อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาไมโตซิสนี้ใช้ endosperm เซลล์ของ Zephyranthes ตามวิธีการคล้ายของ Bajer (1955) ซึ่งเป็นพืชที่ออกดอกตลอดปี มี fertility สูง ให้ดอกเมล็ดมากและรวดเร็ว ในการศึกษาใช้ endosperm เซลล์ที่ได้หลังจากการผสมแล้วประมาณ ๖ ถึง ๗ วัน ในระยะนี้ endosperm อยู่ในระยะ free cell ยังไม่เกิด cell wall ทำให้มองเห็นลักษณะภายในได้ชัดเจน เมื่อนำมาเลี้ยงบนวุ้นอาหาร สามารถจะทำให้เซลล์แบนราบได้ตามความต้องการ มองเห็นโครโมโซมและพฤติการณ์ต่างๆที่เกิดขึ้นได้โดยตลอด คุณสมบัติที่ดีคือ endosperm กำลังอยู่ในระยะที่มีการเจริญและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว ขนาดของเซลล์ใหญ่เอาออกจากเมล็ดได้ง่ายวิธีการธรรมดา จึงสามารถจะหาเซลล์ที่ทำการศึกษาไมโตซิสได้ง่าย

Endosperm ที่ทำการศึกษามี ๔๔ โครโมโซม จากการนับจำนวนโครโมโซมจากปลายราก ขนาดของโครโมโซมปานกลาง เนื่องจาก endosperm ปกติเป็น triploid ฉนั้นจึงมี ๖๖ โครโมโซม ลักษณะของนิวเคลียสใน endosperm ใหญ่ มีนิวคลีโอลัสเป็นจำนวนมาก ซึ่งจำนวนนิวคลีโอลัสของแต่ละเซลล์แตกต่างกัน

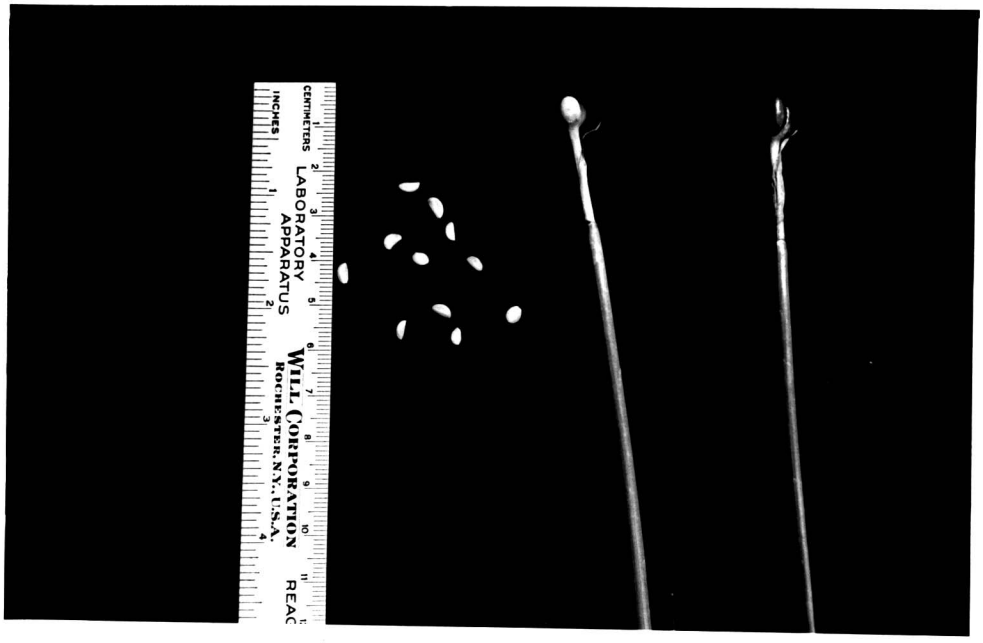
อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

๑. สไลด์พิเศษทำด้วยพลาสติก ขนาด ๗๖ X ๒๖ มม. หนา ๑ มม. เจาะสไลด์ตรงกลางให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด ๒๑ X ๑๗.๕ มม. ปิดด้วย cover glass ทั้งสองด้าน การที่ใช้สไลด์ชนิดนี้แทนสไลด์แบบ hanging drop แบบธรรมดาก็เพื่อป้องกันมิให้แสงกระจายเนื่องจากความโค้งของสไลด์

