ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารเคมี

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุอุปกรณ์

- ตู้เย็น
- อ่างน้ำอุ่น (water bath)
- เครื่อง vortex mixture
- ตู้เพาะเลี้ยง (incubator)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูป
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical)
- เครื่องกรองสาร และ millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- โถสำหรับย้อมสี (staining jar)
- Automicropipette, micropipette tips และ pipette ขนาดต่าง ๆ
- กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ
- หลอดสุญญากาศ (vacuum tube) ขนาด 10 มล. ที่เคลือบด้วยเฮปาริน (heparin)
- ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 และ 15 มล.
- ขวดเก็บ media ขนาด 1000, 500 และ 100 มล.
- Hot plate และ magnetic stirrer
- บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
- Flasks ขนาดต่าง ๆ
- กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง
- สำลี ทิชชู ยาง ถุงพลาสติก label ปากกา และดินสอ

1.2 สารเคมี

- อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- Fetal calf serum (FCS)
- ยาปฏิชีวนะ Penicillin–Streptomycin
- โคลชิซิน (colchicine)
- กรดอะเซติกเข้มข้น (glacial acetic acid)

- เมทานอล (methanol)
- เอทานอล 95% และ 70% (ethanol 95% and 70%)
- สีย้อมจิมซ่า (Giemsa's stain)
- โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส ($NaHPO_4$)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- เอนไซม์ทริปซิน (trypsin)
- HBSS powder (Hank's balance salt solution)

2. การเตรียมอาหารและสารเคมี

2.1 การเตรียม stock media

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อชนิด DMEM

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. DMEM solution 80%
2. Fetal calf serum 10%
3. New born calf serum 5%
4. Aminomax 3%
5. Penicillin-streptomycin 2%

วิธีเตรียม

1. ผสมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ DMEM และส่วนประกอบข้างต้นให้เข้ากันดี
2. ทำให้ปลอดเชื้อ โดยใช้ millipore membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน
3. แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มล. (aseptic technique) เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (working media)

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเลือด 100 มล. ประกอบด้วย

1. DMEM solution 80 มล.
2. Fetal calf serum 10 มล.
3. Penicillin/Streptomycin 1-2 มล.
4. Fetal calf serum 5 มล.
5. Aminomax 3 มล.

2.3 การเตรียม hypotonic solution

สารละลาย hypotonic solution 0.075 M HCl

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. KCl crystal
2. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 มล.)

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง หมายเหตุ : น้ำยานี้มีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์

2.4 การเตรียม colchicine

- สูตรที่ 1 ชั่ง colchicines 0.002 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.2 มก./มล.
- สูตรที่ 2 ชั่ง colchicines 0.001 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มล. ได้ความเข้มข้น 0.1 มก./มล.
- Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

2.5 การเตรียม fixative

สารที่ใช้เตรียม

1. Glacial acetic acid
2. Absolute methanol

วิธีเตรียม

ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 4 ส่วน เก็บใส่ขวดแช่ในตู้เย็น (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้)

2.6 การเตรียม Sorensen's buffer

สารที่ใช้เตรียม

1. Stock solution A : ใช้ KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.
2. Stock solution B : ใช้ $NaHPO_4$ 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มล.

วิธีเตรียม

ใช้ stock solution A 50.8 มล. ผสมกับ stock solution B 49.2 มล. จะได้ Sorensen's buffer (pH 6.8) 100 มล.

2.7 การเตรียมสีย้อม Giemsa's

การเตรียมสีจิมซ่า 10% (10% Giemsa's solution)

สีจิมซ่า 10% เตรียมจาก Giemsa's stain ใช้ชนิด stock Giemsa's solution โดยดูดสีจิมซ่าจาก stock มา 5 มล. ละลายใน Sorensen's buffer 45 มล.

2.8 สารละลาย 1N HCl

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. Conc. HCl
2. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มล.)

ใช้ Conc. HCl จำนวน 43.68 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 456.32 มล. โดยค่อย ๆ รินกรด HCl ใส่ลงในน้ำกลั่น (โดยห้ามเทน้ำลงในกรดเป็นอันขาดแต่ให้เทกรดลงในน้ำ)

2.9 สารละลาย 1 N NaOH

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. NaOH crystal
2. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มล.)

ชั่งผลึก NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.10 Hank's balance salt solution (HBSS)

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. HBSS powder
2. $NaHCO_3$ crystal
3. 1 N, HCl
4. 1 N, NaOH
5. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

1. ละลาย HBSS powder 1 ซอง ใน erlenmeyer flask ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 มล. ล้างผง HBSS ที่ติดอยู่ในซองออกให้หมด เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล. เขย่าจนผงละลายเข้ากันได้

2. ชั่ง $NaHCO_3$ 0.35 กรัม ละลายผลึก $NaHCO_3$ ในสารละลาย HBSS เขย่าจนผลึกละลายหมด

3. ปรับ pH โดยใช้ 1 N HCl และ 1 N NaOH จนได้ pH 7.1-7.3

4. ทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้ millipore membrane filtration ขนาด 0.2 ไมครอน

5. แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 100 มล. (aseptic technique) เก็บที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.11 การเตรียมสารละลาย banding trypsin

น้ำยาที่ใช้เตรียม

1. Bacto trypsin powder (Difco Lab)
2. 0.9% NaCl (normal saline)
3. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม

1. Stock solution

ละลาย trypsin powder ด้วย sterile distilled water 10 มล. เขย่าจนผง trypsin ละลายหมด เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2. Working solution

ใช้ Stock solution 1 มล. ผสมกับ 0.9% NaCl 19 มล. เขย่าให้เข้ากันดี เก็บไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส

2.12 วิธีการทำโครโมโซมเพ้นทิง (chromosome painting)

สารเคมี และอุปกรณ์:

1. Coplin Jars, สารละลายเปปซิน 1% (-20 °C), 2X, 4X และ 20X SSC (standard saline citrate), กรดไฮโดรคลอริก 1N, เอทานอลความเข้มข้น (70%, 90%, 100%)

2. ฟอร์มามายด์ 70% (v/v) (ฟอร์มามายด์ 100% 35 มล. : 2X SSC 15 มล.)

3. ฟอร์มามายด์ 50% (v/v) (ฟอร์มามายด์ 100% 50 มล. : 1X SSC 50 มล.) สำหรับการทำโครโมโซมเพ้นทิงระหว่างชนิดพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางสายวิวัฒนาการ และฟอร์มามายด์ 50% (v/v) (ฟอร์มามายด์ 100% 50 มล. : 2X SSC 50 มล.) สำหรับการทำโครโมโซมเพ้นทิงข้ามชนิดพันธ์ หรือมีความห่างไกลกันทางสายวิวัฒนาการ

4. 4X T (4X SSC 150 มล. + Tween 20 75 ไมโครลิตร)

5. antibodies: Cy3-avidin 1:1000 (เจือจางด้วย 4X T)

วิธีการ:

การเตรียมสไลด์และการทำให้โครโมโซมเสียสภาพ

1. หยดเซลล์แขวนลอย 10-15 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ที่ล้างด้วยเอทานอล โดยไสล์จะต้องแห้ง สะอาด และเย็น

2. ตรวจสอบโครโมโซมระยะเมทาเฟส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

3. ย่อยโปรตีนส่วนเกินออกด้วยเพ็ปซิน (น้ำกลั่น 50 มล. กรดไฮโดรคลอริก 1N 500 ไมโครลิตร และ เพ็ปซิน1% 200 ไมโครลิตร) ประมาณ 3-5 นาที

4. ล้างด้วย 2X SSC 2 ครั้ง (ครั้งละ 3 นาที) เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเพ็ปซิน

5. ดึงน้ำออกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% 2 นาที 90% 2 นาที และ100% 3 นาที ปล่อยให้แห้ง

6. อบที่ 65 °C ประมาณ 1-2 ชม. ส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 1.30 ชม.

7. นำสไลด์มาบ่มใน coplin jar ที่มีฟอร์มามายด์ 70% และอุ่นที่ 65 °C เพื่อทำให้โครโมโซมเสียสภาพ

8. ย้ายสไลด์มาจุ่มในเอทานอล 70% ที่เย็นจัด 2 นาที และดึงน้ำออกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% 2 นาที 90% 2 นาที และ100% 3 นาที ปล่อยให้แห้ง

9. หยดโพรบ: Biotin-labeled probes 50-200 นาโนกรัม (0.5-2.5 ไมโครลิตร PCR product) + hybridization buffer (สำหรับชนิดพันธุ์ที่ใกล้กันใช้ 0.5 ul PCR product + 54% hybridization buffer, สำหรับชนิดพันธุ์ที่ห่างไกลกันใช้ 2 ul PCR product + 50% Hybridization buffer) ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นทำให้โพรบเสียสภาพด้วยเครื่อง PCR ที่ 75 °C 10 นาที และที่ 37 °C ประมาณ 30 นาที)

10. หยดโพรบลงบนสไลด์ที่โครโมโซมเสียสภาพแล้ว ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และผนึกด้วยกาว

11. นำสไลด์ไปบ่มที่ 37 °C ประมาณ 24-48 ชม.

การล้างโพรบส่วนเกินออกหลังจากทำไฮบริไดเซชัน

1. เตรียม 2X SSC 3 จาร์ ๆ ละ 50 มล. ฟอร์มามายด์ 50% 2 จาร์ ๆ ละ 50 มล. นำไปบ่มที่ 42-45 °C, 4X T 3 จาร์ ๆ ละ 50 มล. นำไปบ่มที่ 37 °C.

2. นำสไลด์จุ่มใน 2X SSC เพื่อเอากระจกปิดสไลด์ออก ประมาณ 3-5 นาที จากนั้นย้ายสไลด์ไปจุ่มในฟอร์มามายด์ 50% จาร์ละ 5 นาที จากนั้นจุ่มใน 2X SSC 2 จาร์ ๆ ละ 5 นาที

3. หยด Cy3-avidin (1:1000 เจือจางด้วย 4X T) ลงบนบริเวณที่มีโครโมโซมไฮบริไดซ์กับโพรบ (ประมาณ 100 ไมโครลิตร) และปิดด้วยพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ประมาณ 15-20 นาที

4. ล้างสไลด์ 3 ครั้ง ใน 4X SSC จาร์ละ 5 นาที จากนั้นจุ่มลงในจาร์ที่มี 2X SSC with DAPI.

