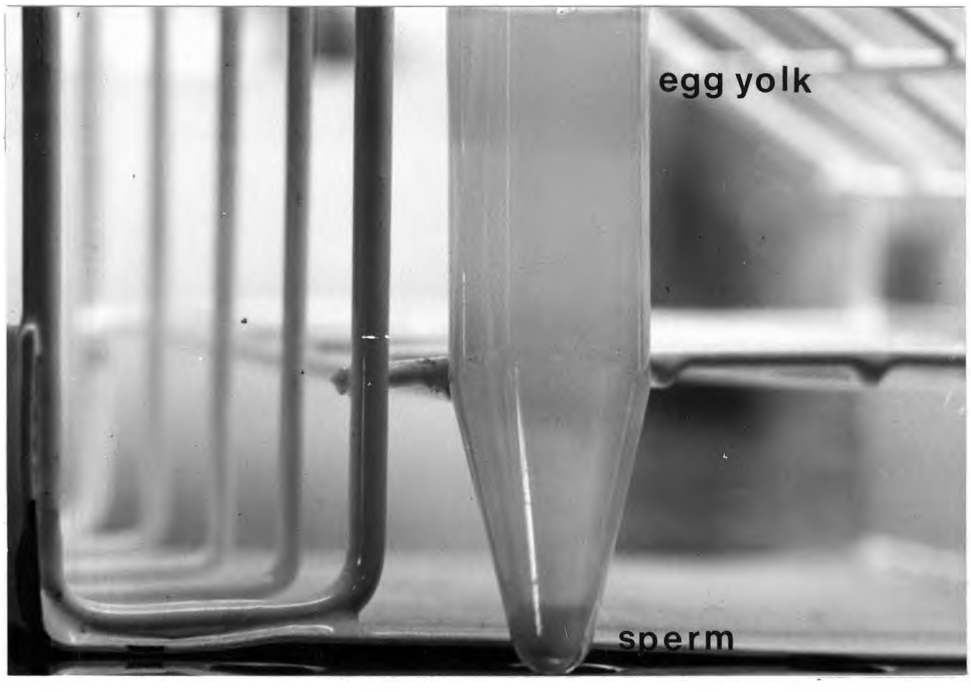
4.2 การเตรียมอสุจิกระบือปลัก

4.2.1 การละลาย (thaw) อสุจิของกระบือปลักแช่แข็ง

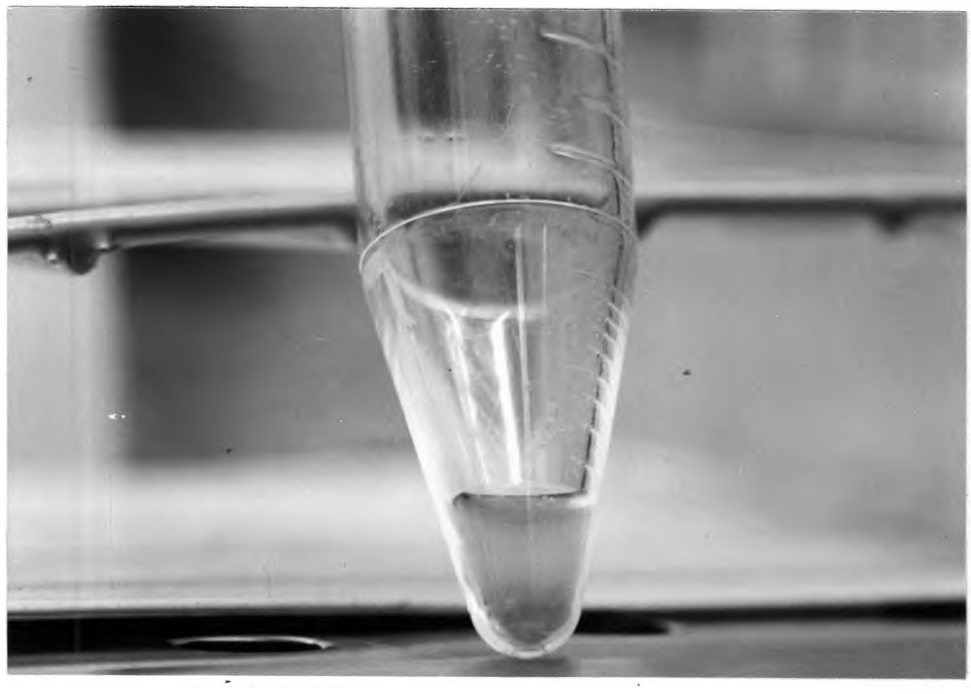
อสุจิกระบือปลักบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติคขนาด 0.25 มล. (French Ministraw) มีไข่แดง-ทริส (Egg-Yolk-Tris) ที่มีกลีเซอรอล (glycerol) อยู่ 7% เป็นน้ำยาละลาย ซึ่งแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เวลานำมาใช้เอามาใส่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างรวดเร็ว แช่ในน้ำอุ่นประมาณ 30 วินาที ใช้กระดาษที่สะอาดเช็ดน้ำให้แห้งแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% อีกครั้งหนึ่ง ใช้กรรไกรที่คมตัดที่ปลายของหลอดน้ำเชื้อ เอาน้ำเชื้อใส่ขวดที่สะอาด โดยตัดปลายอีกข้างหนึ่งของหลอดให้น้ำเชื้อไหลออกจนหมดหลอด

