# บทที่ 3
# วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาพันธุศาสตร์เซลล์ของสัตว์วงศ์เสือ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดเสือทั้ง 6 ชนิด จากสวนสัตว์ในสังกัดองค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย แสดงไว้ดังตารางที่ 1 จากนั้นนำกลับมาเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการเก็บตัวอย่างเลือดของสัตว์ทดลองทั้ง 6 ชนิด ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณต้นขาด้านใน (femoral vein) และบริเวณลำคอ (jugular vein) การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมโครโมโซม การตรวจสอบโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

**ตารางที่ 1** แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างของสัตว์วงศ์เสือที่ใช้ในการศึกษา

| ชนิดของเสือ | เพศ | | สถานที่เก็บ | |
|---|---|---|---|---|
| | ผู้ | เมีย | สวนสัตว์นครราชสีมา | สวนสัตว์สงขลา |
| แมวดาว | 3 | 2 | 2 | 3 |
| เสือดาว | 1 | 1 | - | 2 |
| เสือลายเมฆ | 1 | 1 | 2 | - |
| เสือกระต่าย | 2 | 2 | - | 4 |
| เสือไฟ | - | 1 | - | 1 |
| เสือปลา | - | 1 | - | 1 |

## 3.1 การเตรียมโครโมโซม

วิธีดำเนินการวิจัยดัดแปลงจาก อมรา คัมภิรานนท์ (2546) และ Rooney (2001) ดังนี้

### 3.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte culture)

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ jugular vein เก็บเลือดในหลอดสุญญากาศ (vacuum tube) ที่มีสารเฮปาริน (heparin) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว RPMI 1640 ใช้สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ PHA เสร็จแล้วแบ่งอาหารลงขวดเพาะเลี้ยงขวดละ 7.5 มล.

ใส่เลือด 15 หยด (ประมาณ 2 cc) บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าเลือดทุกเช้าเย็น ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ประมาณ 30 นาที หยดสารโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ปริมาณ 100 ไมโครลิตร (µl) เขย่าให้โคลชิซินละลายจนทั่ว นำเข้าตู้บ่มบ่มอีก 30 นาที ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ระหว่างชั่วโมงที่ 68-72

**3.1.2 การ synchronization (ในกรณีที่ศึกษาโครโมโซมในระยะโพรเฟสตอนปลาย)**

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวครบ 48 หรือ 72 ชั่วโมง เติม methotrexate ($10^{-5}$M) 0.05 มล. (62.5 nM) เพื่อชักนำให้เกิด synchronization โดยทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ S-phase นำเข้าตู้บ่มนาน 17 ชั่วโมง แล้วล้าง methotrexate โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 รอบต่อนาที (530xg) ดูดส่วนใสทิ้ง (supernatant) เติม RPMI 1640 5.0 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,800 รอบต่อนาที (530xg) แล้วล้างซ้ำอีก 1 รอบ ทำการปลดปล่อย (release) เซลล์ โดยเติม thymidine 0.2 มล. (250 nM) เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เกิดขึ้นพร้อมกัน นำเข้าตู้บ่มนาน 5 ชั่วโมง 10 นาที เมื่อครบเวลาให้เก็บเกี่ยวเซลล์ทันที

**3.1.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvesting)**

เมื่อครบชั่วโมงเก็บเกี่ยวเซลล์ แยกเซลล์เม็ดเลือดออกจากอาหารเพาะเลี้ยง โดยย้ายสารละลายเลือดลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 มล. จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที (100xg) เป็นเวลา 5-10 นาที นำมาดูดส่วนใสทิ้งไปทำให้เซลล์พองโตกว่าเดิมเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัวดี โดยการเติม 0.075 M KCl ซึ่งเป็น hypotonic solution จำนวน 10 มล. ลงในตะกอนเม็ดเลือด แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาแยกเอา KCl ออกโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 รอบ/นาที (100xg) เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป ตรึงเซลล์ (fixation) โดยเติม fresh cold fixative ซึ่งเป็น methanol: glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3: 1 จนได้ตะกอนขาวที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไปเกือบหมดเหลือไว้เหนือเซลล์ประมาณ 0.5–1 มล. เติม fixative อีกประมาณ 1–2 มล. (ขึ้นกับปริมาณตะกอนเซลล์) ผสมให้เข้ากันดี หยดสารละลายตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวบนสไลด์ที่สะอาดทิ้งสไลด์ให้แห้ง จึงนำมาตรวจโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกสไลด์ที่โครโมโซมกระจายไว้ย้อมสี

