บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษา เก็บจากเส้นเลือดสายสะดือของเด็กทารกแรกเกิด ปริมาตรคนละ 5 มล. จากโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า จำนวน 1,000 คน อย่างต่อเนื่อง

2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด
   - 2.1 ไซริงค์ขนาด 5 มล.
   - 2.2 เข็มเจาะเลือด เบอร์ 21
   - 2.3 70% ethyl alcohol
   - 2.4 สารกันเลือดแข็ง (heparin)
   - 2.5 สำลีและกระดาษติดชื่อตัวอย่างเลือด

3. เครื่องแก้ว
   - 3.1 กระบอกตวง
   - 3.2 ปิเปตขนาด 5 และ 10 มล.
   - 3.3 ปาสเตอร์ ปิเปต (pasteur pipette)
   - 3.4 beaker ขนาด 500 และ 1,000 มล.
   - 3.5 volumetric flask ขนาด 1,000 มล.
   - 3.6 ขวดเลี้ยงเซลล์พร้อมฝาปิด
   - 3.7 โถแก้วสำหรับใส่น้ำยาทำความสะอาด
   - 3.8 โถแก้วสำหรับใส่สีย้อมโครโมโซม(coplin jar)
   - 3.9 plastic centrifuge tube ขนาด 10 มล.
   - 4.0 สไลด์

4. เครื่องมือ
   - 4.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด
   - 4.2 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

4.4 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath)

4.5 ตู้เลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิพร้อม CO_2 5 เปอร์เซ็นต์

4.6 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเซลล์

4.7 ชุดกรองแบบดูด (suction)

4.8 ตะเกียงบุนเสน

4.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.10 เครื่องปั่น (centrifuge)

4.11 ตู้แช่พลาสม่า ชนิดแช่แข็ง (-20 °C)

4.12 ตู้เย็น

4.13 เครื่องผสมชนิดกดปั่น (vertex mixer)

4.14 กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ blue filter และ green filter

4.15 เครื่องอัดขยายรูปขาวดำ

5. สารเคมี

5.1 absolute methanol

5.2 bacto trypsin

5.3 barium hydroxide ($Ba(OH)_2$)

5.4 bovine calf serum (flow laboratory)

5.5 colchicine

5.6 D-76 developer (Kodak)

5.7 dektal developer (Kodak)

5.8 di-sodium hydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)

5.9 fixer (Kodak)

5.10 สีย้อม Giemsa

5.11 glacial acetic acid (CH_3COOH)

5.12 glyceral

5.13 Hanks' balanced salt solution

5.14 น้ำยาฆ่าเชื้อ Hibiscrub และ Savlon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.15 hydrochloric acid (HCl)

5.16 normal saline (0.9% NaCl)

5.17 penicillin

5.18 สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ phytohemagglutinin-m (Gibco)

5.19 potassium chloride (KCl)

5.20 potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)

5.21 potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)

5.22 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ชนิดผง (flow laboratory)

5.23 sodium chloride (NaCl)

5.24 sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)

5.25 sodium hydroxide (NaOH)

5.26 7X solution (flow laboratory)

5.27 streptomycin

5.28 sulfuric acid (conc.H_2SO_4)

5.29 tri-sodium citrate ($Na_2C_6H_5O_7.2H_2O$)

5.30 น้ำกลั่น (water injection)

6. วัสดุในการถ่ายภาพและบันทึกภาพ

6.1 ฟิล์มสีและฟิล์มสไลด์ ขนาด 36 รูป

6.2 ฟิล์มขาวดำ (Kodak technical pan film) ขนาด 36 รูป

6.3 กระดาษอัดรูป เบอร์ 4 ขนาด 5" x 7"

6.4 ถาดพลาสติค ขนาด 5" x 7"

7. เครื่องใช้เบ็ดเตล็ด

7.1 aluminium foil

7.2 กล่องเก็บสไลด์

7.3 กระดาษเช็ดเลนส์

7.4 น้ำยาเช็ดเล็นส์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.5 parafin oil

