**บทที่ 3**

**วิธีดำเนินการวิจัย**

 การดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การเก็บตัวอย่าง การเตรียมโครโมโซม และการตรวจสอบโครโมโซม

**3.1 การเก็บตัวอย่าง**

 เก็บตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิด เพื่อนำมาศึกษาโครโมโซมในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

**3.2 การเตรียมโครโมโซม**

 **3.2.1 เตรียมโดยวิธีทางตรง (direct method)**

 1. ชั่งน้ำหนักตัวของสัตว์ตัวอย่างเพื่อทำการฉีดโคลซิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 0.01 % ปริมาณ 1 ml. ต่อ 100 g ของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง

 2. ฉีดโคลซิซินความเข้มข้น 0.01 % เพื่อยับยั้งการทำงานของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องของสัตว์ตัวอย่างทิ้งไว้นาน 18 – 20 ชั่วโมง

 3. จากนั้นใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดกระดูกขาหน้าและขาหลัง พยายามเลาะกล้ามเนื้อออกจากกระดูกให้หมด จากนั้นตัดกระดูกส่วน อิพิไฟซิส (Epiphysis) ออกดันเอาไขกระดูกมาจากโพรงกระดูกด้วยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCL) 0.075 M ที่บรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยาที่มีเข็มติดอยู่ออก แล้วแช่ไขกระดูกที่ได้ไว้ในโพแทสเซียมคลอไรด์ ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ (Petri dish)

 4. ใช้กรรไกรผ่าตัดสับเซลล์ไขกระดูกให้ละเอียดอย่างน้อย 15 นาที แล้วจึงบ่มเซลล์ไขกระดูกในโพแทสเซียมคลอไรด์ที่อุณภูมิห้องต่ออีก 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์บวมซึ่งจะทำให้โครโมโซมกระจายตัวดี

5. นำเอาไขกระดูกที่ได้ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 14 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,600 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ดูดส่วนที่ใส (Supematant) ทิ้งให้เหลือปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว

6. ทำการตรึงเซลล์ (Fixative) ที่มีอัตราส่วนของ metanol : acetic acid เป็น 3:1 ที่เตรียมใหม่และเย็น (Fresh cold fixative) ใช้หลอดหยดน้ำยาตรึงเซลล์ทีละหยด ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรจนได้ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีก 2-3 รอบ เพื่อล้างตะกอนเซลล์จนกว่าจะได้ตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด

7. ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ หยดลงสไลค์ที่สะอาดและเย็น โดยหยดให้สูงจากสไลค์ 2-3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตก และโครโมโซมแผ่กระจายดี ทำการผึ่งสไลด์ให้แห้ง

8. นำไปย้อมด้วยสีจิมซ่า 20 % แช่สไลค์นาน 20-45 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ผี่งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปศึกษาโครโมโซมต่อไป

**3.3 การตรวจสอบโครโมโซม**

 3.3.1 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐาน

 ประกอบด้วยขั้นตอนการตรวจสอบโครโมโซม จัดคาริโอไทป์ และสร้างอิดิโอแกรมมาตราฐานดัดแปลงจากวิธีการของกันยารัตน์ ไชยสุต (2532)

 1) การตรวจสอบโครโมโซมเลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกันนำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 100X โดยใช้ชุดถ่ายภาพที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ หรือใช้กล้องดิจิตอล เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซมจำนวน 100 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และศึกษาโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; LI) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (total length; LT , LT = Ll + Ls) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (Cl) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

 2) การจัดทำคาริโอไทป์ ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามเรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

 **3.2.3 การจัดทำคาริโอไทป์มาตราฐาน**

 1) เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายที่ดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวนชนิดละ 10 เซลล์

2) ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การวัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายทีละแท่ง กำหนดหมายเลยให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้างและความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

3) การคำนวณหาค่า relative length (RL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

ค่า relative length (RL) = ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)

 ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง (∑LT)

 การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซมเพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

4) การคำนวณหาค่า centromeric index (CL) คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

ค่า centromeric index (CL) = ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Ll)

 ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)

 นำค่า Cl ที่ได้มาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

 ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.500-0.599 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก

 ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.600-0.699 จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนตริก

 ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.700-0.899 จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก

 ค่า Cl อยู่ระหว่าง 0.900-1.000 จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

 5) การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้ โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

 โครโมโซมขนาดใหญ่ (large = L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

ดังนั้น L > LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย

2

 โครโมโซมขนาดกลาง (medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

ดังนั้น M < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1 + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย

2

 โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

ดั้งนั้น S < LT เฉลี่ยคู่ที่ 1

2

 6) จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามชนิดของโครโมโซมก่อน แล้วค่อยเรียงตามความยาวของ โครโมโซม แต่ละคู่จากมากไปหาน้อยยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลยของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่างวางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

 **3.3.3 การทำอิดิโอกรมมาตรฐาน**

 อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสชนิดละ 10 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนียร์ (vernier) จัดทำภาพวาด อิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003