**3.1.4 การย้อมสีโครโมโซม**

**3.1.4.1 การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา**

ย้อมสีโครโมโซมแบบแบบธรรมดาด้วยสีจิมซ่า 10% ชนิด stock Giemsa's solution นาน 15–20 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำโครโมโซมไปศึกษาต่อไป

**3.1.4.2 การย้อมแถบสีแบบจี**

นำสไลด์ที่ต้องการย้อมอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 3 วัน เตรียม trypsin EDTA 0.025% ทำการอุ่น trysin ให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเร่งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ นำสไลด์ที่ต้องการย้อมมาหยด trypsin ให้ท่วมสไลด์ ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 วินาที หยุดการทำงานของ trypsin โดยใช้ Sorensen buffer จากนั้นนำสไลด์ไปย้อมสีจิมซ่า 10% ประมาณ 15-20 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ไปศึกษาต่อไป

## 3.2 การตรวจสอบโครโมโซม จัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

การตรวจสอบโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์ และการจัดอิดิโอแกรม ดัดแปลงมาจาก กันยารัตน์ ไชยสูต (2532) และ Wurster-Hill and Centerwall (1982)

### 3.2.1 การตรวจสอบโครโมโซม

เมื่อนับจำนวนโครโมโซมครบแล้ว ถ่ายภาพโครโมโซมโดยด้วยเลนส์วัตถุกำลังขยาย x100 นำฟิล์มที่ล้างแล้วมาอัดรูป นำภาพไปขยาย 4,000 เท่า ใช้รูปถ่ายนี้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน และศึกษาโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (length long; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (length short; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (length total; LT, LT = Ll + Ls) จากนั้นทำการศึกษาหาค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) เพื่อหาชนิดของโครโมโซม

### 3.2.2 การจัดทำคาริโอไทป์

คาริโอไทป์ คือ การศึกษารายละเอียดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยการศึกษารูปร่าง ขนาด จำนวนของโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์จะใช้โครโมโซมระยะเมทาเฟสเพียง 1 เซลล์ เป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เซลล์ที่นำมาจัดจะต้องเป็นเซลล์ที่ไม่มีความผิดปกติ

ขั้นตอนในการจัดทำคาริโอไทป์

1. เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่สั้นมากและไม่ยาวมาก มีการกระจายตัวดี และสามารถนับจำนวนได้ ทำการถ่ายภาพที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกถ่ายภาพให้ได้มากที่สุด

2. ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่ของโครโมโซมโดยจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยดูจากขนาดและรูปร่าง และตำแหน่งของเซนโตรเมียร์เป็นหลัก จากนั้นทำการวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมทั้ง 2 ข้างของโครโมโซมทุกแท่ง โดยจะต้องกำหนดหมายเลขของโครโมโซมทุกแท่ง

ก่อน และทำการตรวจสอบโครโมโซมที่ทำการจับคู่ในเบื้องต้นว่ามีขนาดใกล้เคียงกันหรือไม่ ทำการจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันไว้เป็นคู่เดียวกัน

3. การคำนวณหาค่า relative length (RL)

ค่า relative length (RL) = $\frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง } (\sum LT)}$

ค่า relative length (RL) สามารถใช้ในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า relative length (RL) ของโครโมโซมจะคงที่ในทุกๆเซลล์ ส่วนค่าความยาวจะแตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์