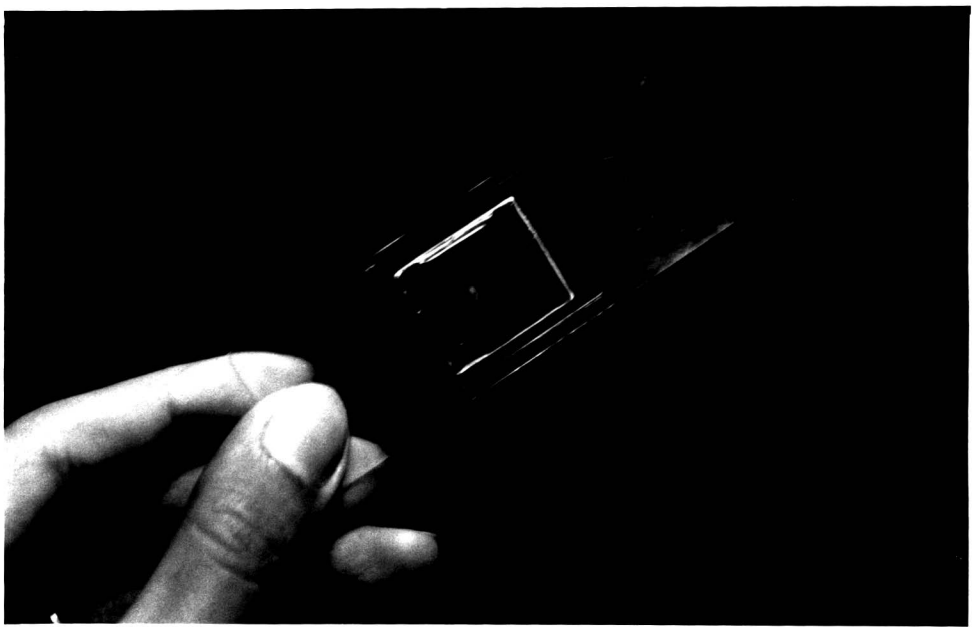
๒. กล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast Zeise Wibkle objective ชนิด achromatic และ apochromatic ที่มีกำลังขยาย ๔๐ เท่า และ eyepiece ชนิดพิเศษสำหรับถ่ายภาพมีกำลังขยาย ๓ เท่า

๓. เครื่องถ่ายภาพยนต์แบบ Time Lapse ประดิษฐ์โดย อาจารย์ ยรรยง ณ ตะกั่วทุ่ง และ อาจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย

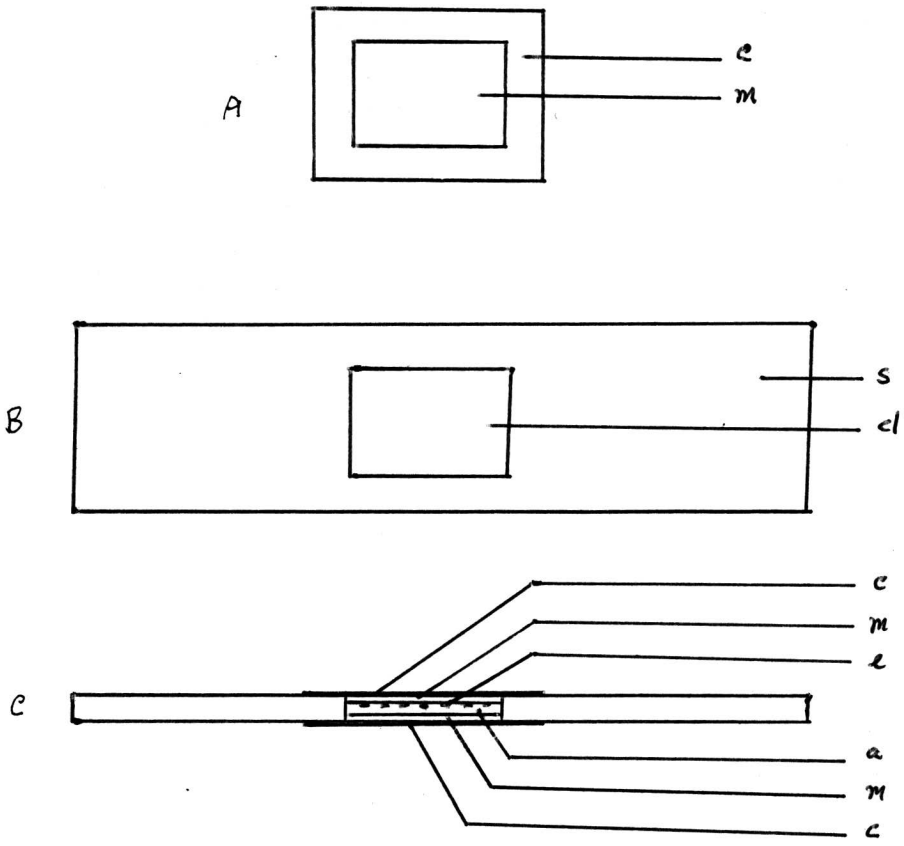
รูปที่ ๑ ต้นบัวจีน **Zephyranthes**



รูปที่ ๒ ผักและเมล็ดของ Zephyranthes
ขนาดของเมล็ดที่แสดงในภาพนี้ได้หลังจากการผสมแล้ว ๗ วัน
มี endosperm เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวอยู่เป็นจำนวนมาก



รูปที่ ๓ แสดงสไลด์ที่ใช้เลี้ยง endosperm เซลล์เพื่อดู mitosis เนื้อเยื่อขาวที่เห็นภายในสไลด์คือกลุ่มของ endosperm เซลล์ที่ปนออกมากับน้ำเลี้ยง

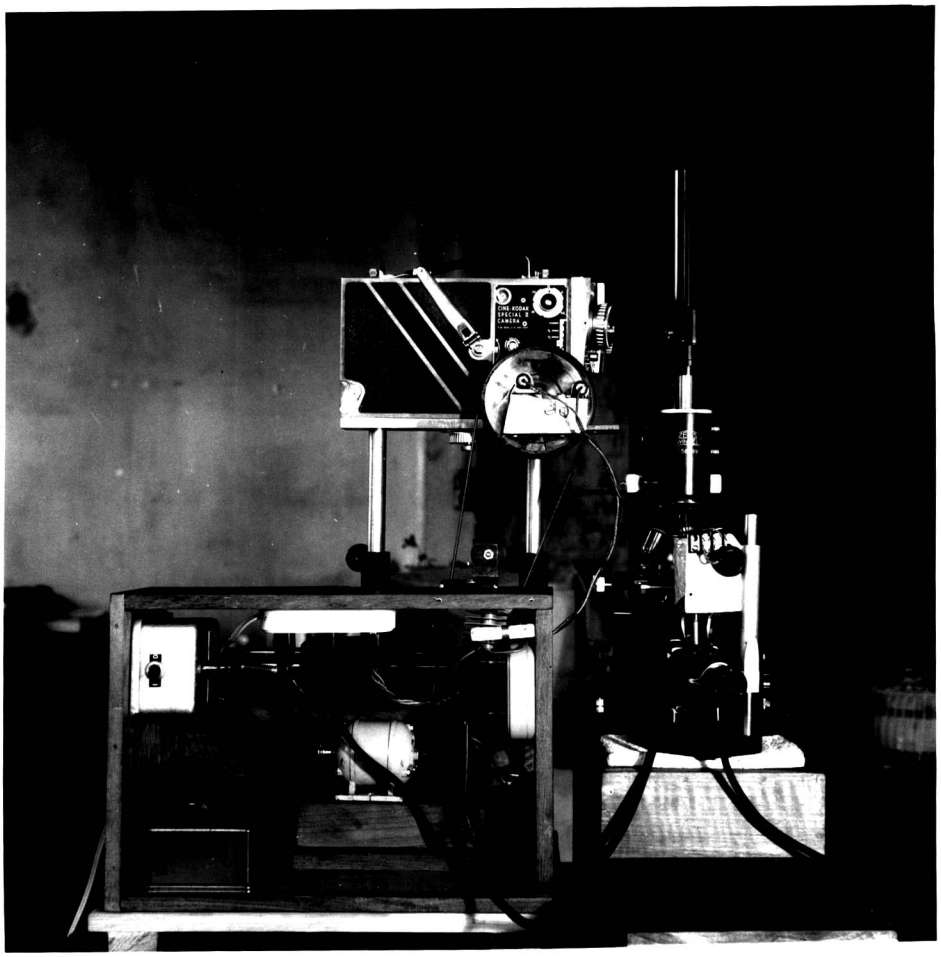


รูปที่ ๔ แสดง diagram ของสไลด์ที่ใช้เลี้ยง endosperm เซลล์เพื่อดูไมโทซิส

รูป A แสดง cover glass (c) ทาด้วย agar medium (m) cover glass นี้ปิดทั้งสองด้านของไลด์แต่ด้านหนึ่งมี endosperm เซลล์อยู่ endosperm เซลล์กระจายอยู่ทั่วไป

