บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยได้ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อใบหูของค่างแว่นถิ่นใต้เพศผู้ 1 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว จากสวนสัตว์สงขลาในสังกัดองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใบหูด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) แล้วใส่ลงในขวดที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (DMEM media) ซึ่งทำการเตรียมจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อใบหูของค่างแว่นถิ่นใต้ไปเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เก็บเกี่ยวโครโมโซม และทำเทคนิค FISH ที่ Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming, Yunnan, China. P.D.R. การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน คือ การเตรียมโครโมโซม การย้อมโครโมโซมแถบสีแบบจี การย้อมโครโมโซมโดยเทคนิค FISH (chromosome painting) การจัดทำคาริโอไทป์ และการทำแผนที่โครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้เปรียบเทียบกับโครโมโซมของมนุษย์

1. การเตรียมโครโมโซม

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหู

ตัดใบหูของค่างแว่นถิ่นใต้ขนาด 0.5 ตารางเซนติเมตร เก็บใส่ขวดอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 80% และ fetal calf serum (FCS) 20% เพื่อเป็นอาหารเสริม ใส่ยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียและเชื้อรา แช่ตัวอย่างในน้ำแข็งตลอดเวลาจนถึงห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำใบหูมาเพาะเลี้ยงโดยตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ อย่างละเอียดใน 1X PBS ล้างด้วย 1X PBS 3 ครั้ง เท PBS ทิ้ง ใช้ปิเปตเขี่ยเซลล์ให้แยกออกจากกันให้มากที่สุดบนพื้นของขวดเพาะเลี้ยงแล้วหงายขวดไว้ ทิ้งให้เซลล์เกาะที่พื้นของขวดเพาะเลี้ยง 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C จะต้องทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อสังเกตเห็นว่าสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ใช้เวลาประมาณหนึ่งสัปดาห์ เซลล์จะเจริญเติบโตและมีจำนวนมากพอที่จะสามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ ซึ่งสามารถสังเกตได้โดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope

1.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell harvesting)

เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตจำนวนมากพอแล้ว หยดโคลชิซิน (colchicine) 100 µg/ml 1 หยด ลงในขวดเพาะเลี้ยงทิ้งไว้ประมาณ 30-40 นาที เพื่อยับยั้งการสร้างเส้นใยสปินเดิล (spindle fibers) จากนั้นหยดเอ็นไซม์ทริปซิน (trypsin) 0.25% ปริมาณ 1 มล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity, RH) 95% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% เป็นเวลา 10-15 นาที เทอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 5 มล. เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ถ่ายเซลล์ลงในหลอดเซนทิฟิวจ์ (centrifuge tube) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,300 รอบต่อนาที (300 xg) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทของเหลวทิ้ง แล้วเติม KCl 0.4% ประมาณ 13 มล. เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำให้เซลล์บวมพอง ทำการตรึงเซลล์ด้วยฟิกเซทีฟ (4 : 1 fixative) ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล 100% 4 ส่วน ต่อกรดอะซิติกเข้มข้น 1 ส่วน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,300 รอบต่อนาที (300 xg) เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วล้างด้วยฟิกเซทีฟอีก 2 รอบ โดยทำเหมือนขั้นตอนข้างต้น ขั้นสุดท้ายให้เทของเหลวทิ้งเกือบหมดแล้วเติมฟิกเซทีฟลงไป 0.5 มล. (ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์) จากนั้นนำเซลล์แขวนลอย (cells suspension) ไปหยดให้กระจาย (spread) บนสไลด์ที่แห้งสะอาดและเย็น เพื่อทำให้เซลล์แตกและโครโมโซมมีการกระจายตัวดี จากนั้นนำสไลด์ที่แห้งแล้วไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และเลือกสไลด์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีไม่ทับซ้อนกันมาทำเทคนิค FISH ต่อไป

