สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เทคนิคการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831

นางสาวบุญญาณี อภิรักษ์เหล่าสกุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67282
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chromosome Preparation Techniques for Cytogenetic Study of Asiatic Painted Frog, *Kaloula pulchra* Gray, 1831

Boonyanee Apiruklosakul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง เทคนิคการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831

นักศึกษา นางสาวบุญญาณี อภิรักษ์เหล่าสกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ. ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง เทคนิคการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831

นักศึกษา นางสาวบุญญาณี อภิรักษ์เหล่าสกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเทคนิคการเตรียมโครโมโซมเพื่อศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของอึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831 ผลคือสามารถเตรียมโครโมโซมที่แบ่งแบบไมโทซิสจากเซลล์ไขกระดูกได้โดยตรง หลังจากที่ฉีดสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ปริมาตร 0.01 มล./น้ำหนักตัว 1 กรัม โดยฉีดเข้าช่องท้องแล้วทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที จึงผ่าตัด นำเซลล์ไขกระดูกแช่ในสารละลาย 0.075 M KCl เป็นเวลา 30 นาที และตรึงเซลล์ด้วยสารละลายเมทานอล-กรดอะซิติก (3:1) ก่อนการย้อมสีต้องทำให้โครโมโซมแห้งในอากาศ ย้อมสี Giemsa 10% นาน 10 นาที จำนวนโครโมโซมของ *K. pulchra* คือ 2n = 28 ประกอบด้วยโครโมโซมรูปร่างแบบเมทาเซนทริก 5 คู่ และซับเมทาเซนทริก 9 คู่ ส่วนค่าความยาวสัมพัทธ์ ดัชนีเซนโทรเมียร์ และอัตราส่วนของแขนโครโมโซม อยู่ในช่วงระหว่าง 4.411-13.316 35.483-49.916 และ 1.003-1.818 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Chromosome Preparation Techniques for Cytogenetic Study of Asiatic Painted Frog, *Kaloula pulchra* Gray, 1831
Name	Miss Boonyanee Apiruklosakul
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assistant Professor Dr. Ounruan Petcharawan
Special Project Co-Advisor	Assistant Professor Dr. Supattar Poeaim

Abstract

The investigation of chromosome preparation techniques for cytogenetic study of Asiatic painted frog, *Kaloula pulchra* Gray, 1831, the results showed that the mitotic chromosomes could be prepared directly from bone marrow cells after intraperitoneally injected with 0.01 ml/g body weight of 0.5 mg/ml colchicine solution and left for 2 hours and 30 minutes before sacrifice. Bone marrow cells were treated with 0.075 M KCl for 30 minutes and fixed in methanol-acetic acid (3:1) solution. Chromosomes were obtained by air drying and stained for 10 minutes in 10% Giemsa solution. The chromosome numbers of *K. pulchra* was 2n = 28, with 5 metacentric pairs and 9 submetacentric pairs. The relative length, centromeric index and arm ratio of chromosomes ranged from 4.411-13.316, 35.483-49.916 and 1.003-1.818, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและคำแนะนำที่มีประโยชน์จาก ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ ประสบการณ์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้าในภายหน้า ข้าพเจ้ามีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชรวัลย์ และ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการสอบโครงงานพิเศษ รวมทั้งให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบรูณ์เรียบร้อยยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจโดยเฉพาะพี่ๆในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ช่วยเหลือ แนะนำ จนทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจ เป็นกำลังใจสำคัญ และให้การสนับสนุนส่งเสริมทางด้านการศึกษาแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

นางสาวบุญญาณี อภิรักษ์เหล่าสกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV-V
สารบัญตาราง.....VI
สารบัญรูป.....VII
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3
2.1 อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra* Gray, 1831).....3
2.2 การศึกษาโครโมโซม.....4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....11
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....11
3.2 วิธีการทดลอง.....12
3.2.1 การศึกษาปัจจัยของ colchicine และระยะเวลาที่อยู่ในตัวสัตว์ ต่อปริมาณเมทาเฟส.....12
3.2.2 การศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อเซลล์.....12
3.2.3 การย้อมสีแบบธรรมดา.....13
3.2.4 การวิเคราะห์โครโมโซมและการทำคารีโอไทป์.....13
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....15
4.1. การศึกษาปัจจัยของ colchicine และระยะเวลาที่อยู่ในตัวสัตว์ ต่อปริมาณเมทาเฟส.....15
4.2 การศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อเซลล์.....16
4.3 การวิเคราะห์โครโมโซมและการทำคารีโอไทป์.....17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....21
เอกสารอ้างอิง.....22
ภาคผนวก.....26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 การจำแนกชนิดของโครโมโซมจากค่าของ Centromeric index (CI).....14

3.2 แสดงลักษณะ รูปร่าง ขนาด ค่า Centromeric index (CI) ค่า Arm ratio (AR) และ ค่า Relative length (RL) ของอึ่งอ่างบ้าน.....19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	อึ่งอ่างบ้าน *Kaloula pulchra* Gray, 1831	3
2.2	แสดงส่วนประกอบของโครโมโซม	4
2.3	แสดงตำแหน่งไคนีโทคอร์ในโครโมโซม	5
2.4	แสดงรูปโครโมโซม	6
2.5	แสดงลักษณะการแบ่งเซลล์ในระยะต่างๆ	8
3.1	แสดงการจับคู่ตามความยาวที่ใกล้เคียงกันของโครโมโซมอึ่งอ่างบ้าน	14
4.1	แสดงโครโมโซมระยะเมทาเฟสของเซลล์ไขกระดูกใช้ colchicine ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที	15
4.2	เซลล์จากไขกระดูกซึ่งแช่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.075 โมลาร์ นาน 30 นาที	16
4.3	แสดงลักษณะของเซลล์จากเนื้อเยื่อตับที่ใช้ความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.075 โมลาร์ระยะเวลาต่างกัน	17
4.4	ภาพบนแสดงระยะเมทาเฟสของอึ่งอ่างบ้าน ภาพล่าง แสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซมอึ่งอ่างบ้าน	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ / ที่มาของโครงงานพิเศษ

ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย ยังมีการศึกษาไม่มากนัก จากรายงานของส่วนวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ ในปี พ.ศ. 2541 ประเทศไทยมีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก 106 ชนิด (สวัสดิ์, 2541) ต่อมา Office of Environment Policy and Planning (2000) รายงานจำนวนสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย มีทั้งสิ้น 123 ชนิด ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยของสัตว์กลุ่มนี้มีไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านชีววิทยา ปริมาณประชากร การแพร่กระจาย พฤติกรรม รวมถึงสถานภาพของสัตว์กลุ่มนี้ (กำธร, 2543) นอกจากนี้ทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ และพันธุศาสตร์โมเลกุลของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย มีการศึกษาน้อยมากเช่นกัน

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์ที่มีผิวหนังอ่อนนุ่มและบาง ดังนั้นจึงได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและมลพิษต่างๆ เช่น คุณภาพของน้ำในแหล่งอาศัย สารเคมีต่างๆ ตลอดจนอุณหภูมิที่สูงขึ้น เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุทำให้สัตว์กลุ่มนี้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังตัวอย่างที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามลพิษต่างๆมีผลทำให้สะเทินน้ำสะเทินบกผิดปกติเป็นจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ (Johnson, 2002)

อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra* Gray 1831) จัดเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบได้ตามแหล่งที่อยู่อาศัยทั่วไป แต่ปัจจุบันพบเห็นค่อนข้างยากกว่าแต่ก่อน อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมของแหล่งอาศัยเปลี่ยนแปลงไป เช่น พื้นที่ป่าไม้ถูกทำลาย นอกจากนี้ยังถูกจับกินเป็นอาหาร ดังนั้นจึงทำให้สัตว์ในกลุ่มนี้มีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ซึ่งปัจจุบันยังขาดความรู้พื้นฐานทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะทำการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์กลุ่มนี้ให้มากขึ้น เพื่อเป็นความรู้เบื้องต้นที่จะศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการเตรียมโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน
2. เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและจำนวนโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน
3. ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คาริโอไทป์ของอึ่งอ่างบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน เช่น ลักษณะรูปร่าง และจำนวนโครโมโซม การทำคาริโอไทป์ โดยการย้อมสีแบบธรรมดาด้วยสี Giemsa

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน
2. ทราบถึงชนิดของเซลล์และอวัยวะที่เหมาะสมต่อการศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน
3. ทราบข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การศึกษาชนิดของอึ่งอ่างบ้านในระดับโมเลกุลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 อึ่งอ่างบ้าน (*Kaloula pulchra* Gray 1831)