4. การคำนวณหาค่า centromeric index (CL)

ค่า centromeric index (CI) = $\frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแขนข้างยาว (LI)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$

กำหนดชนิดของโครโมโซมจากค่า CI ดังต่อไปนี้

| ค่า CI | ชนิดของโครโมโซม |
|---|---|
| 0.500-0.599 | เมทาเซนทริก |
| 0.600-0.699 | ซับเมทาเซนทริก |
| 0.700-0.899 | อะโครเซนทริก |
| 0.900-1.000 | เทโลเซนทริก |

5. การกำหนดขนาดของโครโมโซม นำค่าที่วัดได้จากเซลล์เมทาเฟสมาเป็นตัวกำหนด และจัดจำแนกออกเป็น 3 ขนาด ดังนี้

โครโมโซมขนาดใหญ่ (L)

> (LT เฉลี่ยคู่ที่ใหญ่ที่สุด + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย) / 2

โครโมโซมขนาดกลาง (M)

< (LT เฉลี่ยคู่ที่ใหญ่ที่สุด + LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย) / 2

โครโมโซมขนาดเล็ก (S)

< LT เฉลี่ยคู่ที่ใหญ่ที่สุด / 2

6. การจัดเรียงคาริโอไทป์

การจัดคาริโอไทป์โดยจัดเรียงเป็นกลุ่มออกเป็น 6 กลุ่ม แบ่งกลุ่มตามชนิดและขนาดของโครโมโซมและโครโมโซมเพศจัดไว้เป็นคู่สุดท้าย ทำการจัดคาริโอไทป์ตามมาตรฐานของแมวบ้าน โดยดัดแปลงการจัดคาริโอไทป์จากรายงานของ Wurster-Hill and Centerwall (1982) ดังนี้

กลุ่ม A เป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ และขนาดกลาง จำนวน 3 คู่

กลุ่ม B เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนตริกขนาดใหญ่ และขนาดกลาง จำนวน 4 คู่

กลุ่ม C เป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริกขนาดใหญ่ และขนาดกลาง จำนวน 2 คู่

กลุ่ม D เป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนตริกขนาดเล็ก จำนวน 4 คู่

กลุ่ม E เป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริกขนาดเล็ก จำนวน 3-4 คู่

กลุ่ม F เป็นโครโมโซมชนิดทีโลเซนตริกขนาดเล็ก จำนวน 1-2 คู่

**3.2.3 การทำอิดิโอแกรม**

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ (โครโมโซมเอ็กซ์ และวาย) โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ จากเซลล์ระยะเมทาเฟส และเซลล์ในระยะก่อนเมทาเฟสที่ทำการย้อมสีแบบธรรมดา และแถบสีแบบจีของเสือแต่ละชนิด อย่างน้อยชนิดละ 10 เซลล์ การจัดทำอิดิโอแกรม ทำการจัดตามการเรียงของคาริโอไทป์แบ่งภาพวาดโครโมโซมออกเป็น 6 กลุ่ม และให้โครโมโซมเพศเป็นคู่สุดท้าย ภาพวาดโครโมโซมที่ได้ได้มาจากเซลล์เมทาเฟสจำนวน 10 เซลล์ ซึ่งจัดทำได้ดังนี้

**3.2.3.1 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา**

ใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสจากการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาเพศละ 10 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยไม้บรรทัดเวอร์เนียร์ (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาวัดกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศเอ็กซ์ และวายจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003

**3.2.3.2 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบจี**

ใช้เซลล์ระยะเมทาเฟสจากการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบจี 10 เซลล์ นำมาจัด คาริโอไทป์ สังเกตแถบสีที่ปรากฏบนแท่งโครโมโซม ซึ่งมีทั้งแถบมืด และแถบสว่าง แล้ววัดความยาวของแถบมืด และแถบสว่างด้วย เวอร์เนียร์ กรอกข้อมูลความยาวแถบมืด และแถบสว่างในโปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 แล้ววาดกราฟเป็นแท่งโครโมโซมแต่ละแท่งเรียงลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศเอ็กซ์ และวายจัดเป็นคู่สุดท้าย นำมาปรับรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Powerpoint XP/2003 จากนั้นกำหนด landmark และ region โดย landmark หมายถึงสิ่งที่

ปรากฏอยู่บนโครโมโซมที่สามารถแบ่งโครโมโซมแต่ละแท่งออกเป็นส่วนกว้าง ๆ ได้แก่ เซนโทรเมียร์ เทโลเมียร์ และแถบสีที่มีขนาดใหญ่ ส่วน region หมายถึงช่วงที่อยู่ระหว่าง 2 landmark ที่อยู่ติดกัน มาการกำหนดเลขของ region ให้มีเลขที่เป็น 1, 2, 3...n โดยลำดับที่ 1 จะอยู่ติดกับเซนโทรเมียร์ และลำดับต่อไปจะถัดออกไปตามแขนทั้งสองข้างของโครโมโซม ภายใน region นี้จะมีการกำหนดลำดับเลขของแถบมืด และแถบสว่าง ให้เริ่มจาก 1, 2, 3,...n โดยลำดับที่ 1 จะอยู่ติดกับเซนโทรเมียร์ และลำดับต่อไปจะถัดออกไปตามแขนทั้งสองข้างของโครโมโซม เมื่อขึ้น region ใหม่ก็ให้เริ่มกำหนดลำดับเลขของแถบมืดและแถบสว่างเป็น 1, 2, 3,...n ใหม่

**3.2.4.3 อิดิโอแกรมจากการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง**

ใช้เซลล์ระยะโพรเมทาเฟสจากการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง 10 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ สังเกตแถบสีที่ปรากฏบนแท่งโครโมโซม วัดความยาวของแถบมืด และแถบสว่างด้วยเวอร์เนียร์ วาดแท่งโครโมโซม กำหนด landmark, region และ band เช่นเดียวกับการทำอิดิโอแกรมจากการย้อมแถบสีแบบจี เปรียบเทียบกับอิดิโอแกรมจากการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบจี สังเกตว่ามีแถบสีใดแยกออกมา ให้กำหนดแถบนั้นเป็นแถบย่อย (subband) โดยจะใส่จุดตามหลังเลขของ band ที่แถบย่อยนั้นแยกออกมาเป็น .1, .2, .3...n โดยลำดับที่ .1 จะอยู่ติดกับเซนโทรเมียร์ และลำดับต่อไปจะถัดออกไปตามแขนทั้งสองข้างของโครโมโซม

## 3.3 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะคาริโอไทป์

เมื่อจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรมเสร็จแล้ว ทำการเปรียบเทียบโครโมโซม ดังนี้

3.3.1 เปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง และชนิดของโครโมโซมทั้งโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ ทุกแท่งของเสือทั้ง 6 ชนิด จากการย้อมสีแบบธรรมดา

3.3.2 เปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง และชนิดของโครโมโซมทั้งโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ ทุกแท่งของเสือทั้ง 6 ชนิด จากการย้อมแถบสีแบบจี

3.3.3 เปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง และชนิดของโครโมโซมทั้งโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ ทุกแท่งของเสือทั้ง 6 ชนิด จากการย้อมแถบสีแบบจีที่ให้รายละเอียดสูง

3.3.4 เปรียบเทียบลักษณะโครโมโซมที่ได้จากการย้อมแถบสีแบบจีของเสือทั้ง 6 ชนิด กับคาริโอไทป์ของแมวบ้านที่อ้างอิงจาก Nie et al. (2002) โดยศึกษาจากแถบสีที่ปรากฏบนแท่งโครโมโซม และแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มโครโมโซมที่เหมือนกัน กลุ่มโครโมโซมที่คล้ายกัน และกลุ่มโครโมโซมที่แตกต่างกัน