5. ย้อมทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที และเมาท์สไลด์ด้วย antifade mounting solution

6. ถ่ายภาพโครโมโซมที่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ และทำการเปรียบเทียบรูปแบบการไฮบริไดเซชันกับคาริโอไทป์จากเทคนิคการย้อมโครโมโซมแถบสีแบบจี

หมายเหตุ:

1. การใช้กรดอะซิติก 50% จะช่วยลดโปรตีนส่วนเกิน แต่ถ้าใช้เวลานานมากเกินไปจะทำให้สูญเสียดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นผลให้โครโมโซมสูญหายไปในกระบวนการทำเทคนิค FISH

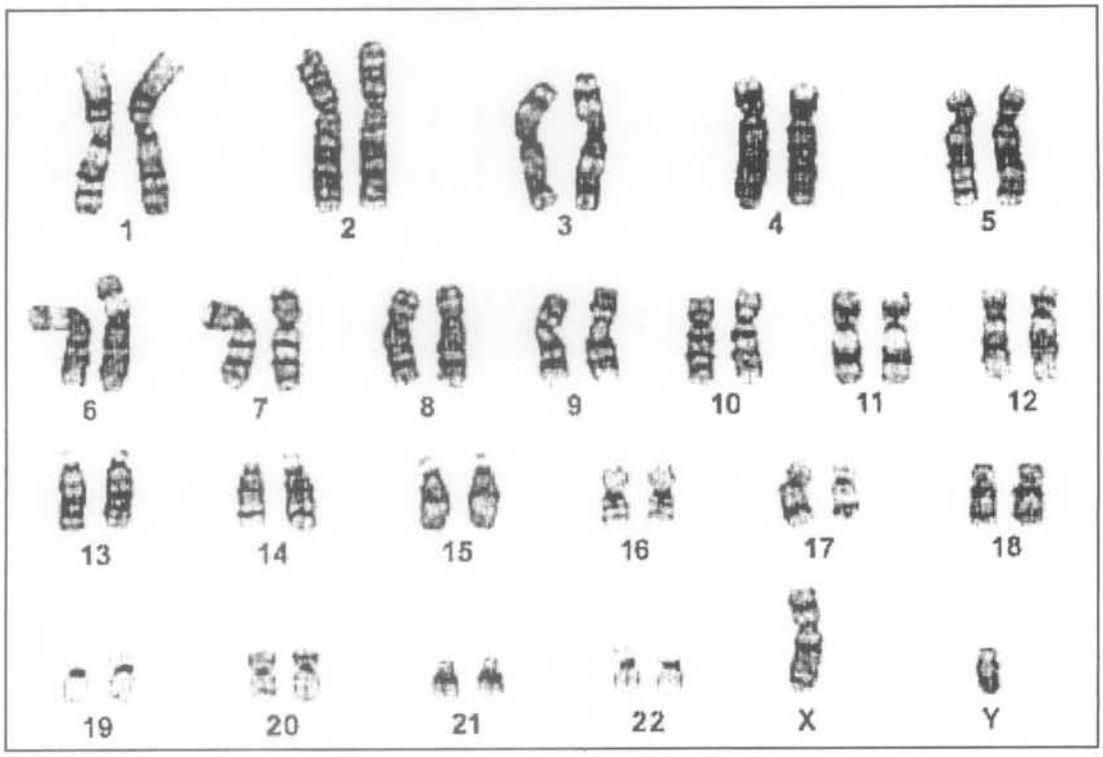
2. สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงเวลาและอุณหภูมิได้ในขั้น pepsin treatment และ 70% formamide

3. เพ็ปซิน และ 2X SSC สามารถใช้ได้ครั้งเดียว แต่แอลกอฮอล์และฟอร์มามายด์สามารถใช้ได้อีกหลายครั้ง

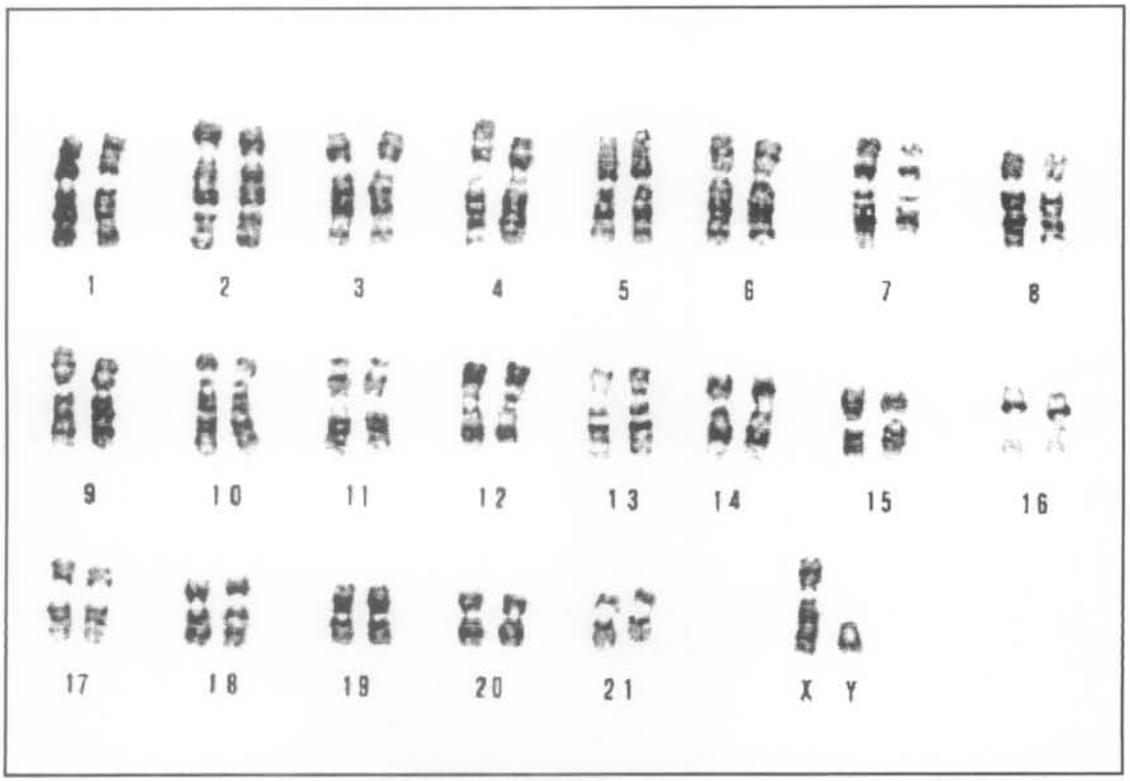
ภาคผนวก ข

รูปภาพ

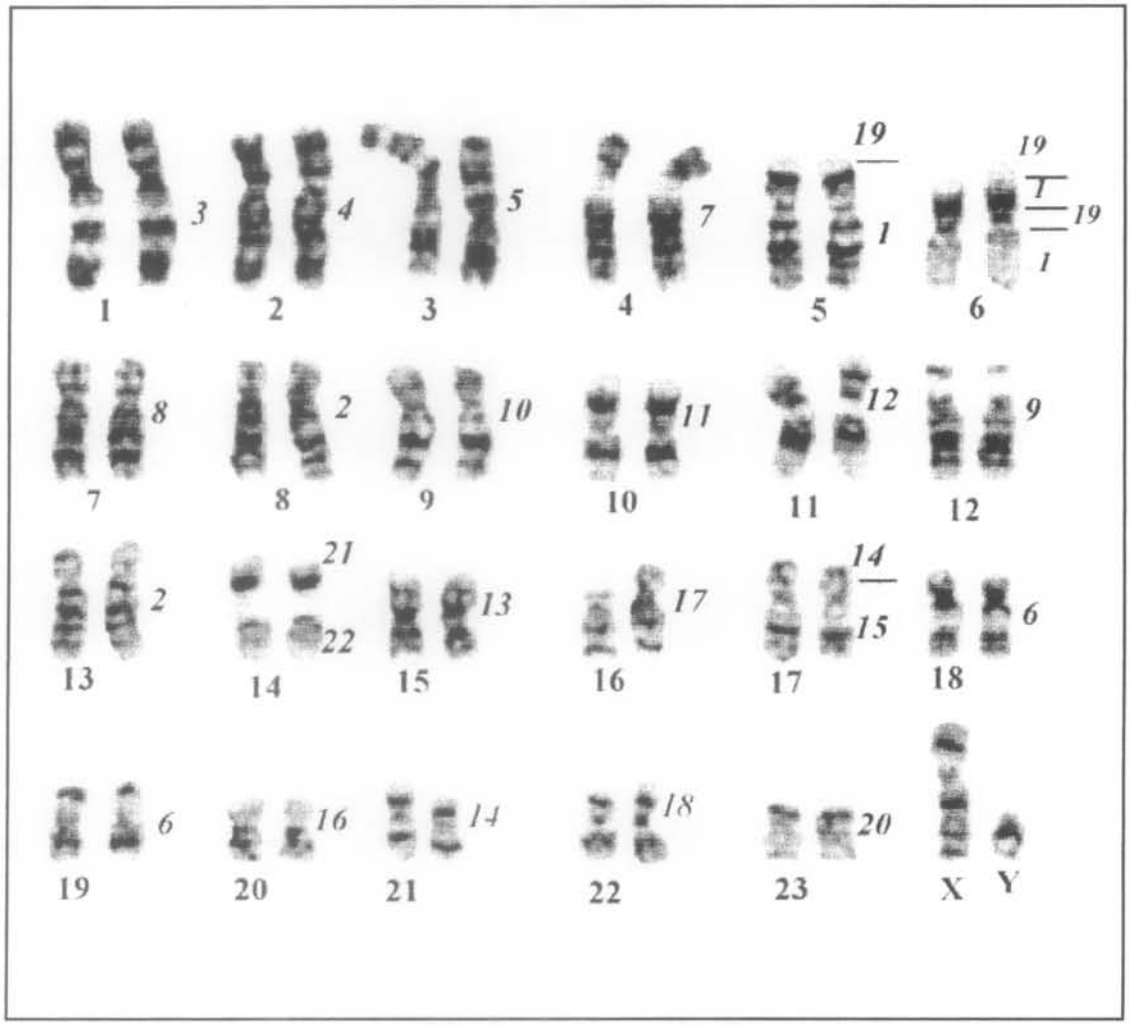
1. คาริโอไทป์ของมนุษย์ (*Homo sapiens*) จากการย้อมโครโมโซมแถบสีแบบจี (Roony, 2001)



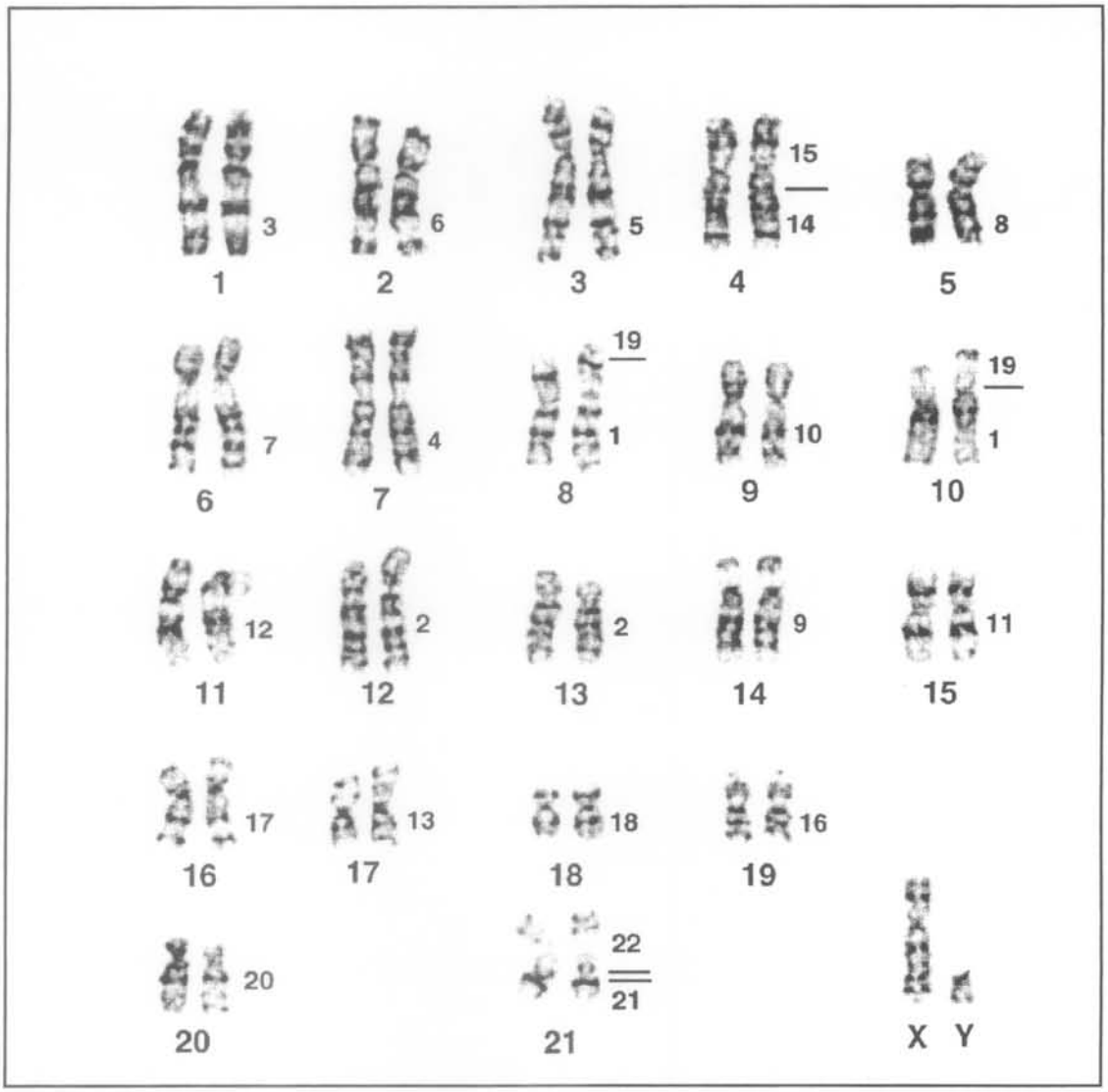
2. คาริโอไทป์ของค่างแอฟริกา (*Colobus guereza*) (Bigoni et al., 1997b)