7.6 parafilm paper

7.7 ผ้ากอส

7.8 กรรไกร

7.9 มีดสำหรับผ่าตัด

7.10 กระดาษชำระ

7.11 สำลี

7.12 ไซริงค์ ขนาด 1 มล.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดสายสะดือเด็กทารกแรกเกิดทุกรายจำนวน 1,000 คน อย่างต่อเนื่องกัน ที่คลอดภายในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า โดยเก็บในไซริงค์ที่ปราศจากเชื้อโรค (disposable syringe) ที่เคลือบด้วยสารกันเลือดแข็งตัว (heparin)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์

เลี้ยงเซลล์ลิมโฟซัยต์โดยวิธีการปลอดเชื้อเติมสารอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ปริมาณ 4.5 มล., Bovine calf serum 0.5 มล., pennicillin;streptomycin 0.3 มล. เลือด 0.8 มล. (ประมาณ 15 หยดหลังจากเอาเข็มออก) และสารกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัว phytohaemagglutinin-m 0.1 มล. ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ ปิดฝา เขย่าเพื่อให้สารต่าง ๆ ผสมกันเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน คลายฝาเกลียวออกพอหลวม เก็บเข้าตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C, CO_2 5 เปอร์เซนต์ นาน 48 ชั่วโมง

3. การเตรียมโครโมโซมบนสไลด์

3.1 หลังจากเลี้ยงเซลล์ครบ 48 ชั่วโมง เติม colchicine (0.2 microgram/ml) ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ 1 มล. เขย่า, ทิ้งไว้ 20 นาที เทสารลงในหลอดปั่นขนาด 15 มล. ปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็ว 1,100 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.2 ดูดของเหลวส่วนที่ใส (supernatant) ออก เหลือไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประมาณ 0.5 มล. แล้ว resuspend ตะกอนด้วยการเขย่าหลอดด้วยนิ้วมือ

3.3 เติมสารละลาย 0.075 M,KCl ที่ 37 °C 8 มล.ผสมให้ทั่ว เก็บไว้ที่ 37 °C นาน 15-20 นาที เพื่อให้เซลล์บวม นำไปปั่นที่ 1,100 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนที่ใสทิ้งให้เหลือไว้ประมาณ 1 มล.

3.4 ตรึงเซลล์ด้วย fresh cold fixative (methanol:glacial acetic acid 3:1) โดยใช้ปาสเตอร์ปิเปต หยดทีละหยดพร้อมๆ กับเขย่าหลอดด้วย virtex mixer เติม fixative ลงไปได้ 6 มล. ปิดหลอดด้วย parafilm หนา 2 ชั้น ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้เซลล์และโครโมโซมเกิดความคงตัว จากนั้นนำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 1,100 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.5 ดูดของเหลวส่วนที่ใสทิ้งไป แล้วเปลี่ยน fixative ใหม่ซ้ำอย่างน้อย 4-6 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษของเม็ดเลือดแดงและโปรตีนออกให้หมด

3.6 เติม fixative ประมาณ 0.5-1.0 มล. เพื่อผสมกับตะกอนของเซลล์ cell suspension ที่ได้ นำมาหยดด้วยปาสเตอร์ปิเปตลงบนสไลด์ที่แช่เย็นแผ่นละ 3 หยด ให้สูง 2-3 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตกตัวและโครโมโซมกระจายตัวบนสไลด์ ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4. <u>การย้อมโครโมโซม</u>

4.1 <u>การย้อมวิธี conventional หรือ solid stain</u> (ดัดแปลงจาก Patil et al. 1971)

1. เตรียมสี 20% Giemsa in phosphate buffer
2. ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa นาน 15 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา
3. ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

4.2 <u>การย้อมวิธี G-banding</u> (ดัดแปลงจาก Seabright, 1971)

4.2.1 แช่สไลด์ที่มีโครโมโซมใน 0.25% trypsin นาน 45 วินาที เพื่อชักนำให้เกิดแถบบนโครโมโซม

