บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร 28 ชนิด จากสวนสมุนไพรสิรีรุกขชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะเภสัชศาสตร์ และภาควิชาพฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. กระถางขนาด 6 นิ้ว, ทราย, ดินขุยไผ่ และปุ๋ยอินทรีย์ กทม.
3. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซม
   3.1 สารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene
   3.2 น้ำยา Carnoy's solution
   3.3 ferric chloride เข้มข้น
   3.4 acetic acid 45 และ 90 เปอร์เซ็นต์
   3.5 ethyl alcohol 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
   3.6 normal hydrochloric acid
   3.7 propionocarmine 2 เปอร์เซ็นต์
   3.8 Schiff's reagent
4. อุปกรณ์ในการศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์
   4.1 ขวดสำหรับเก็บตัวอย่างขนาด 20 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร
   4.2 ปากคีบปลายแหลม
   4.3 เข็มเขี่ย
   4.4 สไลด์และแผ่นแก้วปิด
   4.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์
   4.6 แท่งเคาะโครโมโซม
   4.7 เทอร์มอมิเตอร์
   4.8 กระดาษซับ
   4.9 กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า
   4.10 กล้องสองตา (dissecting microscope)
   4.11 อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
   4.12 ยาทาเล็บชนิดใส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. อุปกรณ์และสารเคมีในการทำสไลด์ถาวร
   5.1 Ridged jars
   5.2 petridish
   5.3 acetic acid 45 เปอร์เซนต์
   5.4 absolute ethanol
   5.5 Euparol
   5.6 Xylene
6. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพและอัดภาพ
   6.1 กล้องจุลทรรศน์ Vanox T
   6.2 ฟิลม์ถ่ายภาพขาว-ดำ Panatomic X-32
   6.3 ฟิลม์สีสไลด์ Ektachrome 64
   6.4 ฟิลม์สี Kodak Gold 100
   6.5 กระดาษอัดภาพ Kodak F4
   6.6 Kodak developer D-19
   6.7 Kodak Fixing bath F-5

วิธีดำเนินการทดลอง

ในการศึกษาโครโมโซมของพืชสมุนไพร ใช้ตัวอย่างดอกอ่อน และราก มานับจำนวนโครโมโซมซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง 2 ขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร

อวัยวะของพืชสมุนไพรที่นำมานับจำนวนโครโมโซมในการศึกษานี้คือ ดอกอ่อนหรือราก ถ้าพืชสมุนไพรชนิดนั้นเป็นไม้ยืนต้นจะเลือกเก็บตัวอย่างดอกอ่อน ส่วนพืชสมุนไพรที่เป็นไม้ล้มลุก จะแยกต้นอ่อน หรือเก็บเมล็ดมาปลูกจนได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงจึงตัดรากมาศึกษาโครโมโซม

1.1 การเก็บตัวอย่างดอก

ในการเก็บตัวอย่างดอก ต้องคำนึงถึงขนาดดอก ถ้าเป็นดอกเดี่ยวจะเลือกเก็บดอกอ่อนที่กลีบดอกยังไม่มีสีมาหลาย ๆ ขนาด แต่ถ้าเป็นดอกช่อ จะเก็บช่อดอกที่ยังไม่มีดอกบานเลย นอกจากนี้แล้วยังต้องคำนึงถึงเวลาในการเก็บตัวอย่างปกติอยู่ในช่วงเวลา 11.00-16.00 น. เมื่อเลือกขนาดดอกได้แล้วนำตัวอย่างดอกมาฟิกซ์ในน้ำยาCarnoy (glacial acetic acid : chloroform : absolute ethyl alcohol ในอัตราส่วน 1:3:6) ที่ใส่ ferric

chloride เข้มข้น 2-3 หยด จนน้ำยามีสีเหลืองเพื่อช่วยให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น สารละลาย Carnoy ที่ใช้ฟิกซ์ดอกนั้นจะหยุดเมแทบอลิซึมของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ให้เหมือนขณะที่มีชีวิตมากที่สุด ส่วนผสม glacial acetic acid และ absolute ethyl alcohol ช่วยให้น้ำยาฟิกซ์ ซึมผ่านเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ส่วน chloroform ช่วยละลายไขมัน (Sharma, 1980) ตัวอย่างดอกที่แช่ในน้ำยาฟิกซ์ (Carnoy's solution) นี้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 - 48 ชั่วโมง แล้วล้างดอกให้สะอาดด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอทีลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เก็บตัวอย่างดอกใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอทีลแอลกอฮอล์ เพื่อรักษาสภาพเซลล์ให้คงอยู่ได้ซึ่งเก็บไว้ได้ประมาณ 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.2 การเก็บตัวอย่างราก

