บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ตัวอย่างเลือดจากคนปกติจำนวน 40 คน และผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกจำนวน 50 คน คนละประมาณ 3 - 5 ml

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด

2.2 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2.4 ตะเกียงอัลกอฮอล์

2.5 ตู้ปลอดเชื้อ

2.6 ตู้อบปรับอุณหภูมิ

2.7 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ

2.8 เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงหนีศูนย์ (centrifuge)

2.9 เครื่องผสมชนิดกดปั่น

2.10 กล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา กำลังขยาย 10 X 10 และ 10 X 100 พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

2.11 occular micrometer

3. เครื่องแก้ว

3.1 กระบอกตวง

3.2 ปิเปตขนาด 0.1 , 1 และ 5 ml

3.3 ปาสเตอร์ปิเปต (Pasteur pipette)

3.4 coplin jar

3.5 ขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมจุกยางชนิดทนความร้อน

3.6 หลอด centrifuge ขนาด 12 - 15 ml

3.7 สไลด์

3.8 หลอดแก้วเก็บตัวอย่างเลือดขนาด 5 ml

4. น้ำยาและสารเคมี *

4.1 อาหารเลี้ยงเซลล์

4.2 phytohemagglutinin - P (Gibco)

4.3 สารละลาย 0.075 M KCl

4.4 fixative

4.5 สารละลาย 0.2 N HCl

4.6 สารละลาย 0.07 N $Ba(OH)_2$

4.7 2 X SSC

4.8 Giemsa staining solution

4.9 น้ำยาล้างเครื่องแก้ว (dichromate cleansing solution)

4.10 สารละลาย colchicine

4.11 sodium heparin

5. วัสดุในการถ่ายภาพ

5.1 ฟิลม์ขาวดำ ขนาด 36 รูป ชนิด technical pan และ panatomic - X

---

* ดูรายละเอียดจากภาคผนวก

5.2 กระดาษอัดรูปเบอร์ 3 ขนาด 5" X 7"

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก และคนปกติที่มารับการรักษาและตรวจร่างกาย ที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เป็นจำนวนคนละประมาณ 3 – 5 ml โดยวิธีการปลอดเชื้อ ใส่ในหลอดแก้วที่มีฝาปิด ที่มีสาร sodium heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดในปริมาณ 10 IU/ml คนปกติที่ใช้เป็น control นี้ต้องเป็นหญิงที่ผ่านการสมรสแล้ว และมีอายุ 55 ปีขึ้นไป ทั้งคนไข้และคนปกติทุกคนที่เก็บตัวอย่างเลือดต้องตรวจสอบประวัติ ผลการตรวจโรคมะเร็งปากมดลูกจากห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยาทุกคน

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีการของ Hungerford (1965) ดังนี้คือ โดยใช้วิธีการปลอดเชื้อ เติมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 ml เลือด 0.5 ml phyte-hemagglutinin-P 0.025ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปิดจุกขวดให้แน่น เขย่าเพื่อให้สารต่างๆ ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37° C นาน 64 ชั่วโมง

3. การเตรียมสไลด์เพื่อใช้ในงานทดลอง

การเตรียมสไลด์ที่สะอาดทำโดยแช่สไลด์ในน้ำยา dichromate cleansing ให้ทั่วทั้งแผ่นเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างน้ำประปาที่ไหลรินตลอดเวลา เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ผ่านน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วจึงแช่สไลด์ในน้ำกลั่นในกะบะแช่สไลด์ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° – 8° C

4. การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

4.1 เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ครบ 64 ชั่วโมงแล้ว นำมาเติมสารละลาย colchicine จำนวน 0.3ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อทำลายเส้นใยสปินเดิล เป็นการหยุด

การแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะเมตาเฟส เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37° C อีก 1 ชั่วโมง

4.2 เทของทั้งหมดจากขวดเพาะเลี้ยงลงในหลอด centrifuge ซึ่งเขียนหมายเลขของตัวอย่างเลือดไว้ตรงกัน ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ของในหลอดจะแยกตัวออกเป็นส่วนเซลล์และน้ำยาดูดส่วนน้ำยาทิ้งไป

4.3 เติมสารละลาย 0.075M KCl จำนวน 5 ml ลงไปเพื่อทำให้เซลล์รวมตัวผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นแยกส่วนน้ำยาทิ้งไป

4.4 ค่อยๆ หยด fixative ลงไปทีละหยดในขณะที่หลอด centrifuge นั้นอยู่ในเครื่องกดปั่น จนได้น้ำยาหลอดละ 5 ml แล้วปั่นแยกส่วนน้ำยาทิ้งไป