อึ่งอ่างบ้าน (Asiatic painted frog หรือ banded bull frog) จัดอยู่ในแฟมมิลี่ Microhylidae ลักษณะตัวเต็มวัยมีขนาดใหญ่ ความยาวจากปากถึงรูทวารหนักประมาณ 6 เซนติเมตร ลำตัวอ้วนป้อมคล้ายรูปสามเหลี่ยม ผิวหนังมีตุ่มขนาดเล็กกระจายทั่วไป และที่ด้านท้องมีขนาดเล็กกว่าบนหลัง และมีตุ่มขนาดปานกลางกระจายอยู่ห่างๆ ขาหน้ายาวและมีนิ้วตีนยาว ปลายนิ้วแผ่เป็นแผ่นแบนที่ส่วนปลายตัดตรง ไม่มีแผ่นหนังระหว่างนิ้วตีน นิ้วแรกสั้นกว่านิ้วที่สอง ปุ่มใต้นิ้วใหญ่ ปุ่มที่ฝ่าตีนมี 3 ปุ่ม ปุ่มนอกรูปร่างยาวและมีขนาดใหญ่ที่สุด ปุ่มกลางมีขนาดเล็กที่สุด ขาหลังสั้นมาก ตีนหลังมีนิ้วยาวเรียว นิ้วที่ห้าสั้นกว่านิ้วที่สอง ระหว่างนิ้วมีร่องรอยของแผ่นหนังเล็กน้อย ปลายนิ้วขยายออกแต่มีขนาดเล็กกว่าของนิ้วตีนหน้า ปุ่มใต้นิ้วตีนหลังใหญ่ ปุ่มใต้ฝ่าตีนหลังมี 2 ปุ่ม ปุ่มในรูปร่างคล้ายพลั่วและมีขนาดใหญ่ ปุ่มนอกมีขนาดเล็ก ลำตัวด้านบน ส่วนใหญ่สีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีแถบสีครีมขอบไม่เรียบจากบริเวณตาพาดเฉียงลงมาถึงต้นขาหลัง ขอบแถบมีเส้นสีดำ ท้องมีลายร่างแหสีเขม่า ตัวผู้มีคางสีดำ (โกวิท, 2545) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

ก. ข.

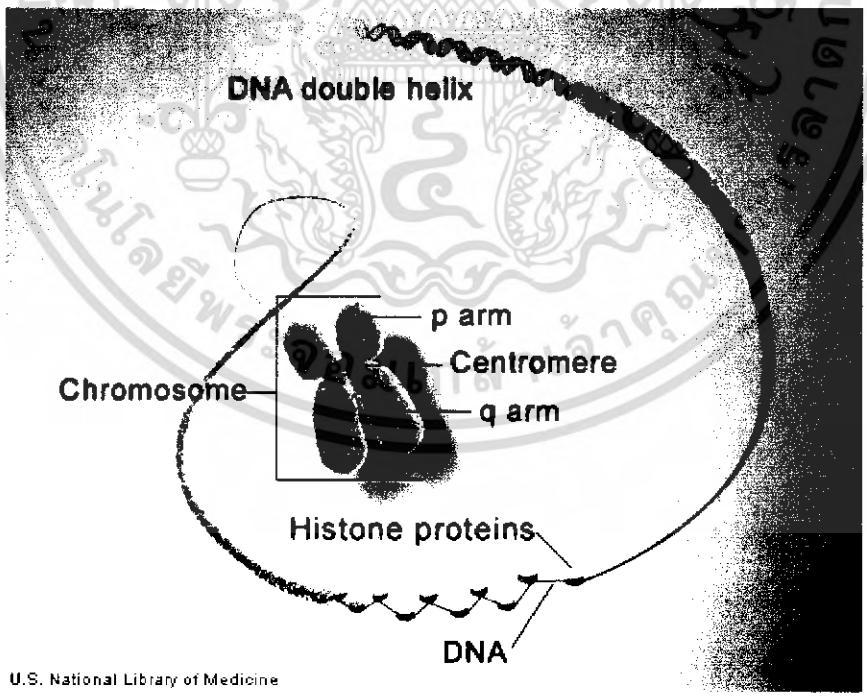
รูปที่ 2.1 อึ่งอ่างบ้าน (*K. pulchra*) เพศผู้ ก. ด้านหลัง และ ข. ด้านท้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การศึกษาโครโมโซม

2.2.1 ส่วนสำคัญของโครโมโซม (รูปที่ 2.2 และ 2.3)

โมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่รวมกับโปรตีนไม่ว่าจะเป็นโปรตีนฮิสโตน หรือโปรตีนที่ไม่ใช่ ฮิสโตน เรียกว่าโครมาติน (chromatin) บนแท่งโครโมโซมบางส่วนของโครมาตินขดตัวแน่นเรียกว่า เฮเทอโรโตรมาติน (heterochromatin) สามารถสังเกตเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อย้อมสีโครโมโซมด้วยสี Giemsa หรือ สีคาร์มีน (carmine)เฮเทอโรโตรมาตินจะติดสีเข้ม ส่วนของโครโมโซมที่เกิดจากโครโมโซมที่ขดตัวอย่างหลวมๆ เรียกว่า ยูโครมาติน (euehromatin) จะติดสีจางกว่า โดยทั่วไปโครโมโซมมีรอยคอด (constriction) ซึ่งเกิดจากโครโมโซมที่ขดตัวแน่นมาก 1 แห่ง เรียกว่า เซนโทรเมียร์ (centromere) หรือไพรมารีคอนสตริกชัน (primary constriction) แต่โครโมโซมบางแท่งมีรอยคอด 2 แห่ง รอยคอดที่ 2 เรียกว่า เซคันดารีคอนสตริกชัน (secondary constriction) โครโมโซมที่มีรอยคอด 2 แห่ง เรียกว่า โครโมโซมซาเทลไลท์ (satellite chromosome) รอยคอดที่ 1 หรือ เซนโทรเมียร์มีความสำคัญต่อการจำแนกชนิดของโครโมโซมและการเคลื่อนที่ของโครโมโซมขณะที่มีการแบ่งเซลล์ ส่วนรอยคอดที่ 2 ของโครโมโซมซาเทลไลท์บางแท่งทำหน้าที่สร้างนิวคลีโอลัส บริเวณนี้จึงเรียกว่านิวคลีโอลาร์ออร์กาไนเซอร์ (nucleolar organizer region) (โครงการตำราวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์มูลนิธิสอวน.,2547)

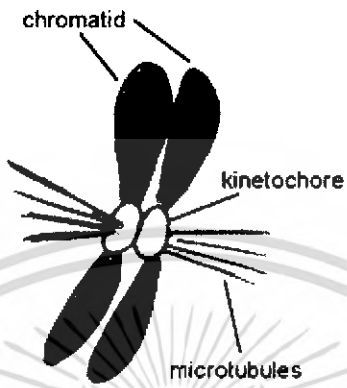


รูปที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของโครโมโซม

ที่มา : www.http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/ picture/chromosome_structure

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซนโทรเมียร์ (centromere) และไคนีโทคอร์ (kinetochore) ในการแบ่งเซลล์มักจะพบสองคำนี้ควบคู่กันเสมอ นักเซลล์วิทยาได้กำหนดให้รอยคอดหลักของแท่งโครโมโซม เรียกว่าเซนโทรเมียร์ และเรียกบริเวณเซนโทรเมียร์ที่ยึดติดกับสปินเดิลว่าไคนีโทคอร์ (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 แสดงตำแหน่งไคนีโทคอร์ ในโครโมโซม
ที่มา : www.park.edu/.../bi320/ recaps/chromosomes.htm

เซนโทรเมียร์เป็นส่วนสำคัญของโครโมโซม เป็นโครงสร้างที่ทำให้โครโมโซมเสถียรและโครมาติดแยกกันอย่างมีแบบแผนในระยะแอนาเฟส (anaphase) โดยมีการแบ่งเซนโทรเมียร์ไปกับโครมาติดแต่ละเส้น และเป็นตัวป้องกันอันตรายให้กับไคนีโทคอร์ ในระยะเมทาเฟส (metaphase) เมื่อดูโครโมโซมจากกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นโครโมโซมประกอบด้วยโครมาติด 2 เส้นยึดติดกัน โดยที่เซนโทรเมียร์ของโครมาติดแต่ละแท่งอยู่ติดกันจนคล้ายกับว่ามีเซนโทรเมียร์เพียงอันเดียว เซนโทรเมียร์มีหน้าที่ 2 ประการคือ หน้าที่ที่ทำให้โครมาติดพี่น้อง (sister chromatid) อยู่ติดกันเมื่อโครโมโซม 1 แท่งประกอบด้วย 2 โครมาติด และทำหน้าที่ที่โครมาติดพี่น้องแยกออกจากกันในระยะแอนาเฟส

2.2.2 รูปร่างของโครโมโซม

โครโมโซมของยูคาริโอท จะมีโครงสร้างขนาดสั้นที่สุดและเห็นรูปร่างชัดเจนในระยะเมทาเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ปกติโครโมโซม 1 แท่งที่มีโครมาติด 1 เส้นนั้นมีเซนโทรเมียร์เพียงอันเดียว จากเหตุผลดังกล่าวทำให้สามารถจำแนกรูปร่างของโครโมโซมตามตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ได้เป็น 4 ชนิด คือ