4.2.2 การแยกอสุจิออกจาก egg-yolk

น้ำอสุจิที่ได้จากข้อ 4.2.1 มาใส่ centrifuge tube ซึ่งมีเปอร์คอล 45% และ 30% ที่แยกเป็นชั้น ใส่อสุจิลงบนชั้นของ 30% เปอร์คอล 1 มล. เบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที อสุจิจะอยู่ที่ก้นหลอด มีลักษณะอัดเป็นก้อน (sperm pellet) ส่วน egg yolk จะแยกอยู่ส่วนบน (รูปที่ 4.2) ใช้ pipett pump ดูดเอา egg yolk ที่อยู่บริเวณผิวส่วนบนออกทิ้งไป ค่อย ๆ ดูดเรียงลำดับจากส่วนบนสุดลงมาจนถึงบริเวณที่มีอสุจิ ต่อจากนี้ใช้ Pasteur pipette ที่ดึงจนเล็กสวมกับท่อยางใช้ปากดูดท่อยางเพื่อดูดเอาสารละลายเปอร์คอลออกจนหมด ระวังไม่ให้อสุจิถูกดูดออกมาด้วย หลังจากนั้นนำอสุจิที่ได้มาละลายในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW (0.6% BSA, 0.5 mM hypotaurine) ปริมาตร 5 มล. ที่ใช้สำหรับการคาพาซิเตทอสุจิ ใน centrifuge tube โดยค่อย ๆ ผสมอสุจิอย่างเบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างเอาเปอร์คอลออก ดูดเอาของเหลวส่วนบนออกให้หมด จะเหลืออสุจิอยู่ที่ก้นหลอด (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.2 แสดงการแยก egg yolk ออกจากอสุจิด้วยวิธีการปั่นแยก ในแอลกอฮอล์ 45% และ 30%



รูปที่ 4.3 แสดง sperm pellet ที่ก้นหลอดหลังการปั่นแยกด้วยเปอร์คอล 45% และ 30% ที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที และปั่นแยกอีกครั้งหนึ่งด้วย BWW ที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที

4.2.3 การคาพาซิเตทอสุจิกระบือบลักในหลอดแก้วด้วยเฮปาริน

การคาพาซิเตทอสุจิกระบือบลักในครั้งนี้ใช้วิธีกระตุ้นด้วยเฮปาริน ซึ่งเคยใช้ได้ผลในโค (Handrow และคณะ,1982; Parish และคณะ,1986; Fukui และคณะ,1990; Lu และคณะ,1987) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำอสุจิที่ได้มาละลายให้มีความเข้มข้น 20 x 10^6 ตัว/มล. ด้วย BWW ซึ่งเตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว (glucose-free, 0.6% BSA, 0.5 mM hypotaurine, 10 mM Cafeine) นำสารแขวนลอยอสุจิ (sperm suspension) 100 ไมโครลิตร เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW 100 ไมโครลิตร ที่มีเฮปาริน ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25 และ 20 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ จะได้สารแขวนลอยอสุจิมีความเข้มข้น 10 x 10^6 ตัว/มล. อยู่ใน BWW ที่มีเฮปารินเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 10 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ นำไปเลี้ยงในตู้อบที่มี 5% คาร์บอนไดอ็อกไซด์ 95% ความชื้น อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที ทั้งนี้ปริมาณอสุจิที่ใช้ และความเข้มข้นของเฮปารินขึ้นอยู่กับแผนการทดลองในแต่ละครั้ง ซึ่งจะต้องดูจากปริมาณไข่แฮมสเตอร์ที่ได้ด้วย เพื่อความเหมาะสมในการวางแผนการทดลอง

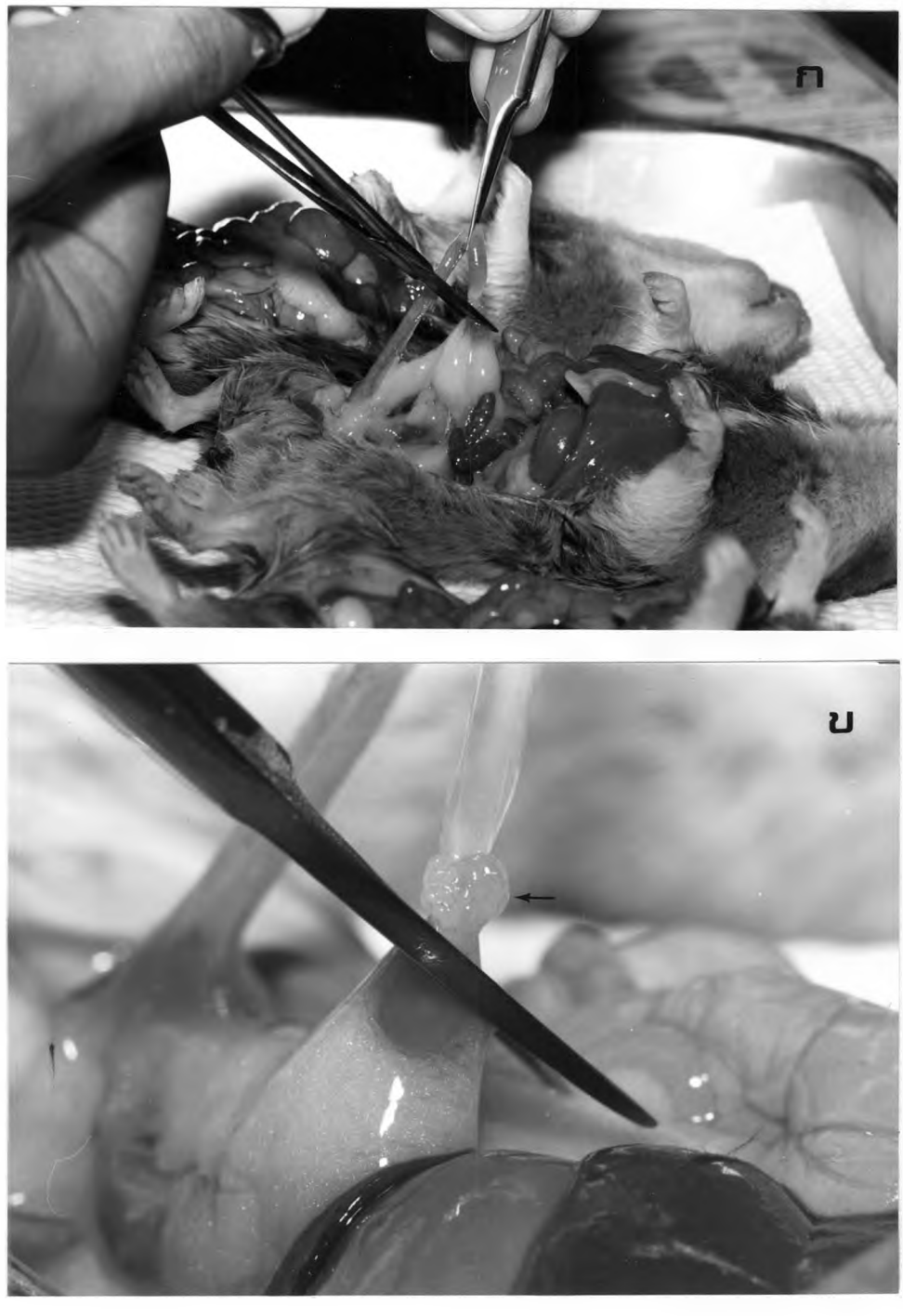
เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการคาพาซิเตทอสุจิกระบือด้วยเฮปารินแล้ว ปรับอสุจิให้มีความเข้มข้น 2.5 x 10^6 ตัว/มล. ด้วย BWW ที่ใช้สำหรับเตรียมไข่ แล้วดูดสารแขวนลอยอสุจิใส่ลงในหยดของน้ำยาที่มีไข่แฮมสเตอร์ที่เตรียมไว้ ตามตารางที่ 4.1