4.5 เติม fixative ลงไปอีก 5 ml ปิดปากหลอด แล้วเก็บในตู้เย็นอย่างน้อย 30 นาที

4.6 นำมาปั่นแยกส่วนน้ำยาทิ้งไป เติม fixative อีก 5 ml ปั่นแยกน้ำยาทิ้งไป

4.7 เติม fixative ประมาณ 0.5 – 1.0 ml เพื่อผสมกับกลุ่มเซลล์เป็น cell suspension

4.8 หยด cell suspension ด้วย ปาสเตอร์ปิเปตลงบนสไลด์ที่แช่เย็นและนำขึ้นจากน้ำพอหมาดแผ่นละ 2 หยด เพื่อให้เซลล์แตกตัวและโครโมโซมกระจายตัวบนสไลด์ ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5. <u>การย้อมโครโมโซมโดยวิธี C-banding</u>

5.1 นำสไลด์จากข้อ 4.8 มาแช่ใน 0.2 N HCl ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง นำขึ้นล้างน้ำ

5.2 แช่สไลด์ใน 0.07N $Ba(OH)_2$ ที่อุณหภูมิ 50° C นาน 5–15 นาที นำขึ้นมาล้างน้ำหลายๆ ครั้ง

009835

i17930960

5.3 แช่สไลด์ใน 2 X SSC ที่อุณหภูมิ 60° C นาน 1 ชั่วโมง นำขึ้นมาล้างน้ำ

5.4 ย้อมสไลด์ด้วย 2% Giemsa นาน 1½ ชั่วโมง ล้างน้ำแล้วผึ่งให้แห้ง

6. การตรวจสอบโครโมโซม

การตรวจสอบโครโมโซมที่ย้อมแล้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา กำลังขยาย 10 X 10 และ 10 X 100 เลือกดูโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ที่มีการกระจายตัวของโครโมโซมดี ดู C-band ของโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 และ 16 ถ่ายภาพโครโมโซมในระยะนี้จากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 10 X 100 ตัวอย่างละ 3-5 เซลล์ โดยฟิล์มขาวดำ ASA 125 ล้างฟิล์มด้วยน้ำยา D-19 อัดภาพขยายเพิ่มขึ้นจากเดิม 4 เท่า นำภาพขยายมาวัดความยาวของ C-band ของโครโมโซมคู่ที่ 1, 9 และ 16 และความยาวของแขนสั้นของโครโมโซมหมายเลข 16 ทั้งคู่ด้วย eccular micrometer บันทึกผล

7. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จัดขนาดของ C-band เป็นระดับต่างๆ ตามมาตรฐานของ Patil และ Lubs (1977) และเปรียบเทียบความแตกต่างของ C-band ของโครโมโซมหมายเลข 1, 9 และ 16 ระหว่างผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกและ control โดยแยกพิจารณาใน 3 ลักษณะ คือ

7.1 เปรียบเทียบการกระจายตัวของขนาด C-band ของโครโมโซมหมายเลข 1, 9 และ 16 ทีละหมายเลข

7.2 เปรียบเทียบ heteromorphism ของโครโมโซมหมายเลข 1, 9 และ 16 ทีละหมายเลข โดยพิจารณาในด้านขนาด คือ ถ้าโครโมโซมคู่นั้นมีขนาดของ C-band ต่างกันมากกว่า 25% ถือว่ามี polymorphism

7.3 เปรียบเทียบ heteromorphism ของโครโมโซมหมายเลข 1, 9 และ 16 ทีละหมายเลข โดยพิจารณาตำแหน่งของ C-band ปกติจะพบ C-band อยู่บนแขนยาวของโครโมโซมใกล้บริเวณ เซนโตเมียร์ ถ้ามีส่วนของ C-band เกิด inversion กลับขึ้นไปเป็นบางส่วน (partial inversion) หรือกลับขึ้นไปทั้งหมด (total inversion)

การเกิด inversion ของ C-band นี้จัดเป็น heteromorphism ในด้านตำแหน่ง

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ ไคสแควร์ (Chi - square test) ซึ่งมีสูตร ดังนี้

χ^2 = $(O-E)^2$, d.f. = (R-1) (C-1)

χ^2 = ค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้

O = ค่าที่ได้จากการสังเกต (Observed value)

E = ค่าที่คาดว่าจะได้ (Expected value)

R = จำนวนแถวของข้อมูลในตาราง

C = จำนวนสดมภ์ของข้อมูลในตาราง

d.f. = ขั้นแห่งความเป็นอิสระ (degree of freedom)

$E = \frac{\text{ผลรวมของแถว} \times \text{ผลรวมของสดมภ์}}{\text{ผลรวมทั้งหมด}}$

ถ้าค่าที่ได้จากการสังเกตมีจำนวนน้อยกว่า 5 ทดสอบไคสแควร์ โดยใช้สูตร

$\chi^2 = \frac{(O-E-0.5)^2}{E}$