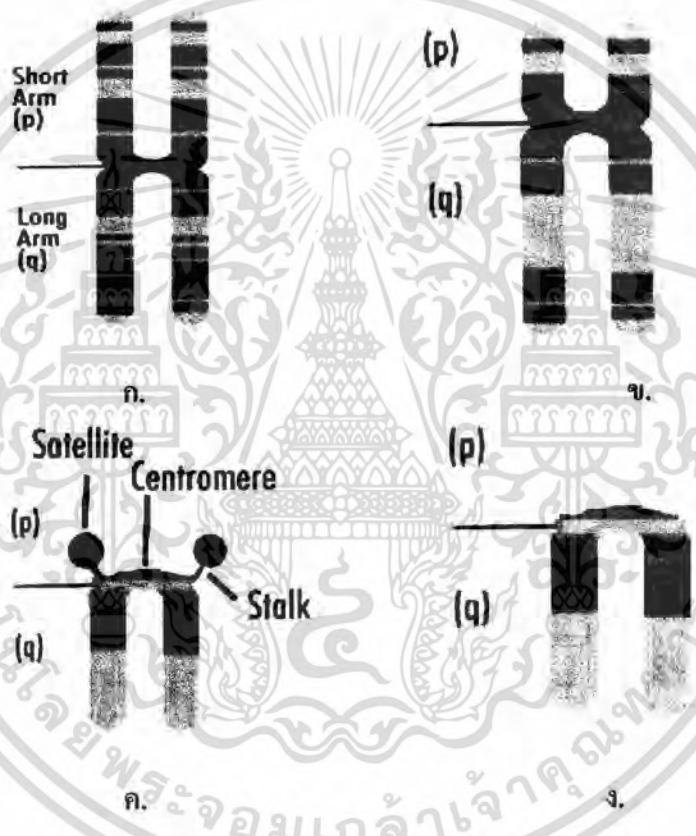
ก. เมทาเซนทริก (metacentric) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโทรเมียร์อยู่กึ่งกลางแท่งของโครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ซับ เมทาเซนทริก (submetacentric) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนมากึ่งกลางแท่งของโครโมโซม

ค. อะโครเซนทริก (acrocentric) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปทางปลายแท่งของโครโมโซม

ง. ทีโลเซนทริก (telocentric) เป็นโครโมโซมที่มีเซนโทรเมียร์อยู่ที่ปลายแท่งของโครโมโซม



รูปที่ 2.4 แสดงรูปร่างโครโมโซม

ก : เมทาเซนทริก (metacentric)

ข : ซับเมทาเซนทริก (submetacentric)

ค : อะโครเซนทริก (acrocentric)

ง : ทีโลเซนทริก (telocentric)

ที่มา : www.park.edu/.../bi320/ recaps/chromosomes.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 เทคนิคการเตรียมโครโมโซม

การศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ส่วนมากเตรียมตัวอย่างจากเนื้อเยื่อหลากชนิด และวิธีการเตรียมหลายวิธี เช่น ถาวร และคณะ (2535) ศึกษาจำนวนโครโมโซมและทำคาริโอไทป์อึ่งปากขวด (*Glypholossus molossus* Gunther) และปาดบ้าน (*Rhacophorus leucomystax* Kuhl.) โดยเตรียมจากเซลล์ไขกระดูก ขั้นแรกทำการฉีด colchicine (0.2 มิลลิลิกรัม/มิลลิลิตร) ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร/ 100 กรัมน้ำหนักตัว ฉีดเข้าช่องท้องและปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง และแช่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ส่วนการตรึงเซลล์ใช้ fixative (methanol : acetic acid = 3 : 1) และย้อมสี Giemsa 15 % ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ผลคือจำนวนโครโมโซมของสัตว์ทั้งสองชนิดมีจำนวนเท่ากัน 2n=26 รูปร่างของโครโมโซมมี 3 แบบ ได้แก่ เมทาเซนทริก ซับ เมทาเซนทริก และ อะโครเซนทริก คาริโอไทป์ของอึ่งปากขวด ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 3 คู่ ซับเมทาเซนทริก 9 คู่ และ อะโครเซนทริก 1 คู่ ส่วนคาริโอไทป์ของปาดบ้านประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 7 คู่ ซับเมทาเซนทริก 5 คู่และ อะโครเซนทริก 1 คู่

Kasahara และคณะ (1998) ได้อธิบายเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวก่อนที่จำนำมาศึกษาเซลล์พันธุศาสตร์ โดยศึกษาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในวงศ์ Bufonidae, Hylidae และ Leptodactylidae อาหารที่เลี้ยงเซลล์ ได้แก่ T 199-Earl Salts, RPMI 1640, MEM และอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดยเฉพาะ (Amphibian culture medium) โดยดูดเลือดจากหัวใจห้องล่างประมาณ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัว ปริมาตรเลือดที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของตัวสัตว์ด้วย กรณีที่ได้เลือดน้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร จะใช้อาหาร 2.5 มิลลิลิตร และไม่ต้องปั่นแยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 หรือ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน นอกจากนี้ Kasahara และคณะ(1998) ได้อธิบายขั้นตอนการใช้ colchicine โดยแนะนำให้หยด colchicine ลงไปในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้นประมาณ 2 หยดต่ออาหาร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบกำหนดทำการปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 800-1,000 รอบ/นาที นาน 7 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย hypotonic (pre-warm 0.075 M KCl hypotonic solution) 5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แขวนลอยโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายพ่นตะกอนเซลล์ขึ้นลง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบกำหนดทำการปั่นเซลล์ด้วยความเร็ว 800-1,000 รอบ/นาที นาน 7 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ต่อมาทำ pre-fixation ที่อุณหภูมิห้อง โดยตอนแรกหยด fixative ที่เย็นจัด 6 หยด (methanol : acetic acid = 3:1) ทำให้เซลล์แขวนลอยโดยการเคาะขวดเพาะเลี้ยงเบาๆ ประมาณ 5 นาที จากนั้นหยด fixative เพิ่มลงไปอีก 0.5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายพ่นขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนเซลล์แขวนลอย ประมาณ 5 นาที นำไปปั่นแยก ดูดส่วนใสทิ้ง ทำวิธีการดังกล่าวซ้ำอีก 2 ครั้งหรือมากกว่า ต่อมาหยดเซลล์ที่อยู่ใน fixative ครั้งสุดท้าย ลงบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด ใช้วิธี air dried ในอุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ตลอดคืน จึงทำการย้อมสี Giemsa

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากเซลล์ไขกระดูกและเม็ดเลือดขาวแล้ว ธวัชและอัจฉริยา (2543) เตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อตับของกบภูเขา (*Limnonectes blythii*) เขียดบัว (*Rana erythraea*) เขียดกาญจนบุรี (*Rana leptoglossa*) เขียดน้ำนอง (*Occidozyga martensii*) และอึ่งเพ้า (*Glyphoglossus molossus*) โดยฉีดสารละลาย colchicines 0.3 % เข้าช่องท้อง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 200 กรัม ทิ้งไว้นาน 18-25 ชั่วโมง แช่ตับในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.075 % โดยสับตับเป็นชิ้นเล็กๆ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที การตรึงเซลล์ใช้ fixative ประกอบด้วย absolute ethanol : glacial acetic acid = 3 : 1 แช่ใน fixative นาน 25 นาที การย้อมสีใช้ Giemsa ผลการศึกษาพบว่ากบภูเขามีโครโมโซม 2n = 24 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 5 คู่ ซับเมทาเซนทริก 6 คู่และ ซับทีโลเซนทริก 1 คู่ เขียดบัว มีโครโมโซม 2n = 26 ประกอบด้วย โครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 8 คู่ ซับเมทาเซนทริก 4 คู่และ ซับทีโลเซนทริก 1 คู่ เขียดกาญจนบุรี มีโครโมโซม 2n = 26 ประกอบด้วย โครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 6 คู่ และซับเมทาเซนทริก 7 คู่ เขียดน้ำนองมีโครโมโซม 2n = 26 ประกอบด้วย โครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 9 คู่ ซับเมทาเซนทริก 3 คู่และซับทีโลเซนทริก 1 คู่ และอึ่งเพ้า มีโครโมโซม 2n = 26 ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมทาเซนทริก 9 คู่ และซับเมทาเซนทริก 4 คู่

Odierna และคณะ (2000) ยังใช้เนื้อเยื่อของอวัยวะภายในมาทำคาริโอไทป์ของ *Alytis muletensis* โดยฉีดสารละลาย colchicine (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิตร) ความเข้มข้นที่ใช้ 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 2 ชั่วโมง จึงจะวางยาสลบ นำเนื้อเยื่อส่วนของลำไส้ ม้าม ปอด และอัณฑะ ไปศึกษาต่อไป ส่วนสีที่ย้อมคือ 5% Giemsa pH 7.0 และพบว่าจำนวนโครโมโซมของ *Alytis muletensis* 2n=38

