หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

ปลาที่จับมาได้แต่ละครั้ง นำมาใส่ตู้กระจกที่ขังน้ำประปาไว้อย่างน้อย 3 วัน โดยใส่ปลา 5-6 ตัว ต่อตู้กระจก 1 ตู้ ปลาบางชนิดอ่อนแอและตายง่าย บางส่วนจึงต้องฉีด colchicine ทันทีขณะเก็บปลาชนิดนั้นได้ แล้วนำกลับมาทำต่อที่ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ในวันเดียวกัน ฉะนั้นสถานที่ ๆ จะไปเก็บตัวอย่างปลาจึงจำเป็นต้องอยู่ในระยะทางที่จะเดินทางกลับถึงจุฬาฯ ได้ภายใน 3 ชั่วโมง ส่วนปลาที่เหลือ ฆ่าในวันต่อไปให้หมดเร็วที่สุดเท่าที่จะสามารถทำได้ ปลาที่ใช้ในการศึกษาโครโมโซมนี้เลือกขนาดระหว่าง 1-50 กรัม ทำโดยวิธีดัดแปลงมาจากวิธีของ Davission (1972)

1. <u>การเตรียมโครโมโซมของปลาโดยทำเป็น permanent slide</u>

1.1 Preteratment : เพื่อให้เซลที่กำลังแบ่งตัวหยุดหยู่ในระยะ metaphase โดยฉีด colchicine 0.5 % ปริมาณ 0.003 ลบ.ซม. ต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม เข้าที่ช่องท้อง เวลาที่เหมาะสมในการฉีด colchicine ของปลาที่ศึกษานี้ ระหว่างเวลา 11.00-14.00 น. หลังจากนั้นให้ปลาว่ายน้ำในภาชนะที่มีอากาศผ่าน 3-4 ชั่วโมง แล้วฆ่าปลาโดยแช่ในน้ำแข็งที่ 0 °ซ

1.2 Hypotonic treatment : เพื่อช่วยให้เซลพอง สะดวกในการที่ทำให้เซลแตกและโครโมโซมกระจาย หลังจากฆ่าปลาแล้วใช้มีดปลายแหลมคม กรีดท้องตั้งแต่ระดับใต้คางจนถึงทวาร เปิดช่องท้องตัดเอาเฉพาะม้าม ถ้ามีมันติดมาด้วยต้องตัดมันออกให้หมด ใช้กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็กตัดม้ามให้เป็นชิ้นเล็กละเอียด แช่ใน 1 % sodium citrate ซึ่งเป็น hypotonic solution นาน 30 นาที ส่วนปลาที่ตัดม้ามออกแล้วผูกป้าย ดองใน 10 % ฟอร์มาลิน เก็บไว้เป็นหลักฐานในการวิเคราะห์ปลา

1.3 Fixation : เพื่อเก็บรักษาเซลโดยไม่ทำลายส่วนประกอบของเซล ใช้หลอดหยด ดูด hypotonic solution ออกให้หมด แล้วเติม 50 % glacial acetic acid ซึ่งเตรียมใหม่ ๆ ลงไป จะทำหน้าที่เป็น fixative ใช้กระจกปิดกันระเหย ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

1.4 Squash preparation : เพื่อให้โครโมโซมกระจาย โดยใช้หลอดหยด ดูดม้ามในน้ำยา fixative หยดบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ปลายเข็มเขี่ยให้เนื้อเยื่อของม้ามกระจาย ปิดด้วย cover glass ที่สะอาด ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ใช้กระดาษซับวางทับด้านบน ครั้งแรกใช้นิ้วหัวแม่มือกดเบา ๆ แล้วจึงเพิ่มแรงกดให้หนักมากขึ้น โดยระวังไม่ให้ cover glass เลื่อนไปจากตำแหน่งเดิม เพื่อป้องกันไม่ให้โครโมโซมปนกับโครโมโซมของเซลอื่น

1.5 Air dried slide : ทำสไลด์ให้แห้ง โดยนำแผ่นสไลด์ที่มีโครโมโซมถูกบี้กระจายแล้ววางบนก้อนน้ำแข็งแห้ง นานอย่างน้อย 30 นาที ใช้ใบมีดโกนแกะ cover glass ออกจากแผ่นสไลด์ขณะที่แผ่นสไลด์อยู่บนก้อนน้ำแข็งแห้ง โดยวิธีนี้โครโมโซมจะติดไปกับแผ่น cover glass น้อยมาก (Conger and Fairchild, 1953) นำแผ่นสไลด์ผึ่งให้แห้งในอากาศประมาณ 24 ชั่วโมง

1.6 Staining : เพื่อให้เห็นโครโมโซมชัดเจน ย้อมด้วยสี Giemsa (Gurr, 1966) ที่เตรียมใหม่ ๆ ก่อนย้อมทุกครั้งนาน 19-20 ชั่วโมง ล้างสีที่เกินพอด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งในอากาศ

1.7 Permanent slide preparation : เซลที่ย้อมสีแล้วทำให้ใสโดยผ่านการแช่ xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที mount ด้วย canada balsam

2. การถ่ายรูปโครโมโซมจาก permanent slide

ใช้กล้องถ่ายรูป Olympus PM-6 ที่ติดกับกล้องจุลทัศน์ โดยใช้ objective ขนาดกำลังขยาย X 100 และ eye piece ขนาดกำลังขยาย X 15 เลือกถ่ายเฉพาะโครโมโซมที่กระจายดี และมีจำนวนมากที่สุดของปลาแต่ละชนิดประมาณ 50-60 เซล

3. การหาจำนวนโครโมโซมของปลาแต่ละชนิดที่ศึกษา

นำฟิล์ม ที่ถ่ายภาพของโครโมโซมจากข้อ 2 ไปล้าง เป็นฟิล์ม negative ให้ได้ภาพขยายประมาณ 7,000 เท่า (ตัดฟิล์มใส่กรอบและฉายโดยเครื่องฉายสไลด์) นับจำนวนโครโมโซมจากภาพที่ขยายนี้ จำนวนเซลที่นับโครโมโซมได้น้อยกว่าจำนวนที่ควรจะเป็น $\pm$ 2 ไม่นำมาแสดงในตารางผลการทดลอง (ตารางที่ 1) จากจำนวนเซลที่นับจำนวนโครโมโซมได้ในปลาแต่ละชนิดในตารางที่ 1 นี้ นำไปทดสอบทางสถิติโดยวิธี "t-test" เพื่อหาค่าของความเชื่อมั่น

4. การจัดแคริโอไทพ์ของปลา

เลือกฟิล์ม nega ive รูปโครโมโซมของปลาแต่ละชนิดที่กระจายดีที่สุด และมีจำนวนถูกต้องมา 10 เซลจาก 20 เซล ไปอัดเป็นภาพขยายขนาด 5,500 เท่า (โดยเทียบกับขนาดของ stage micrometer) วัดความยาวของ short arm (Ls) และ long arm (Ll) โดยวัดจากตำแหน่ง centromere ไปยังปลายโครโมโซมทั้ง 2 ข้าง โดยใช้แคริปเปอร์วัดภายใต้กล้อง 2 ตา ขนาดกำลังขยายประมาณ 15 เท่า ตัดรูปโครโมโซม แล้วจัดคู่โดยอาศัยลักษณะที่คล้ายกันมากที่สุดประกอบกับค่า C.I. และความยาวเท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุด เรียงลำดับตามความยาว และแบ่งชนิดของโครโมโซมโดยใช้ค่า centromeric index (C.I.) = $\frac{Ll}{Lt}$ (Le juene, 1965)

เพื่อที่จะแยกชนิดของโครโมโซมได้ชัดเจนและเหมาะสมกับลักษณะโครโมโซมของปลาที่ศึกษาครั้งนี้จึงจัดกลุ่มชนิดของโครโมโซมโดยอาศัยค่าของ C.I. ดังต่อไปนี้

4.1 metacentric chromosome
ค่า C.I. ระหว่าง 0.500-0.599

4.2 submetacentric chromosome
ค่า C.I. ระหว่าง 0.600-0.779

4.3 acrocentric chromosome หรือ telocentric chromosome
ค่า C.I. ระหว่าง 0.780-1.000

แบ่ง acrocentric chromosome ซึ่งดัดแปลงจาก Chen and Ruddle (1970) ออกเป็น 2 พวกคือ

4.3.1 long short-armed acrocentric chromosome (LSA)
ซึ่งมีค่า C.I. $<$ 0.8

4.3.2 short short-armed acrocentric chromosome (SSA)
ซึ่งมีค่า C.I. $>$ 0.8

และ LSA หรือ SSA ชนิดใดชนิดหนึ่งมีจำนวนเกิน 50 % ขึ้นไปถือเป็น LSA หรือ SSA group ตามลำดับ

ขนาดของโครโมโซมแบ่งได้เป็น 2 พวก ตามวิธีของ Ullerich (1966) คือโครโมโซมขนาดใหญ่และเล็ก โดยที่โครโมโซมขนาดใหญ่มีขนาดความยาวเกินครึ่งหนึ่งของโครโมโซมคู่ยาวที่สุด ส่วนที่เหลือจัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็ก

5. เปรียบเทียบแคริโอไทพ์ในปลาสกุลเดียวกัน ได้แก่ปลาสกุล Pangasius และ Mystys

5.1 จำนวนโครโมโซม (diploid number)

5.2 ชนิดของโครโมโซม (chromosome type)

5.3 จำนวนแขนของโครโมโซม (arm number)

โดยถือหลักของ Simon and Dollar (1963) โครโมโซมที่มี centromere อยู่กึ่งกลางหรือเกือบกึ่งกลางเป็น bi-arm chromosome ดังนั้น metacentric และ

submetacentric chromosome มี arm number = 2 แต่ถ้า centromere อยู่ปลาย หรือค่อนไปทางปลาย จัดเป็น one-arm chromosome ดังนั้น acrocentric และ telocentric chromosome มีจำนวน arm number = 1