4.3.4 การเตรียมไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดา

ใช้วิธีการของ Yanagimachi (1976) เร่งการตกไข่แฮมสเตอร์ โดยการฉีด PMSG เข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ในวันที่ 1 ของวงรอบการเป็นสัด (วันที่พบเยื่อมูก) เวลา 8.00-11.00 น. อีก 56-58 ชั่วโมงต่อมา คือวันที่ 3 ของวงรอบการเป็นสัด ฉีด HCG 30 หน่วยสากล เข้าช่องท้อง เวลา 16.00-19.00 น. 15-17 ชั่วโมงต่อมาฆ่าแฮมสเตอร์ด้วยวิธีดึงคอ (cervical dislocation) (รูป 4.4) เมื่อแฮมสเตอร์ตายแล้ว ทำการผ่าท้อง (รูปที่ 4.5) เพื่อเก็บท่อนำไข่ (oviduct) ทั้ง 2 ข้าง (รูปที่ 4.6)

รูปที่ 4.4 แสดงวิธีฆ่าแฮมสเตอร์ด้วยวิธีดึงคอ (cervical dislocation)

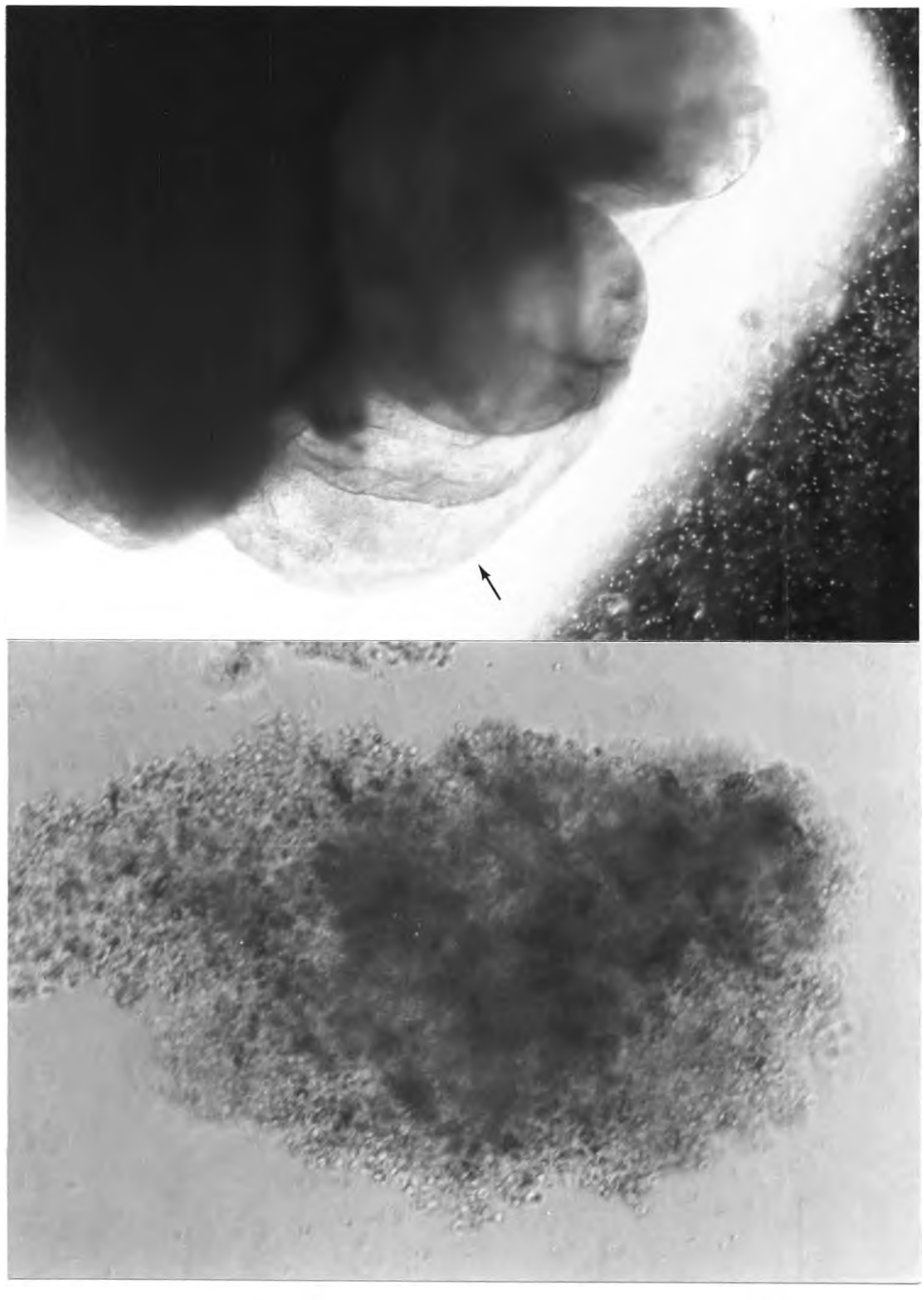
รูปที่ 4.5 แสดงแฮมสเตอร์ เมื่อผ่าท้องแล้ว เพื่อแยกเอาท่อนำไข่ออกมา



รูปที่ 4.6 ก. แสดงการตัดเอาท่อนำไข่ออกจากรังไข่และปีกมดลูก

ข. ส่วนขยายภาพ ก. (ศรชี้ คือ ท่อนำไข่)

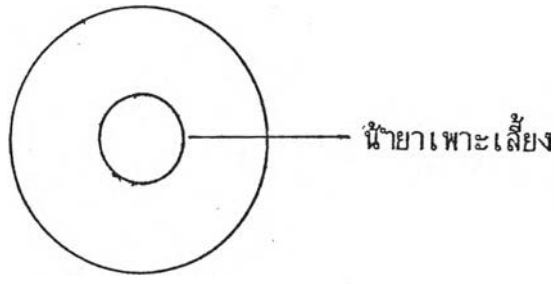
รูปที่ 4.7 แสดงการแยก cumulus mass ออกจากท่อนำไข่ โดยใช้เข็มเบอร์ 27 กรีดบริเวณ ampulla ของท่อนำไข่



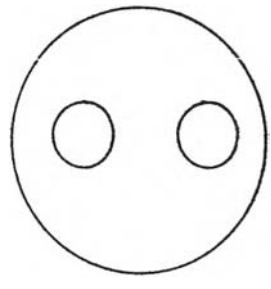
รูปที่ 4.8 บน แสดงบริเวณ ampulla ของท่อนำไข่ (ศรชี้)
(กำลังขยาย 200 เท่า)
ล่าง แสดง cumulus mass ที่ไหลออกมาจากบริเวณ ampulla
เมื่อกรีดด้วยเข็มเบอร์ 27 ซึ่งจะมีไข่อยู่ (กำลังขยาย
200 เท่า)