Vences และคณะ (2000) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Nannophrys ceylonensis* (2n=26) *N. marmorata* (2n=26) ส่วน *Indirana* sp. (2n=30) และ *I.* cf. *leptodactyla* (2n=24) โดยใช้เนื้อเยื่อจากลำไส้ ม้าม ปอด และอัณฑะ ความเข้มข้นของ colchicine และสีย้อมที่ใช้เช่นเดียวกับ Odierna และคณะ (2000) การนับจำนวนโครโมโซมนับจากเซลล์ระยะเมทาเฟสที่ชัดเจนอย่างน้อย 25 metaphase plates ส่วนการศึกษาคาริโอไทป์ใช้เซลล์ประมาณ 6 metaphase plates โดยทำการหาค่า Relative length, Centromeric index

Vences และคณะ (2002) ศึกษาคาริโอไทป์ของ Micorhylid ในสกุล *Scaphiophryne* 3 ชนิด ดังนี้ *Scaphiophryne gottlebei*, *S. madagascariensis* และ *S. spinosa* ใช้ตัวเต็มวัยในการศึกษา ความเข้มข้นของ colchicines ที่ฉีดเข้าช่องท้อง (0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ใช้ 0.01 มิลลิตร/น้ำหนักตัว 1 กรัม ปล่อยทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง ผ่าเอาส่วนของลำไส้และอวัยวะสืบพันธุ์ใส่ลงใน 0.5% sodium citrate บ่มเป็นเวลา 30 นาที และ fix ด้วย ethanol:acetic acid=3:1

Zhu และคณะ (2002) ใช้เลือดจากหัวใจของ Andrias davidianus (Blanchard, 1871) (Cryptobranchidae, Caudata) ปริมาตรเลือดที่ใช้เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตรต่อสัตว์ 1 ตัว เลี้ยงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้หยด 0.1% colchicine ลงไป 2-3 หยด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อย้อมสีแล้วศึกษาลักษณะของโครโมโซม โดยแบ่งกลุ่มโครโมโซมตามขนาดออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ขนาดใหญ่ (macrochromosome) และขนาดเล็ก (microchromosome)

Andreone และคณะ (2003) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Mantidactylus* sp. ใช้ colchicine (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กรัม ปล่อยให้อยู่ในตัวสัตว์นาน 2-4 ชั่วโมง นำส่วนของลำไส้ ปอด ม้าม และอัณฑะ บ่มในสารละลาย 0.7% sodium citrate นอกจากนี้ยังใช้เซลล์ไขกระดูกในการศึกษาเช่นกัน

นอกจากนี้ Cuevas และคณะ (2003) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของสกุล *Alsodes* (Anura:Leptodactylidae) 4 ชนิด คือ *Alsodes pehuenche*, *A. vanzolinii*, *A. verrucosus*, และ *A.* aff. *vittatus* ทั้ง 4 ชนิด 2n=26 ส่วน Azevedo et al. (2003) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Bufo ictericus* และ *B. paracnemis* โดยการย้อมสี Giemsa พบ 2n=22 ทั้งสองชนิด และโครโมโซมประกอบด้วย submetacentric และ metacentric นอกจากนี้ยังพบ secondary constriction ที่ short arm ของโครโมโซมคู่ที่ 7

Rosa และคณะ (2003) ศึกษาความผันแปรของคาริโอไทป์ของกบ 3 ชนิด คือ *Megaelosia massarti*, *M. boticariana* และ *M. lutzae* โดยใช้เนื้อเยื่อของตัวเต็มวัยและลูกอ๊อด ฉีด 1% colchicines เข้าช่องท้อง สำหรับตัวเต็มวัย ปล่อยทิ้งไว้นาน 4 ชั่วโมง ส่วนลูกอ๊อด ปล่อยทิ้งไว้ 4-5 ชั่วโมง แยกเนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้ และอัณฑะ มาศึกษาจำนวนโครโมโซม ผลที่ได้คือ *M. boticariana* 2n=30 *M. lutzae* 2n=32 และ *M. massarti* 2n=28+1 เนื่องจากพบ B-chromosome ในกบชนิดนี้

Siqueira-Jr. (2004) ศึกษาคาริโอไทป์ของ *Eleutherodactylus binotatus* โดยวิธีย้อม Giemsa ใช้เนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ อัณฑะ และเซลล์ไขกระดูก ช่วงเวลาของการปล่อยให้ colchicine อยู่ในช่องท้องนาน 3 ชั่วโมง และย้อมด้วย 10% Giemsa พบว่าทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน 2n=22

2.2.4 การทำคาริโอไทป์ (Karyotype)

สิ่งมีชีวิตต่างๆจะมีความจำเพาะในจำนวน ขนาด และชนิดของโครโมโซม หรือกล่าวได้ว่ามีความจำเพาะในคาริโอไทป์ คาริโอไทป์ หมายถึง การนำเอาโครโมโซมแต่ละแท่งจากเซลล์ในระยะเมทาเฟส (โดยอาศัยเซลล์ใดเซลล์หนึ่งเท่านั้น) มาเรียงเป็นคู่ homologous เรียงตามลำดับจากขนาดใหญ่ไปจนถึงขนาดเล็ก เริ่มต้นจากโครโมโซม เมทาเซนทริก ซับเมทาเซนทริก อะโครเซนทริก และทีโลเซนทริก การวางโครโมโซมให้แขนข้างสั้นตั้งขึ้น และนิยมวางโครโมโซมเพศอยู่ที่มุมล่างขวาสุด (อมรา, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยปกติแล้วโครโมโซมในระยะเมทาเฟสของเซลล์แต่ละเซลล์ จะมีความแตกต่างกันเกี่ยวกับ ขนาดและรูปร่าง ซึ่งขึ้นอยู่กับเซลล์นั้นอยู่ในระยะใดของไมโทซิส ถ้าเซลล์อยู่ในระยะก่อนเมทาเฟสเล็กน้อย หรือระยะโพรเฟสตอนท้าย โครโมโซมจะยาวมาก แต่ถ้าอยู่ในระยะเมทาเฟสตอนท้ายโครโมโซมจะหดสั้นมาก นอกจากนี้การปล่อยเซลล์ให้อยู่ใน colchicine ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้างสปินเดิล (spindle formation) ระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และทำให้โครโมโซมไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์ ถ้าปล่อยทิ้งไว้ในสารชนิดนี้นานเกินไปมีผลให้โครโมโซมหดตัวมาก (Tolliver และ Robbins, 1991 ; อมรา, 2540) จากรูปที่ 2.2 และ 2.4 แสดงให้เห็นว่าแต่ละโครโมโซมประกอบด้วย 2 โครมาติด ซึ่งจะติดกันตรงตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ และแต่ละโครโมโซมมีตำแหน่งเซนโทรเมียร์ที่แน่นอน ทำให้แบ่งแขนของโครโมโซมออกเป็นแขนข้างสั้น ใช้สัญลักษณ์ p และแขนข้างยาว ใช้สัญลักษณ์ q (อมรา, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 สัตว์ทดลอง ได้แก่ อึ่งอ่างบ้าน ซึ่งจับจากแหล่งอาศัยในจังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.1.2 อุปกรณ์

- เครื่องมือผ่าตัด
- กระบอกตวง
- Coplin jar
- ขวดแก้ว ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- กระบอกฉีดยาพร้อมเข็ม ขนาด 1 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร และหลอดปั่นสารขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- สไลด์แบบเรียบและสไลด์หลุม
- พาสเจอร์ปิเปต
- ไมโครปิเปต พร้อม pipet tip ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- เครื่องชั่ง
- โกร่ง
- ไมโครมิเตอร์
- ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -21 องศาเซลเซียส
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound พร้อมกล้องถ่ายภาพ
- กล้องถ่ายภาพแบบดิจิตอล

3.1.3 สารเคมี

- สารละลาย colchicine ความเข้มข้น 0.2-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- โปตัสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.046-0.075 โมลาร์
- เมทานอล
- กรดอะซิติริก
- Giemsa 10%
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- คลอโรฟอร์ม
- น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาปัจจัยของ colchicine และระยะเวลาที่อยู่ในตัวสัตว์ต่อปริมาณแมทาเฟส

ในที่นี้ใช้เซลล์ไขกระดูกและเนื้อเยื่อจากอวัยวะภายใน

กลุ่มที่ 1 ฉีดสารละลาย colchicine (0.2 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม เข้าในช่องท้อง ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารละลาย colchicine (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม เข้าในช่องท้อง ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 4-24 ชั่วโมง

3.2.2 การศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อเซลล์

3.2.2.1 การเตรียมเซลล์จากไขกระดูก มีขั้นตอนดังนี้

1. หลังจากฉีดสารละลาย colchicine ตามขั้นตอน 3.2.1 แล้ว ทำการวางยาสลบอึ่งอ่างบ้าน จากนั้นใช้กรรไกรตัดกระดูกขาส่วน femur และ tibia (อมรา, 2540)

2.ใช้กระบอกฉีดยาดูดสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ หรือสารละลาย hypotonic (0.075 M KCl) 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าในโพรงกระดูกดันเซลล์จากโพรงกระดูกออกมาพร้อมกับสารละลาย hypotonic โดยมีหลอดแก้วรองรับไว้ ปล่อยให้เซลล์อยู่ในสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที

3. ทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากสารละลาย hypotonic ด้วยความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดเอาส่วนใสทิ้ง เหลือไว้ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหยด fixative (methanol:acetic acid = 3:1) ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดพ่นขึ้นลงทำให้เซลล์แขวนลอย ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เติม fixative ลงไปอีก 0.5 มิลลิลิตร ปั่นแยกส่วน supernatant ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้งหรือมากกว่า จนกระทั่งตะกอนเซลล์ในหลอดมีสีขาวสะอาด จากนั้นจึงเติม fixative ที่เย็นจัดเป็นครั้งสุดท้ายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

4. หยดเซลล์ที่แขวนลอยใน fixative ลงบนสไลด์ที่สะอาด ซึ่งเตรียมแช่เย็นอยู่ในน้ำกลั่น จากนั้นผึ่งให้แห้งในอากาศ รอการย้อมสี Giemsa ต่อไป

3.2.2.2 การเตรียมเนื้อเยื่อจากอวัยวะภายใน มีขั้นตอนดังนี้

1. หลังจากครบเวลา colchicine ตามข้อ 3.2.1 ให้วางยาสลบอึ่งอ่าง และแยกอวัยวะภายใน เช่น ลำไส้ ตับไต ปอด และอัณฑะ หรือรังไข่ เป็นต้น

2. ทำการสับอวัยวะดังกล่าว ให้เป็นชิ้นเล็กๆ และแช่เนื้อเยื่อจากอวัยวะภายในลงในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.046-0.075 โมลาร์ นาน 1 ชั่วโมง

3. ปั่นแยกเอาสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ออกทิ้ง โดยปั่นที่ความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เหลือไว้ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วหยดน้ำยาตรึงเซลล์ (methanol: acetic acid = 3:1) ที่เย็นจัดลงในหลอดประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยการเขย่าขวดเพาะเลี้ยงขณะหยดน้ำยาตรึงเซลล์ แช่เซลล์ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่น ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปอีก อาจทำประมาณ 2 ครั้งหรือมากกว่า จนกระทั่งตะกอนเซลล์ที่อยู่ก้นหลอดจะขาวสะอาด หลังจากการปั่นครั้งสุดท้ายล้วจึงเติมน้ำยาตรึงเซลล์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3.2.2.3 นำเซลล์แขวนลอยที่อยู่ใน น้ำยาตรึงเซลล์ หยดลงบนสไลด์แช่เย็นที่สะอาด 2-3 หยด ควรหยดสูงจากสไลด์ประมาณ 30-40 เซนติเมตร (Henegariu และคณะ, 2001) จากนั้นปล่อยให้แห้งในอากาศ เพื่อนำไปย้อมสีต่อไป แต่ในกรณีที่เซลล์ยังไม่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ให้ทำการย่อยเนื้อเยื่อด้วยกรดอะซิติก 50% แล้วจึงหยดเซลล์ที่บดแล้วลงบนสไลด์ที่สะอาด ตามด้วยการปล่อยให้แห้งในอากาศ ด้วยวิธี air dried จึงนำไปย้อมสี Giemsa ต่อไป

3.2.3 การย้อมสีแบบธรรมดา (Conventional staining)

นำสไลด์ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างทั้งหมด แช่ลงในสีย้อม Giemsa 10 % นาน 10 นาที จากนั้นล้างสีด้วยน้ำประปา ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งสนิท จึงจะนำไปตรวจดูลักษณะโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound พร้อมกล้องถ่ายภาพ

3.2.4 การวิเคราะห์โครโมโซมและการทำคาริโอไทป์

3.2.4.1 นำสไลด์ที่ย้อมสีแบบธรรมดา และมีโครโมโซมกระจายตัวดี นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมต่อไป

3.2.4.2 การศึกษาลักษณะของโครโมโซม โดยการวัดขนาดคู่ของโครโมโซม พิจารณาจากความยาวของโครโมโซม และตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ คำนวณหาค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ หรือ Centromeric index (CI), อัตราส่วนของแขนข้างยาวกับแขนข้างสั้น หรือ Arm ratio (AR) และความยาวสัมพัทธ์ หรือ Relative length (RL) โดยค่า CI และ AR เป็นค่าที่บ่งบอกรูปร่างลักษณะของโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน ส่วนค่า RL เป็นค่าที่บอกขนาดของโครโมโซม I แท่ง เมื่อเปรียบเทียบกันโครโมโซมอื่นๆ ทั้งจีโนม เพื่อใช้เรียงลำดับขนาดของโครโมโซม เป็นประโยชน์ต่อการทำคาริโอไทป์ การคำนวณหาค่า CI, AR และ RL มีดังนี้

ค่า Centromeric index (CI) = $p / (p + q) \times 100$

p คือ ส่วนแขนข้างสั้น q คือ ส่วนแขนข้างยาวของโครโมโซม เมื่อคำนวณได้ให้นำค่าไปเปรียบเทียบชนิดของโครโมโซมตามตารางที่ 1

ค่า Arm ratio (AR) = q/p

ค่า Relative length (RL) = $\frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง} \times 100}{\text{ผลรวมของความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในจำนวน haploid}}$

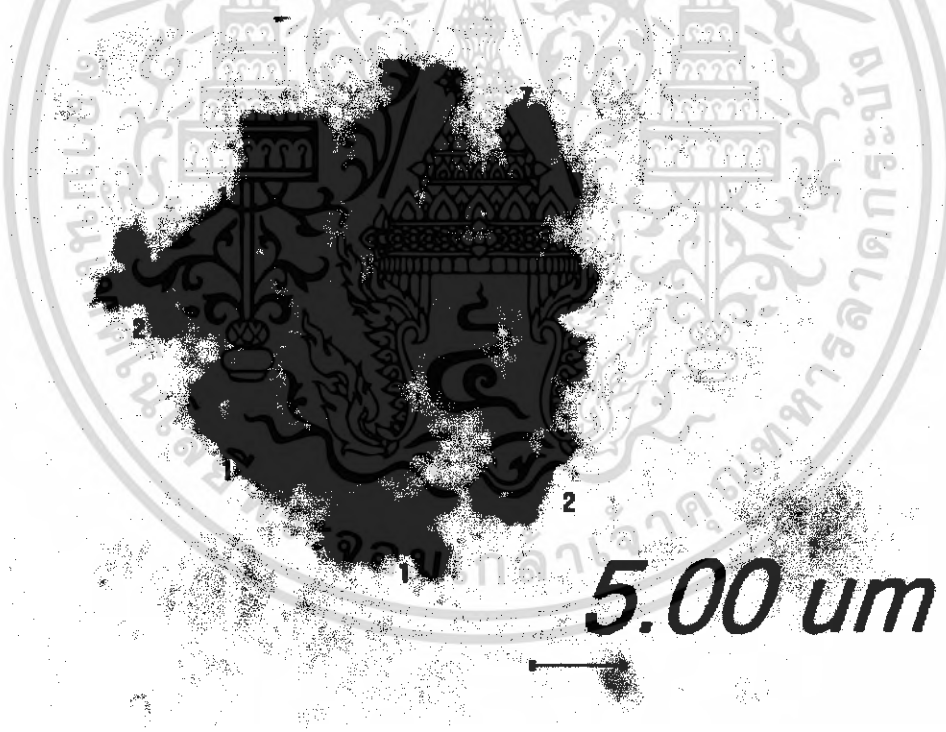
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 การจำแนกชนิดของโครโมโซมจากค่าของ Centromeric index (CI)

Centromere position	Alternative terminology	Chromosome symbol	Centromeric index range
Near median	Metacentric	m	46-49
Submedian	Submetacentric (more metacentric)	sm	36-45
Submedian	Submetacentric (less metacentric)	sm	26-35
Subterminal	Acroeentric	st	15-30
Terminal	Telocentric	t	< 15

การจับคู่ของโครโมโซมแต่ละแท่ง ยึดหลักการต่อไปนี้ (อลงกลด และคณะ, 2005)

1. ทำการจับคู่ของโครโมโซม โดยพิจารณาจากความยาวของโครโมโซม และตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน กำหนดหมายเลขโครโมโซมแต่ละแท่ง (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 แสดงการจับคู่ตามความยาวที่ใกล้เคียงกันของโครโมโซมอึ่งอ่างบ้าน

2. วัดความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่งจากภาพถ่าย

3. กำหนดชนิดของโครโมโซมจากค่า CI ดังตารางที่ 3.1

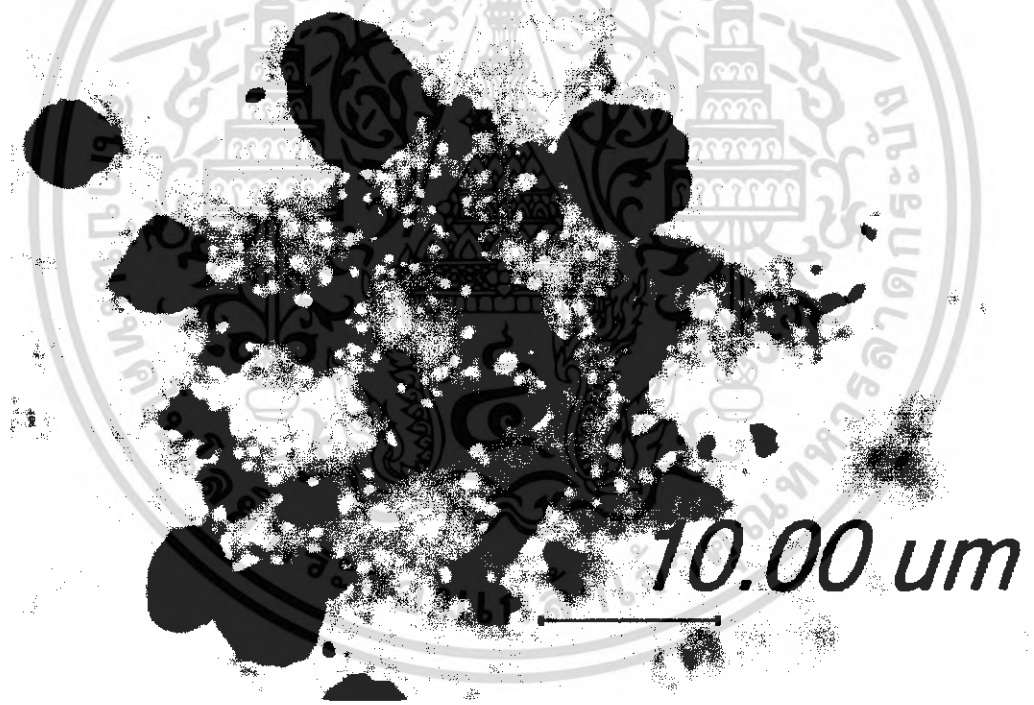
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาปัจจัยของ colchicine และระยะเวลาที่อยู่ในตัวสัตว์ต่อปริมาณเมทาเฟส

กลุ่มที่ 1 ฉีดสารละลาย colchicine (0.2 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม เข้าในช่องท้อง ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที จากการศึกษาพบว่า จำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสของไขกระดูกหลังจากฉีดสารละลาย colchicine ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีจำนวนมากกว่าความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเซลล์ในเนื้อเยื่ออื่นๆนอกจากไขกระดูก ไม่พบจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสทั้งสองความเข้มข้น



รูปที่ 4.1 แสดงโครโมโซมระยะเมทาเฟสของเซลล์ไขกระดูก
ใช้ colchicine ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที

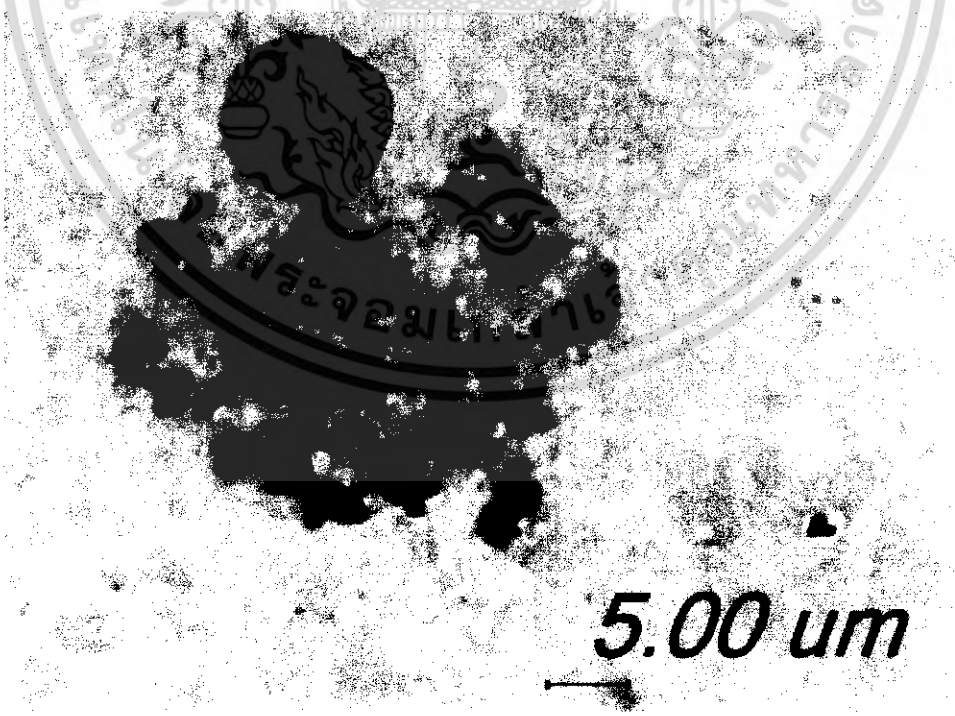
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น ระยะเวลาที่ปล่อยหลังจากที่ฉีด colchicine เข้าช่องท้อง โดยใช้ colchicine ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าระยะเวลานาน 2 ชั่วโมง 30 นาที เซลล์ไขกระดูกจะมีปริมาณ เมทาเฟสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ ส่วนเซลล์ในเนื้อเยื่ออื่นๆนอกจากไขกระดูกไม่พบเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสทุกระยะเวลาที่ปล่อยเวลาที่ฉีด colchicines เข้าช่องท้อง

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารละลาย colchicine (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวสัตว์ 1 กรัม เข้าในช่องท้อง ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน 4-24 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาที่ปล่อยให้ colchicine อยู่ในตัวสัตว์นาน มีผลต่อเซลล์ของไขกระดูก และเนื้อเยื่ออื่นๆ เนื่องจากความเป็นพิษ และโครโมโซมหดสั้นมาก จึงไม่สามารถนับจำนวนและศึกษาลักษณะของโครโมโซม

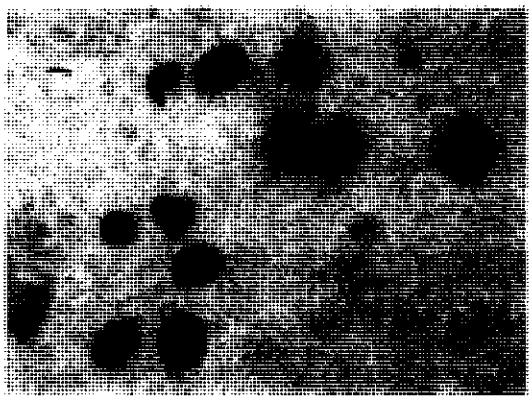
4.2 การศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อเซลล์

จากผลการทดลองความแตกต่างของความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์ (0.046, 0.056 และ 0.075 โมลาร์) และระยะเวลาที่แช่เนื้อเยื่อในโปแตสเซียมคลอไรด์ (30, 40, 50 และ 60 นาที ใช้ความเข้มข้น 0.075) พบว่าผลของทุกความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ และทุกระยะเวลาที่แช่เนื้อเยื่อในโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อเซลล์ ตับ ปอด ไต ลำไส้ ได้ผลคล้ายกัน คือ เซลล์บวม ส่วนเซลล์ไขกระดูกใช้โปแตสเซียมคลอไรด์เพียงความเข้มข้นเดียวคือ 0.075 โมลาร์ และแช่นาน 30 นาที ผลที่ได้คือเซลล์บวมดีมาก และเมื่อหยดเซลล์ลงบนสไลด์เซลล์แตกทำให้โครโมโซมกระจายออกจากเซลล์ได้ดี (รูปที่ 4.2) สำหรับเซลล์ไขกระดูกที่แช่ในโปแตสเซียมคลอไรด์ นาน 40-60 นาที ไม่พบเซลล์ในระยะเมทาเฟส เซลล์บวมมากเช่นกัน



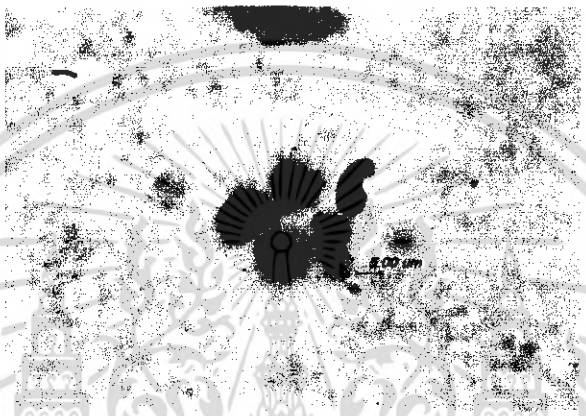
รูปที่ 4.2 เซลล์จากไขกระดูกซึ่งแช่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.075 โมลาร์ นาน 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก.

ข.



ค.