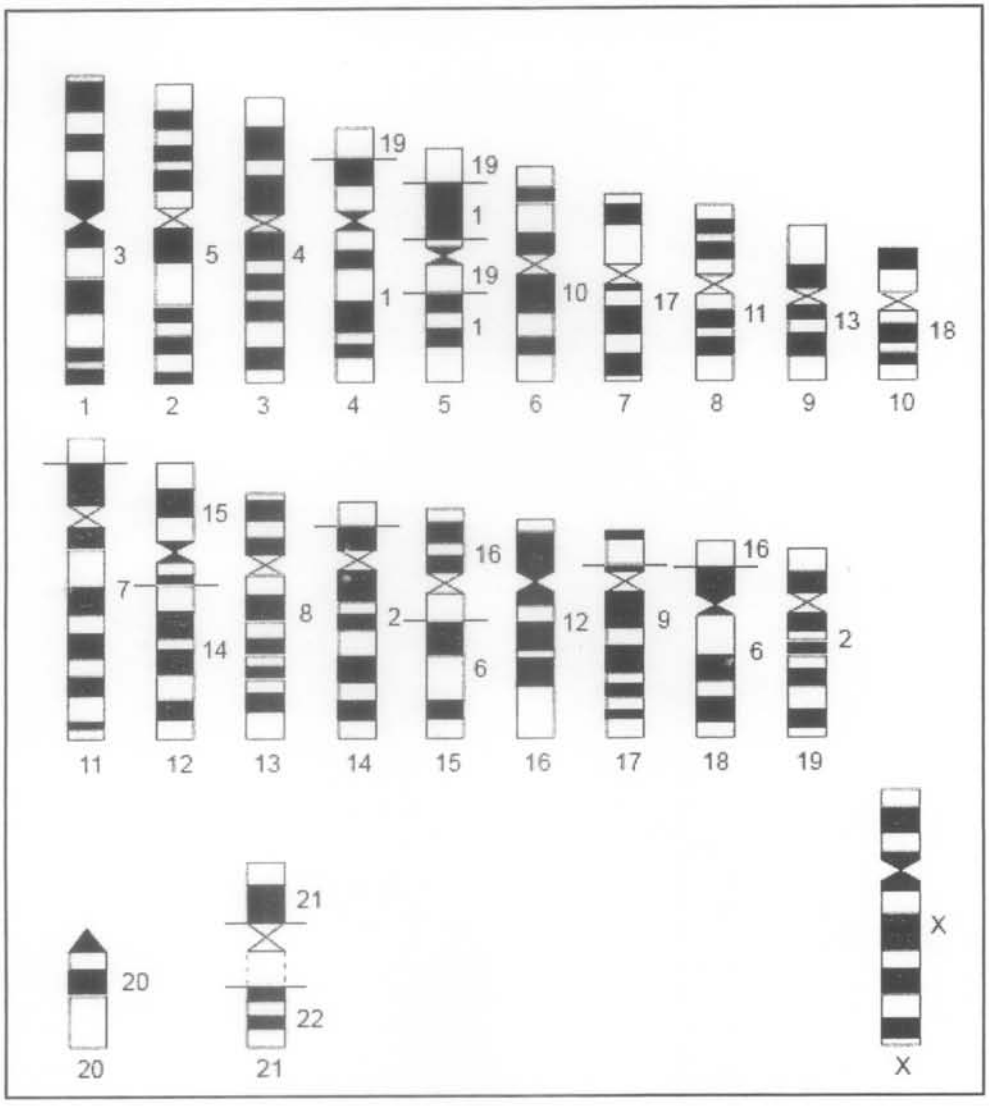
3. คาริโอไทป์ของลิงงวง (*Nasalis larvatus*) (Bigoni et al., 2003)



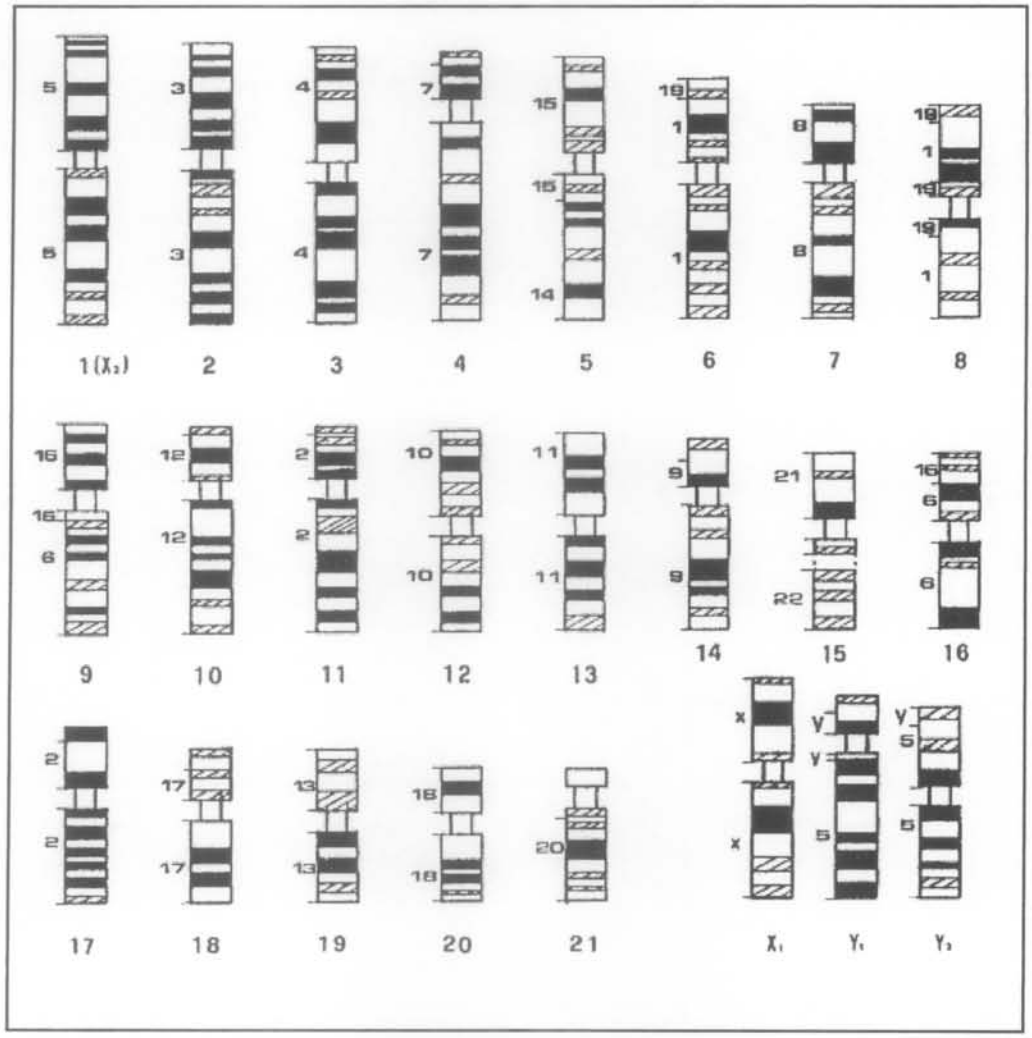
4. คาริโอไทป์ของค่างห้าสี (*Pygathrix nemaeus*) (Bigoni et al., 2004)



5. อิดิโอแกรมของค่างแว่นถิ่นเหนือ (*Semnopithecus phayrei*) และค่างหัวมงกุฎ (*S. francoisi*) (Nie et al., 1998)



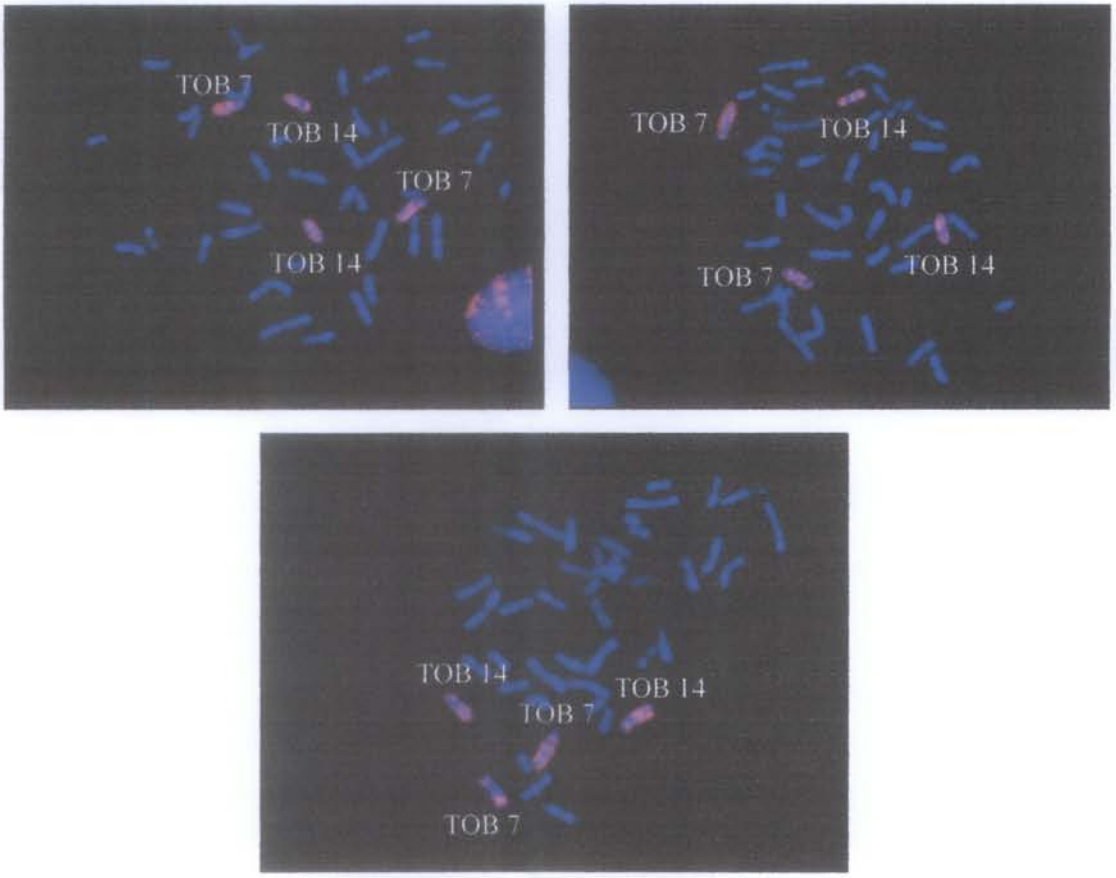
6. อิดิโอแกรมของค่างเทา (*Presbytis cristata*) (Bigoni et al., 1997a)