ใส่ใน petridish ซึ่งมีหยดน้ำยา BWW (0.3% BSA) นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting กำลังขยาย 15-20 เท่า ใช้ปลายเข็มเบอร์ 27 ที่สวมติดกับ plastic syringe 1 มล. กรีดผนังท่อนำไข่ให้ขาดบริเวณที่เป็น ampulla (รูปที่ 4.7) ส่วน cumulus masses ที่มีไข่อยู่ภายในจะไหลออกมาจากท่อนำไข่ (รูปที่ 4.8) ใช้ปลายเข็มเขี่ยให้แยกจากกัน ดูด cumulus masses ใส่แก้วหลุมที่มี 0.15% hyaluronidase ใน BWW (0.3% BSA) เพื่อย่อยสลาย cumulus cells ใช้ Pasteur pipette ที่ดึงจนเล็กขนาดพอเหมาะกับไข่ ดูดไข่ที่มี โซนาเพลลูซิดา มาล้างใน BWW (0.3% BSA) 2 ครั้ง แล้วนำไข่ไปใส่ในแก้วหลุมที่มี 0.15% trypsin ใน BWW (0.3% BSA) เพื่อย่อย โซนาเพลลูซิดา ในขั้นตอนนี้ต้องสังเกตภายใต้กล้องอยู่ตลอดเวลา เมื่อ โซนาเพลลูซิดา ถูกย่อยแล้ว ให้รีบย้ายไข่ลงใน BWW (0.3% BSA) ล้างไข่ 3 ครั้ง เพื่อล้างเอา trypsin ออก ดูดไข่แฮมสเตอร์ที่ได้ไปใส่ใน BWW (0.3% BSA) ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบต่าง ๆ 6 แบบ ซึ่งในแต่ละแบบ จะมีจำนวนไข่และปริมาตรของหยดน้ำยาต่าง ๆ กัน ดังรูป

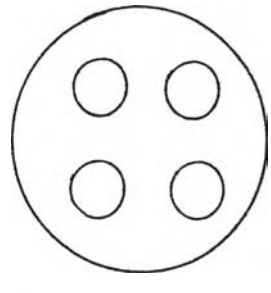
ทุกขั้นตอนต้องทำภายใต้ mineral oil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว



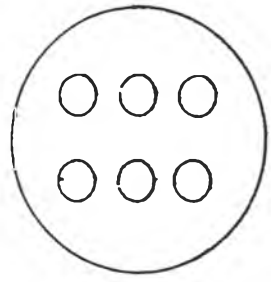
แบบที่ 1 น้ำยาเพาะเลี้ยง ปริมาตรหยดละ 200 ไมโครลิตรต่อ 15-25 โอโอไซต์



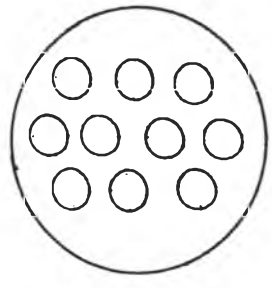
แบบที่ 2 น้ำยาเพาะเลี้ยง ปริมาตรหยดละ 100 ไมโครลิตร 2 หยด บริเวณเส้นผ่าศูนย์กลางของจานเพาะเลี้ยง โดยใช้ 1 หยดต่อ 15-20 โอโอไซต์



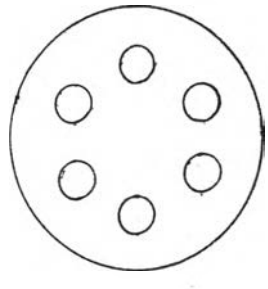
แบบที่ 3 น้ำยาเพาะเลี้ยง ปริมาตรหยดละ 100 ไมโครลิตร 4 หยด โดยใช้ 1 หยดต่อ 15-20 โอโอไซต์



แบบที่ 4 น้ำยาเพาะเลี้ยง ปริมาตรหยดละ 25 ไมโครลิตร 6 หยด จัดเรียงเป็น 2 แถว ๆ ละ 3 หยด ดังรูป โดยใช้ 1 หยดต่อ 5 โอโอไต์



