บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างเลือดจากสายสะดือเด็กแรกเกิดที่ปกติ จำนวน 200 คน แบ่งเป็นเพศหญิง 100 คน เพศชาย 100 คน คนละประมาณ 3 - 5 ml.

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด

2.2 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

2.3 เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงหนีศูนย์ (centrifuge)

2.4 เครื่องผสมชนิดกดปั่น

2.5 ตะเกียงแก๊ส

2.6 ตู้อบปรับอุณหภูมิ

2.7 ตู้ปลอดเชื้อ

2.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2.9 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

2.10 กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องตา กำลังขยาย 10 x 10 และ 10 x 100 พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

2.11 กล้อง sterio microscope พร้อม micrometer

3. เครื่องแก้ว

3.1 กระบอกตวงขนาดต่าง ๆ

3.2 ปิเปต ขนาด 0.1, 1 และ 5 ml.

3.3 พาสเตอร์ปิเปต (Pasteur pipette)

3.4 Coplin jar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมจุกยางชนิดทนความร้อน

3.6 หลอดแก้วกันแหลม ขนาด 12 - 15 ml.

3.7 สไลด์ชนิดปลายข้างหนึ่งหยาบ

3.8 หลอดแก้วเก็บตัวอย่างเลือดขนาด 5 ml.

4. น้ำยาและสารเคมี*

4.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ Ham-F 10 (GIBCO)

4.2 Phytohemagglutinin-M (GIBCO)

4.3 fetal bovine serum (GIBCO)

4.4 Sodium heparin

4.5 Sodium Penicillin, Streptomycin

4.6 $NaHCO_3$

4.7 colcemid

4.8 สารละลาย 0.075 M KCl

4.9 absolute methanol

4.10 glacial acetic acid

4.11 สารละลาย 0.2 N HCl

4.12 สารละลาย 0.07 N $Ba(OH)_2$

4.13 NaCl

4.14 KH_2PO_4

4.15 Na_2HPO_4

4.16 สี Giemsa

4.17 $K_2Cr_2O_7$

4.18 H_2SO_4 (conce)

---

* ดูรายละเอียดในภาคผนวก

5. วัสดุในการถ่ายและอัดภาพ

5.1 ฟิล์มขาวดำ Kodak technical pan 2415 (ESTAR-AH Base) ขนาด 36 รูป

5.2 กระดาษอัดรูป Kodak เบอร์ 3 ขนาด 5" x 7"

5.3 น้ำยาล้างรูป Kodak Dektol developer และน้ำยา Fixer

5.4 น้ำยาเคลือบรูป Kodak photo flow

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดของเด็กแรกเกิดที่ปกติจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, โรงพยาบาลศิริราช, โรงพยาบาลรามาธิบดี และ โรงพยาบาลราชวิถี โรงพยาบาลละ 50 คน แบ่งเป็นเพศชาย 25 คน และเพศหญิง 25 คน รวมตัวอย่างเลือดทั้งสิ้นเป็นเพศชาย 100 คน และเพศหญิง 100 คน เก็บตัวอย่างเลือดโดยวิธีปลอดเชื้อในหลอดแก้วที่มีฝาปิดซึ่งใส่ sodium heparin ป้องกันการแข็งตัวของเลือดอยู่ด้วย

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยวิธีปลอดเชื้อ ซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ Hungerford (1965) เติมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ 4.5 ml., เลือด 0.5 ml. และ phytohemagglutinin-M 0.1 ml. ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปิดจุกขวดให้แน่น ผสมให้เข้ากันดี เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 66 - 68 ชั่วโมง

3. การเตรียมสไลด์เพื่อใช้ในงานทดลอง

ทำความสะอาดสไลด์โดยแช่ในน้ำยา dichromate cleansing solution ให้ทั่วทั้งแผ่นเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลานาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง แล้วแช่สไลด์ในกระบะน้ำกลั่น เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซลเซียส

012551 i10296736

4. การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ครบ 66 ชั่วโมงแล้ว เติมสารละลาย colcemid เข้มข้น 1 µg/ml ปริมาณ 0.1 ml. มีความเข้มข้นครั้งสุดท้าย = 0.02 µg/ml เพื่อยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล เป็นการหยุดเซลล์ให้อยู่ในระยะเมตาเฟส เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อีก 2 ชั่วโมง