นำต้นอ่อนของพืชสมุนไพรที่เก็บมาจากสถานที่ต่างๆ ปลูกลงกระถางขนาด 6 นิ้ว ใส่ดิน 3 ส่วน ปุ๋ยอินทรีย์ กทม. 1 ส่วน และทราย 1 ส่วน บำรุงรักษาประมาณ 1 เดือน เมื่อต้นแข็งแรงดีรากจะมีลักษณะอวบ ขาว ปลายรากใส ตัดรากขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ในขวดที่มีสารละลายอิ่มตัวของ alphabromonapthalene ถ้าตัดรากยาวเกินไปจะทำให้สารละลายที่ใช้เป็น pretreatment ซึมเข้าเซลล์ได้ไม่ทั่วถึง alphabromonapthalene ทำหน้าที่หยุดวงชีพเซลล์ (cell cycle) ให้อยู่ในระยะเมทาเฟส และช่วยให้โครโมโซมหดตัวได้ดีทำให้เห็นรอยคอด (constriction) บนแท่งโครโมโซมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังช่วยลดความหนืดของไซโทพลาสซึมด้วย ในการตัดรากพืชสมุนไพรแต่ละครั้งจะตัดต้นละ 3-4 ราก แล้วแช่ไว้ในสารละลายอิ่มตัวของ alphabromonaphthalene ระยะเวลาในการ pretreat รากสมุนไพร แต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวงชีพเซลล์ของพืชนั้น ๆ คือ ประมาณ 22-32 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างรากไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แล้วนำรากไปฟิกซ์ใน กรดแอซิติก 90 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที (ถ้าแช่นานเกินไปจะทำให้โครโมโซมบวม) แล้วล้างรากด้วยเอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บตัวอย่างรากในเอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส ได้นาน 6-12 เดือน

2. การศึกษาจำนวนโครโมโซม

เทคนิคที่ใช้ศึกษาจำนวนโครโมโซมมีหลายวิธี จะเลือกใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่นำมาศึกษา ถ้าตัวอย่างเป็นดอกอ่อนที่มีเนื้อเยื่อบางจะใช้วิธี smear method ส่วนรากสมุนไพรเนื้อเยื่อมีความแข็งแรงกว่าต้องใช้วิธี feulgen squash โดยนำรากไป hydrolyse ให้เนื้อเยื่อนิ่มลง

2.1 Smear Method

เป็นวิธีที่ใช้ศึกษาโครโมโซมจากดอกอ่อน โดยนำดอกอ่อนที่เก็บไว้ใน เอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์มาส่องด้วยกล้อง dissecting microscope เพื่อแยกเอาอับเรณู 2-3 อัน วางบนแผ่นสไลด์หยด propionocarmine 1 หยด แล้วใช้เข็มแบ่งอับเรณูแต่ละอันออกเป็น 2 ส่วน กดอับเรณูให้ไมโครสปอร์โรไซต์หลุดออกมาแล้วคีบผนังอับเรณูทิ้ง นำสไลด์อุ่นไฟพอร้อนเป็นการช่วยให้โครโมโซมติดสีดีขึ้น และทำให้เซลล์พองตัว วางแผ่นแก้วปิดระวังไม่ให้มีฟองอากาศ นำสไลด์ที่เตรียมได้ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x10 และ x40 ถ้าพบเซลล์ที่มีการแบ่งนิวเคลียสระยะเมทาเฟสแรกซึ่งเห็นโครโมโซมคู่เหมือนจับกันเป็น bivalent หรือ multivalent ถ้าหากโครโมโซมกระจายดีวางกระดาษซับลงบนแผ่นแก้วปิดแล้วใช้หัวแม่มือกดเป็นการช่วยให้โครโมโซมอยู่ในระนาบเดียวกัน ในบางครั้งการเตรียมสไลด์มีปัญหาคือโครโมโซมไม่กระจาย ทำให้นับจำนวนได้ยากมีวิธีช่วยให้โครโมโซมกระจายได้โดยใช้กรดแอซิติก 45เปอร์เซ็นต์หยดลงข้างๆแผ่นแก้วปิดนำสไลด์ลนไฟพอร้อนเพื่อให้เซลล์พองตัวโครโมโซมก็จะหลุดออกจากบริเวณที่ทับกัน หลังจากนั้นใช้กระดาษซับกรดแอซิติกทิ้ง กดสไลด์อีกครั้งเพื่อให้โครโมโซมที่กระจายแล้วอยู่ในระนาบเดียวกัน ใช้ยาทาเล็บเคลือบริมขอบของแผ่นแก้วปิดนำสไลด์ ไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมภายใต้เลนส์วัตถุ กำลังขยาย x100 เลือกเซลล์ที่โครโมโซมกระจายชัดเจนมานับจำนวนโครโมโซม 10 เซลล์ เลือกเซลล์ที่สวยที่สุดมาถ่ายรูป ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Vanox-T โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 เพื่อเก็บผลการทดลอง