แบบที่ 5 น้ำยาเพาะเลี้ยง ปริมาตรหยดละ 25 ไมโครลิตร 10 หยดต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง โดยใช้ 1 หยดต่อ 5 โอโอไซต์



แบบที่ 6 น้ำยาเพาะเลี้ยง ปริมาตรหยดละ 25 ไมโครลิตร 6 หยดต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง จัดเรียงตามแนวรัศมี ดังรูป โดยใช้ 1 หยดต่อ 5 โอโอไซต์

เมื่อนำไข่ใส่จานเพาะเลี้ยงแล้วจะปิดทับด้วย mineral oil ให้ท่วมหยดน้ำยา แล้วนำไปเข้าตู้บ่ม (5% คาร์บอนไดอ็อกไซด์ 95% ความชื้น 38 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะผสมกับอสุจิ

4.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำอสุจิผสมกับไข่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย Ham's F-10 เสริมด้วย 10% fetal calf serum ปริมาตรอสุจิที่ใช้ผสมเป็นไปตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาตรของอสุจิที่ใช่ผสมกับไข่ในแต่ละรูปแบบของการหยดน้ำยา

รูปแบบน้ำยาเพาะเลี้ยง	ปริมาตรน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อหยด (ไมโครลิตร)	จำนวนหยดต่อจานเพาะเลี้ยง	จำนวนไข่ต่อหยด	ปริมาตรอสุจิที่ใช้ผสม 2.5×10^6 ตัว/มล. (ไมโครลิตร)	ความแข็งแรงสุดท้ายของอสุจิหลังผสมกับไข่ ตัว/มล.
แบบที่ 1	200	1	15-25	50	0.5×10^6
แบบที่ 2	100	2	15-20	25	0.5×10^6
แบบที่ 3	100	4	15-20	25	0.5×10^6
แบบที่ 4	25	6	5	6.25	0.5×10^6
แบบที่ 5	25	6	5	6.25	0.5×10^6
แบบที่ 6	25	6	5	6.25	0.5×10^6

เมื่อนำอสุจิเข้าผสมกับไข่แล้ว จะได้อสุจิมีความเข้มข้น 0.5 x 10^6 ตัว/มล. แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่ม เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เมื่ออสุจิผสมกับไข่ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำมาล้างในหยดน้ำยา Ham's F-10 (10% fetal calf serum) ซึ่งเตรียมไว้ส่วงหน้าแล้ว 3 ครั้ง เพื่อล้างเอาอสุจิส่วนเกินออกไป หลังจากนั้นนำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 หยดใหม่ ที่เตรียมไว้ส่วงหน้าแล้วเช่นกัน ตามรูปแบบน้ำยาเหมือนกับตอนแรก นำไข่ไปเลี้ยงต่อตามวิธีเดิมนาน 8 ชั่วโมง

4.4 การตรวจดูการปฏิสนธิ (fertilization check)

หลังจากเลี้ยงไข่ครบ 8 ชั่วโมงแล้ว นำไข่มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อดูการปฏิสนธิ โดยดูจาก male pronuclei ซึ่งมีลักษณะกลมมีขอบใสภายในจะเห็นนิวคลีโอลัส (nucleolus) หลายอัน มีลักษณะเป็นจุดสีดำมีหลายขนาด และอาจจะเห็น second polarbody ของไข่ ถูกขับออกมา

4.5 การเตรียมไข่เพื่อศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟส

เปลี่ยนไข่แฮมสเตอร์ไปใส่ใน Ham's F-10 ที่มี podophyllotoxin และ vinblastine ความเข้มข้นอย่างละ 0.06 ไมโครกรัม ต่อ มล. ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้จะยับยั้งไม่ให้เกิด tuberlin polymerization ซึ่งจำเป็น สำหรับการสร้าง spindle fiber ในระยะนี้ไข่จะแบ่งตัวในระยะ first cleavage ปิดทับด้วย mineral oil แล้วนำไปเลี้ยงต่ออีก 12 ชั่วโมง ไข่ที่อยู่ในระยะเมตาเฟสจะไม่เห็นโปรนิวคลีไอในไซโตพลาสซึม