4.2 ถ่ายสารละลายทั้งหมดจากขวดเลี้ยงเซลล์ลงในหลอดแก้วก้นแหลม ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge มีแรงเหวี่ยงหนีศูนย์ 250 G นาน 10 นาที สารละลายในหลอดจะแยกเป็นส่วนเซลล์และส่วนน้ำยา ดูดเอาส่วนน้ำยาข้างบนทิ้งไป

4.3 เติมสารละลาย 0.075 M KCl ปริมาณ 5 ml. ลงไปในหลอดเพื่อให้เซลล์บวมตัว ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสข้างบนทิ้งไป

4.4 ค่อย ๆ หยด fixative* ทีละหยด ลงไปในหลอดขณะที่อยู่บนเครื่องผสม จนกระทั่งใส่ fixative ลงไปครบ 5 ml. นำไปปั่นแยกเอาส่วนใสทิ้งไป

4.5 เติม fixative ปริมาณ 5 ml. ลงไปในหลอด ปั่นแยกเอาส่วนใสทิ้งไป ทำเช่นนี้อย่างน้อย 2 ครั้ง

4.6 เติม fixative ปริมาณ 0.5 - 1.0 ml. เพื่อมิให้เซลล์หนาแน่นเกินไป

4.7 หยดสารละลายที่มีเซลล์อยู่นี้ด้วยพาสเตอร์ปิเปตลงบนสไลด์ที่แช่เย็น สไลด์ละ 2 หยด ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 5 - 7 วัน

5. การย้อมโครโมโซมโดยวิธี CBG ที่ปรับปรุงมาจากวิธีของ Sumner (1972)

5.1 นำสไลด์จากข้อ 4.7 มาแช่ใน 0.2 N HCl ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่น

5.2 แช่สไลด์ใน 0.07 N $Ba(OH)_2$ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำขึ้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

---

* fixative ประกอบด้วย glacial acitic acid 1 ส่วน methylalcohol 3 ส่วน

5.3 แช่สไลด์ในสารละลาย 2XSSC ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างน้ำกลั่น

5.4 ย้อมสไลด์ด้วย 5 % Giemsa นาน 7 นาที ล้างน้ำแล้วผึ่งให้แห้ง

6. การตรวจสอบโครโมโซม

6.1 ตรวจดูโครโมโซมบนสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 10 x 10 และ 10 x 100 เลือกโครโมโซมในระยะเมตาเฟสที่มีรูปร่างยืดยาวและการกระจายตัวดี ดู C-band ของโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 และ 16

6.2 ถ่ายภาพของเซลล์เหล่านี้ไว้ด้วยกำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 10 x 100 เท่า ด้วยฟิล์มขาวดำ ASA 125 ถ่ายภาพตัวอย่างละ 5 เซลล์

6.3 นำฟิล์มมาล้างด้วยน้ำยา D-19 แล้วอัดภาพให้ขยายเพิ่มขึ้นจากเดิม 4 เท่า

6.4 นำภาพขยายนี้มาวัดความยาว C-band ของโครโมโซม คู่ที่ 1, 9, 16 และความยาวของแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 16 ด้วย occular micrometer ใน stereo microscope บันทึกผล แล้วจัดแยกขนาดของ C-band ออกเป็น 5 ระดับ ตามมาตรฐานของ Patil and Lubs (1977)

6.5 นำภาพขยายนี้มาตรวจสอบตำแหน่งของ C-band บนโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 และ 16 เพื่อดูว่ามี inversion เกิดขึ้นหรือไม่ โดยจัดแยกตำแหน่งของ C-band ออกเป็น 3 ระดับ ตามมาตรฐานของ Buckton และคณะ (1976)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แบ่งการพิจารณาเป็น 2 ลักษณะคือ การแปรของขนาด C-band และการแปรของตำแหน่ง C-band

7.1 การแปรของขนาด C-band แบ่งการพิจารณาเป็น 2 ลักษณะคือ พิจารณาโครโมโซมแต่ละแท่ง และพิจารณาคู่ homologous chromosome

7.1.1 พิจารณาโครโมโซมแต่ละแท่ง (Individual chromosome)

7.1.1.1 หาระดับความยาว C-band ที่มีความถี่มากที่สุดของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9, 16 ทั้งในหญิงและชาย

7.1.1.2 หาค่าเปอร์เซ็นต์เฮเทอโรมอร์ฟิล์มของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9, 16 ทั้งในหญิงและชาย โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Verma และคณะ (1979)

7.1.1.3 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาด C-band ที่ระดับต่าง ๆ ของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9 และ 16 ระหว่างหญิงและชาย โดยเปรียบเทียบทีละระดับและทีละโครโมโซม

7.1.1.4 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์เฮเทอโรมอร์ฟิล์มของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9, 16 ระหว่างหญิงและชาย โดยเปรียบเทียบทีละแท่งของโครโมโซม

7.1.2 พิจารณา homologous chromosome

7.1.2.1 หาระดับขนาด C-band ที่มีความถี่มากที่สุดของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ในหญิงและชาย

7.1.2.2 หาเปอร์เซ็นต์เฮเทอโรมอร์ฟิล์มของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ในหญิงและชาย โดยใช้หลักที่ว่า หากแต่ละแท่งของโฮโมโลกัสโครโมโซมมีขนาดของ C-band ต่างระดับกัน ถือว่าบุคคลนั้นมีเฮเทอโรมอร์ฟิล์มของโครโมโซมคู่นั้น

7.1.2.3 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาด C-band ของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ระหว่างหญิงและชาย โดยเปรียบเทียบทีละคู่ระดับ

7.1.2.4 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์เฮเทอโรมอร์ฟิล์มของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ระหว่างหญิงและชาย โดยเปรียบเทียบทีละคู่ของโครโมโซม

7.2 การแปรที่เกี่ยวกับตำแหน่งของ C-band แบ่งการพิจารณาเป็น 2 ลักษณะคือ พิจารณาโครโมโซมแต่ละแท่ง และพิจารณาคู่ homologous chromosome

7.2.1 พิจารณาโครโมโซมแต่ละแท่ง

7.2.1.1 หาระดับอินเวอร์ชั่นที่มีความถี่สูงสุดของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9, 16 ในหญิงและชาย

7.2.1.2 หาเปอร์เซ็นต์อินเวอร์ชั่นของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9, 16 ในหญิงและชาย

7.2.1.3 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์อินเวอร์ชั่นของโครโมโซมแท่งที่ 1, 9, 16 ระหว่างหญิงและชาย โดยเปรียบเทียบทีละแท่งของโครโมโซม

7.2.2 พิจารณา homologous chromosome

7.2.2.1 หาว่าการจับคู่ของอินเวอร์ชั่นระดับใดที่มีความถี่มากที่สุดของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ในหญิงและชาย

7.2.2.2 หาค่าเปอร์เซ็นต์อินเวอร์ชั่นของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ในหญิงและชาย

7.2.2.3 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์อินเวอร์ชั่นของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1, 9, 16 ระหว่างหญิงและชายโดยเปรียบเทียบทีละคู่ของโครโมโซม

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ Chi-square test (Steel and Torrie, 1960) ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$X^2_{cal} = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

degree of freedom = $(r-1)(c-1)$

ถ้าหากค่าที่ได้จากการสังเกตมีจำนวนน้อยกว่า 5 หรือมีค่า degree of freedom = 1 ต้องมีการแก้ไขโดยใช้ Yates' correction for continuity ซึ่งมีสูตรว่า

$$X^2 \text{ (corrected)} = \sum_{i} \frac{(|O_i - E_i| - 0.5)^2}{E_i}$$

อธิบายคำย่อ

X^2_{cal} = ค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้

O_i = ค่าที่ได้จากการสังเกต (observed value)

E_i = ค่าที่คาดว่าจะได้ (expected value)

r = จำนวนแถวของข้อมูลในตาราง

c = จำนวนสดมภ์ของข้อมูลในตาราง

คำนวณค่า E_i จากสูตร $E_i = \frac{\text{ผลรวมของแถว} \times \text{ผลรวมของสดมภ์}}{\text{ผลรวมทั้งหมด}}$