2.2 Feulgen squash method

วิธีนี้ใช้ศึกษาโครโมโซมจากโซมาติกเซลล์ เช่น เซลล์เจริญปลายราก โดยนำรากที่เก็บไว้ในเอทีลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ มาล้างน้ำให้สะอาด (ถ้ามีแอลกอฮอล์เหลืออยู่จะทำให้โครโมโซมไม่ติดสี) แล้วนำรากไป hydrolyse ด้วย N.HCl ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 8-10 นาที N.HCl ช่วยละลายผนังเซลล์ชั้น middle lamella ช่วยให้เซลล์กระจายได้ดี และทำให้เบส purine แยกจาก deoxyribose glucosidic bond ของดีเอ็นเอได้หมู่ aldehyde ซึ่งทำปฏิกริยากับสี basic fuchsin ของ Schiff reagent ให้สีม่วงแดง (กันยารัตน์ ไชยสุต 2532) ส่วนของโครโมโซมติดสีม่วงแดงเห็นได้ชัดเจนส่วนของไซโทพลาสซึมจะใส ถ้าใช้เวลาในการ hydrolyse น้อยเกินไป หมู่ aldehyde เกิดขึ้นน้อย จะทำให้โครโมโซมติดสีไม่ดีพอ แต่ถ้านานเกินไปเบส pyrimidine จะถูกแยกออกจากดีเอ็นเอทำให้โครโมโซมไม่ติดสีย้อม การติดสีของโครโมโซมขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (ถ้าอุณหภูมิไม่คงที่ การติดสีของโครโมโซมจะไม่สม่ำเสมอ) และเวลาในการ hydrolyse

พืชแต่ละชนิดใช้เวลาในการ hydrolyse ต่างกัน ในการศึกษาตัวอย่างพืชสมุนไพรแต่ละชนิดจึงต้องทดลองหาเวลาที่เหมาะสม โดยดัดแปลงเวลา hydrolyse 8, 9 และ 10 นาที แล้วสังเกตุเวลาที่โครโมโซมติดสีดีที่สุดเพื่อเป็นแนวทางในการ hydrolyse ครั้งต่อไป เมื่อ hydrolyse รากแล้วเท N.HCl ทิ้ง ย้อมรากด้วย Schiff's reagent เป็นเวลา 30 ถึง 120 นาที การติดสีของโครโมโซมของพืช แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบภายในเซลล์ รากที่ดีจะมีสีแดงภายในเวลา 10-15 นาที ย้ายรากจาก Shciff reagent ไปแช่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำแล้ว ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายรากเฉพาะส่วนที่มีสีแดง (บริเวณเนื้อเยื่อเจริญ) วางบนสไลด์ หยด propionocarmine 1 หยด แล้วใช้ปลายปากคีบขยี้ให้เนื้อเยื่อแยกเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางแผ่นแก้วปิดตรงบริเวณ ที่มีน้ำยาแล้วใช้กระดาษซับสีส่วนเกินออก ใช้แท่งเคาะโครโมโซม เคาะเบา ๆ บนแผ่นแก้วปิดบริเวณที่มีเนื้อเยื่อสีแดง จนกลุ่มเซลล์สีแดงกระจายแยกจากกัน นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศ์โดยใช้เลนซ์วัตถุกำลังขยาย x10 และ x40 ถ้าพบเซลล์ ที่มีการแบ่งนิวเคลียส ในระยะเมทาเฟส นำสไลด์มากดให้โครโมโซมอยู่ระนาบเดียวกัน ยาแผ่นแก้วปิดด้วยทาเล็บ นำไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 นับจำนวนโครโมโซมจาก 10 เซลล์ เลือกเซลล์ที่โครโมโซมกระจายอยู่ในระนาบเดียวกันมาถ่ายรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศ์ Vanox -T โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 เพื่อเก็บผลการทดลอง

หลังจากนับจำนวนโครโมโซมแล้ว สามารถเก็บสไลด์ไว้ศึกษาได้นาน ๆ โดยการนำสไลด์มาทำเป็นสไลด์ถาวรซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ทิ้งสไลด์ไว้ในตู้เย็น ช่องแช่แข็ง 1 คืน (ไม่ควรเกิน 1 สัปดาห์) แล้วนำสไลด์มาแช่ ในกรดแอซิติก 45 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 15 นาที แผ่นแก้วปิดจะร่อนออกจากสไลด์ จากนั้นนำสไลด์ และแผ่นแก้วปิด แช่ลงใน absolute ethyl alcohol 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10 นาที เพื่อไล่น้ำออกจากเซลล์, จุ่มสไลด์และแผ่นแก้วปิดลงใน xylene หยดeuparol 1 หยดบนสไลด์ ตรงตำแหน่งที่มเซลล์ แล้ววางแผ่นแก้วปิดทับที่ตำแหน่งเดิมทิ้งไว้จนสไลด์แห้งสไลด์ถาวรที่เตรียมได้นี้เก็บไว้ได้ 15 ปี (Dyer 1979) แผ่นสไลด์ที่ใช้ควรทำความสะอาดด้วย 95 เปอร์เซนต์ เอทีลแอลกอฮอล์ก่อนเพื่อกำจัดคราบฝุ่นและ ไขมัน เมื่อนำมาทำสไลด์ถาวรเซลล์จะเกาะติดแผ่นสไลด์ได้ดี