2. การย้อมโครโมโซมแถบสีแบบจี

นำสไลด์ที่ต้องการย้อมใส่ในโถดูดความชื้นเพื่อให้แห้งนาน 7-10 วัน หรืออบที่อุณหภูมิ 60°C อย่างน้อย 4 ชม. หรือข้ามคืน (over night) เตรียม trypsin EDTA 0.25% นำสไลด์ที่อบแล้วมาแช่ในทริปซินที่อุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 37°C ประมาณ 15-30 วินาที หยุดการทำงานของทริปซิน โดยใช้ 1X PBS จากนั้นล้างด้วยน้ำประปา และย้อมสีจิมซ่าเข้มข้น 10% ประมาณ 5 นาที นำสไลด์ไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และถ่ายภาพเซลล์ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีไม่ทับกัน บันทึกภาพไว้เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3. การย้อมสีโครโมโซมโดยเทคนิค FISH

เทคนิค FISH เป็นการย้อมโครโมโซมโดยใช้โพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ หรือเป็นดีเอ็นเอทั้งโครโมโซม ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โพรบทั้งแท่งของโครโมโซมมนุษย์ที่เรียกว่า whole human chromosome specific probe ที่มีลำดับเบสของทั้งโครโมโซมนั้น ๆ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.Wenhui Nie, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming,

Yunnan, China. ซึ่งโพรบที่สร้างนี้สามารถนำมาไฮบริไดเซชันกับโครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้ได้ เนื่องจากมนุษย์และค่างแว่นถิ่นใต้มีบรรพบุรุษร่วมกันมาและเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โพรบที่สร้างขึ้นมานี้จะต้องมีการติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ก่อน ซึ่งอาจเป็นการติดฉลากโดยใช้สารเรืองแสงโดยตรง หรืออาจจะใช้สารที่สามารถตรวจสอบด้วยสารเรืองแสงอีกที สารเรืองแสงที่ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวตรวจสอบ ได้แก่ Cy3 ซึ่งให้สีแดงหรือชมพูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนสารที่จำเป็นต้องอาศัยตัวตรวจสอบ ได้แก่ biotin dUTP, avidin FITC, Cy3 anti-avidin เป็นต้น โดยการติดฉลากโพรบและการเพิ่มปริมาณโพรบนี้ใช้เทคนิคที่เรียกว่า DOP-PCR (degenerated oligonucleotide primer-polymerase chain reaction) สามารถตรวจสอบผลหลังจากการย้อมด้วยเทคนิค FISH โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่มีฟิลเตอร์ที่จำเพาะกับสารเรืองแสงที่ใช้ได้ หลังจากนั้นทำการถ่ายรูปเซลล์ระยะเมทาเฟสด้วยชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปที่มาพร้อมกับกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

4. การจัดทำคาริโอไทป์

คาริโอไทป์ คือ การศึกษารายละเอียดของโครโมโซมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยศึกษาทั้งจำนวนโครโมโซม และรูปร่างโครโมโซม การจัดทำคาริโอไทป์จะใช้โครโมโซมจากระยะเมทาเฟส ที่มีการย้อมแถบสีแบบจีเพียง 1 เซลล์ (เพศผู้และเพศเมีย) มาเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น การทำคาริโอไทป์ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่โดยเรียงจากมากไปหาน้อยยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายเสมอ นิยมวางแท่งโครโมโซมโดยให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบนและแขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และวางตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ให้ตรงกัน อีกทั้งต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง และบอกโครโมโซมเพศด้วยว่าเป็นโครโมโซมเอ็กซ์หรือโครโมโซมวาย

5. การทำแผนที่โครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้เปรียบเทียบกับโครโมโซมของมนุษย์

ทำการเปรียบเทียบทั้งการย้อมโครโมโซมแบบแถบสีจี และการย้อมโครโมโซมโดยเทคนิค FISH จากนั้นจัดทำแผนที่โครโมโซมของค่างแว่นถิ่นใต้เปรียบเทียบกับโครโมโซมของมนุษย์จากผลการวิเคราะห์ที่ได้