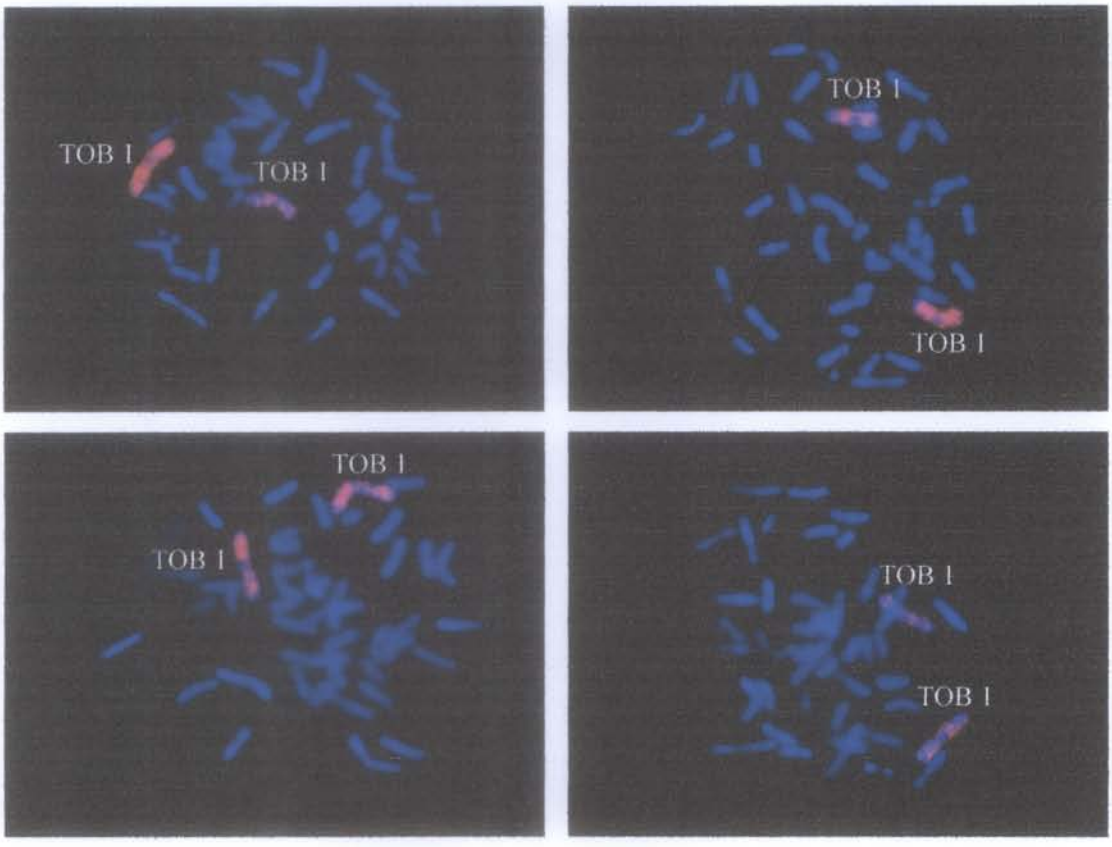
7. ภาพเซลล์ระยะเมทาเฟสของค่างแว่นถิ่นใต้โดยเทคนิค FISH

7.1 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 1 กับ 19 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 6 กับ 8

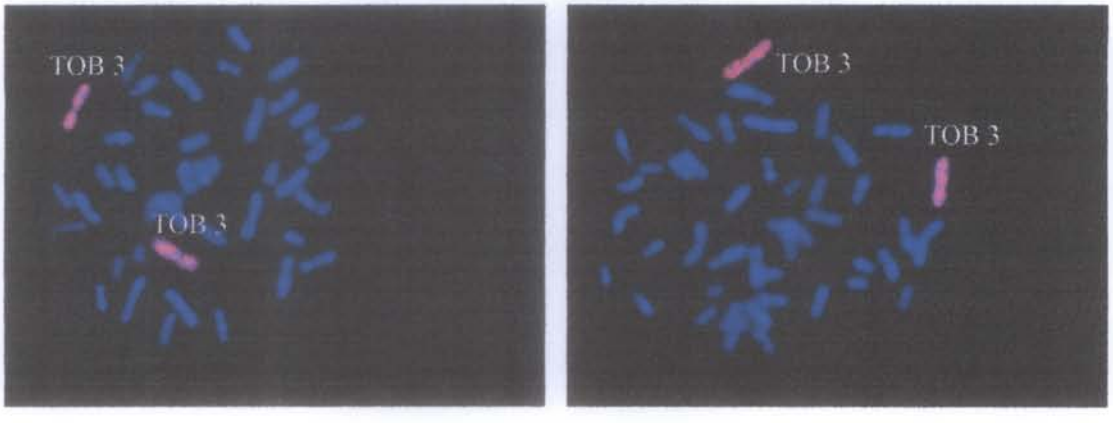
7.2 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 2 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 7 กับ 14



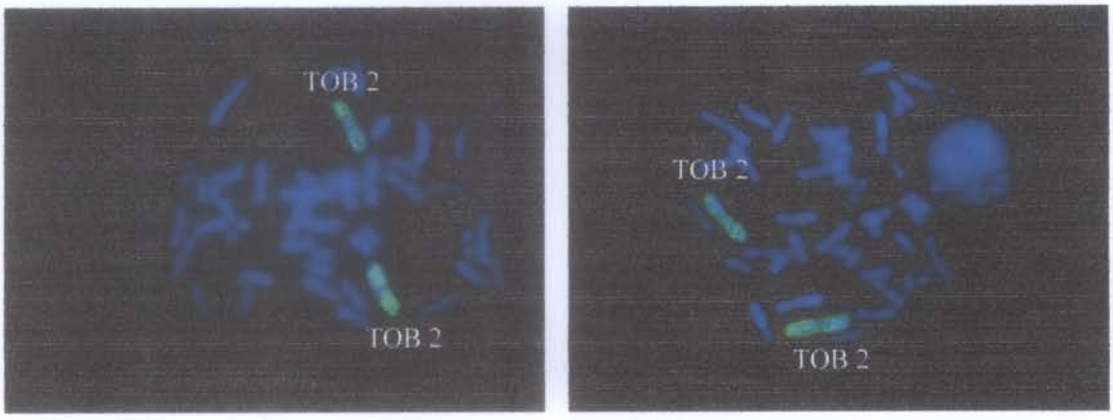
7.3 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 3 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 1



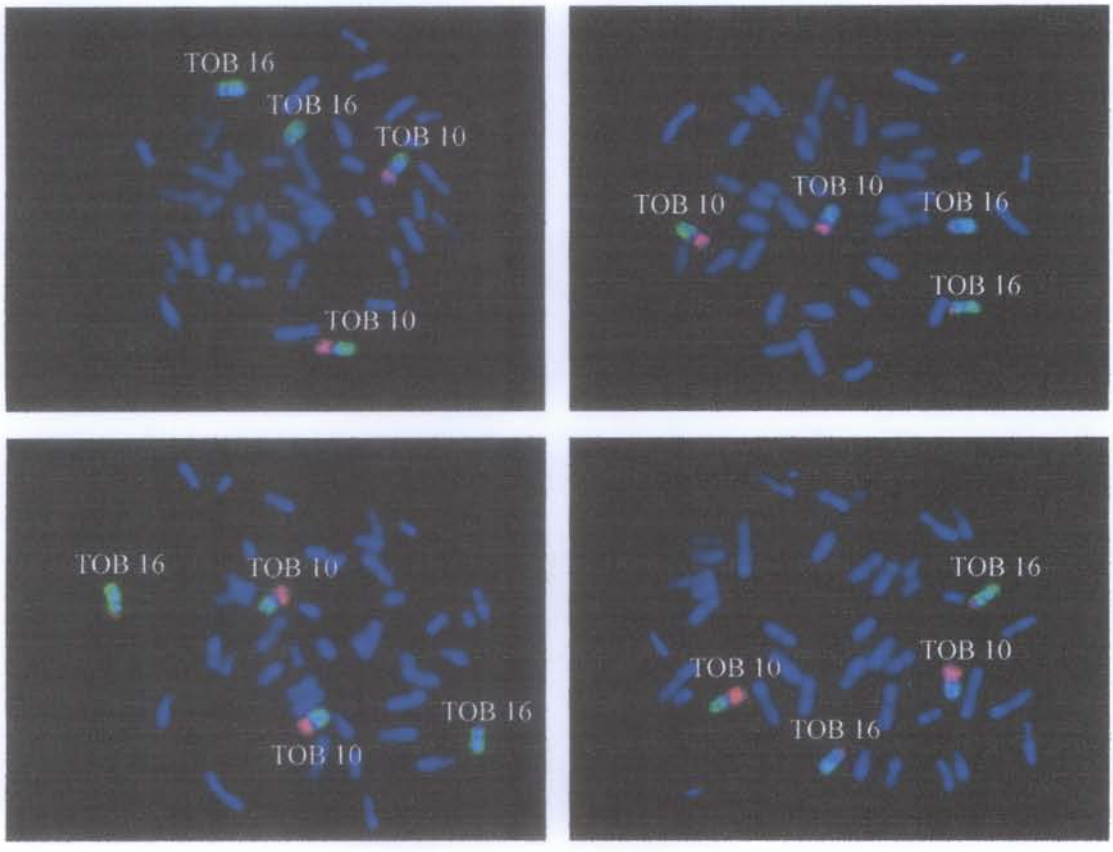
7.4 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 4 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 3



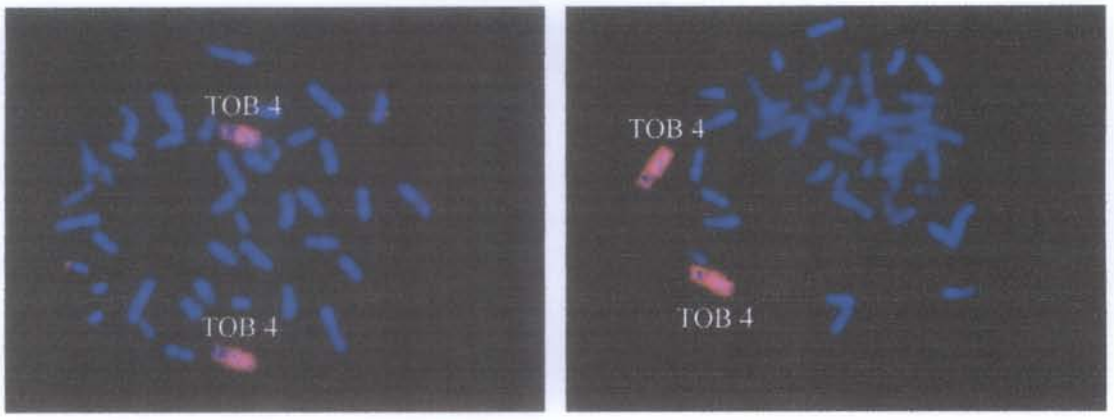
7.5 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 5 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 2



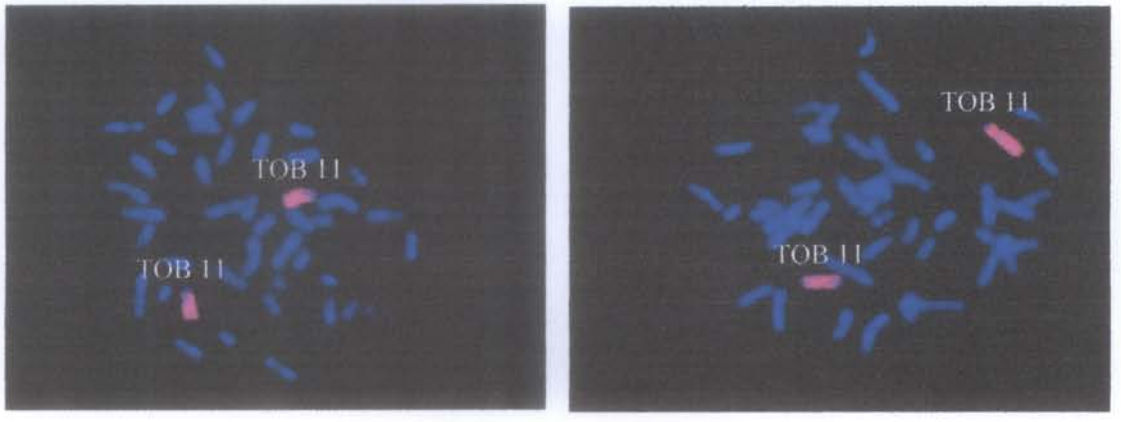
7.6 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 6 กับ 16 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 10 กับ 16