4.2.2 ล้างเอ็นไซม์ทริปซินออกด้วย phosphate buffer

4.2.3 ย้อมสีโครโมโซมด้วย 20% Giemsa นาน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.3 <u>การย้อมวิธี C-banding</u> (ดัดแปลงจาก Summer et al,1971)

4.3.1 แช่สไลด์ใน 0.2 N,HCl ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เพื่อให้กรดทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่อยู่บนโครโมโซมและสลายโปรตีนบางส่วนออก ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น

4.3.2 ทำให้โครโมโซมเป็นด่างโดยแช่สไลด์ใน 0.07 N, $Ba(OH)_2$ ที่ 37 °C นาน 15 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นที่ 37 °C เช่นเดียวกัน

4.3.3 แช่สไลด์ใน 2x saline sodium citrate ที่ 65 °C นาน 1-2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น

4.3.4 ย้อมสีด้วย 20% Giemsa นาน 15-20 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

<u>หมายเหตุ</u>

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการย้อมแถบโครโมโซมแบบ G-banding ทุกรายที่ทำการศึกษา ส่วนการย้อมด้วยวิธี C-banding และ conventional staining นั้น จะทำเฉพาะในบางรายที่พบว่ามีความผิดปกติของโครโมโซม หรือในบางรายที่สงสัยว่าน่าจะมีความผิดปกติ เมื่อทำการย้อมแถบแบบ G-banding แล้ว ทั้งนี้เพื่อยืนยันความผิดปกติ หรือที่สงสัยว่าน่าจะมีความผิดปกติของโครโมโซมที่พบในการย้อม G-banding

4.4 <u>ขนาดของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา</u>

ขนาดของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คำนวณจากสูตรทางสถิติ(เติมศรี,2526) ดังนี้

$$n = q/(\lambda^2 p)$$

กำหนดให้ n = ขนาดของตัวอย่าง

p = ค่า prevalence value หรือค่าอุบัติการความผิดปกติ

q = 1-p

λ = 0.05 คือ กำหนดให้มีความผิดพลาดได้ 5%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ้าหากเราใช้ค่าอุบัติการความผิดปกติของโครโมโซมของประเทศเดนมาร์ก เป็นค่า prevalence value (2.023%)(Nielsen และคณะ,1982) แล้ว เมื่อใช้สูตรคำนวณแล้วจะได้ขนาดตัวอย่างประมาณ 19,401 คน ซึ่งการที่ต้องใช้ขนาดตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่เช่นนี้เพราะโอกาสที่จะพบความผิดปกติของโครโมโซมนั้นน้อยมาก ถ้าหากขนาดของตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเล็กไปอาจไม่พบเลยก็ได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ขนาดของตัวอย่างที่มากพอ จึงจะพบความผิดปกติของโครโมโซมและผลที่ได้ก็สามารถสรุปเป็นผลที่พบในประชากรที่ศึกษานั้น การวิจัยครั้งนี้จึงได้พิจารณาขนาดของตัวอย่างโดยจะใช้ขนาดตัวอย่างเป็นทารกแรกเกิดจำนวน 1,000 คนมาศึกษาหาค่าอุบัติการของความผิดปกติโครโมโซม

4.5 การตรวจสอบโครโมโซม

ตรวจสอบโครโมโซมที่ย้อมแล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด 2 ตา กำลังขยาย 10x10 และ 10x100 เลือกดูโครโมโซมในระยะเมตาเฟสที่มีแถบ,มีขนาดความยาวเหมาะสม และกระจายตัวดี เพื่อความสะดวกต่อการตรวจสอบจำนวน 10 เซลล์ใน 1 ราย ถ้าพบว่ามีโครโมโซมผิดปกติเพียง 1 เซลล์ จะเพิ่มการตรวจสอบเป็น 25-50 เซลล์ ถ่ายภาพโครโมโซมที่ดีที่สุด 1 เซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 10x100 ด้วยฟิล์มขาวดำ แล้วนำมาจัดเรียงคาริโอไทป์ เปรียบเทียบกับ Standardization in Human Cytogenetic (Paris Conference 1975) และ An International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN (1970)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย