สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของอสุจิในผู้สูบบุหรี่โดยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization

นางสาว ปิตินดา วงศ์อัครางกูร
นางสาว พรพรหม พิชญ์เลิศชาญ
นาย พิทักษ์ เหลืองเรืองโรจน์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67296
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
.b 11bk3042
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Detection of abnormality sperm in smoker by Fluorescence In Situ Hybridization

Miss Pitinada Wongakarangoon

Miss Pornprom Pitlertchan

Mr. Pitak Leungreungroj

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของอสุจิในผู้สูบบุหรี่โดยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization

นักศึกษา นางสาว ปิตินดา วงศ์อัครางกูร

นางสาว พรพรหม พิชญ์เลิศชาญ

นาย พิทักษ์ เหลืองเรืองโรจน์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของอสุจิในคนสูบบุหรี่โดยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization

นักศึกษา นางสาว ปิตินดา วงศ์อัครางกูร
นางสาว พรพรหม พิชญ์เลิศชาญ
นาย พิทักษ์ เหลืองเรืองโรจน์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมเพศ X และ Y ในอสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่ โดยในบุหรี่มีสาร mutagen และ carcinogen เป็นจำนวนมาก ซึ่งสารพิษเหล่านี้อาจส่งต่อโครโมโซมของอสุจิ โดยใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ในการศึกษาโดยมีเกณฑ์การเก็บตัวอย่าง คือ ต้องเป็นผู้ที่สูบบุหรี่และยินยอมบริจาคตัวอย่าง โดยสูบบุหรี่จำนวน 10-20 มวน/วัน และสูบมาเป็นระยะเวลานานกว่า 3 ปี โดยศึกษาเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่เป็นตัวอย่างควบคุม โดยใช้วิธี masturbation ในการเก็บตัวอย่าง หลังจากการศึกษาตัวอย่างของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 1 ตัวอย่าง และผู้ที่สูบบุหรี่จำนวน 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี interphase FISH ซึ่งใช้ตัวติดตาม CEP X ที่ติดสารเรืองแสง spectrum orange (สีแดง) และตัวติดตาม CEP Y ที่ติดสารเรืองแสง spectrum green (สีเขียว) และมีเกณฑ์การวิเคราะห์ผลคือ นับสัญญาณสีในตัวอสุจิจำนวน 200-500 ตัว จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ใช้ควบคุมมีอัตราการผิดปกติ 0.58 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างผู้สูบบุหรี่ทั้ง 4 คน มีอัตราความผิดปกติเฉลี่ย 6.45 เปอร์เซ็นต์ (XX 4.75 เปอร์เซ็นต์ YY 2.25 เปอร์เซ็นต์ XY 14.5 เปอร์เซ็นต์ และ XXY 0.75 เปอร์เซ็นต์) โดยอสุจิจากตัวอย่างของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่นั้นมีลักษณะทางโครงสร้างเป็นปกติ แต่พบว่าอสุจิจากตัวอย่างของผู้ที่สูบบุหรี่จะมีลักษณะผิดปกติ เช่น ลักษณะ 2 หัว 2 หาง 4 หาง รูปร่างหัวผิดปกติ เป็นต้น ซึ่งกล่าวได้ว่า ผู้ที่ได้รับสารพิษจากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะสารพิษที่ได้รับจากการสูบบุหรี่ อาจส่งผลต่อลักษณะโครงสร้างและโครโมโซมของตัวอสุจิได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Detection of abnormality sperm in smoker by Fluorescence In Situ Hybridization
Name	Miss Pitinada Wongakarangoon Miss Pornprom Pitlertchan Mr. Pitak Leungreungroj
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic year	2005
Spacial Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Supattra Poeaim

ABSTRACT

Detection of sex chromosome abnormality in sperm of smokers. Cigarette contains mutagen and carcinogen which are capable of inducing abnormality male reproductive system. Fluorescence in-situ hybridization (FISH) was performed on ejaculated sperm samples from smoker donors to compare with non-smoker donors to analyse chromosomes X and Y ,with each smoker donors are smoking 10-20 cigarettes per day for 3 years. We used interphase FISH to analyse sperm samples with probe CEP X (spectrum orange) and probe CEP Y (spectrum green) and counted the signals about 200-500 signals. We analysed non-smokers 1 sample (control) and smokers 4 samples and observed that control sample was 0.58% and smoker samples were 6.45% (XX 4.75% YY 2.25% XY 14.5% and XXY 0.75%) of abnormality. And characters of abnormal morphology were found for example sperm 2 tails, sperm 4 tails, bullhead etc. We conclude that cigarette smoking may increase the risk of aneuploidy chromosomes such defects may affect male fertility and may increase future chances of fathering offspring with aneuploidy syndromes.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และโครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากขาดซึ่งความกรุณาจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ อบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้าทุกด้านทั้งด้านจริยธรรมด้านการทำงาน รวมถึงความมีเมตตากรุณาที่มีให้กับข้าพเจ้าในการทำงานและการดำรงชีวิต

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมสอบโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งคำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า เป็นผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงงานพิเศษนี้ ตลอดทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและทุกคนในครอบครัว ที่ให้คำแนะนำในการทำงานที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อย่างมาก ตลอดทั้งกำลังใจที่มอบให้ด้วยดีตลอดมา รวมถึงสถาบันอันทรงเกียรติแห่งนี้ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลา 4 ปี

ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ที่พึงจะได้รับจากโครงงานพิเศษฉบับนี้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวปีตินดา วงศ์อัครางกูร
นางสาวพรพรหม พิชญ์เลิศชาญ
นายพิทักษ์ เหลืองเรืองโรจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II
กิตติกรรมประกาศ..... III
สารบัญ..... IV
สารบัญรูป..... VII
สารบัญตาราง..... IX
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ..... 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ..... 3
2.1 กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย..... 3
2.2 ลักษณะรูปร่างและลักษณะพันธุกรรมที่ปกติของอสุจิ..... 4
2.2.1 ลักษณะรูปร่างของอสุจิ..... 4
2.2.2 ลักษณะทางพันธุกรรมที่ปกติของอสุจิ..... 5
2.3 ปัญหาที่เกิดจากอสุจิที่ผิดปกติ..... 6
2.3.1 Down syndrome..... 6
2.3.2 Klinefelter syndrome..... 7
2.3.3 Patua syndrome..... 9
2.4 การตรวจลักษณะทางกายภาพของน้ำอสุจิ..... 10
2.4.1 ลักษณะทั่วไปของน้ำอสุจิ (appearance)..... 10
2.4.2 ปริมาตรของน้ำอสุจิ..... 11
2.4.3 การละลายตัว (liquefaction)..... 12
2.4.4 ความหนืดของน้ำอสุจิ (viscosity)..... 12
2.4.5 ความเป็นกรดด่างของน้ำอสุจิ..... 13
2.5 วิธีการกรวดน้ำอสุจิด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล..... 15
2.5.1 Acidic aniline blue (AAB)..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

2.5.2 Chromomycin A3 (CMA3)..... 16
2.5.3 Sperm chromatin structure assay (SCSA)..... 17
acridine orange (AO)
2.5.4 การตรวจ DNA fragmentation..... 19
2.5.4.1 Terminal deoxynucleotidyl transferase..... 21
dUTP nick end labeling (TUNEL)
2.5.4.2 Single cell gel electrophoresis (COMET) assay..... 21
2.5.4.3 FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)..... 23

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 32
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี..... 32
3.1.1 การเลี้ยงเชื้อ..... 32
3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ (โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin)..... 33
3.1.3 การเตรียมสไลด์..... 33
3.1.4 การทำ Nick translation..... 34
3.1.4.1 การทำ Nick translation ด้วยวิธี conventional..... 34
3.1.4.2 การทำ Nick translation โดยใช้ชุดทำ Nick translation..... 34
สำเร็จรูปของ Vysis
3.1.5 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส..... 35
3.1.6 Fluorescence in situ hybridization (FISH)..... 35
3.1.6.1 Pretreatment slide..... 35
3.1.6.2 การทำเทคนิค FISH ด้วยวิธี Indirect..... 36
3.1.6.2.1 การตกตะกอนตัวติดตาม..... 36
3.1.6.2.2 Hybridization..... 36
3.1.6.2.3 Post hybridize..... 36
3.1.6.3 การทำเทคนิค FISH โดยใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปของ Vysis..... 37
3.1.6.3.1 Hybridization..... 37
3.1.6.3.2 Post hybridize..... 37
3.2 ตัวอย่างอสุจิ..... 37
3.3 วิธีการทดลอง..... 38
3.3.1 การเลี้ยงเชื้อ E.Coli ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล..... 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin..... 39
มีขั้นตอนดังนี้
3.3.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความบริสุทธิ์และความ..... 40
เข้มข้นของดีเอ็นเอ
3.3.4 การเตรียมสไลด์..... 40
3.3.5 การทำ Nick translation..... 41
3.3.5.1 การทำ Nick translation ด้วยวิธี conventional..... 41
3.3.5.2 การทำ Nick translation โดยใช้ชุดทำ..... 41
Nick translation สำเร็จรูปของ Vysis
3.3.6 การทำอีเลคโตรโฟรีซิส..... 42
3.3.7 การทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH)..... 43
3.3.7.1 การทำ Pretreatment slide..... 43
3.3.7.2 การทำเทคนิค FISH ด้วยวิธี Indirect..... 44
3.3.7.3 การทำเทคนิค FISH โดยใช้ชุดทำ FISH..... 46
สำเร็จรูปของ Vysis

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล..... 48
4.1 การเตรียมสไลด์..... 48
4.2 การสกัดพลาสมิด.....48
4.3 การทำ Nick translation.....48
4.3.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ DNase.....48
4.3.2 การหาวิธีที่เหมาะสมในการทำ Nick translation..... 49
4.4 รูปร่างของอสุจิก่อนการทำ Fluorescence In Situ Hybridization..... 49
(FISH)
4.5 การตรวจโครโมโซมเพศด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ..... 51
hybridization (FISH)

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 54
ภาคผนวก..... 55
เอกสารอ้างอิง..... 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชายโดย A แสดงลำดับขั้นตอน.....4
ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และ B แสดงลักษณะของอสุจิ
2. แสดงลักษณะปกติของตัวอสุจิ.....5
3. แสดงการแยกของโครโมโซมระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส.....6
โดยเมื่อสิ้นสุดไมโอซิสจะได้ 4 เซลล์
4. แสดงลักษณะ Karyotype ของผู้ป่วยโรค Down syndrome.....7
5. แสดงลักษณะ Phenotpye ของผู้ป่วยโรค Down syndrome.....7
6. แสดงลักษณะ Karyotype ของผู้ป่วยโรค Klinefelter syndrome.....8
7. แสดงลักษณะ Phenotype ของผู้ป่วย Klinefelter syndrome.....9
8. แสดงลักษณะ Phenotype ของเด็กที่เป็น Patua syndrome.....9
9. แสดงลักษณะ Karyotype ของผู้ที่เป็น Patua syndrome..... 10
10. แสดงโครงสร้างของ Chromomycin A3.....17
11. แสดงการตรวจสอบตัวอสุจิด้วย Acridine orange โดยหัวตัวอสุจิที่ติดสีเขียว..... 18
เป็นตัวอสุจิที่มีดีเอ็นเอปกติในขณะที่หัวอสุจิที่ติดสีแดงและเหลืองเป็นตัวอสุจิ
ที่เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอ
12. การตรวจหาการแตกหักของดีเอ็นเอในอสุจิโดยวิธี TUNEL ซึ่งย้อมสี DAPI..... 21
อสุจิที่ติดสีฟ้าแสดงถึงอสุจิ ตัวนั้นมีดีเอ็นเอที่ปกติ ในขณะที่สีเขียวแสดงถึงการที่
อสุจิตัวนั้นถูกทำลายดีเอ็นเอ
13. ดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย (การแตกหักของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่)..... 22
ในการตรวจโดยวิธี COMET
14. แสดงไดอะแกรมการเกิดการจับกันของเบสคู่สม (hybridization)..... 23
เริ่มจากการเกิด denature ดีเอ็นเอเป้าหมาย การเข้าจับของตัวติดตามที่
ติดฉลากไว้จนได้ hybrid เกิดขึ้น
15. แสดงการติดฉลากตัวติดตามด้วยวิธี direct method..... 24
16. แสดงการติดฉลากด้วยวิธี indirect method..... 25
17. แสดงโครงสร้างของ Biotin 11 – dUTP..... ... 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ **หน้า**

18. แสดงโครงสร้างของ Photodigoxigen.....25
19. แสดงการเข้าจับของตัวติดตามในเซลล์ระยะ Metaphase และ Interphase.....26
20. แสดงการเข้าจับของตัวติดตามกับโครโมโซมในระยะ Methaphase.....27
21. แสดงการเข้าจับของตัวติดตามกับโครมาทินในเซลล์ในระยะ Interphase.....27
22. แสดงการอ่านค่าจากสัญญาณสี XY ผิดปกติ, X ปกติ และ Y ปกติ ตามลำดับ.....30
23. Ideogram แสดงตำแหน่งการจับของตัวติดตามบนโครโมโซมรูป.....33
(A) Xp 11.1 (B) YqI1.1 และ (C) Yq11.1
24. รูปAแสดงให้เห็นอสุจิของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ โดยอสุจิจะมีรูปร่างปกติ.....50
ส่วนรูป B C D และ E เป็นรูปอสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่
โดยรูป B อสุจิมี 2 หาง รูป C อสุจิมี acrosome ผิดปกติ รูป D อสุจิมี 4 หาง
และรูป E อสุจิมี 2 หัว
25. รูป A แสดงสัญญาณสีของอสุจิที่มีโครโมโซมเพศปกติ รูป B C D และ E.....52
แสดงสัญญาณสีของอสุจิที่มีโครโมโซมเพศผิดปกติ โดยสัญญาณสีแดงคือ
โครโมโซม X และ สัญญาณสีเขียวคือ โครโมโซม Y

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงรายละเอียดของตัวติดตาม	32
2	แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด	38
3	แสดงอัตราความผิดปกติของโครโมโซมเพศ ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และผู้ที่สูบบุหรี่	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในสังคมปัจจุบันการสูบบุหรี่เข้ามามีบทบาทกับวัยรุ่นมากขึ้น ซึ่งวัยรุ่นเป็นวัยที่มีอัตราการเจริญเติบโตมากที่สุดรวมถึงการเจริญทางเพศ การที่คนได้รับสารพิษจากภายนอก เช่น ได้รับการรักษาทางยา ฉายรังสี ยาฆ่าแมลง สารพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม การดื่มแอลกอฮอลล์ และการสูบบุหรี่ ความเสี่ยงเหล่านี้อาจจะมีผลต่อการพัฒนาทางเพศของวัยรุ่น การที่ได้รับสารพิษจากภายนอกเป็นเวลานานอาจจะส่งผลถึงกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งทางด้านรูปร่างและจำนวนโครโมโซมในเซลล์อสุจิ ซึ่งถ้าเซลล์อสุจิที่ผิดปกติเหล่านี้ได้รับการผสมกับไข่ของเพศหญิง เด็กทารกที่คลอดออกมาจะมีความเสี่ยงที่ผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น โรค down syndrome (47, XY+21 หรือ 47, XX+21) โรค turner syndrome (47, XY+13) หรือ (47, XX+13) และ โรค klinfelter syndrome (47, XXY) เป็นต้น

Rubes และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาอัตราการเพิ่มขึ้นของการเกิด sperm disomic และการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพของน้ำอสุจิที่สามารถตรวจสอบได้ ระหว่างวัยรุ่นเพศชายที่สูบบุหรี่และดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยศึกษาในวัยรุ่นชายที่สูบบุหรี่เป็นประจำ จำนวน 10 คน (20 มวนต่อวันและสูบบุหรี่มาอย่างน้อยเป็นเวลา 2 ปี ซึ่งยืนยันโดยผลตรวจปริมาณ cotinine ในปัสสาวะ) ซึ่งดื่มแอลกอฮอล์ด้วย และในวัยรุ่นที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 15 คน โดยกลุ่มคนที่นำมาศึกษาทุกคนมีอายุ 18 ปี สุขภาพดีและยังไม่เคยผ่านการตรวจสอบความสามารถในการมีบุตรมาก่อน โดยใช้วิธี Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization, วิธี conventional semen analyses, วิธี computer-aided sperm analysis for motility และวิธี sperm chromatin structure analysis ในการตรวจสอบ sperm aneuploidy ที่โครโมโซม 8, X และ Y ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่าวัยรุ่นชายที่สูบบุหรี่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของ sperm aneuploidy (Y disomy ที่นัยสำคัญ <0.001 และ เกิด X, Y และ 8 disomy ร่วมกันที่ค่านัยสำคัญ <0.01) มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิที่ค่านัยสำคัญ <0.05 และมีลักษณะ round-headed ของตัวอสุจิ (ค่านัยสำคัญ <0.01) น้ำอสุจิของวัยรุ่นที่สูบบุหรี่จะมีตัวอสุจิน้อยกว่า (ค่านัยสำคัญ <0.001) และมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้น้อยกว่า (ค่านัยสำคัญ <0.001) วัยรุ่นที่ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวัยรุ่นที่สูบบุหรี่จะมีอัตรา disomic sperm ที่เพิ่มมากขึ้นและมีคุณภาพของน้ำอสุจิที่ต่ำลงซึ่งอาจทำให้เกิดภาวะมีบุตรยากและการเกิด aneuploidy syndrome ในบุตรได้

Viloria และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผู้ที่สูบบุหรี่ทั้งเพศหญิงละเพศชายเพื่อเปรียบเทียบว่าเพศใดจะส่งผลต่อปัญหาการมีบุตรยากมากกว่า โดยได้ศึกษาคู่สามีภรรยา 56 คู่ ที่สูบบุหรี่ ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมถึงคู่สามีภรรยาที่อยู่ในโปรแกรม preimplantation genetic diagnosis (PGD) ด้วย โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามปริมาณการสูบบุหรี่ต่อวัน โดยกลุ่มแรกคือผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ กลุ่มที่ 2 คือผู้สูบบุหรี่ 1 ถึง 9 มวนต่อวัน และกลุ่มที่ 3 คือผู้สูบบุหรี่จัดโดยสูบ 20 มวนต่อวัน ซึ่งใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ในการศึกษาตำแหน่งของโครโมโซม X และ Y ในอสุจิรวมถึงการศึกษาในเอ็มบริโอด้วยเช่นกัน โดยผลที่ได้จากการตรวจสอบอสุจิด้วยเทคนิค FISH พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของโครโมโซม X และ Y ในตัวอย่างอสุจิทั้งกลุ่ม 3 กลุ่ม อย่างไรก็ตาม จากตัวอย่างของผู้ที่อยู่ในโปรแกรม preimplantation genetic diagnosis (PGD) ชายที่สูบบุหรี่จัดจะมีอัตราการปฏิสนธิต่ำโดยจะเกิดเอ็มบริโอ XX และ XY น้อยกว่าเมื่อเทียบกับชายที่ไม่สูบบุหรี่ (22:47 และ 80:71 ที่นัยสำคัญ 0.0057) โดยพบว่าคู่สามีภรรยาที่เพศหญิงสูบบุหรี่จะไม่เกิดผลกระทบต่อการปฏิสนธิ แต่ในคู่ที่ภรรยาไม่สูบบุหรี่แต่สามีสูบบุหรี่จัดจะมีอัตราการปฏิสนธิที่น้อยลงเมื่อเทียบกับคู่ที่สามีไม่สูบบุหรี่ โดยสามารถสรุปได้ว่าจากตัวอย่างน้ำอสุจิของชายที่สูบบุหรี่นั้นไม่มีความแตกต่างระหว่างอัตราของอสุจิ X หรือ Y อย่างไรก็ตาม ชายที่สูบบุหรี่จัดสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของเอ็มบริโอเมื่อเกิดการปฏิสนธิได้ โดยอาจทำให้เกิด X spermatozoa enrichment หลังจากที่อสุจิว่ายเข้าปฏิสนธิกับไข่ของหญิงที่สูบบุหรี่ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมเพศในอสุจิผู้ที่สูบบุหรี่
2. เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของตัวติดตามที่ใช้ในเทคนิค FISH

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาเฉพาะโครโมโซมเพศ X และ Y ในอสุจิของคนสูบบุหรี่ (10-20 มวนต่อวัน) เป็นระยะเวลามากกว่า 3 ปี และไม่สูบบุหรี่ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย

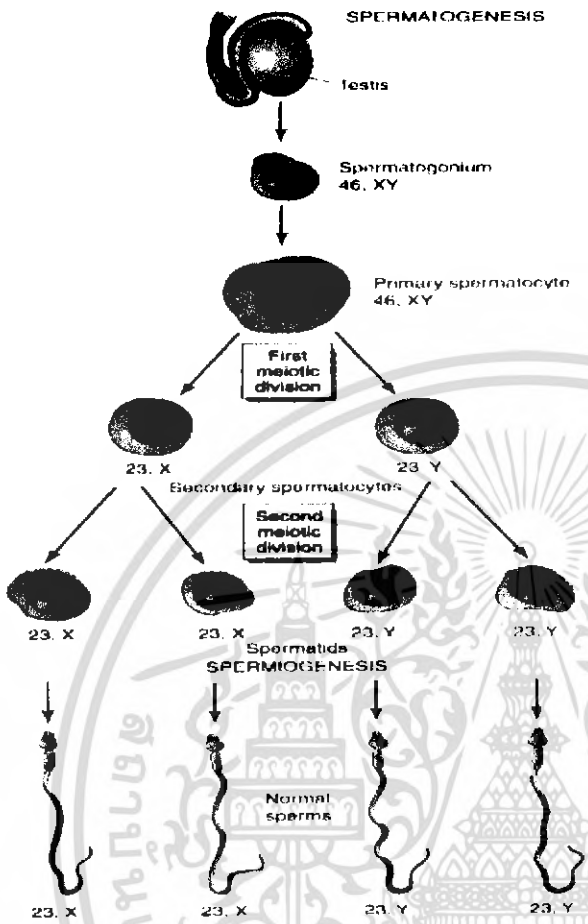
ขณะที่อัณฑะกำลังก่อตัวขึ้นในช่องท้อง จะมีเซลล์จำนวนหนึ่งก่อกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm) ที่อยู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut endoderm) เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า เซลล์สืบพันธุ์ดั้งเดิม (Primordial germ cell) ซึ่งจะเคลื่อนที่จากจุดกำเนิดมาฝังตัวที่เนื้อเยื่อที่กำลังก่อตัวเป็นอัณฑะ และเมื่อเจริญเติบโตเป็นอัณฑะแล้ว พบว่า primordial germ cell จะแบ่งเซลล์ทวีจำนวนและแปรสภาพไปเป็น spermatogonium ฝังตัวอยู่ในหลอดผลิตอสุจิ ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะเจริญไปเป็นอสุจิต่อไป Primordial germ cell จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสอย่างรวดเร็ว จึงเรียกระยะนี้ว่า multiplication division จนในที่สุดจะได้เซลล์ spermatogonium ซึ่งเป็นเซลล์ diploid (2n) และจะเพิ่มจำนวนตลอดเวลาตั้งแต่เป็น embryo จนถึงวัยเจริญพันธุ์

เมื่อเริ่มเข้าสู่วัยหนุ่ม จะได้รับ Follicle stimulating hormone (FSH) และ Luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมอง ทำให้ spermatogonium เจริญมีขนาดใหญ่ขึ้น ภายในมีการจำลองโครโมโซมทำให้ 1 โครโมโซม ประกอบด้วย 2 โครมาติด มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ จำนวนโครโมโซมยังเป็น diploid พร้อมที่จะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสต่อไป เซลล์ในระยะนี้เรียกว่า primary spermatocyte เนื่องจากระยะนี้แต่ละเซลล์จะมีการเพิ่มขนาดแต่ไม่มีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ จึงเรียกระยะนี้ว่า growth period Spermatocyte ในระยะแรกแต่ละเซลล์จะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่หนึ่ง ได้ secondary spermatocyte จำนวน 2 เซลล์ แต่ละเซลล์มีโครโมโซมเป็น haploid (n) และขนาดเล็กลงครึ่งหนึ่ง ไมโอซิสครั้งที่สอง spermatocyte จะแบ่งได้ spermatid มีขนาดเท่าๆกัน 4 เซลล์ ขนาดลดลงไปจากเดิมครึ่งหนึ่ง (แสดงดังรูปที่ 1 A และ B) หลังจากนั้น spermatid ทั้ง 4 เซลล์จะมีการแปรสภาพจนมีรูปร่างเป็นอสุจิที่สมบูรณ์ มีการสลัด cytoplasm ทิ้งเพื่อให้มีขนาดเล็กลงและสะดวกในการเคลื่อนไหว มีการสร้างหาง fragellum เพื่อใช้ในการโบกพัดเคลื่อนที่ นิวเคลียสมีขนาดเล็กลง ส่วนของ golgicomplex จะกลายเป็น acrosome สร้างเอนไซม์ที่ช่วยให้อสุจิแทรกผ่านเข้าไปในไข่ได้ง่าย

จากกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ จะเห็นว่าเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของ embryo ไปตลอดระยะการสืบพันธุ์จนกระทั่งตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(A)



(B)

รูปที่ 1 แสดงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชายโดย A แสดงลำดับขั้นตอนในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและ B แสดงลักษณะของอสุจิ