รูป B แสดงสไลด์ (s) และช่องว่างตรงกลาง (cl) ซึ่งใช้เป็นช่องเลี้ยง

รูป C แสดง section ของสไลด์หลังจากการตระเตรียมเสร็จสิ้นแล้ว cover glass ด้านบนมี endosperm เซลล์อยู่ระหว่าง cover glass ทั้งสองมีช่องอากาศ (a) อยู่เล็กน้อย



รูปที่ ๕ เครื่องถ่ายภาพยนต์แบบ Time Lapse

๔. กล้องถ่ายภาพยนต์ Kodak Special Camera II ขนาด ๑๖ มม.

๕. ฟิล์มภาพยนต์ Tri-X reversal ขนาด ๑๖ มม.

๖. กลูโคสและ Bacto agar

วิธีการเลี้ยงเซลล์

วิธีการทำแบบ hanging drop technique โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bajer (1955) วุ้นอาหารที่ใช้เลี้ยง คือ กลูโคส ๕ เปอร์เซ็นต์ และ agar ๐.๖ เปอร์เซ็นต์ การเตรียมสไลด์ตามรูปที่ ๔

วิธีการเชื่อม cover glass ติดกับสไลด์ด้านหนึ่งด้วยวาสลินหรือ Dow Conning Stop Cork Grease บน cover glass ทาด้วย glucose agarเป็นแผ่นบางๆ หนาประมาณ ๐.๔ มม. Agar บน cover glass นี้จะมีผิวเรียบเนื่องจากแรงดึงที่ติดกับขอบสไลด์ นำเอาเมล็ดที่ต้องการซึ่งมีขนาดประมาณ ๓ ถึง ๕ มม. มาค่อยๆบีบให้น้ำภายในและเซลล์ไหลลงบนวุ้น เอียงสไลด์ไป มาให้น้ำกระจายไปทั่วเพื่อให้เซลล์กระจายและเป็นการทำให้เซลล์แบนราบด้วยแรงตึงผิวระหว่างเซลล์และวุ้น ทำให้โครโมโซมเรียงตัวอยู่ในระดับเดียวกันและทำให้โฟคัสง่ายสดวกแก่การถ่ายภาพ Cover glass อีกด้านหนึ่งก็ทาด้วยกลูโคส agar เช่นเดียวกัน แล้วนำมาปิดสไลด์และยาด้วยวาสลินเช่นเดียวกับอันแรก ทั้งนี้เพื่อจะเก็บความชื้นภายในช่องเลี้ยงให้คงตัวไม่ให้น้ำจากเมล็ดบนด้านตรงข้ามระเหยออกไปได้เร็ว ระหว่าง cover glass ทั้งสองจะมีช่องว่างเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ก็มีอิทธพลเพียงพอสำหรับการหายใจ

วิธีการเลี้ยง endosperm เซลล์แบบนี้พยามทำให้ปราศจากเชื้อราและแบคทีเรียและใช้น้ำกลั่นสองชั้นเพื่อการผสมวุ้นอาหาร น้ำกลั่นครั้งที่สองทำโดยเอาน้ำกลั่นจากเครื่องกลั่นธรรมดามากลั่นด้วยเครื่องกลั่นที่ทำด้วยแก้วล้วนอีกครั้งหนึ่งเพื่อกำจัดสารเคมีหรือ heavy metal ต่างๆที่เหลืออยู่ เครื่องใช้ทุกชนิดล้างให้สะอาดที่สุดด้วย redistilled water นี้