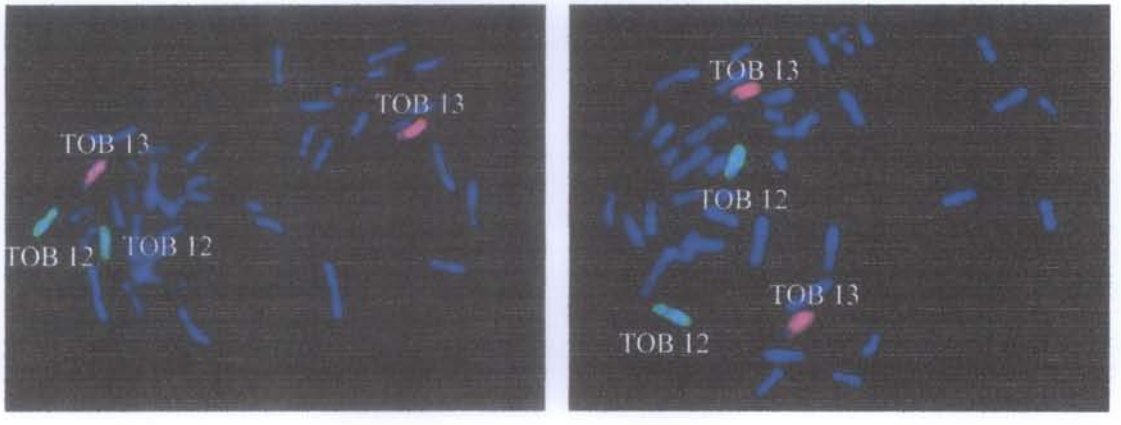
7.7 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 7 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 4



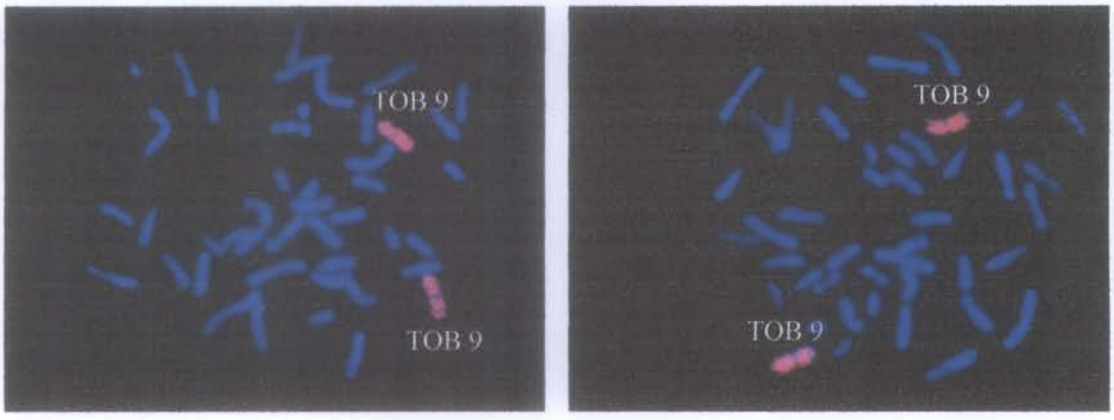
7.8 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 8 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 11



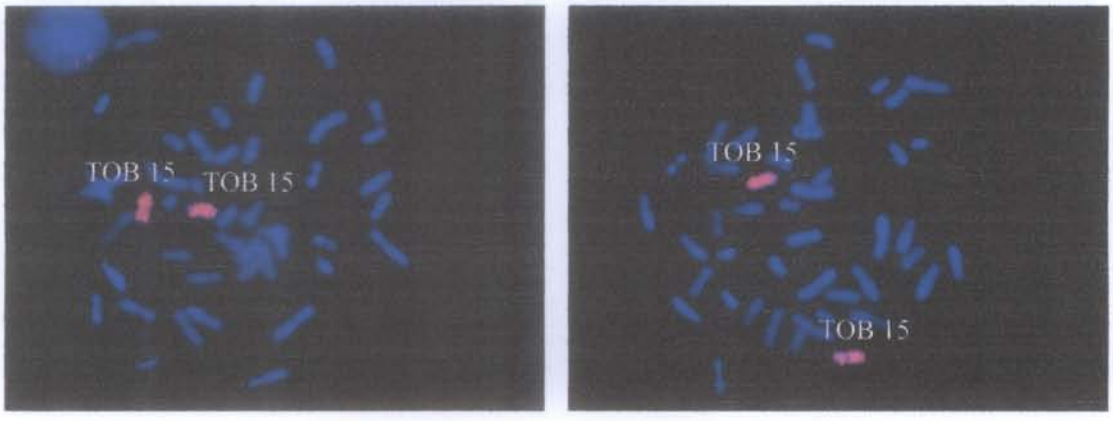
7.9 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 9 กับ 12 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 13 กับ 12 ตามลำดับ



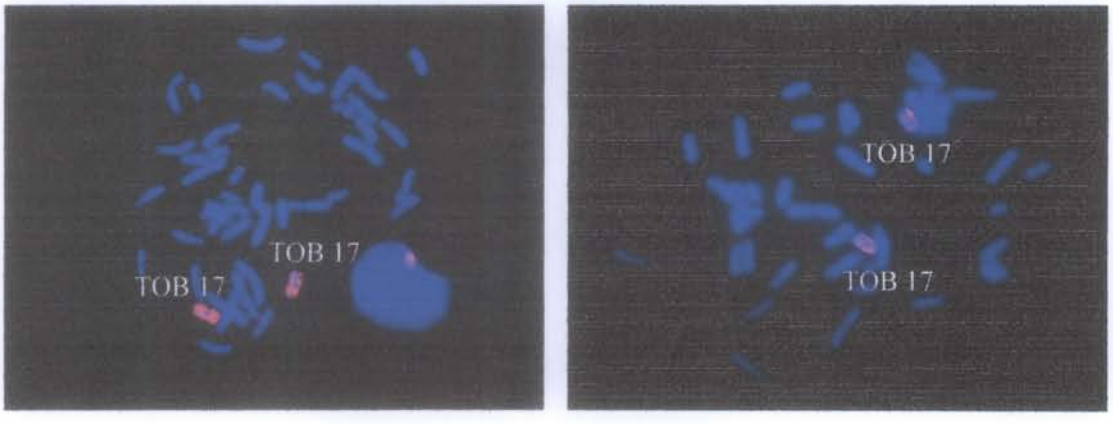
7.10 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 10 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 9



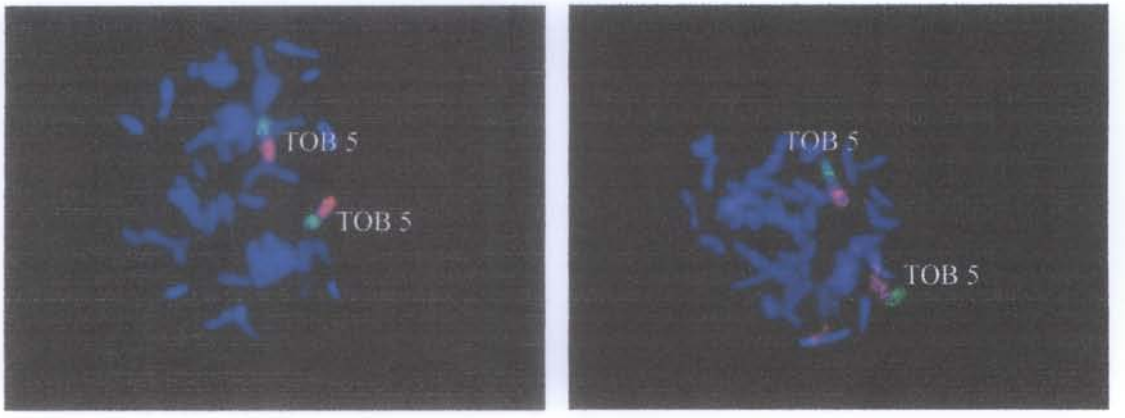
7.11 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 11 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 15



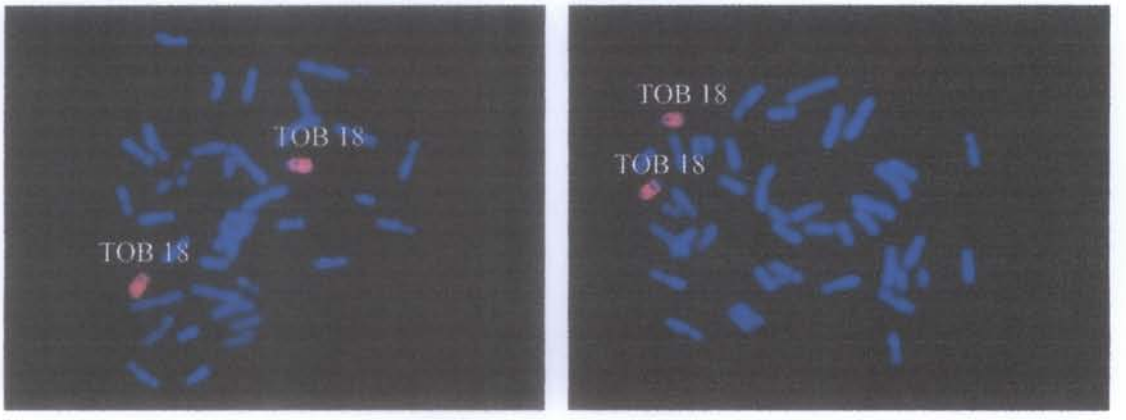
7.12 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 13 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 17



7.13 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 14 กับ 15 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 5

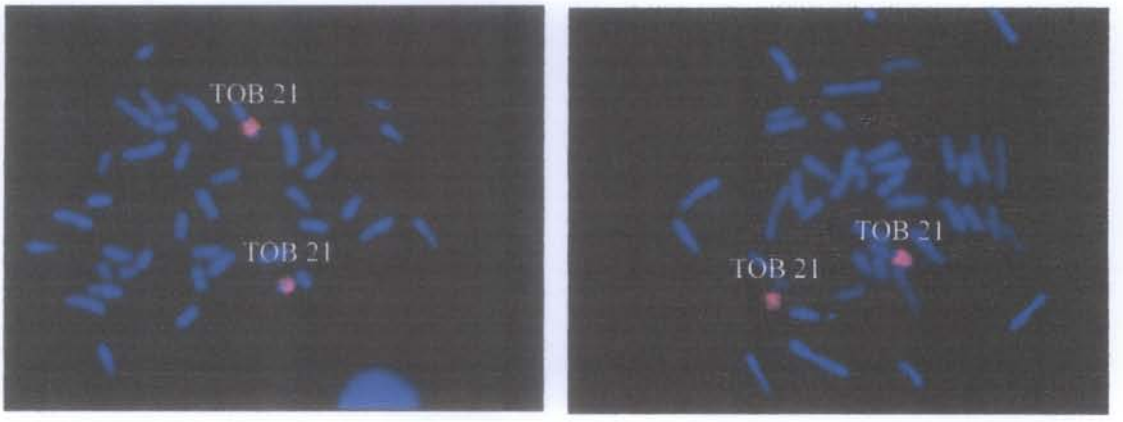


7.14 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 17 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 18

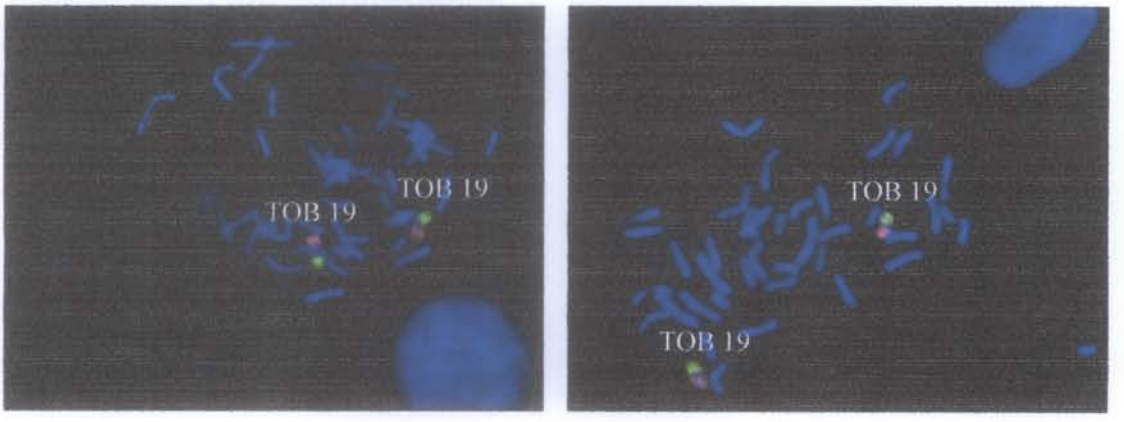


7.15 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 18 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 20

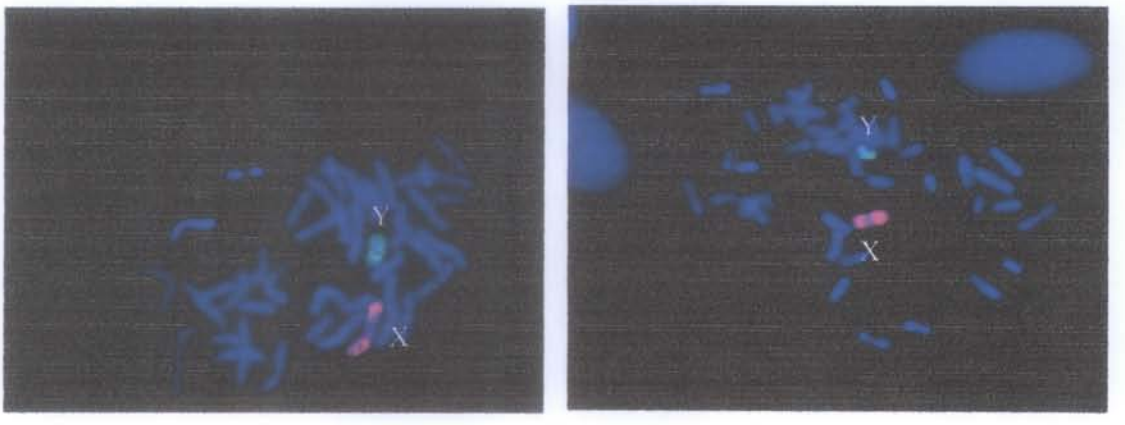
7.16 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 20 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 21



7.17 โพรบโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 21 กับ 22 ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 19



7.18 โพรบโครโมโซมเพศ X และ Y ของมนุษย์ ไฮบริไดซ์กับโครโมโซมเพศค่างแว่นถิ่นใต้



ภาคผนวก ค
ข้อมูลการเผยแพร่วิทยานิพนธ์

1. **บทความวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ**

บทความที่เสนอตีพิมพ์แล้ว

Sangpakdee, S., Tanomtong, A., Monthatong, M. and Nie, W. 2007. Homology of Human (*Homo sapiens*) Chromosome 1, 19 and Relationship to Dusky Langur (*Trachypithacus obscurus*) Chromosome 6, 8 by FISH. **Cytologia** (Submitted).

Homology of Human (*Homo sapiens*) Chromosome 1, 19 and Relationship to Dusky Langur (*Trachypithacus obscurus*) Chromosome 6, 8 by FISH

Wiwat Sangpakdee[1], Alongkoad Tanomtong[1,*], Monthira Monthatong[1] and Wenhui Nie[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University,
Khon Kaen, 40002, Thailand

[2]Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, P. R. China

*Corresponding author email address: tanomtong@hotmail.com

Summary Chromosomal relationship between human and dusky langur (*Trachypithecus obscurus*, 2n=44) were establish by chromosome painting using chromosome specific DNA probes of human chromosome 1 and 19 which each gave hybridization signals on two non-homologous dusky langur chromosomes. The results show that human chromosome 1 and 19 probes hybridized to three regions of dusky langur on autosome 6 and 8. The human chromosome 1 probe hybridized to one region on dusky langur chromosome 6 and to two regions on dusky langur chromosome 8, where the human chromosome 19 probe hybridized on the same pattern but different regions. Hybridization patterns of human painting probes on dusky langur compared with the data on other species in the same genus suggests that the alternating hybridization pattern of the conserved segments homologous to human chromosomes 1 and 19 on dusky langur chromosome 6 and 8 occurred from reciprocal translocation followed by pericentric inversion. This study also indicates that dusky langur's chromosomes 6 and 8 had the same hybridization patterns with other Asian colobines.

Keywords: *Trachypithecus obscurus*, chromosome painting, reciprocal translocations

Dusky langur (*Trachypithecus obscurus*), also called dusky leaf monkey belongs to the family Cercopithecidae, subfamily Colobinae. There are three groups of colobine monkeys: the colobus monkeys of Africa, the langurs and the odd-nosed monkeys of Asia. *T. obscurus* is Asian langurs that distributed in south-east Asia. However in Thailand, were found only in southern part. The classification and taxonomy of colobines have been unsettled and subjected to continued revision (Napier and Napier, 1967, 1985; Vogel and Winkler, 1990; Groves,1970, 1993; Oates et al., 1984). For instance, there is no consensus even on the number of genera and species. The dusky langur is either classified in genus *Trachypithecus* (Oates et al., 1984) or genus *Presbytis* (Napier and Napier, 1985). In our research, we used the Oates et al. (1984) classification system and put dusky langur in the genus *Trachypithecus*.

In the previous studies using classical staining, the diploid number of both African (genus *Colobus*) and Asian (genus *Presbytis*) colobines was found to be 2n=44 (Chiarelli, 1963; Ushima et al., 1964). All chromosomes can be divided into two groups; metacentric and submetacentric according to their centromeric index, except that the Asian langurs have a pair of small acrocentric chromosomes that are found to be metacentric in the African colobines (Nie et al., 1998).

The establishment of complete chromosomal homologies among primate species is essential for the study of primate chromosome evolution and taxonomy. With the introduction of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using whole chromosome-specific probes (chromosome painting) (Nie et al., 1998), it is now possible to establish chromosomal homology and study the relationship between human and dusky langur on the basis of DNA sequence homologies. There are more reports on chromosome banding in Asian colobines, i.e., genus *Presbytis* (Sharma et al., 1972; Krishna-Murthy et al., 1979; Ponsa et al., 1983; Dutrillaux et al., 1984). Chromosomal homologies have been successfully established between karyotypes of humans and great apes (chimpanzees, gorilla, orangutan), lesser apes (gibbons and siamang) and macaques by using chromosome painting technique (Wienberg et al., 1990, 1992; Stanyon et al., 1992, 1995; Jauch et al., 1992; Koehler et al., 1995a,b; Yu et al., 1997). Nie et al. (1998) reported the chromosomal homologies between human and Francois' monkey and Phayre's leaf monkey established by chromosome painting using chromosome-specific probes from 23 human chromosomes (22

autosomes plus the X). Here we report the chromosomal homologies and relationship between human choromosome 1 and 19 on dusky langur choromosome by chromosome painting.

Materials and methods

Cell culture and chromosomal preparation

The male *Trachypithecus obscurus* ear tissue were collected at Songkhla Zoo, Songkhla province, Thailand. Metaphase chromosomes were prepared from fibroblast cells of male *T. obscurus*, which provided by the Kunming Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences. The cell line were grown at 37°C in DMEM medium enriched with 20% newborn calf serum. Before harvesting for chromosome analysis, the cells were treated with 0.05 μg/ml colchicine (Sigma) for 1 hr. Chromosome preparation followed standard procedures, which include a 15-20 minute hypotonic treatment in 0.075 M KCl, four fixations in methanol-glacial acetic acid (4:1) and air drying. We performed G-band metaphase separated from fluorescence *in situ* hybridization and used DAPI-banding concurrently with *in situ* hybridization also facilitated chromosome identification. The karyotype numbering and arrangement were following Kampiranont (1997).

Fluorescence in situ hybridization

Human chromosome-specific probes (1 and 19) were kindly provided by Dr. Wenhui Nie, Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan, China. Human chromosome-specific probes were resuspended in 10 μl with hybridization buffer (50% deionized formamide, 10% dextran sulphate, 2X SSC, 0.5 M phosphate buffer, pH 7.3), denatured at 65°C for 10 min. and preannealed by incubation at 37°C for 1 hr. Slides were denatured by incubation in 70% formamide/2X SSC solution at 65°C for 2 min., quenched in ice-cold 70% ethanol and dehydrated through 70%, 90%, and 2 times 100% ethanol series. The preannealed probes were applied onto slides and allowed to hybridize 24 hr. at 37°C. Post-hybridization washes were two 5 min. incubations in 50% formamide, 50% 2X SSC at 50°C followed by two 5 min. incubation in 2X SSC at 50°C. Biotin-labeled probes were visualized by fluorescein isothyocyanate (FITC)-avidin

and Cy3 labeled probes. The slides were counterstained with DAPI, air drying and added 15 μl mounting solution then cover with a clean glass coverslip.

Microscopy

FISH preparations slides were visualized on fluorescent microscope combined with video camera equipped with specific filter sets for FITC and Cy3. Hybridization signals and G-band were captured by GENUS software and apple computer which provided by Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan, China.

Results

G-banded karyotype of *T. obscurus*

T. obscurus were found to have the same diploid numbers of 2n=44 with the other colobine monkeys in the previous reports (Chen et al., 1981; Bigoni et al., 1997,2003; Lui et al., 1997; Nie et al., 1998). According to the karyotype numbering and arrangement system as Kampiranont (1997), we found that *T. obscurus* karyotype composition is: 22(M)+18(SM)+2(A), X(M) and Y(SM). One pair of metacentric chromosome 19, also called the marked chromosome bears the NORs (nucleolar organizer regions) at the secondary constriction near the centromere on the long arm. The chromosomes are divided into three groups on the basis of centromeric index: metacentrics, submetacentrics and acrocentric chromosomes. All of the chromosomes are ordered according to their relative length and sizes. Figure 1 show the metaphase chromosome and karyotype by G-banding technique of *T. obscurus*. We also found that *T. obscurus* have the similar G-banding patterns with other Asian colobines.

Hybridization of human chromosome-specific probes onto metaphases of *T. obscurus*

The hybridization signal of human chromosome-specific probes 1 and 19 gave bright painting on the dusky langur chromosomes 6 and 8. The human chromosome 1 and 19 probes hybridized to three regions of dusky langur autosome 6 and 8 respectively. Human chromosome 1 probe hybridized to one region on dusky langur chromosome 6 and to two regions on dusky langur chromosome 8, where human chromosome 19 probe hybridized on the same pattern but

different region on homologous chromosome (Figure 2). We compared dusky langur chromosomes banding patterns with human chromosomes banding pattern in term of Roony (2001). The result shown that the alternating hybridization pattern of the conserved segments homologous to human chromosomes 1 and 19 on dusky langur chromosome 6 and 8 occurred from reciprocal translocation followed by pericentric inversion (Figure 3).