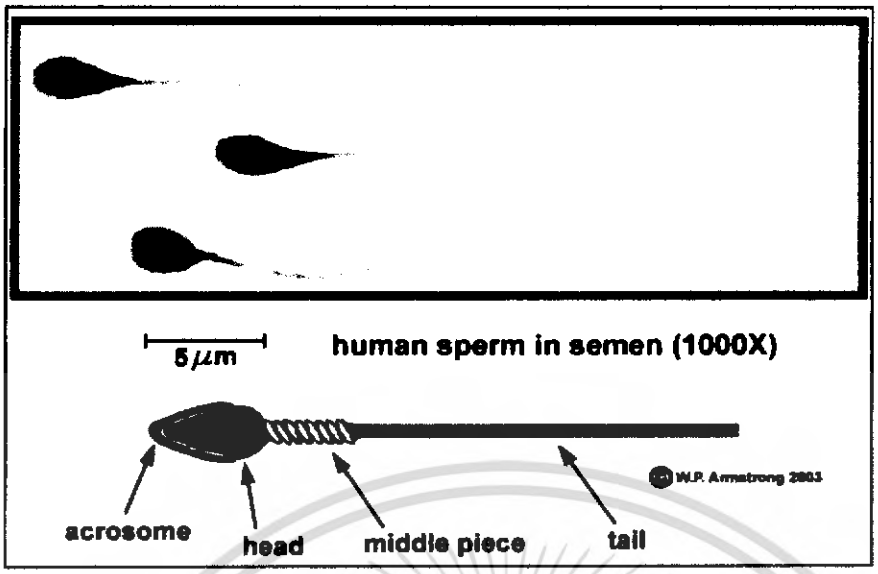
ที่มา : http://tecn.rutgers.edu/ bio342/sperm_meiosis.html

2.2 ลักษณะรูปร่างและลักษณะพันธุกรรมที่ปกติของอสุจิ

2.2.1 ลักษณะรูปร่างของอสุจิ

รูปร่างอสุจิปกติจะมีส่วน (Head) เป็นรูปวงรี ส่วนลำตัว (Midpiece) ป้อมและสั้นกว่าส่วนหัวเล็กน้อย ส่วนหาง (Tail) จะยาวกว่าส่วนหัว 7 ถึง 15 เท่า มีลักษณะ เรียวเล็กลงเรื่อยๆ ทำหน้าที่โบกพัดเพื่อเคลื่อนไหวไปทางข้างหน้า (แสดงดังรูปที่ 2) โดยทั่วไปน้ำอสุจิที่หลั่งออกมาจะมีอสุจิที่รูปร่างผิดปกติปะปนอยู่ด้วยแต่มักไม่เกินร้อยละ 30 ถึง 40 ถ้าเกินกว่านี้ถือว่าผิดปกติ ซึ่งอาจจะเกิดเนื่องจากโครโมโซมผิดปกติหรือได้รับสารพิษเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงลักษณะปกติของอสุจิ

ที่มา : waynesword.palomar.edu/ images/sperm4.jpg

Kruger และคณะ (1986) ได้แนะนำให้ใช้วิธีที่เรียกว่า Strict Criteria ในการตรวจดูรูปร่างของอสุจิ โดยย้อมอสุจิด้วยสีพิเศษ (Diff-Quick Stain) ผลสรุปได้ว่า

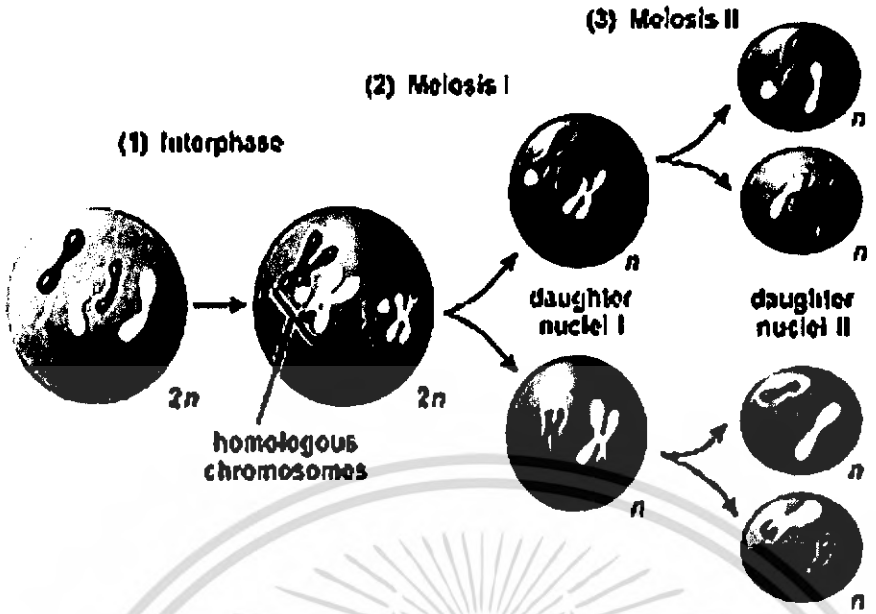
1. น้ำอสุจิที่ปกติ (Normal : ตัวย่อ N) จะตรวจพบอสุจิ ที่มีรูปร่างปกติมากกว่าร้อยละ 14
2. น้ำอสุจิที่คุณภาพค่อนข้างดี (Good Prognosis : ต่อย่อ G) จะตรวจพบอสุจิมีรูปร่างปกติ ร้อยละ 4-14
3. น้ำอสุจิที่คุณภาพไม่ดี (Poor : ตัวย่อ P) จะตรวจพบอสุจิที่มีรูปร่างปกติน้อยกว่าร้อยละ 4

ในน้ำอสุจิที่ปกติทั่วไปมักจะมีอสุจิที่เคลื่อนไหวได้ดีไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 และอย่างน้อยร้อยละ 60 จะมีการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าได้ดีในระดับ 3 หรือ 4 (นิตยสารแม่และเด็ก ปีที่ 24 ฉบับที่ 349 มีนาคม 2544)

2.2.2 ลักษณะทางพันธุกรรมที่ปกติของอสุจิ

ลักษณะทางพันธุกรรมของอสุจิจะมีจำนวนโครโมโซมเป็น haploid (n) (แสดงดังรูปที่ 3) โดยจะมีโครโมโซมร่างกายจำนวน 22 แท่ง และโครโมโซมเพศจำนวน 1 แท่ง โดยหากเราตรวจสอบอสุจิด้วยเทคนิคที่เหมาะสม จะทราบว่าอสุจิมีโครโมโซมเพศเป็น X หรือ Y

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงการแยกของโครโมโซมระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในการสร้างอสุจิ โดยเมื่อสิ้นสุดไมโอซิสจะได้ 4 เซลล์

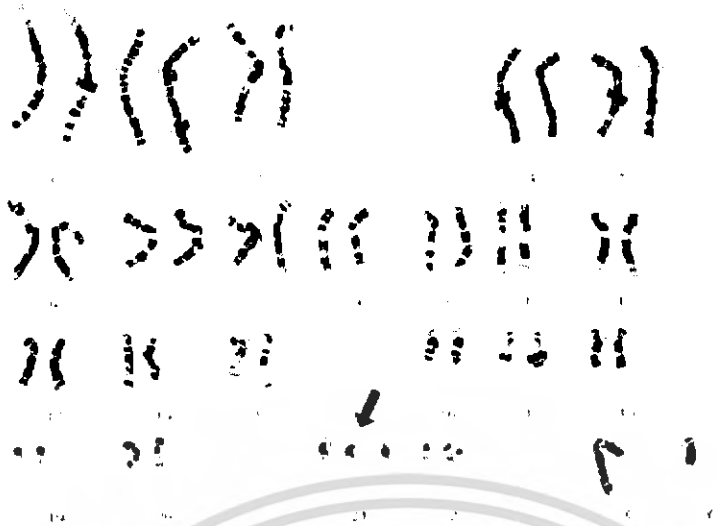
ที่มา : http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/meiosisover.html

2.3 ปัญหาที่เกิดจากอสุจิที่ผิดปกติ

2.3.1 Down syndrome

กลุ่มอาการดาวน์หรือ Down syndrome เป็นโรคพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมเนื่องจากการที่มีโครโมโซมคู่ที่ 21 เพิ่มขึ้นมา 1 แท่ง (แสดงดังรูปที่ 4) ที่พบบ่อยที่สุด เด็กกลุ่มอาการดาวน์จะมีศีรษะค่อนข้างเล็ก แบน และตาเฉียงขึ้น ดั้งจมูกแบน ปากเล็ก ลิ้นมักยื่นออกมา ตัวค่อนข้างเตี้ย มือสั้น (แสดงดังรูปที่ 5) มักมีโรคหัวใจพิการแต่กำเนิด หรือโรคลำไส้อุดตัน ตั้งแต่แรกเกิด เด็กพวกนี้จะมีใบหน้าที่คล้ายคลึงกันมากกว่าพี่น้องท้องเดียวกัน ปัญหาที่สำคัญที่สุดของเด็กเหล่านี้ก็คือ ภาวะปัญญาอ่อน นอกจากนี้ก็คือโรคหัวใจพิการแต่กำเนิด และภาวะต่อมธัยรอยด์บกพร่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงลักษณะ Karyotype ของผู้ป่วยโรค Down syndrome

ที่มา : www.downsyn.com/ whatisds.html

รูปที่ 5 แสดงลักษณะ Phenotype ของผู้ป่วยโรค Down syndrome

ที่มา : www.anotherthink.com/ my_graphics/down.jpg

2.3.2 Klinefelter syndrome

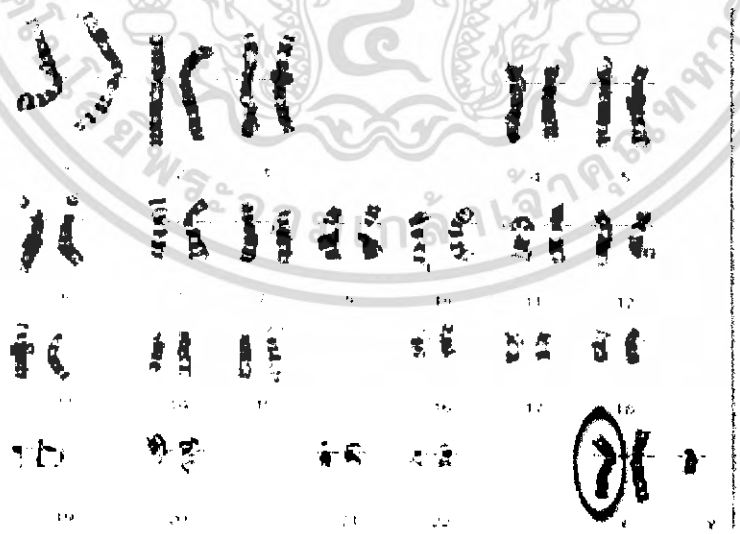
ไคลเฟลเทอร์ซินโดรม (Klinefelter syndrome) เป็นความผิดปกติที่พบในเพศชาย ซึ่งจะเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมเพศโดยจะมีโครโมโซมเพศเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจมีโครโมโซมเป็นไทรโซมิค XXY (แสดงดังรูปที่ 6) หรือดับเบิลไทรโซมิค XXYY

กลุ่มอาการในชายที่มีโครโมโซม X มากกว่าปกติ มีความผิดปกติที่สำคัญคือ เต้านมโตคล้ายผู้หญิง อัณฑะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไม่ได้ อวัยวะเพศมีขนาดเล็ก คนเหล่านี้จึงเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมัน รูปร่างสูงและอ้วนมักปัญญาอ่อน กลุ่มอาการนี้รายงานเป็นครั้งแรกโดย ดร.ไคลน์เฟลเตอร์ ในปีค.ศ.1942 โดยคนที่เป็นมักมีโครโมโซม เป็น 47,XXY แต่บางคนมีโครโมโซมเป็น 49,XXXXY และพบว่ายิ่งมีโครโมโซม X เกินมากเพียงใดอาการปัญญาอ่อนก็จะรุนแรงยิ่งขึ้น 47,XXY เกิดจากการผสมของไข่ ที่มีโครโมโซม 2X กับอสุจิปกติ หรือจากการผสมของไข่ปกติกับอสุจิที่เป็น XY และจะพบบ่อยขึ้นในมารดาที่อายุมาก