การศึกษาไมโตซิส

เลือกศึกษาจากเซลล์ที่กำลังมี mitotic activity หลังจากนำออกมาเลี้ยง

บนสไลด์ใหม่ๆด้วยกล้องจุลทัศน์ phase contrast Zeise Wibkle objective 40 X eyepiece 3 X บันทึกพฤติการณ์ที่เกิดขึ้นด้วยการถ่ายทำเป็นภาพยนต์โดยใช้เครื่องถ่ายแบบ Time Lapse ด้วยความเร็ว ๑๒ ภาพต่อนาที ด้วยกล้อง Kodak Special II ใช้ฟิล์ม Tri-X reversal ระหว่างหลอดไฟและกล้องจุลทัศน์มี water cell เพื่อกันเอา heat ray ออก ถ่ายในอุณหภูมิห้องประมาณ ๒๔° ถึง ๓๑° ซ ฟิล์มภาพยนต์ที่ถ่ายได้ล้างด้วย D-19 เป็นเวลา ๘ นาที ณ อุณหภูมิ ๒๐° ซ วิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นจากภาพยนต์ที่บันทึกไว้

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสในระยะต่างๆของไมโตซิส เริ่มจากระยะ prophase จนกระทั่งถึง telophase หาระยะเวลาของระยะต่างๆในไมโตซิสจากเซลล์ที่มีการแบ่งแบบปกติและผิดปกติภาพใต้สภาพธรรมชาติ พร้อมทั้งดูพฤติการณ์ต่างๆที่เกิดขึ้น

<u>การวิเคราะห์ผล</u>

วิเคราะห์จากการถ่ายภาพยนต์ดูการเปลี่ยนแปลงและจาก micrograph ซึ่งอัดจากฟิล์มภาพยนต์ตามลำดับของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น เว้นระยะภาพละ ๑๕, ๒๐, ๓๐, ๖๐, ๑๒๐ วินาทีตามลำดับของเหตุการณ์ การหาระยะเวลาและพฤติการณ์ต่างๆในไมโตซิสศึกษาจาก micrograph เป็นส่วนใหญ่

<u>วิธีการ</u>

ในระยะเริ่มต้นของไมโตซิสคือระยะ prophase, contraction stage, และ metakinesis ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสโดยการวัดขนาดการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส หลังจาก nuclear membrane ละลายก็วัดขนาดของกลุ่มโครโมโซมแทนตามวิธีการของ Bajer & Molé-Bajer (1956) พร้อมทั้งดูพฤติการณ์ประกอบด้วยจาก micrograph การวัดขนาดของนิวเคลียสนี้วัดความกว้างตาม metaphase plane และความสูงที่ตั้งฉากกับ metaphase plane วิธีการวัดใช้ไม้โปรเตคเตอร์วัดจาก micrograph ที่อัดขยายจาก negative ๙ เท่า รวมกำลังขยายทั้งหมดจากเซลล์ ๑๐๘๐ เท่า วัดเป็นมิลลิเมตร์แล้วเทียบหาขนาดจริงเป็น micron อีกทีหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทำให้ทราบว่าในระยะใดที่เข้าสู่ระยะ contraction stage และ metakinesis

การหาระยะ anaphase เริ่มจากการแยกของ kinetochore การเกิดนิวคลีโอลัสขึ้นใน daughter nuclei ถือเป็นการสิ้นสุดของระยะ telophase

การวัดระยะต่างๆของไมโตซิสเนื่องจากพฤติการณ์ที่เกิดขึ้นติดต่อกันไปไม่สามารถจะแบ่งแยกออกจากกันได้โดยเด็ดขาด จึงแบ่งออกดังนี้

๑. Contraction stage เริ่มจากการที่กลุ่มโครโมโซมถูกกดมารวมตัวกันเข้าแล้วกระจายออกจากกัน

๒. Metakinesis และ Metaphase เริ่มจากการที่กลุ่มโครโมโซมที่กระจายออกเดินทางมารวมกันสร้าง metaphase plate จนกระทั่งสมดุล เกิดการแยกของ kinetochore

๓. Anaphase และ Telophase เริ่มจากการที่ kinetochore แยกออกจากกันที่ metaphase plate แล้วเดินทางไปยังขั้ว เปลี่ยนแปลงลักษณะเกิดเป็น daughter nuclei Telophase จบเมื่อเริ่มเกิดนิวคลีโอลัส ในระยะนี้อาจแบ่งออกได้เป็นสองตอน คือ

ก. การแยกของ kinetochore จนกระทั่งเกิด cell plate

ข. การเกิด cell plate จนกระทั่งเกิดนิวคลีโอลัส