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของเซลล์จากเนื้อเยื่อตับที่แช่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ ระยะเวลาต่างกัน

ก. ระยะเวลาแช่นาน 40 นาที

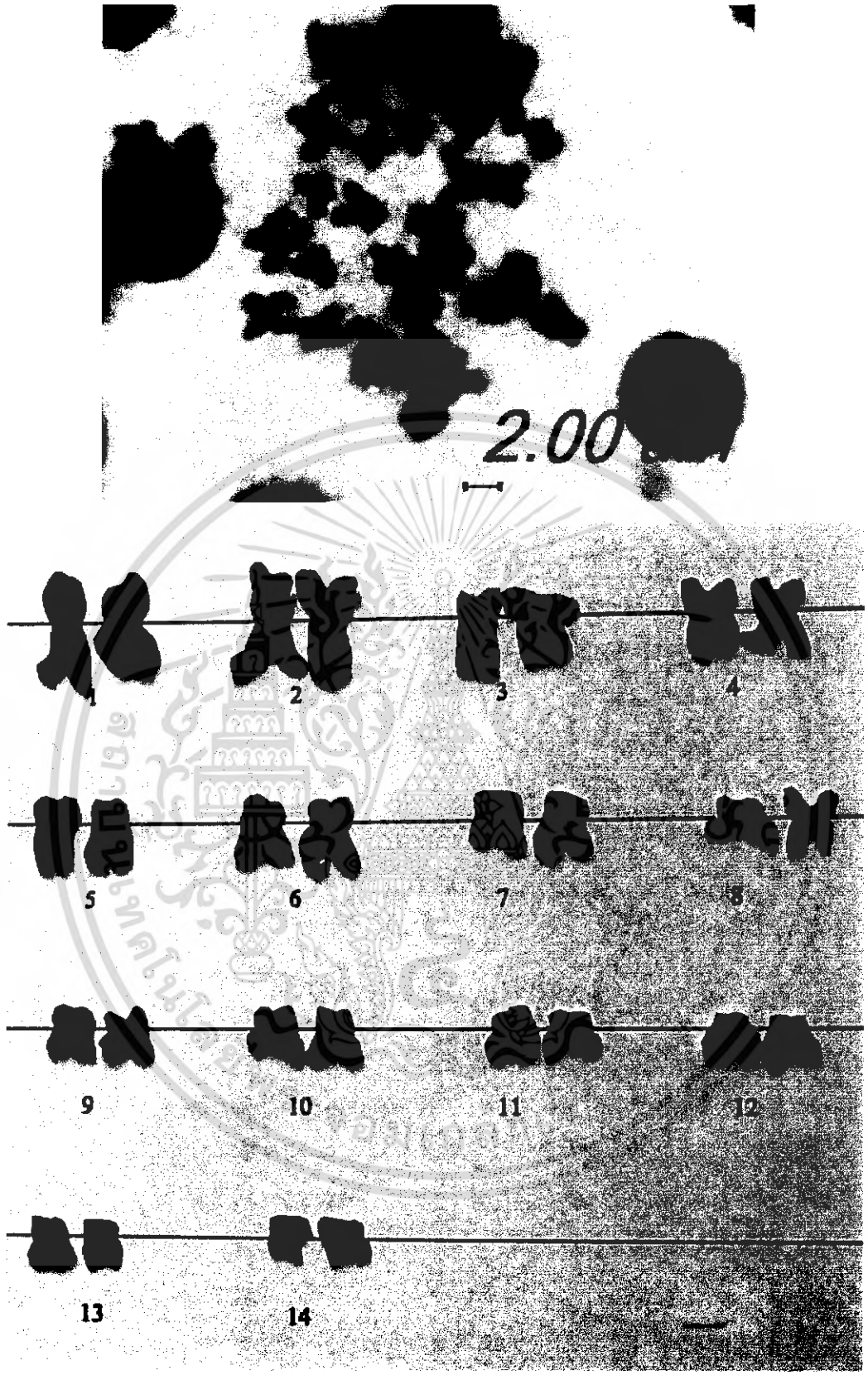
ข. ระยะเวลาแช่นาน 50 นาที

ค. ระยะเวลาแช่นาน 60 นาที

4.3 การวิเคราะห์โครโมโซมและการทำคาริโอไทป์

จากผลการทดลองในการเตรียมโครโมโซมและนำมาย้อมสี Giemsa 10 % สามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ทั้งหมด 2n = 28 และจากการวิเคราะห์ผลจากการคำนวณหาค่า Centromeric index (CI), Arm ratio (AR) และ Relative length (RL) รายละเอียดในตารางที่ 4.1 พบว่าโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้านมีลักษณะรูปร่าง ดังนี้ แบบเมทาเซนตริก (metacentric) จำนวน 5 คู่ และแบบซับเมทาเซนตริก (submetacentric) จำนวน 9 คู่ ดังรูปที่ 4.4

67282
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ภาพบนแสดงระยะเมทาเฟสของอึ่งอ่างบ้าน
ภาพล่าง แสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซมอึ่งอ่างบ้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะรูปร่าง ขนาด ค่า centromeric index ค่า arm ratio และค่า relative length ของโครโมโซมอิ่งอ่างบ้าน

คู่ที่	p (μm)	q (μm)	p+q (μm)	CI {p/(p+q)*100}	AR (q/p)	RL (%)	Chromosome morphology
1	3.853	3.978	7.831	49.20189	1.032442	13.31599	m
2	3.551	3.563	7.114	49.91566	1.003379	12.09679	m
3	1.876	3.411	5.287	35.48326	1.81823	8.990121	sm
4	2.268	2.458	4.726	47.98984	1.083774	8.036185	m
5	1.842	2.51	4.352	42.32537	1.362649	7.400228	sm
6	1.583	2.5	4.083	38.77051	1.57928	6.942815	sm
7	1.533	2.259	3.792	40.42722	1.473581	6.447993	sm
8	1.37	2.229	3.599	38.06613	1.627007	6.119812	sm
9	1.663	1.721	3.384	49.14303	1.034877	5.754221	m
10	1.301	1.915	3.216	40.45398	1.471945	5.276403	sm
11	1.193	1.91	3.103	38.44666	1.601006	5.276403	sm
12	1.118	1.838	2.956	37.82138	1.644007	5.026442	sm
13	1.167	1.605	2.772	42.09957	1.375321	4.713564	sm
14	1.258	1.336	2.594	48.49653	1.062003	4.410889	m
รวม	25.576	33.233	58.809				

หมายเหตุ : p = โครโมโซมแขนข้างสั้น q = โครโมโซมแขนข้างยาว CI = Centromeric index หาได้จาก p / (p + q) x 100 และค่านำไปเทียบกับตารางที่ 3.1, AR = Arm ratio หาได้จาก q/p โดย AR $<$ 1.2 แสดงว่าเป็น m หรือ metacentric หรือ AR $\geq$ 1.2 แสดงว่าเป็น sm หรือ submetacentric, RL = Relative length หาได้จาก ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง / ผลรวมของความยาวของโครโมโซมทั้งหมดในจำนวน haploid คูณด้วย 100 สำหรับรูปร่างของโครโมโซม สัญลักษณ์ m = Metacentric และ sm = Submetacentric

ค่า Centromeric index (CI) และค่า Arm ratio (AR) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงรูปร่างลักษณะของโครโมโซม ที่คำนวณได้จากโครโมโซมอิ่งอ่างบ้าน เมื่อนำค่าที่คำนวณได้เปรียบเทียบกับตารางที่ 3.1 สามารถจำแนกลักษณะรูปร่างของโครโมโซมได้เป็น 2 แบบ คือ แบบเมทาเซนตริก ได้แก่ คู่ที่ 1, 2, 4, 9 และ 14 (CI อยู่ในช่วง 46-49 และ AR น้อยกว่า 1.2) ส่วนอีกแบบคือซับเมทาเซนตริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 3, 5-8 และ 10-13 (CI อยู่ในช่วง 36-45 หรือ 26-35 และ AR มากกว่าหรือเท่ากับ 1.2) และค่า Relative length หรือ RL เป็นค่าที่แสดงถึงขนาดของโครโมโซมเพื่อใช้ในการจัดเรียงคาริโอไทป์จากขนาดโครโมโซมที่ใหญ่สุดจนถึงขนาดโครโมโซมที่เล็กสุด โดยคู่ที่ 1 จะมีขนาดใหญ่ที่สุด และคู่ที่ 14 จะมีขนาดเล็กที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเซลล์ไขกระดูก เป็นเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้าน ทั้งนี้เพราะเตรียมตัวอย่างได้ง่าย พบเซลล์ในระยะเมทาเฟสเป็นจำนวนค่อนข้างมาก ส่วนเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่ออวัยวะภายในไม่พบเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสทุกวิธีการทดลองที่ปฏิบัติ ดังนั้น การศึกษาโครโมโซมของอึ่งอ่างบ้านควรใช้เซลล์ไขกระดูก สำหรับการใช้สารละลาย colchicine ที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ฉีดเข้าช่องท้อง ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวอึ่งอ่างบ้าน 1 กรัม และทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ซึ่งถ้ามากกว่านี้เซลล์จะเกิดความเป็นพิษ ทำให้เซลล์มีโครโมโซมหดสั้น ไม่เหมาะแก่การศึกษาขนาด และรูปร่าง ส่วนความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ ควรใช้ 0.075 โมลาร์ แช่เป็นเวลา 30 นาที เพราะเนื่องจากเซลล์จากไขกระดูกจะถูกสารละลายนี้โดยตรง ทำให้เซลล์แตกง่ายกว่าเซลล์จากเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน ดังนั้นเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าและนานกว่า จะส่งผลให้เซลล์เกิดการบวมและแตกได้