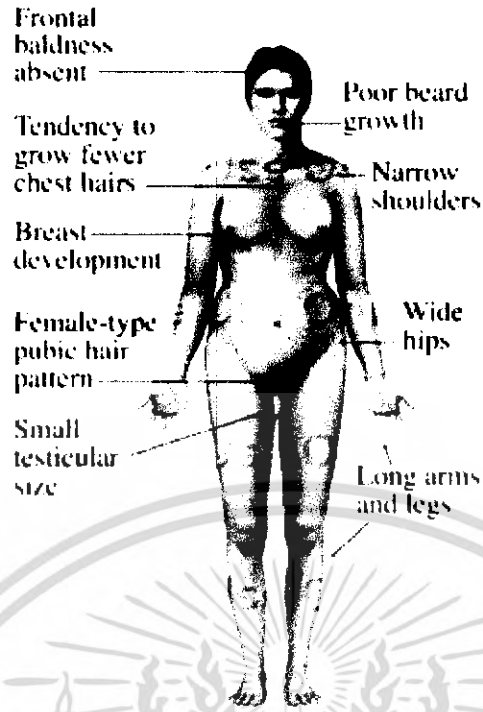
นอกจากนี้ยังมีอาการผิดปกติอย่างอื่นที่เกิดจากการเพิ่มมากขึ้นของโครโมโซมเพศ เช่นTriple X syndrome หรือ superfemale เป็นกลุ่มอาการในหญิงที่มีโครโมโซม X 3 แท่ง ความผิดปกติที่สำคัญ คือ ปัญญาอ่อน มีอาการผิดปกติทางใจ ลักษณะของเพศหญิงไม่เจริญ ไม่มีประจำเดือน รังไข่ฝ่อ ไม่มีไข่ เป็นหมัน ความผิดปกติแต่ละคนต่างกันบางคนลักษณะเพศเจริญดีและอาจมีลูกได้ โครโมโซมที่เป็น 47,XXX อาจเกิดจากไข่ที่เป็น 24,XX ผสมกับอสุจิปกติหรือไข่ปกติผสมกับอสุจิ 24,XY นอกจากพบแบบ 47,XXX แล้วอาจพบในลักษณะ 49,XXXXX ก็ได้ ยิ่งมีโครโมโซม X มากเท่าใดความผิดปกติของสมองและลักษณะทางเพศก็ยิ่งรุนแรงมากขึ้น และ double Y syndrome คือกลุ่มอาการในชายที่มี Y มากกว่าปกติ มีลักษณะที่สำคัญ คือ รูปร่างมักสูงผิดปกติ หน้าเป็นสิวมาก อวัยวะเพศมีขนาดใหญ่กว่าปกติ ปัญญาด้อย ใจเร็ว โมโหง่ายและมีความโน้มเอียงที่จะเป็นอาชญากรได้บ่อยกว่าปกติกลุ่มอาการนี้มีโครโมโซมเป็น 47,XXY และพบบางคนในกลุ่มอาการนี้มีร่างกายและจิตใจปกติและมีลูกได้เหมือนคนปกติ 47,XYY เกิดจากอสุจิชนิด 24,YY ผสมกับไข่ปกติ คนที่มีโครโมโซม 47,XYY จะรับความผิดปกติมาจากพ่อ และบางคนอาจมีโครโมโซมเป็น 48,XXYY (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะ Karyotype ของผู้ป่วยโรค Klinefelter syndrome

ที่มา : gslc.genetics.utah.edu/. ../klinefelter.cfm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงลักษณะ Phenotype ของผู้ป่วย Klinefelter syndrome

ที่มา : catalog.nucleusinc.com/ generateexhibit.php?ID...

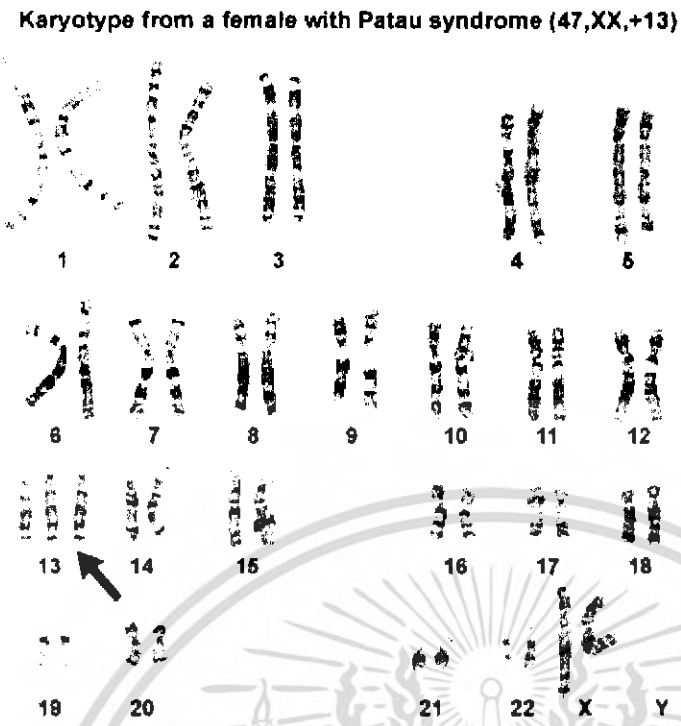
2.3.3 Patua syndrome

ทารกที่เป็นโรคนี้จะมีกระหม่อมที่กระโหลกยังไม่ปิด หัวสมองเล็ก เมื่อโตขึ้นปัญญาอ่อนและเป็นใบ้ได้ นิ้วมือและนิ้วเท้างอกเกินมาข้างละ 1 นิ้ว ส่วนใหญ่ทารกจะตายตั้งแต่เกิด (แสดงดังรูปที่ 8) โดยเกิดจากการมีโครโมโซมที่ 13 เกินมา 1 แท่ง (แสดงดังรูปที่ 9)

รูปที่ 8 แสดงลักษณะ Phenotype ของเด็กที่เป็น Patua syndrome

ที่มา : www.humpath.com/article. php3?id_article=4517

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงลักษณะ Karyotype ของผู้ที่เป็น Patua syndrome

ที่มา : www.geneticsolutions.com/ PageReq?id=3152:1873

2.4 การตรวจลักษณะทางกายภาพของน้ำอสุจิ

การตรวจลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะทั่วไปของน้ำอสุจิ ปริมาตรของน้ำอสุจิ การละลายของน้ำอสุจิ (liquefaction) และความหนืดของน้ำอสุจิ (viscosity) นอกจากนั้นยังรวมถึงการตรวจวัดความเป็นกรด ด่าง และ osmolarity ด้วย

2.4.1 ลักษณะทั่วไปของน้ำอสุจิ (appearance)

น้ำอสุจิทั่วไปจะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน สีขาวไปจนถึงสีขาวเทา หากน้ำอสุจิที่หลั่งออกมามีลักษณะเหลวใส (Clear) มักแสดงถึงว่ามีจำนวนและความเข้มข้นของอสุจิน้อยเกินไป ในกรณีที่น้ำอสุจิมีสีน้ำตาลแสดงว่าน่าจะมีเม็ดเลือดแดงปนเปื้อน (Haematoospermia) ในกรณีที่น้ำอสุจิมีสีเขียวหรือเหลืองหรือมีกลิ่นรุนแรง อาจแสดงว่ามีการติดเชื้อ ซึ่งควรตรวจยืนยันด้วยกล้องจุลทรรศน์ และพิจารณาทำการเพาะเชื้อจากท่อปัสสาวะด้วย ในบางกรณีอาจพบการปนเปื้อนของน้ำปัสสาวะในรายที่มีความผิดปกติของการทำงานของคอกระเพาะปัสสาวะ (bladder neck) ปัสสาวะที่ปนเปื้อนจะมีผลเสียต่ออสุจิ เนื่องจากยูเรียในปัสสาวะและการเปลี่ยนแปลงของ osmolarity มีผลโดยตรงต่ออสุจิบางกรณีมีการปนเปื้อนของ bilirubin ได้ในรายที่เป็นดีซ่าน (jaundice) ทำให้น้ำอสุจิมีสีเหลืองสด น้ำอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรได้รับการตรวจทันทีที่มีการละลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใน 1 ชั่วโมงภายหลังเก็บเชื้อ

ความเข้มข้นของอสุจิในคนปกติทั่วไปจะมากกว่า 40 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ซึ่งคำนวณเป็นจำนวนอสุจิทั้งหมดที่หลั่งออกมาแต่ละครั้งจะมีค่าระหว่าง 150-200 ล้านตัว ในทางการแพทย์จำนวนอสุจิที่ถือว่าปกติจะต้องมากกว่า 20 ล้านตัวต่อมิลลิลิตรขึ้นไป หากอสุจิมีจำนวนน้อยกว่า 10 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร (Oligospermia) ความสามารถในการปฏิสนธิตามธรรมชาติ จะลดลงอย่างมาก แต่ถ้ามากกว่า 300 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร จะถือว่ามีความหนาแน่นของอสุจิมากเกินไป (Polyzoospermia) เป็นปัญหาด้านมีบุตรยากเช่นเดียวกันเนื่องจาก (แม้ว่ารูปร่างของอสุจิจะปกติก็ตามการเคลื่อนไหวของอสุจิโดยเฉพาะเคลื่อนไหวไปข้างหน้าจะลดน้อยลง ถือว่ามีความสำคัญมากในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ โดยปกติต้องเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (Forward Pro-gression) ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 50 ของจำนวนอสุจิทั้งหมด การเคลื่อนที่ของอสุจิมีหลายระดับ) Grade) คือ

ระดับ 0 : ไม่เคลื่อนไหว

ระดับ 1 : เคลื่อนไหวอยู่กับที่

ระดับ 2 : เคลื่อนไหวไปข้างหน้าอย่างช้าๆ

ระดับ 3 : เคลื่อนไหวไปข้างหน้าค่อนข้างตรงด้วยความเร็วปานกลาง

ระดับ 4 : เคลื่อนไหวไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว

2.4.2 ปริมาตรของน้ำอสุจิ

น้ำอสุจิต่อการหลั่ง 1 ครั้งควรมีปริมาตร (Volume) 2 มิลลิลิตรหรือมากกว่า การวัดปริมาตรน้ำอสุจิอาจทำได้โดยใช้กระบอกตวง หรือใช้ปิเปตที่สามารถวัดปริมาตรได้แม่นยำถึงระดับ 0.1 มิลลิลิตร ในกรณีที่จะนำน้ำอสุจิไปเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจการทำงานของอสุจิ หรือนำมาใช้ในการรักษา เช่น การฉีดเชื้ออสุจิเข้าโพรงมดลูกหรือการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ควรใช้อุปกรณ์ที่ปราศจากเชื้อไม่ควรวัดปริมาตรของน้ำอสุจิโดยดูดเข้าไปในกระบอกฉีดยาพลาสติกที่ติดกับเข็ม เนื่องจากอสุจิที่ดูดผ่านปลายเข็มที่มีขนาดเล็กจะมีผลต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ เมื่อวัดปริมาตรแล้วควรบันทึกไว้

การตรวจพบว่าน้ำอสุจิมีปริมาตรน้อยอาจมีสาเหตุมาจากการอุดตัน การไม่มี vas-deferens ทั้งสองข้างแต่กำเนิด หรือการหลั่งอสุจิย้อนกลับซึ่งพบได้บ่อยในผู้ป่วยเบาหวาน การตรวจยืนยันการหลั่งอสุจิย้อนกลับทำได้โดยตรวจปัสสาวะภายหลังการหลั่งอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 การละลายตัว (liquefaction)

น้ำอสุจิที่หลั่งออกมาจะมีลักษณะจับตัวเป็นก้อน (coagulum) โดยเอนไซม์ protein kinases ซึ่งหลั่งมาจาก seminal vesicle แต่กำเนิดทำให้ไม่พบเอนไซม์ดังกล่าว และฟรุคโตสในน้ำอสุจิ น้ำอสุจิจะสามารถละลายได้ภายใน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนใหญ่มักจะละลายตัวได้ภายใน 15 นาที การตรวจพบว่าน้ำอสุจิมีมูกเป็นสายแสดงว่ามีการละลายไม่สมบูรณ์ซึ่งอาจรบกวนการตรวจความเข้มข้นของอสุจิ

การละลายตัวของน้ำอสุจิเกิดจาก fibrinolysin, fibrinogenase และ aminopeptidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่หลั่งจากต่อมลูกหมาก ดังนั้นกระบวนการละลายตัวของน้ำอสุจิ แสดงถึงการทำงานเป็นปกติของต่อมลูกหมาก ในรายที่น้ำอสุจิไม่มีการละลายตัวใน 60 นาที แสดงว่าการทำงานของต่อมลูกหมากผิดปกติไป ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการอักเสบของต่อมลูกหมาก รายที่ไม่มีการละลายตัวของน้ำอสุจิอาจเป็นสาเหตุของภาวะมีบุตรยากได้ เนื่องจากอสุจิไม่สามารถออกมาจากน้ำอสุจิได้ เมื่อศึกษาการละลายตัวของน้ำอสุจิด้วย scanning electron microscopy พบว่าในขณะที่มีการละลายตัวของน้ำอสุจิจะมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างจาก fibers มาเป็น globular bodies ซึ่งจะเชื่อมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน

กลไกการจับตัวกันเป็นก้อนของน้ำอสุจิรวมทั้งการละลายตัวยังไม่เป็นที่ทราบชัดแน่นอน มีการศึกษาในเรื่องดังกล่าวน้อยมาก เนื่องจากไม่ค่อยมีความสำคัญทางคลินิก อย่างไรก็ตามการศึกษากระบวนดังกล่าวอย่างลึกซึ้ง อาจนำมาใช้พัฒนาสารที่ยับยั้งการละลายตัวของน้ำอสุจิและมีฤทธิ์ฆ่าอสุจิด้วย ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการคุมกำเนิดทางช่องคลอดได้

ระยะเวลาของการละลายตัวของน้ำอสุจิมีความสัมพันธ์กันในเชิงลบกับปริมาตรของน้ำอสุจิ ในกรณีที่น้ำอสุจิยังคงไม่มีการละลาย อาจเติม bromelin 1 กรัม/ลิตร หรือ chymotrypsin 150 USP/มิลลิลิตร เพื่อให้สามารถตรวจน้ำอสุจิได้ อย่างไรก็ดามยังไม่ทราบถึงผลของการให้สารดังกล่าวต่อการทำงานของอสุจิและการตรวจทางชีวเคมีของน้ำอสุจิ ควรให้น้ำอสุจิละลายหมดก่อนแล้วทำการผสมน้ำอสุจิให้เข้ากันดีแล้วจึงบันทึกลักษณะทางกายภาพ การผสมน้ำอสุจิให้ดีระหว่างการละลายตัวของน้ำอสุจิจะช่วยลดความผิดพลาดของการตรวจความเข้มข้นของอสุจิได้

2.4.4 ความหนืดของน้ำอสุจิ (viscosity)

ความหนืดของน้ำอสุจิแสดงถึงปริมาณมูก (mucus) ในน้ำอสุจิ การประเมินความหนืดทำได้โดยดูดน้ำอสุจิเข้าใน pipette และปล่อยให้น้ำอสุจิหยดลงตามแรงโน้มถ่วง จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นสังเกตความยาวของสายน้ำอสุจิที่หยดลงมา ตามปกติน้ำอสุจิจะไม่มีความหนืดมากจะหยดลงเป็นหยดแยกกันชัดเจน ถ้าน้ำอสุจิหนืดมาก (หยดมาเป็นสายยาวกว่า 2 เซนติเมตร) อาจผสมให้เข้ากันได้ลำบากและรบกวนการตรวจความเข้มข้นของอสุจิ, การเคลื่อนไหวของอสุจิ และการตรวจหาภูมิต้านทานต่ออสุจิ (antisperm antibodies) ได้

การตรวจหาความหนืดของน้ำอสุจิทำได้อีกวิธีหนึ่งโดยใช้แท่งแก้วจุ่มน้ำอสุจิแล้วยกขึ้นในกรณีที่ทำให้เกิดสายน้ำอสุจิเกินกว่า 2 เซนติเมตร ถือว่ามีความหนืดสูงผิดปกติ เชื่อว่ามีสาเหตุจากปริมาณมูกในน้ำอสุจิมากเกินไป บางแห่งตรวจความหนืดของน้ำอสุจิโดยใช้ rotation viscometer เป็นวิธีที่ตรวจวัดความหนืดของอสุจิเชิงปริมาณ สะดวกรวดเร็ว และพบว่าน้ำอสุจิจะมีความหนืดสูงในรายที่มีคุณภาพของน้ำอสุจิผิดปกติมากกว่ารายที่มีคุณภาพของน้ำอสุจิปกติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระว่างความเข้มข้นของน้ำอสุจิหรือการเคลื่อนไหวของอสุจิกับความหนืดของน้ำอสุจิ

การที่น้ำอสุจิมีความหนืดมาก (hyperviscosity) อาจจะขัดขวางการเคลื่อนไหวของอสุจิได้ และป้องกันไม่ให้อสุจิสัมผัสกับปากมดลูกภายหลังการร่วมเพศ ความสำคัญทางคลินิกของการเพิ่มขึ้นของความหนืดของน้ำอสุจิ สามารถประเมินได้โดยการตรวจหาอสุจิในมูกปากมดลูกภายหลังการร่วมเพศ (postcoital test) ถ้าตรวจพบว่ามีอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวได้ดี 8-10 ตัว/HPF ในมูกปากมดลูก แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของความหนืดของน้ำอสุจินั้นไม่มีความสำคัญทางคลินิก

การลดความหนืดของสุจิลงสามารถทำได้โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร หรือ 10 มิลลิลิตร ดูดน้ำอสุจิผ่านเข็มเบอร์ 18 หรือ 19 หลายๆครั้งจะทำให้น้ำอสุจิมีความหนืดเป็นปกติ แต่อาจก่อให้เกิดฟองอากาศขึ้น หรืออาจใช้วิธีเติม dithiothreitol (DTT) α-amylase หรือ chymotrypsin ลงไปเพื่อลดความหนืด โดย dithiothreitol (DTT) ไม่มีผลต่อความเข้มข้นของอสุจิและร้อยละของอสุจิที่มีการเคลื่อนไหว มีผลเล็กน้อยต่อลักษณะการเคลื่อนไหวของอสุจิ และรูปร่างของอสุจิ นอกจากนั้นพบว่า DTT ไม่มีผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มอสุจิ mitochondria และ acrosome อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงผลของการใช้ DTT ต่อการทำงานของอสุจิและผลต่อโครมาตินของอสุจิอย่างละเอียด รวมทั้งความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิด้วย

2.4.5 ความเป็นกรดด่างของน้ำอสุจิ

ปกติค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำอสุจิมีค่าอยู่ระหว่าง 7.2-8.0 ถ้าค่า pH มากกว่า 8.0 อาจ หมายถึงมีการติดเชื้อและมีการหลั่งของของเหลวจากต่อมลูกหมาก ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดลดลง ถ้าค่า pH น้อยกว่า 6.4 ให้สงสัยว่ามีการอุดตันของท่อนำน้ำอสุจิจากถุงเก็บเชื้อ (Seminal Vesicles) การตรวจ pH อาจใช้วิธี colorimetric method หรือ glass electrode

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

method ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจด้วยวิธี glass electrode method จะมีความแม่นยำกว่า แต่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ใช้วิธี colorimetric method โดยใช้แถบกระดาษวัด pH เนื่องจากสะดวกและไม่สิ้นเปลือง ทำได้โดยหยดน้ำอสุจิลงบนแถบกระดาษวัด pH ซึ่งสามารถวัด pH ในช่วง 6.1 ถึง 10 แล้วนำไปเทียบสี ภายหลังการหลั่งอสุจินาน 60 นาที โดยทั่วไปน้ำอสุจิจะมีฤทธิ์เป็นด่างเล็กน้อย (7.2-8.0) แต่จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ถ้า pH ของน้ำอสุจิต่ำกว่า 7.0 ในรายที่ตรวจไม่พบอสุจิ (azoospermia) อาจเกิดจากความพิการแต่กำเนิดของ seminal vesicles, vas deferens หรือ epididymis การศึกษาในระยะหลังพบว่าค่าปกติของ pH ของอสุจิอยู่ระหว่าง 7.3 ถึง 9.5 โดยมีค่าเฉลี่ยมากกว่า 8.0

ค่าปกติของน้ำอสุจิตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ.2535

- ปริมาตร (Volume) 2 มิลลิลิตรหรือมากกว่า
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง pH 7.2 ถึง 8.0
- ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm Concentration) 20 X 10^6 ตัวต่อมิลลิลิตรหรือมากกว่า
- จำนวนอสุจิทั้งหมด (Total Sperm Count) 40 X 10^6 ตัวต่อการหลั่งแต่ละครั้งหรือมากกว่า
- การเคลื่อนไหว (Motility) 50 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า (เคลื่อนที่ไปข้างหน้า)
- รูปร่าง (Morphology) 30 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า (รูปร่างปกติ)
- การมีชีวิต (Vitality) 75 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า
- จำนวนเม็ดเลือดขาว (White Blood Cells) น้อยกว่า 1 x 10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร

การรายงานผลการวิเคราะห์น้ำอสุจิ แบ่งเป็น

- Normozoospermia น้ำอสุจิมีค่าปกติทั้งหมด
- Oligozoospermia น้ำอสุจิมีจำนวนอสุจิน้อยกว่า 20 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร
- Asthenozoospermia น้ำอสุจิมีอสุจิเคลื่อนไหวผิดปกติมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์
- Teratozoospermia น้ำอสุจิมีอสุจิรูปร่างผิดปกติมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์
- Necrozoospermia อสุจิทั้งหมดไม่มีการเคลื่อนไหว
- Azoospermia ไม่พบอสุจิ ในน้ำอสุจิที่หลั่งออกมา
- Aspermia ไม่มีน้ำอสุจิออกมาเลย

เนิตยสารแม่และเด็ก ปีที่ 24 ฉบับที่ 349 มีนาคม 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 วิธีการตรวจน้ำอสุจิด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เป็นที่ทราบกันดีว่าอสุจิจากผู้ชายที่มีปัญหาการมีบุตรยากจะมีความผิดปกติทางโครงสร้างหรือการทำงาน จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ทำให้แพทย์และนักวิทยาศาสตร์เข้าใจถึงความผิดปกติดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น และพบว่าอสุจิที่ผิดปกติจะไม่สามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการที่อสุจิจับกับ zona pellucida ความผิดปกติบางอย่างอาจเกิดร่วมกับความผิดปกติของโครงสร้าง และการทำงานของอสุจิอื่นๆได้ ทำให้อสุจิไม่มีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ ความผิดปกติอื่นๆที่มาจากฝ่ายชาย ได้แก่ ความผิดปกติของการเคลื่อนไหวของอสุจิ ความผิดปกติของการเกิด acrosome reaction เมื่ออสุจิจับกับ zona pellucida และความผิดปกติในการทำปฏิกิริยากับไข่ การรักษาด้วยวิธีฉีดอสุจิเข้าในไข่ (Intracytoplasmic Sperm Injection : ICSI) ได้ลัดขั้นตอนการคัดเลือกอสุจิตามธรรมชาติดังกล่าวโดยเลือกเพียงอสุจิที่มีรูปร่างปกติมาใช้ ในระยะหลังมีความกังวลเกี่ยวกับการถ่ายทอดโรคทางพันธุกรรมจากการทำ ICSI ทำให้การศึกษาในระยะหลังจึงมุ่งเน้นถึง genomic integrity ของอสุจิ

ในธรรมชาติ นิวเคลียสของอสุจิเป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงได้น้อย เนื่องจากประกอบด้วยดีเอ็นเอและ protamines ซึ่งเป็นโปรตีนที่เข้ามาแทนที่ histone ระหว่างการสร้างอสุจิ ในขณะที่มีการสร้างอสุจิจะมีการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสของอสุจิ ได้แก่ การสร้าง nucleoproteins และการจัดเรียงตัวของโครมาติน โปรตีนในนิวเคลียสของ spermatid มีฤทธิ์เป็นด่าง และประกอบด้วย arginine จำนวนมาก นอกจากนั้นยังมี cysteine จำนวนมากซึ่งทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างสายดีเอ็นเอในระหว่างที่มีการเจริญเต็มที่ของอสุจิ (sperm maturation) ในอัณฑะและ epidermis ในระหว่างที่อสุจิเดินทางผ่าน epidermis ส่วน thiol ของ protamine ซึ่งมี cysteine อยู่เป็นจำนวนมาก จะเกิดการ oxidize ขึ้นทำให้เกิด disulphide bond ขึ้นเป็นจำนวนมาก ทำให้มีการจัดเรียงตัวของโครมาตินอัดแน่นกันขึ้นและเชื่อว่าทำให้โครมาตินและดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงได้ยาก การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้นิวเคลียสของอสุจิมีลักษณะจำเพาะ คือ สามารถติดสีได้หลากหลายลักษณะ เช่น ถ้าย้อมด้วย cationic dyes จะมีการติดสีลดลง ทนทานต่อการทำลายจากความร้อนได้ดีขึ้น และจะมีกระบวนการ decondensation เมื่ออยู่ใน detergents

ดังนั้นการตรวจ nuclear maturity ของอสุจิทำให้ทราบถึงความผิดปกติของการสร้างอสุจิและการเจริญเต็มที่ของอสุจิ ในอดีตพบว่าความผิดปกติของโครมาตินและกระบวนการ sperm maturation ของอสุจิทำให้เกิดปัญหาการมีบุตรยากได้ กระบวนการ sperm maturation ที่สลับซับซ้อน เกิดขึ้นในระหว่างที่อสุจิผ่านไปตามท่ออสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน epidermis ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและปฏิกิริยาทางชีวเคมี จนทำให้อสุจิมีความสามารถในการปฏิสนธิได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของหัวอสุจิและหางส่วน principal piece โดยเกิด disulfide bonds ที่ protamine ในนิวเคลียสทำให้หัวของอสุจิยากต่อการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาที่อสุจิผ่าน epidermis จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละคน ดังนั้นอสุจิที่หลั่งออกมาจะมี nuclear stability แตกต่างกันออกไป

อสุจิจากผู้ชายที่มีบุตรยากมีความผิดปกติของดีเอ็นเอหลายชนิด เช่น ความผิดปกติของโครงสร้างของโครมาตินมีการขาดหายไปของโครโมโซม (microdeletions) หรือพบมีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมและอาจพบว่ามีการแตกหักของดีเอ็นเอได้ จึงมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆมากมายในการตรวจความผิดปกติของดีเอ็นเอของอสุจิ เช่น sperm chromatin structure assay (SCSA) ซึ่งอาศัยคุณสมบัติ metachromatic ของ acidine orange เทคนิคของการย้อมสีอื่นที่ใช้ได้ เช่น aniline blue เพื่อตรวจความผิดปกติของ chromatin condensation เนื่องจากมี histone ค้างอยู่ในอสุจิ และ fluorochromes อื่นๆ เช่น Giemsa stain, Ethidium bromide และ CMA3 โครมาตินของอสุจิปกติจะมีความสามารถในการติดสีดังกล่าวแตกต่างกัน เชื่อว่าการย้อมสีดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติของคุณภาพของ chromatin packaging เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของ nucleoprotein ในระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิ (spermiogenesis)

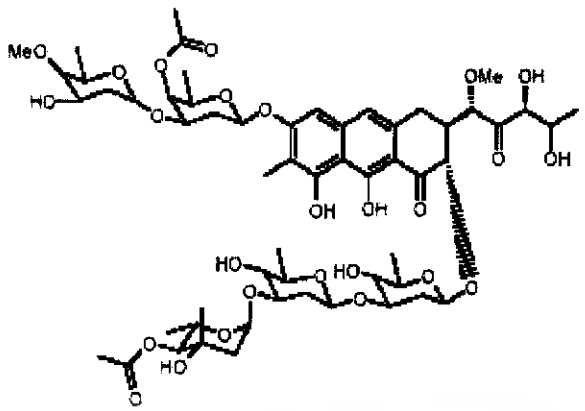
2.5.1 Acidic aniline blue (AAB)

นิวเคลียสของ immature sperm จะย้อมติดสี acidic aniline blue เนื่องจากมี lysine-rich histones การที่มี lysine-rich histones อาจทำให้มีความผิดปกติของ chromatin condensation เพิ่มขึ้น พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างอสุจิที่ติดสี acidic aniline blue กับอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ อย่างไรก็ตามอสุจิที่มีรูปร่างปกติก็ยังคงพบว่าติดสี acidic aniline blue ที่ส่วนหัวของอสุจิ นอกจากนั้นพบว่าอสุจิที่เคลื่อนไหวได้ไม่ดีจะพบว่ามีอสุจิที่ติดสี acidic aniline blue มากขึ้น และพบว่าในรายที่มีอัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกายต่ำจะมีอสุจิที่ติดสี acidic aniline blue มากกว่าในรายที่มีอัตราการปฏิสนธิสูง ในรายที่รักษาภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุจากฝ่ายชายด้วย วิธีการฉีดอสุจิเข้าโพรงมดลูกหรือการปฏิสนธิภายนอกร่างกายไม่ประสบความสำเร็จ พบว่าอสุจิที่มีรูปร่างปกติจะมีประมาณ23 ถึง 7 เปอร์เซ็นต์ มี immature nucleus จากการย้อมด้วย acidic aniline blue

2.5.2 Chromomycin A3 (CMA3)

Fluorochromes เช่น CMA3 (แสดงดังรูปที่ 10) มีประโยชน์ในการตรวจหาทั้งการขาด protamine และความผิดปกติของ chromatin packaging การเพิ่มขึ้นของการติดสีด้วย chromomycin A3 (CMA3) (มากกว่า40 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่ามีความผิดปกติของ chromatin packaging

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของ Chromomycin A3

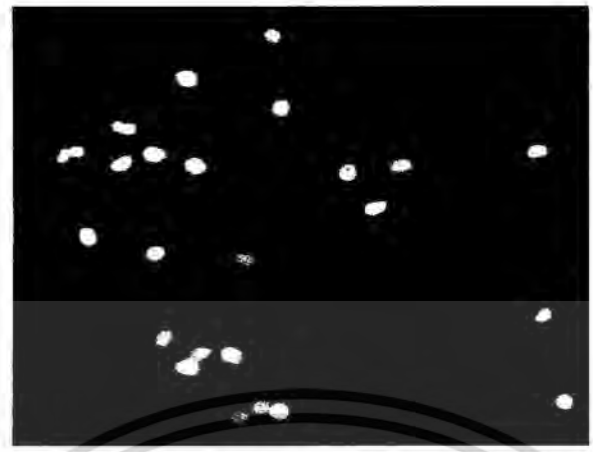
ที่มา : www.fermentek.co.il/ struct/Chromomycin_A3.png

2.5.3 Sperm chromatin structure assay (SCSA) : acridine orange (AO)

วิธี sperm chromatin structure assay (SCSA) เริ่มทำตั้งแต่ปี ค.ศ 1980.ทั้งในสัตว์และในมนุษย์ การตรวจ SCSA ใช้คุณสมบัติ metachromatic ของ acridine orange (AO) (แสดงดังรูปที่ 11) ที่จะมีความแตกต่างกันระหว่างในภาวะกรดหรือเมื่อได้รับความร้อน โดยจะเห็นเรืองแสงสีแดงเมื่อเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเรืองแสงสีเขียวเมื่อเป็นดีเอ็นเอสายคู่ พบว่า sperm nuclear ดีเอ็นเอของผู้ชายที่มีบุตรตามปกติจะทนได้ดีกว่าผู้ชายที่มีบุตรยาก จากการศึกษาในวัวและในหมู พบว่าลักษณะโครมาตินปกติของอสุจิมีความสัมพันธ์กับผลของการตั้งครรภ์ มีการดัดแปลงการตรวจ SCSA โดยการย้อมอสุจิบนสไลด์โดยให้มีสภาพเป็นกรดและย้อมด้วย acridine orange จากนั้นจึงตรวจดูด้วย fluorescent microscope จะพบนิวเคลียสของอสุจิเรืองแสงสีเขียว แดง และเหลือง (อยู่ระหว่างสีเขียวและแดง((แสดงดังรูปที่ 12) วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย แสดงสถานะภาพโดยทั่วไปของการยอมรับต่อการเกิด sperm DNA denaturation แต่การแปลผลทำได้ลำบากเนื่องจาก ผู้ประเมินสามารถแยกการเรืองแสงได้เพียง 3 สี ต่างจากการใช้ flow cytometry ซึ่งสามารถแยกได้หลายระดับ นอกจากนั้นการย้อมด้วย acridine orange จะต้องมีสภาพแวดล้อมที่แน่นอน การย้อมสีบนสไลด์จะทำให้สภาพแวดล้อมแตกต่างกันออกไปได้ นอกจากนั้นระยะเวลาตั้งแต่การย้อมสีจนถึงการตรวจก็มีความสำคัญเนื่องจากอาจมีผลทำให้การเรืองแสงของสีจางลงได้

67296

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 แสดงการตรวจสอบอสุจิด้วย acridine orange โดยหัวอสุจิที่ติดสีเขียวเป็นอสุจิที่มีดีเอ็นเอปกติ ในขณะที่หัวอสุจิที่ติดสีแดงและเหลืองเป็นอสุจิที่เกิดความผิดปกติของดีเอ็นเอ

ที่มา : www.med.utah.edu/.../ images/thumbnail/TUNEL3.jpg

อย่างไรก็ตามพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่เรืองแสงสีเขียวกับภาวะเจริญพันธุ์ โดยพบว่าผู้ชายที่ปกติจะมีร้อยละของอสุจิที่เรืองแสงสีเขียวมากกว่าผู้ชายที่มีบุตรยากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการย้อมด้วย acridine orange ยังสามารถแยกผู้ป่วยที่มีการแท้งเป็นอาจิณ ผู้ป่วยที่มีบุตรยากซึ่งไม่สามารถหาสาเหตุและผู้ชายที่ปกติได้ดีกว่าการตรวจด้วย zona-free hamster egg penetration test

พบว่าการตรวจ SCSA ได้ผลดงที่กว่าการตรวจน้ำอสุจิด้วยวิธีมาตรฐาน สัมประสิทธิ์ความแปรผันของ SCSA ในผู้ชายคนเดียวกันน้อยกว่าการตรวจน้ำอสุจิด้วยวิธีมาตรฐานมาก จากการศึกษาทางพิษวิทยาในสัตว์ทดลองพบว่าการตรวจ SCSA ซ้ำจะได้ผลคงเดิม ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาตรวจทางพิษวิทยาเพื่อการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่เกิดขึ้นจากขนาดของสารพิษที่ต่างกัน การศึกษาทั้งหมดในมนุษย์พบว่า SCSA ไม่ค่อยมีความสัมพันธ์กับการตรวจด้วยน้ำอสุจิด้วยวิธีมาตรฐาน ดังนั้นข้อมูลของ SCSA จึงเป็นวิธีมาตรฐาน และสามารถนำมาใช้เป็นการตรวจประกอบกับการตรวจน้ำอสุจิด้วยวิธีมาตรฐาน พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างผลการตรวจย้อมอสุจิด้วย acridine orange, acidic aniline blue และอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ และผลการตรวจย้อมอสุจิด้วย acridine orangr สามารถใช้ทำนายภาวะเจริญพันธุ์ของฝ่ายชายได้ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับผลการตรวจ sperm penetration assay การศึกษาต่อมาพบว่าการเตรียมอสุจิด้วยวิธี swim-up และ Percoll gradient centrifugation ทำให้ได้อสุจิที่มี nuclear chromatin ปกติและสมบูรณ์เพิ่มมากขึ้น จากการตรวจด้วยการย้อม acidic aniline blue และ acridine orange

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจ SCSA ทำได้ง่ายและรวดเร็วสามารถใช้ในการวินิจฉัยและบอกการพยากรณ์โรคได้ดีในสัตว์ทดลอง การนำผลการตรวจ acridine orange มาใช้ในการทำนายผลการปฏิสนธิภายนอกร่างกายมนุษย์พบว่ายังขัดแย้งกันอยู่ หลายการศึกษาพบว่าการตรวจด้วย acridine orange สามารถใช้ทำนายผลการปฏิสนธิภายนอกร่างกายหรือการตั้งครรภ์ได้ดี

อย่างไรก็ตาม การตรวจดูรูปร่างของอสุจิมีประสิทธิภาพในการทำนายผลอัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกายได้ดีกว่าการตรวจ acridine orange จากการตรวจ acridine orange ถ้าพบว่าอสุจิมีการเรืองแสงสีเขียวมากกว่า50 เปอร์เซ็นต์ มักจะมีความสำเร็จจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ส่วนรายที่อสุจิมีการเรืองแสงสีเขียวน้อยกว่า50 เปอร์เซ็นต์ จะมีเพียง39 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการปฏิสนธิภายนอกร่างกายแต่ไม่มีการตั้งครรภ์เลย เมื่อรักษาด้วยวิธีการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่พบอัตราการปฏิสนธิ64 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการตั้งครรภ์23 เปอร์เซ็นต์ จึงพอสรุปได้ว่า การตรวจด้วย acridine orange จะช่วยในการคัดเลือกผู้ป่วยในการรักษาด้วยวิธีการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่ (ICSI) ส่วนการย้อม aniline blue เพื่อตรวจ chromatin condensation ในผู้ป่วยที่รักษาด้วยวิธี ICSI ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างอัตรา การปฏิสนธิ อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน และอัตราการตั้งครรภ์ จึงสรุปได้ว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง immature (hypocondensed) sperm กับผลการปฏิสนธิภายนอกร่างกายตามปกติ และ ICSI พบว่าจำนวนอสุจิที่เรืองแสงสีเขียวในผู้ป่วยที่มีบุตรยากจะมีน้อยกว่าผู้ชายที่มีน้ำเชื้อปกติ แต่บางรายงานพบว่าการตรวจด้วย acridine orange ไม่มีประโยชน์ทางคลินิกในการนำมาใช้ตรวจประเมินภาวการณ์มีบุตรยาก สรุปว่าอสุจิที่มีรูปร่างปกติจะมีการเจริญเต็มที่ และพบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของอสุจิที่มีรูปร่างปกติกับการตรวจด้วย acridine orange อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วย acridine orange ไม่สามารถทำนายความสำเร็จของการปฏิสนธิภายนอกร่างกายได้

2.5.4 การตรวจ DNA fragmentation

Sperm DNA integrity มีความจำเป็นต่อการสืบทอดพันธุกรรมไปยังลูกหลาน การแตกหักของดีเอ็นเอ เป็นลักษณะแรกเริ่มของ apoptosis (programmed cell death) การรักษาภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุมาจากฝ่ายชายมีการพัฒนาไปอย่างมากตั้งแต่เริ่มมีการฉีดอสุจิเข้าในไข่ (intracytoplasmic sperm injection : ICSI) ทำให้สามารถรักษาภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุจากฝ่ายชายซึ่งไม่สามารถรักษาหายได้ในอดีตสามารถมีบุตรได้ อย่างไรก็ตามการฉีดอสุจิเข้าในไข่โดยตรงทำให้อสุจิไม่ได้ผ่านการคัดเลือกตามธรรมชาติ ซึ่งตามปกติจะคัดอสุจิที่ผิดปกติไม่ให้เข้าปฏิสนธิกับไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นอสุจิที่นำมาใช้ในการทำ ICSI ควรมีดีเอ็นเอตามปกติ อสุจิที่มีดีเอ็นเอตามปกติจะทำให้ลูกหลานปกติ อสุจิที่มีดีเอ็นเอผิดปกติอาจมีการปฏิสนธิกับไข่ได้ภายหลังการทำ ICSI การแตกหักของดีเอ็นเอเป็นลักษณะของ apoptosis ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามปกติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงที่ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ commitment phase และ execution phase ซึ่งประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงหลายอย่าง เช่น เซลล์เหี่ยวลง ,มีการแตกออกของเยื่อหุ้มเซลล์ ,phosphatidylserine ออกมาภายนอกเซลล์ และมีการแตกเป็นส่วนๆ ของโครมาตินและการจับเป็นก้อน ลักษณะของขั้นตอนดังกล่าวจะมีการกระตุ้น endogenous endonuclease ซึ่งทำให้มีการแตกของดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง apoptosis เป็นการตายของเซลล์ที่แตกต่างจาก necrosis เนื่อง apoptosis มีการกระตุ้นให้มีการทำลายเซลล์ตัวเอง โดยมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในหลายประการและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี รวมทั้งมีการเหนี่ยวนำของโมเลกุลและทางพันธุกรรม เนื่องจากอสุจิจะไม่มีกระบวนการ transcription และ translation ดังนั้นเชื่อว่าการแตกหักของดีเอ็นเอ อีกทฤษฎีหนึ่งเชื่อว่า apoptosis ของอสุจิถูกกระตุ้นผ่านทางโปรตีนบนผิวของเซลล์ ที่เรียกว่า Fas กระบวนการสำคัญของ apoptosis เกิดขึ้นที่ mitochondria จะหุ้มส่วน midpiece ของอสุจิ และให้ adenosine triphosphate (ATP) แก่ axenome ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนไหวของส่วนหางของอสุจิ mitochondria ของอสุจิมีความจำเป็นต่อ metabolism และการให้พลังงานต่างๆของอสุจิซึ่งจะบ่งถึงการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์

การมีส่วนร่วมของ mitrochondria ต่อกระบวนการ apoptosis มีหลายกลไก ได้แก่ การกระตุ้นสารในตระกูลcysteine proteasesหรือที่รู้จักกันว่าcaspases ได้แก่ cytochrome C ทำให้เกิดปัญหาต่อกระบวนการส่งต่ออิเลคตรอน และ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ oxidative phosphorylation และการสังเคราะห์ ATP กลไกอื่นได้แก่ การสูญเสียการทำงานของ mitochondrial membrane, มีการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา reduction-oxidation ของเซลล์ และเกี่ยวข้องกับ pro-apoptotic proteins และ anti-apoptotic proteins เช่น Bcl-2 ถึงแม้ว่ากระบวนการ apoptosis จะไม่ขึ้นกับ oxidative phosphorylation หรือ mitochondrial แต่พบว่า mitochondria มีส่วนสัมพันธ์กับกระบวนการ apoptosis ในเซลล์หลายชนิด สามารถพบ apoptosis ได้ในเซลล์ร่างกายทั่วไป โดยการทำ electrophoresis ของดีเอ็นเอ fragments มีลักษณะเป็นขั้นบันได (ladder pattern) เนื่องจาก endonuclease cuts ตัดตัวเชื่อมต่อในสายดีเอ็นเอ แต่การตรวจดังกล่าวทำไม่ได้ในอสุจิ เนื่องจากนิวเคลียสของอสุจิมี protamines เทคนิคอื่นที่สามารถนำมาใช้ได้ เช่น in-situ end labeling โดยการให้ biotinylated nucleotides เข้าไปจับและตรวจหาปลาย 3'-OH ของสายดีเอ็นเอมีวิธีการทางวิทยาศาสตร์หลายวิธีในการตรวจหาการแตกของสายดีเอ็นเอในเซลล์ คือ terminal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), in-situ nick translation และ single cell gel electrophoresis (COMET) assay (นเรศร สุขเจริญ,2543)

2.5.4.1 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)

TUNEL และ in-situ nick translation ทำได้โดยการใส่ biotinyl-16-dUTP โดยใช้ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) หรือ DNA polymerase ตามลำดับ TdT เติม base ไปยังปลาย 3`-OH ของดีเอ็นเอที่มีลำดับไม่เฉพาะเจาะจงและปริมาณที่แตกต่างกัน ในทางกลับกันดีเอ็นเอ polymerase เติม base เข้าใน nicks ในแนว 5`-3` โดยใช้ antisense strand เป็น template

การใช้ TUNEL และ in-situ nick translation assays กับอสุจิต้องใช้ fluorescent probes เช่น sterptavidin-conjugated fluorescein isothiocyanate เพื่อตรวจ biotin ที่เข้าไปในอสุจิบนสไลด์ หรือการใช้ streptavidinconjugated Texas Red fluorescence ในการตรวจด้วย (แสดงดังรูปที่ 13)

รูปที่ 12 การตรวจหาการแตกหักของดีเอ็นเอ ในอสุจิโดยวิธี TUNEL ซึ่งย้อมสี DAPI อสุจิที่ติดสีฟ้าแสดงถึงอสุจิตัวนั้นมีดีเอ็นเอที่ปกติ ในขณะที่สีเขียวแสดงถึงการที่อสุจิตัวนั้นถูกทำลายดีเอ็นเอ

ที่มา : www.med.utah.edu/.../ images/thumbnail/TUNEL5.jpg

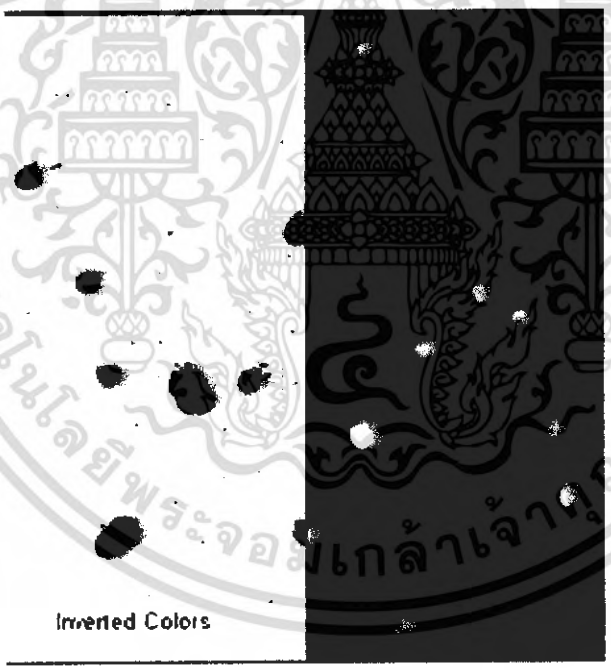
2.5.4.2 Single cell gel electrophoresis (COMET) assay

สถานภาพของดีเอ็นเอของอสุจิอาจตรวจได้โดยใช้ modified alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay โดยที่ดีเอ็นเอที่แตกออกจะเคลื่อนที่โดย electrophoresis ทำให้มีลักษณะคล้ายส่วนหางของดาวหาง ส่วนหัวของดาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หางเป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นปกติ (แสดงดังรูปที่ 14) และสามารถตรวจวัดในเชิงปริมาณ โดยใช้ epifluorescence microscopy และ image analysis

คุณภาพของดีเอ็นเอของอสุจิมีความสัมพันธ์ต่อการสืบพันธุ์ เนื่องจากเป็นตัวนำรหัสทางพันธุกรรมไปสู่ลูกหลาน อสุจิที่มีดีเอ็นเอคุณภาพต่ำอาจเป็นสาเหตุของภาวการณ์มีบุตรยากที่มีสาเหตุจากฝ่ายชายได้ น้ำอสุจิของผู้ชายที่มีบุตรยากพบว่ามีร้อยละของอสุจิที่มีการแตกหักของดีเอ็นเอสูงกว่าอสุจิของผู้ชายที่ปกติ เชื่อว่า การที่อสุจิมีการแตกออกของสายดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอมีความไวสูงขึ้นต่อการทำถูกทำลายอาจมีสาเหตุจาก spermatogenic cells เกิดกระบวนการคล้ายคลึงกับ apoptosis ในระหว่างกระบวนการสร้างอสุจิ พบว่าอสุจิของผู้ชายที่มีบุตรยากมีการแตกของสายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นบ่งว่าเกิดกระบวนการ apoptosis นอกจากนั้นยังพบว่าร้อยละของอสุจิที่มีการแตกหักของดีเอ็นเอ จะมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับอัตราการปฏิสนธิองการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และ ICSI ร้อยละของอสุจิที่มี endogenous DNA nicks จะมีความสัมพันธ์กับการลดลงของภาวะเจริญพันธุ์



รูปที่ 13 ดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย (การแตกหักของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและสายคู่) ในการตรวจโดยวิธี COMET

ที่มา : www.alphascientists.com/ images/embryology/52.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4.3 FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาช่วงลำดับเบสที่สนใจหรือยีนบนแท่งโครโมโซม (gene mapping) เป็นงานที่ใช้เทคนิคของ in situ hybridization แต่เปลี่ยนจากตัวติดตามที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี มาเป็นตัวติดตามชนิดที่ปลอดรังสี (nonradioactive probe) (แสดงดังรูปที่ 15) เทคนิค FISH เป็นงานอิมมูโนวิทยาร่วมกับด้าน in situ hybridization และตรวจหาสัญญาณตำแหน่งของยีนโดยใช้สารสีเรืองแสง (fluorocein หรือ fluorophore) จึงเรียกเทคนิคชื่อเต็มว่า Fluorescence In Situ Hybridization (อมรา, 2546)

รูปที่ 14 แสดงไดอะแกรมการเกิดการจับกันของเบสคู่สม (hybridization) เริ่มจากการเกิด denature ของดีเอ็นเอเป้าหมาย การเข้าจับของตัวติดตามที่ติดฉลากไว้จนได้ hybrid เกิดขึ้น

ที่มา : httpwww.hybridmedicalanimation.com/mediajj_/hybridization.jpg)

หลักการ

ส่วนของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกติดฉลาก (labeled probe) มีการเรียงตัวของ
นิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย (DNA or RNA target) สามารถจับ (hybridization) กับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายนั้นเกิดเป็น hybrid ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

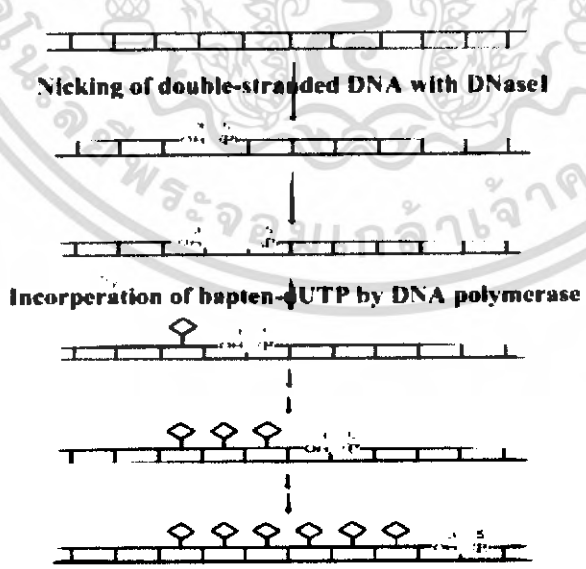
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวติดตาม

ลำดับเบส (sequence) บนดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอของยีน (gene) หรือจีโนม) genome (ที่นำไปใช้ศึกษาโดยการทำ hybridization กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ส่วนใหญ่จะเป็น recombinant DNA บางครั้งอาจใช้ดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction: PCR) หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่ถูกสร้างโดยวิธีทางชีวเคมี ดีเอ็นเอโพรบมักจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงหรือน้ำยาเคมีอื่นๆ เพื่อทดสอบว่ามี hybridization กับสายดีเอ็นเอต้นแบบหรือไม่ ในการตรวจการเกิด hybridization (อภิวัฒน์, 2541)

ชนิดของ FISH

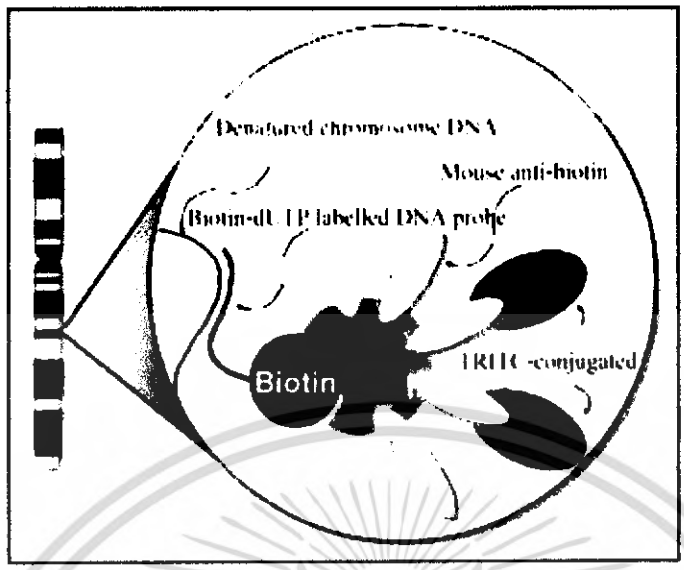
แบ่งตามวิธีการตรวจหาสัญญาณจากการติดสัญญาณสี ด้วยสารเรืองแสงฟลูออโรโครม (fluorochrome) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรายงาน (reporter) หรือตัวจับสัญญาณ (detector) ได้เป็น 2 ชนิด คือ direct method (แสดงดังรูปที่ 16) และ indirect method (แสดงดังรูปที่ 17) ซึ่งวิธี direct method นั้นสารเรืองแสงจะจับติดอยู่กับตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีโดยตรง ทำให้ตรวจหาสัญญาณได้ทันทีหลังจากเกิด hybridization ส่วนวิธี indirect method นั้นตัวติดตามจะติดฉลากด้วยสาร hapten เช่น biotin (แสดงดังรูปที่ 18), photodigoxigenin (แสดงดังรูปที่ 19), photobiotin, bromodeoxy-uridine, acetylaminofluorence เป็นต้น แล้วจึงตรวจหาสัญญาณหรือฉลากด้วยสารเรืองแสงอีกขั้นหนึ่ง โดยการติดสารเรืองแสงไว้กับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ hapten นั้น หรือสารที่มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น strepavidin เป็นต้น