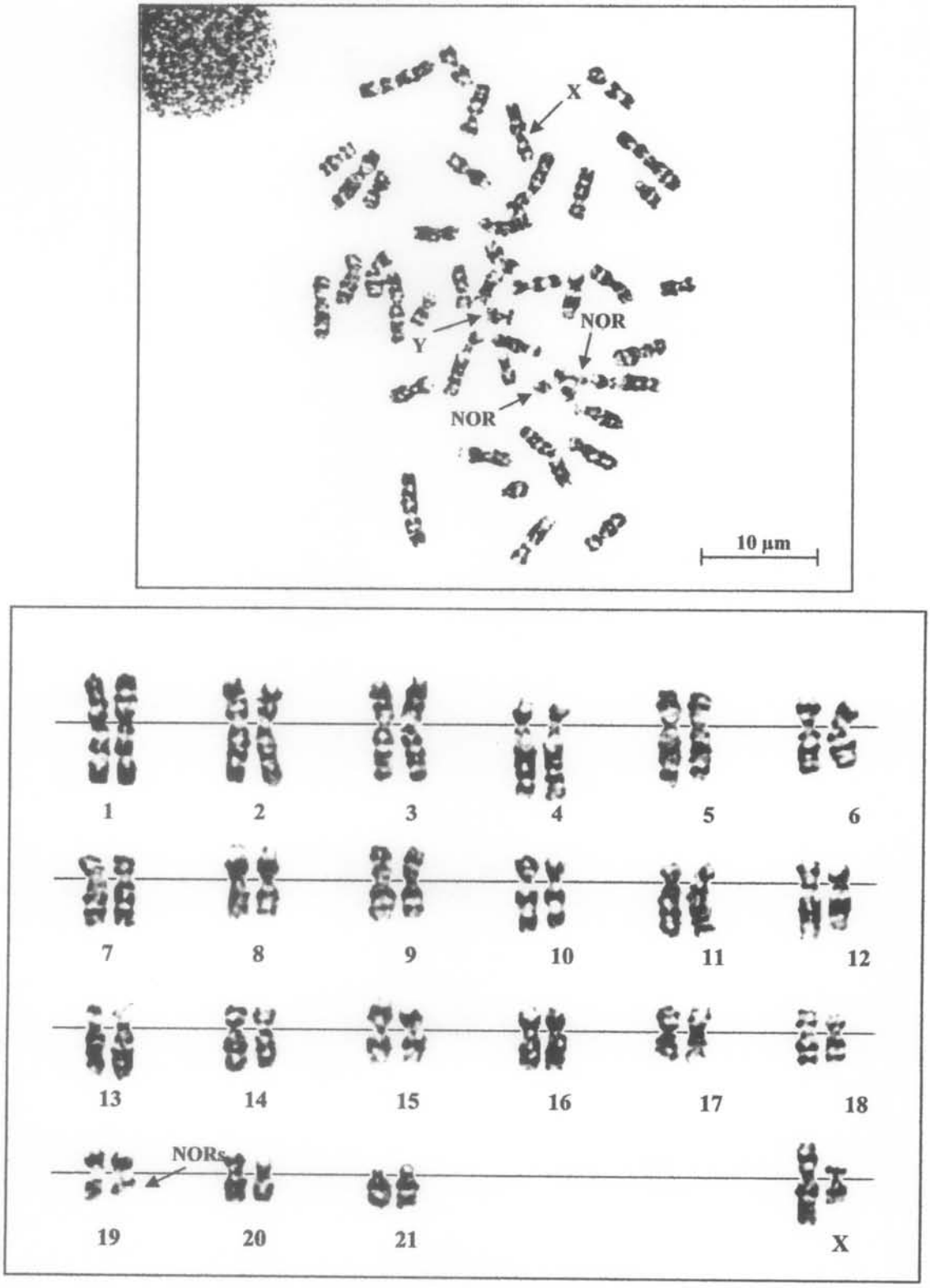


Figure1 Metaphase chromosome plate and karyotype of male Dusky langur (*Trachypithecus obscurus*) 2n (diploid) = 44 by G-banding technique, satellite chromosome arrows.

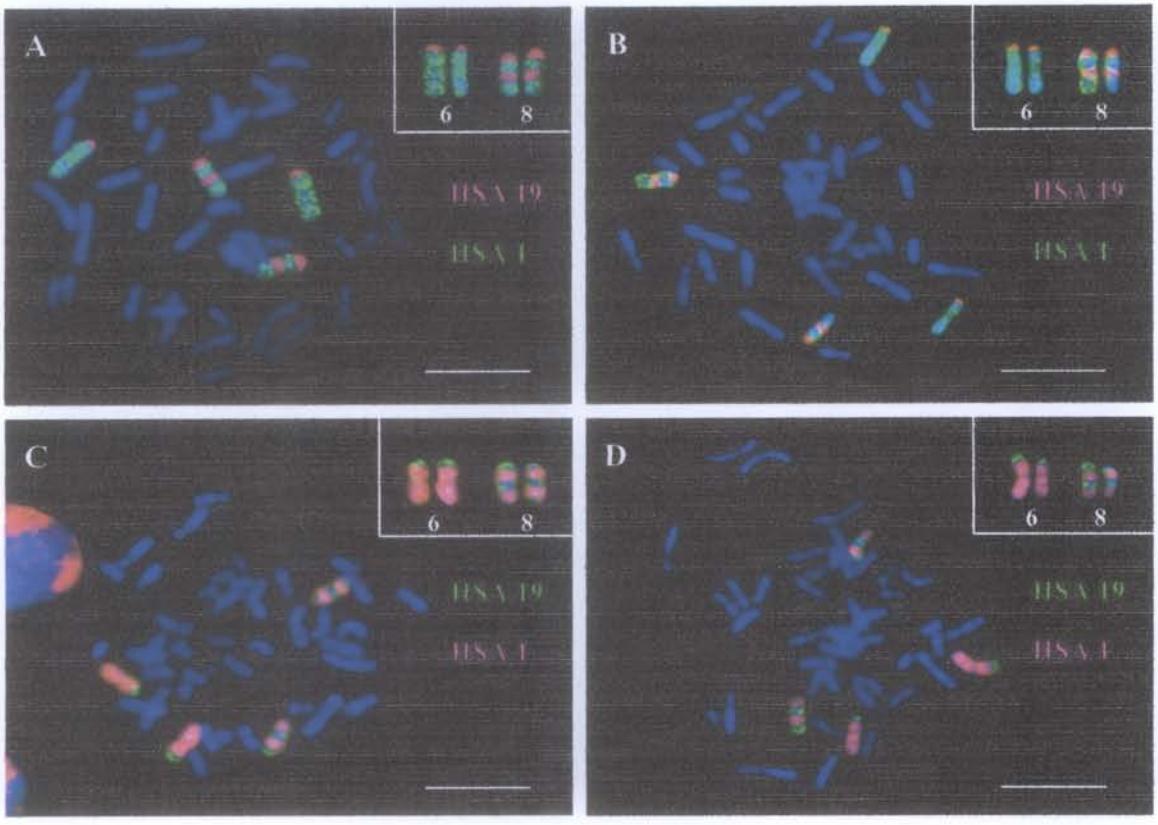


Figure 2 Metaphase chromosomes plate of male Dusky langur (*Trachypithecus obscurus*) 2n=44 show the hybridization patterns obtained with human chromosome-specific probes 1 and 19 binded to Dusky langur chromosomes 6 and 8. A and B using human chromosome 19 cy3-labelled probes (in red), chromosome 1 biotin-labeled probes detected with avidin-FITC (in green). C and D using human chromosome 19 biotin-labeled probes detected with avidin-FITC (in green), chromosome 1 cy3-labelled probes (in red), chromosomes were counter stained with DAPI, bars = 10 μm.

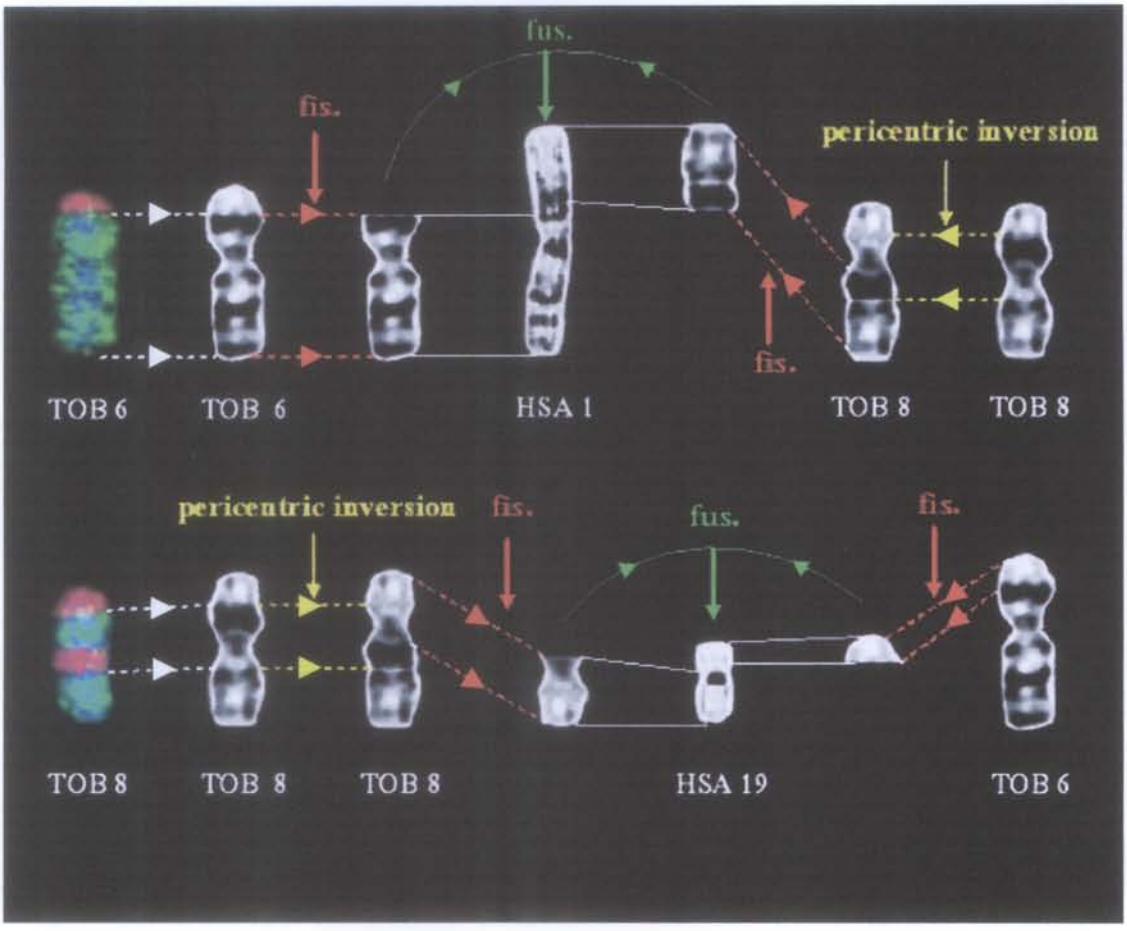


Figure 3 The relationship between human chromosomes (*Homo sapiens*, (HSA)) 1, 19 and Dusky langur (*Trachypithecus obscurus*, (TOB)) chromosomes 6, 8 are the results of a reciprocal translocation followed by pericentric inversion * fis. (fission) and fus. (fusion).

Discussion

G-banded Karyotypes of dusky langur (*T. obscurus*)

We confirmed that the diploid karyotype number of *T. obscurus* is 2n=44, common to all the other species of the Colobinae (Bigoni et al., 1997, 2003; Chiarelli, 1963; Chen et al., 1981; Lui et al., 1997; Nie et al., 1998). G-banded Karyotypes of dusky langur gave similar but not identical karyotypes with other colobines (*Semnopithecus francoisi*, *S. phayrei*) (Nie et al., 1998). The difference may be caused from the numbering system dose not follow published report.

Chromosome 2 of *T. obscurus* have the same banding patterns with *S. francoisi* which is chromosome 2 type a (Nie et al., 1998). We also confirmed that *T. obscurus* have the same

marked chromosome with *Presbytis cristata*, *S. francoisi*, *S. phayrei* and *Nasalis larvatus* when compared in term of banding pattern.

Human Syntenic Groups Fragmented in *Trachypithecus obscurus*

The results from hybridization patterns of human chromosome-specific probes demonstrated that the dusky langur chromosomes showed conserved syntenic homologies to entire human chromosomes. Human chromosome probes 1 and 19 showed hybridization patterns on dusky langur chromosomes 6 and 8, concerning that was occurred from reciprocal translocation followed by pericentric inversion. This result agrees with Bigoni et al. (1997a) who reported that *P. cristata* chromosome 6 and 8 may have been produced by reciprocal transolcation between human chromosomes 1 and 19, the alternating pattern between chromosome segments homologous to human chromosomes 1 and 19 on silvered leaf monkey chromosome 8 indicates a pericentric inversion followed with the translocation. *T. obscurus* also have the same hybridization pattern of human chromosome-specific probe 1 and 19 onto *S. francoisi*, *S. phayrei* (Nie et al., 1998) and *N. larvatus* (Bigoni et al., 2003). The fragmentations and associations of human chromosomes 1 and 19 can be explained with a reciprocal translocation. This associations occur in all documented Asian Colobinae, but not in the African species *Colobus guereza*, in which there are different translocations (Bigoni *et al.*, 1997b). The most parsimonious explanation is that a reciprocal translocation occurred in the lineage of the Asian colobines and distinguishes them from the African colobines (Bigoni et al., 2004). Our results suggest that *T. obscurus* have the same conservative karyotypes and same hybridization patterns with the other Asian colobinae by using human chromosome-specific paint probes.

Acknowledgements

Key Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, P. R. China is gratefully acknowledged. We would like to thank Dr. Wenhui Nie for providing the human chromosome-specific DNA probes, training and analysis in FISH. We also thank the Songkhla Zoo for the langur ear tissue samples.

Reference

Bigoni, F., Koehler, U., Stanyon, R., Ishida, T. and Wienberg, J. 1997a. Fluorescence in situ hybridization establishes homology between human and silvered leaf monkey chromosomes, reveals reciprocal translocations between chromosomes homologous to human Y/5, 1/19 and 6/16 and delineates an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex-chromosome system. **Am. J. PhyAnthro.** 98: 315-328.

Bigoni, F., Stanyon, R., Koehler, U., Morescalchi, A. M. and Weinberg, J. 1997b. Mapping homology between human and black and white Colobine monkey chromosomes by fluorescent in situ hybridization. **Am. J. Promatol.** 42: 289-298.

Bigoni, F., Stanyon, R.,Wimmer, R., and Schempp, W. 2003. Chromosome painting shows that the proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) has a derived karyotype and is phylogenetically nested within Asian Colobines. **Am. J. Primatol.** 60: 85–93.

Bigoni, F., Houck, L. M., Ryder, A. O., Wienberg, J. and Stanyon, R. 2004. Chromosome painting shows that *Pygathrix nemaeus* has the most basal karyotype among Asian Colobinae. **International Journal of Primatology** 25: 679-688.

Chen, Y., Luo, L., Shan, X. and Cao, X. 1981. **Primates chromosome in China**. Beijing: Science Publishing House pp. 129-140.

Chiarelli, B. 1963. Comparative morphometric analysis of primate chromosomes. III. The chromosomes of the genera *Hylobates*, *Colobus* and *Presbytis*. **Caryologia**16: 637-648.

Dutrillaux, B., Webb, G., Muleris, M., Couturier, J., and Butler, R. 1984. Chromosome study of *Presbytis cristatus*: Presence of a complex y-autosome rearrangement in the male. **Ann. Genet.** 27: 148-153.

Groves, C. P. 1970. The forgotten leaf-eaters and the phylogeny of the Colobinae. In Napier, J. R. and Napier, P. H. (eds.): **Old world monkeys: Evolution, systematics and behavior**. London: Academic, pp. 555-587.

Groves, C. P. 1993. Order primates. In Wilson, D. E. and Reeder, D. M. (eds.): **Mammal species of the world**. London: Smithsonian Institution Press, pp. 243-277.

Jauch, A., Wienberg, J., Stanyon, R., Arnold, N., Tofanelli, S., Ishida, T. and Cremer, T. 1992. Reconstruction of genomic rearrangements in great apes and gibbons by chromosome painting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89: 8611-8615.

Kampiranont, A. 2003. **Cytogenetics**. Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Koehler, U., Arnold, N., Wienberg, J., Tofanelli, S. and Stanyon, R. 1995a. Genomic reorganization and disrupted chromosomal synteny in the Siamang (*Hylobates syndactylus*) revealed by fluorescence in situ hybridisation. **Am. J. Phys. Anthropol.** 97: 37-47.

Koehler, U., Bigoni, F., Wienberg, J. and Stanyon, R. 1995b. Genomic reorganization in the concolor gibbon (*Hylobates concolor*) revealed by chromosome painting. **Genomics** 30: 287-292.

Krishna-Murthy, D. S., Jayaraman, S. and Ambani, L.M. 1979. Giemsa banding pattern in the langur monkey *Presbytis entellus entellus* (Dufresne). **Curr. Sci.** 48: 180-181.

Liu, R., Nie, W., Chen, Y. and Wang, J. 1997. Comparative studies on chromosomes for four species primates in China. **Hereditas** 19: 48-49.

Napier, J. R., and Napier, P. H. 1967. **A handbook of living primates**. London: Academic.

Napier, J. R., and Napier, P. H. 1985. **The natural history of the primates**. London: British Museum.

Nie, W., Liu, R., Chen, Y., Wang, J., and Yang, F. 1998. Mapping chromosomal homologies between humans and two langurs (*Semnopithecus francoisi* and *S. phayrei*) by chromosome painting. **Chromosome Research**.6: 447–453.

Oates, J. F., Davies, A. G., and Delson, E. 1984. The diversity of living Colobines. In Oates, J. F. and Davies, A. G. (eds.): **Colobine monkeys: Their ecology, behavior and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 45-73.

Ponsá, M., Boer, de L. E. M. and Egozcue, J. 1983. Banding patterns of the chromosomes of *Presbytis cristatus pyrhus* and *P. obscurus*. **Am. J. Primatol.** 4: 165-169.

Rooney, D. E. 2001. **Human cytogenetics**: constitutional analysis. Oxford University Press: Oxford, UK.

Sharma, G. P., Sobti, R. C., and Gupta, C. M. 1972. An analysis of chromosomes in three primates from **India. J. Hum. Evol.** 2: 283-287.

Stanyon, R., Wienberg, J., Romagno, D., Bigoni, F., Jauch, A. and Cremer, T. 1992. Molecular and classical cytogenetic analyses demonstrate an apomorphic reciprocal chromosomal translocation in *Gorilla gorilla*. **Am. J. Phys. Anthropol.** 88: 245-250.

Stanyon, R., Arnold, N., Koehler, U., Bigoni, F. and Wienberg, J. 1995. Chromosomal painting shows that "marked chromosomes" in lesser apes and old world monkeys are not homologous and evolved by convergence. **Cytogenet. Cell Genet.** 68: 74-78.

Ushima, R. N., Shininger, F. S., and Grand, T. 1964. Chromosome complements of two species of primates: *Cynopithecus niger* and *Presbytis entellus*. **Science** 146: 78-79.

Vogel, C., and Winkler, P. 1990. Langurs and Colobi. In **Grzimek's encyclopedia of mammals**, vol. 2. London: McGraw-Hill, pp. 296-324.

Wienberg, J., Jauch, A., Stanyon, R., and Cremer, T. 1990. Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal *in situ* suppression hybridization. **Genomics** 8: 347-350.

Wienberg, J., Stanyon, R., Jauch, A., and Cremer, T. 1992. Homologies in human and *Macaca fuscata* chromosomes revealed by *in situ* suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries. **Chromosoma** 101: 265-270.

Yu, D., Yang, F. and Liu, R. 1997. A comparative chromosome map between human and *Hylobates hoolock* built by chromosome painting. **Acta. Genetica. Sinica.** 24: 417-423.

2. การประชุมวิชาการระดับชาติ

วิวรรธน์ แสงภักดี, มณฑิรา มณฑาทอง และอลงกลด แทนออมทอง. 2551. ความเหมือนของโครโมโซมระหว่างมนุษย์ (*Homo sapiens*) และค่างแว่นถิ่นใต้ (*Trachypithecus obscurus*) โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน. ใน: **การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 10**. หน้า 158. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

หน้าปกและชื่อการประชุม

หน้าบทคัดย่อ

158 การประชุมวิชาการ เสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 10

Chromosomes Homology between Human (*Homo sapiens*) and Dusky Langur (*Trachypithecus obscurus*) by Fluorescence *In Situ* Hybridization

ความเหมือนของโครโมโซมระหว่างมนุษย์ (*Homo sapiens*) และค่างแว่นถิ่นใต้ (*Trachypithecus obscurus*) โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน

Wiwat Saugpakdee (วิวรรธน์ แสงภักดี)* Dr. Monthira Monthatong (ดร. มณฑิรา มณฑาทอง)**

Alongkoad Tanomtong (อลงกลด แถมออมทอง)***

ABSTRACT

Human (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758, 2n=46) and dusky langur (*Trachypithecus obscurus*, Ried, 1837, 2n=44) are classified in the same order which evolutionary close relatives. The chromosomal homology between both species was established by chromosome painting technique. The fluorescently labeled probes specific to human chromosomes 14, 15, 21 and 22 were developed. The probes were allowed to hybridize with dusky langur chromosome prepared from fibroblast culture of ear tissues. The results showed that the human chromosomes 14 and 15 probes hybridized to chromosome 5 of dusky langur while human chromosomes 21 and 22 probes hybridized to chromosome 19 of dusky langur. The hybridization patterns can be interpreted that dusky langur chromosomes 5 and 19 occurred by Robertsonian translocation from human chromosomes 14/15 and 21/22, respectively. Moreover, chromosome 19 of dusky langur bears the nucleolar organizer regions (NORs) which can be the marked chromosome of this species.

บทคัดย่อ

มนุษย์ และค่างแว่นถิ่นใต้ถูกจัดให้อยู่ในอันดับเดียวกันซึ่งมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกันอย่างใกล้ชิด การศึกษาความเหมือนของโครโมโซมทั้งสองสปีชีส์ครั้งนี้ ใช้เทคนิคโครโมโซมเพ้นทิง โดยเตรียมโพรบจากโครโมโซมของมนุษย์คู่ที่ 14, 15, 21 และ 22 นำไปไฮบริไดซ์ร่วมกับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้ที่เตรียมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อใบหู ผลการทดลองพบว่าโพรบของมนุษย์คู่ที่ 14 และ 15 จับกับโครโมโซมคู่ที่ 5 ของค่างแว่นถิ่นใต้ขณะที่โพรบของมนุษย์คู่ที่ 21 และ 22 จับกับโครโมโซมคู่ที่ 19 จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถอธิบายเชิงวิวัฒนาการของโครโมโซมของทั้งสองสปีชีส์ได้ว่าโครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้คู่ที่ 5 และ 19 เกิดจากกระบวนการรวมตัวกันแบบโรเบิร์ตโซเนียนของโครโมโซมมนุษย์คู่ที่ 14 / 15 และคู่ที่ 21 / 22 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 19 ของค่างแว่นถิ่นใต้มีบริเวณที่เรียกว่านิวคลีโอลาร์ออร์กาไนเซอร์รีเจียนส์ (นอร์) ซึ่งเป็นโครโมโซมเครื่องหมายของค่างสปีชีส์นี้

Key Words : Fluorescence *In Situ* Hybridization, Human (*Homo sapiens*) chromosomes, dusky langur (*Trachypithecus obscurus*) chromosomes

คำสำคัญ : เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินซิทูไฮบริไดเซชัน โครโมโซมมนุษย์ โครโมโซมค่างแว่นถิ่นใต้

* Student, Graduate School, Khon Kaen University.
** Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University.
*** Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University.