4.6 การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

ใช้เทคนิค gradual fixation air drying เพื่อเตรียมโครโมโซมบนสไลด์ ตามวิธีของ Martin (1983) และ Tateno และ Mikano (1987) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ คือ เมื่อเสร็จสิ้นการเลี้ยงไข่แล้ว ดูดไข่ประมาณ 15 ใบ ใส่ลงในแก้วหลุมที่มี

hypotonic solution (1% tri sodium citrate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-6 นาที เขย่าแก้วหลุมเบา ๆ เพื่อป้องกันไข่เกาะติดกัน ดูดไข่ 3-5 ใบ ลงในหยดของ hypotonic solution ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ที่อยู่กลางสไลด์ โดยที่ด้านล่างของสไลด์ใช้ดินสอเขียนแก้วทำเครื่องหมายเป็นวงกลมเล็ก ๆ ไว้ เพื่อความสะดวกในการตรวจหาโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูดน้ำยา fixative (3:1, 95% ethanol : glacial acetic acid) 20 ไมโครลิตร หยดลงบนไข่ในขณะที่ hypotonic solution ที่อยู่บนสไลด์เริ่มจะแห้ง (ถ้า hypotonic solution เหลืออยู่มาก ไข่อาจจะแตกได้) โดยหยดสูงจากสไลด์ 1 เซนติเมตร ก่อนที่ fixative จะแห้ง หยด fixative ลงไปใหม่จนครบ 4 หยด เมื่อครบ 4 หยดแล้วเป่าลมลงบนสไลด์เบา ๆ เพื่อให้ไข่แห้งและกระจายออกจากกัน หลังจากนั้นจะนำไปย้อมสี Giemsa แบบ conventional เพื่อศึกษาโครโมโซมต่อไป โดยนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ถ่ายรูปโครโมโซมที่พบ

4.7 การย้อมสีโครโมโซม

ใช้เทคนิคการย้อมสีแบบ conventional หรือ solid stain (ดัดแปลงจาก Patil และคณะ, 1971) ซึ่งมีวิธีการ คือ

1. เตรียมสี 20% Giemsa ใน phosphate buffer
2. ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa นาน 15 นาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำประปา
3. ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4.8 การตรวจสอบโครโมโซม

ตรวจสอบโครโมโซมของที่ย้อมแล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา กำลังขยาย 10 x 10 และ 10 x 100 เลือกดูโครโมโซมในระยะเมตาเฟสที่ดีที่สุดแล้วถ่ายภาพ

4.9 การทำความสะอาดเครื่องมือเครื่องใช้

เครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ เมื่อใช้เสร็จแล้ว ควรล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง เพื่อไม่ให้คราบสกปรกและสารเคมีต่าง ๆ แห้งติดสิ่งของเหล่านี้ จะทำให้ล้างออกยาก หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย 7X 5% ในน้ำกรองขจัดอิออน ก่อนล้างควรแช่สิ่งของเหล่านี้ไว้ในน้ำยา 1 วัน เมื่อล้างน้ำยาเสร็จแล้ว ให้ล้างด้วยน้ำกรองขจัดอิออนอีก 6 ครั้ง และครั้งสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง อีก 2 ครั้ง ล้างเสร็จแล้วนำไปคว่ำให้แห้งในบริเวณที่ไม่มีฝุ่นละออง

การทำให้เครื่องมือเครื่องใช้ปลอดเชื้อ สำหรับเครื่องแก้ว นำไปอบด้วยความร้อนแห้งในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ก่อนอบใช้อลูมิเนียมฟอยล์ห่อหรือปิดปากภาชนะเสียก่อน สำหรับพวกพลาสติค นำไปอบด้วยความร้อนชื้น ได้แก่การอบในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่มีอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที น้ำที่ใส่ในหม้อต้องเป็นน้ำกลั่นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำ ก่อนอบใช้กระดาษหรือซองกระดาษห่อให้มิดชิด