ถึงแม้ว่าสภาวะข้างต้นจะได้โครโมโซมระยะเมทาเฟสค่อนข้างมาก และเหมาะสมในการศึกษาโครโมโซม แต่โครโมโซมของบางเซลล์เกิดความผิดปกติ เช่น โครโมโซมเหนียวและจับตัวกันเป็นก้อน ทำให้ไม่สามารถนำมาศึกษาได้ เหตุที่ทำให้โครโมโซมเหล่านี้เกิดความผิดปกติ อาจเนื่องมาจากอึ่งอ่างบ้านอยู่ในสภาวะเครียด จึงทำให้โครโมโซมผิดปกติไป ดังนั้นในการเตรียมโครโมโซมของ อึ่งอ่างบ้าน ควรทำในขณะที่อึ่งอ่างบ้านอยู่ในสภาวะปกติ โดยเมื่อได้ตัวอึ่งอ่างบ้านควรศึกษาทันที เพื่อป้องกันการเกิดสภาวะเครียดที่อาจก่อให้เกิดโครโมโซมผิดปกติได้ และอึ่งอ่างบ้านมีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (diploid) 2n = 28 โดยมีรูปร่างแบบเมทาเซนตริก 5 คู่ และแบบซับเมทาเซนตริก 9 คู่

ข้อมูลพื้นฐานนี้มีประโยชน์ในการศึกษาเทคนิคการเตรียมโครโมโซมจากเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในต่อไป และการศึกษาเทคนิคอื่นๆเพื่อแยกลักษณะของโครโมโซมได้ชัดเจนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โกวิท น้อยโคตร. 2545. ความหลากชนิดของกบตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดในพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โครงการตำราวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ สอวน. 2547. *ชีววิทยา 3*. ด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

จารุจินต์ นภีตะภัฏ. 2532. ความหลากหลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในประเทศไทย. น. 169-204. *ใน สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และศุภชัย หล่อโลหะการ (ผู้รวบรวม). ความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย*. บริษัทประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ.

จันทร์ทิพย์ อินธาระ. 2543. การศึกษาโครงสร้างปากที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินอาหารของลูกอ๊อดบางชนิด. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฉาวร สุภาพรม วาริณี อรุณมงคลผล และ แก้ว อุดมศิริชาคร. 2535. การศึกษาจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของอึ่งปากขวดและปาดบ้าน. น.717-724. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30*.

ธวัช ดอนสกุล และ อัจฉริยา รังษิรุจิ. 2543. คาริโอไทป์ของเซลล์ตับในกบภูเขา เขียดบัว เขียดกาญจนบุรี เขียดน้ำนอง และอึ่งเพ้า. น. 544-551 *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43*.

วุฒิ ทักษิณธรรม. 2546. ความหลากชนิดของกบตัวเต็มวัยและลูกอ๊อดในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองแสง. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท*, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานโครงการจัดทำแผนแม่บทและจัดการพื้นที่อุทยานแห่งชาติเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า. 2536. *ข้อมูลพื้นฐานแผนแม่บทการจัดพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว จังหวัดจันทบุรี*. กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

สวัสดิ์ วงศ์ถิรวัฒน์. 2541. *รายชื่อสัตว์ป่าที่มีกระดูกสันหลังในประเทศไทย*. กลุ่มนิเวศวิทยาและสิ่งแวดล้อม. ส่วนวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. *พันธุศาสตร์ของเซลล์*. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อลงกลด แทนออมทอง สัมภาษณ์ คุณสุข วิวรรธน์ แก่นสา และเรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. 2005. การศึกษาคาริโอไทป์ของลิงไอ้เงี้ย (*Macaca assamensis*) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27:1119-1208.

Andreone, F., Aprea, G., Vences, M. And Odierna, G. 2003. A new frog of the genus *Mantidactylus* from the rainforest of North-Eastern Madagascar, and its karyological affinities. *Amphibia-Reptilia*, 24:285-303.

Azevedo, M.F.C., Foresti, F., Ramos, P.R.R. and Jim, J. 2003. Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus, B. Paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

form in sympatry. *Genet. Mol. Biol.*, 26:289-294.

Cuevas, C.C. and Formas, J.R. 2003. Cytogenetic analysis of four species of the genus *Alsodes* (Anura:Leptodactylidae) with comments about the karyological evolution of the genus *Hereditas*, 138:138-147.

Henegariu, O., Heerema, N.A., Wright, L.L., Bray-Ward, P., Ward, D.C. and Vance, G.H. 2001. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry*, 43:101-109.

Johnson, D.H. 2002. Northern Prairie Wildlife Reserch Center. *Introduction to the Malformed Amphibian Issue*. [Online].

Available : http://www.npwrc.usgs.gov/narcam/backgrnd.Html.October 20, 2002.

Kasahara, S,. Silva, A.P.Z. and Gruber, S.L. 1998. Use of lymphocyte cultures BrdU Replication banding patterns in anura species (Amphibia). *Genet.Mol.Biol.* 21(4).Available http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1415-47571998000400011&script=sciarttxt

Matsui, M., Nabhitabhata, J., Chan-Ard, T. And Thirakhupt, K. 1996. Amphibians fauna of Thailand, pp 28-63. *In* M. Matsui (ed.). *Evolutionary Studies of the small animals Living in Asia Tropic* 1994-1995. Kyoto University, Japan.

Odierna, G., Andreone, F., Aprea, G., Arribas, O., Capriglione, T. And Vences, M. 2000. Cytological and molecular analysis in the rare discoglossid species, *Alytes muletensis* (Sanchiz & Adrover 1997) and its bearing on archeobatrachian phylogeny. *Chromosome Research*, 8:435-442.

Office of Environmental Policy and Planning. 2000. National Report: *Biodiversity Conservation in Thailand*. Ministry of Science, Technology and Environment.

Rosa, C., Aguiar-Jr, O., Giaretta, A.A. and Recco-Pimentel, S.M. 2003. Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a Leptodactylid frog. *Copeia*, 1:166-174.

Seabright, M. 1971. A rapid band technique for human chromosomes. *Lancell ii* , 970-972.

Siqueira-Jr, S., Ananias, F. And Recco-Pimentel, S.M. 2004. Cytogenetics of three Brazilian species of *Eleutherodactylus* (Anura, Leptodactylidae) with 22 chromosomes and re-analysis of multiple translocations in *E. binotatus*. *Genet. Mol. Biol.*, 27:363-372.

Vences, M., Aprea, G., Capriglione, T., Andreone, F. And Odierna, G. 2002. Acient tetraploidy and slow molecular evolution in *Scaphiophryne* : ecological correlates

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of speciation mode in Madagasy relict amphibian. *Chromosome Research*, 10:127-136

Vences, M., Wanke, S., Odierna, G., Kosuch, J. And Veith, M. 2000. Molecular and Karyological data on the South Asian ranid genera *Indirana, Nyctibatrachus* and *Nannophrys* (Anura: Ranidae). *Hamadryad*, 25:75-82.

Zhu, B., Feng, Z., Qu, A., Gao, H, Zhang, Y., Sun, D., Song, W. and Saura, A. 2002. Brief report. The karyotype of the caudate amphibian *Andrias davidianus*. *Hereditas*, 136:85-88.

[Online]. Available : www.http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/ picture/chromosome_structure

[Online]. Available : www.http://park.edu/.../bi320/ recaps/chromosomes.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารเคมี (อมรา, 2540)

1. Colchicine ความเข้มข้น 0.2-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.1 ชั่ง Colchicine หนัก 0.2-0.5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 0.046-0.075 โมลาร์

2.1 ชั่งโปแตสเซียมคลอไรด์ตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ต้องการเตรียม} = \frac{\text{น้ำหนักของโปแตสเซียมคลอไรด์}}{\text{มวลโมเลกุลของโปแตสเซียมคลอไรด์}}$$

โดยมวลโมเลกุลของโปรแตสเซียมคลอไรด์ = 74.55

2.2 นำโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ได้จากข้อ 1.2.1 ละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3. น้ำยาตรึงเซลล์ (Fixative)

นำเมทานอลผสมกับกรดอะซิกตริก ในอัตราส่วน 3:1 และนำไปแช่ในตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (เตรียมทันทีที่จะใช้งาน และควรใช้ให้หมดภายในวันเดียวกันเพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพของสารละลาย)

4. กรดอะซิตริก 50 %

นำกรดอะซิตริกเข้มข้นมาละลายในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1

5. สีย้อม Giemsa 10%

5.1 ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) pH 6.8

5.1.1 เตรียม stock A โดยนำ Na_2HPO_4 27.5 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

5.1.2 เตรียม stock B โดยนำ $Na_2H_2PO_4$ 28.4 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

5.1.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5.1.1 และ 5.1.2 มาผสมให้เข้ากันด้วยอัตราส่วน 1:1

5.2 นำสีย้อม Giemsa เข้มข้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาละลายในสารละลายจากข้อ 5.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้