รูปที่ 15 แสดงการติดฉลากตัวติดตามด้วยวิธี direct method

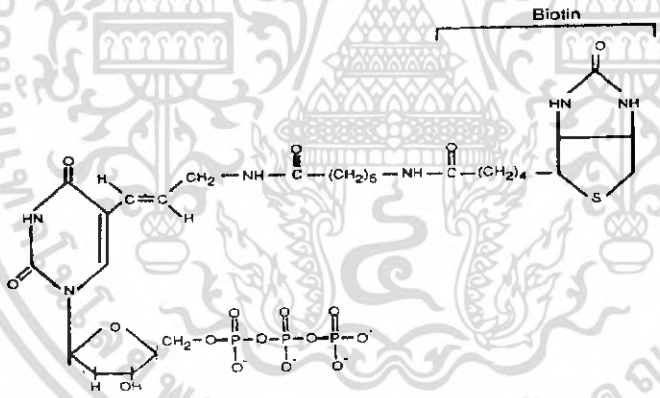
ที่มา : http//www.roche-applied-science.com/dUTP/images/label02.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



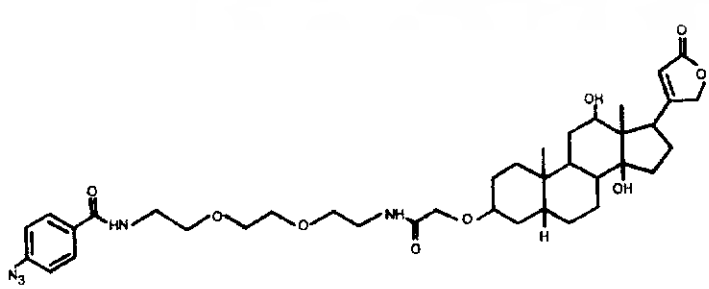
รูปที่ 16 แสดงการติดฉลากตัวติดตามด้วยวิธี indirect method

ที่มา : http//www.jp.amershambiosciences.com/products/kouryaku_/electrochap_/6162imgtec1.gif



รูปที่ 17 แสดงโครงสร้างของ biotin 11 – dUTP

ที่มา : omlc.ogi.edu/.../ str_gif/Biotin



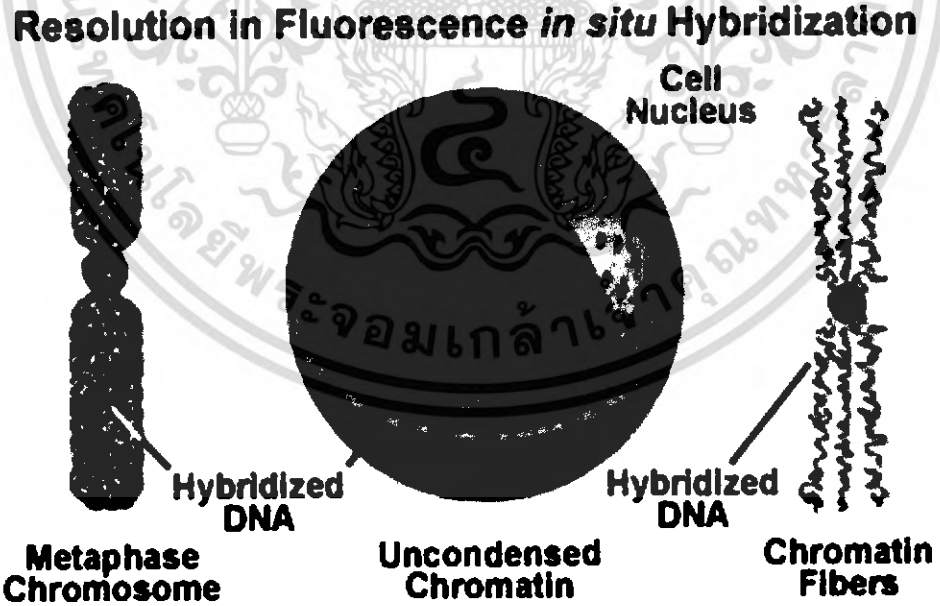
รูปที่ 18 แสดงโครงสร้างของ photodigoxigen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : omlc.ogi.edu/.../ str_gif/photodigoxigen

การเข้าจับของตัวติดตาม

การเข้าจับของตัวติดตามสามารถทำได้ 2 ระยะของเซลล์ คือ ระยะ metaphase และ interphase (แสดงดังรูปที่ 20) ตามความเหมาะสมของงานที่ต้องการศึกษา โดยสำหรับการศึกษาเซลล์ระยะ metaphase จะมีจุดประสงค์ คือ ต้องการศึกษาบนโครโมโซมแต่ละแท่ง ซึ่งเซลล์ระยะ metaphase จะเป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดเพราะโครโมโซมจะอยู่บริเวณกลางเซลล์ทำให้สามารถมองเห็นรูปร่างโครโมโซมได้ชัดเจนที่สุด โดยตัวติดตามที่ใช้จะเป็นตัวติดตามที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับโครโม โซมแท่งที่ต้องการศึกษาสามารถนำมาศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมแต่ละแท่งได้ เช่น การ ศึกษาการแตกหักของโครโมโซม การขาดหายไปของโครโมโซม เป็นต้น เรียกการทำเทคนิค FISH ในเซลล์ระยะนี้ว่า metaphase FISH ส่วนการศึกษาในเซลล์ระยะ interphase นั้นเพื่อศึกษาดูลำดับนิวคลีโอไทด์ของเซลล์ โดยถ้าตัวติดตามที่ใช้มีลำดับเบสที่เป็นคู่สม (complementary) กับลำดับนิว คลีโอไทด์ของเซลล์ที่ต้องการศึกษา จะสามารถเกิดการ hybridization กันทำให้สามารถมองเห็นเป็นจุดสีอยู่ในเซลล์ สามารถนำมาศึกษาความผิดปกติ เช่น การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมเพศในเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย เป็นต้น เรียกการทำเทคนิค FISH ในเซลล์ระยะนี้ว่า interphase FISH



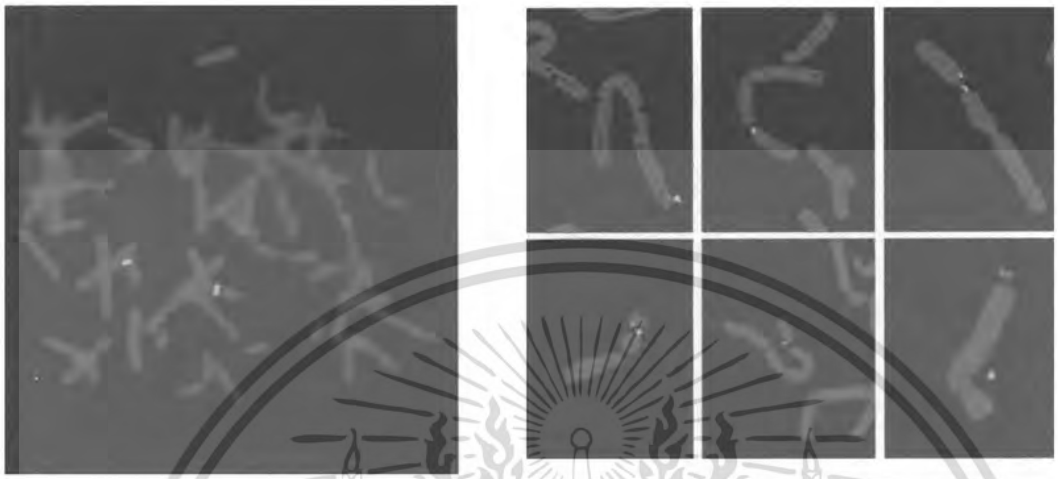
รูปที่ 19 แสดงการเข้าจับของตัวติดตามในเซลล์ระยะ metaphase และ interphase

ที่มา : http//www.hybridmedicalanimation.com/mediajj_/figure1.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Metaphase FISH

เป็นการเข้าจับของตัวติดตามกับโครโมโซมในระยะ metaphase (แสดงดังรูปที่ 21)



รูปที่ 20 แสดงการเข้าจับของตัวติดตามกับโครโมโซมในระยะ metaphase

ที่มา : http://www.dynagene.com/images/digeorgesml.jpg

http://www.gen.cam.ac.uk/newdept/images/farr/FRACyto.jpg

Interphase FISH

เป็นการเข้าจับของตัวติดตามกับโครมาทินในเซลล์ในระยะ interphase (แสดงดังรูปที่ 22)

รูปที่ 21 แสดงการเข้าจับของตัวติดตามกับโครมาทินในเซลล์ในระยะ interphase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : http://www3.mdanderson.org/depts/pathology/fish/images/MCLNEG.JPG

วิธีการ FISH

ขั้นตอนและวิธีการในการทำเทคนิค FISH แบ่งเป็นหลายขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. Slide preparation สำหรับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเซลล์ เช่น เซลล์เลือดและเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะทำการเตรียมสไลด์โดยการทำความสะอาดสไลด์ด้วยแอลกอฮอล์/อีเทอร์ ในอัตราส่วน 1:1 ส่วนสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อ (tissue section) ต้องใช้สไลด์ที่เตรียมขึ้นเป็นพิเศษเพื่อป้องกันการหลุดหายของชิ้นเนื้อในระหว่างขั้นตอนการทำโดยนิยมเคลือบสไลด์ด้วย gelatinchromic alum, poly-L-lysine หรือ amino-alkysilane เป็นต้น

2. Fixation เพื่อรักษารูปร่างโครงสร้างของเซลล์หรือชิ้นเนื้อที่ตรวจ สำหรับเซลล์นิยมตรึงด้วยสารละลายที่ใช้ตรึงสไลด์ ที่มีส่วนผสมของเมทานอล : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 3 : 1 ส่วนชิ้นเนื้อถ้าเป็นชิ้นเนื้อแช่แข็ง นิยมตรึงนาน 30 นาที ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือ Bovin's fixative หรือ paraformaldehyde vapor ส่วนชิ้นเนื้อที่แช่ paraffin-embed นิยมตรึง ด้วยฟอร์มาลีน ข้อควรระวัง สาร fixative สามารถทำปฏิกิริยา cross-linking กับโปรตีนที่อยู่รอบดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะตรวจ ฉะนั้นจึงต้องมีขั้นตอน permeabilization เพื่อขจัดปัญหานี้ โดยเป็นส่วนหนึ่งของขั้นตอน pretreatments ซึ่งกำลังจะกล่าวต่อไป

3. Pretreatment เป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับเตรียมเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้มีความเหมาะสมต่อการเกิด hybridization ต่อไป รวมทั้งลดหรือขจัดสิ่งรบกวนต่อการเกิด hybridization แบ่งเป็นขั้นตอนย่อยๆดังนี้

3.1 Background staining prevention เพื่อกำจัดและลดสิ่งรบกวนต่อสัญญาณ

3.1.1 Endogenous enzyme inactivation ในกรณีที่ hapten ที่ใช้เป็นเอนไซม์จำเป็นต้องหยุดการทำงานของสารจำพวกเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตรวจนั้น (endogenous enzyme) เช่น ถ้าใช้เปอร์ออกซิเดสเป็น hapten นิยมหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตรวจนั้นด้วย1 เปอร์เซนต์ H_2O_2 ในเมทานอล นาน 30 นาที ถ้าใช้อัลคาไลด์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) เป็นแฮปเทนนิยมใช้ levamisole เป็นต้น

3.1.2 RNase treatment ทำในกรณีของ DNA-DNA hybridization เพื่อลดการรบกวนสัญญาณ (signal-to-noise ratio) จากอาร์เอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (endogenous RNA) ด้วย RNase โดยนิยมบ่มเซลล์หรือชิ้นเนื้อด้วย RNase-free RNase (100µg./ml.) in 2x SSC ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที (SSC = โซเดียมคลอไรด์ 150 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรท 15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4)

3.2 Permeabilization เพื่อให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีความเหมาะสมต่อการเกิด hybridization

3.2.1 HCl treatment เพื่อขจัดโปรตีนส่วนเกินและทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสบางส่วนกับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย นิยมใช้กรดไฮโดรคลอริก 200 มิลลิโมลาร์ นาน 30-20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2Detergent treatment เพื่อขจัดไขมันที่ผิวเซลล์ สารที่นิยมเช่น Triton®X-100, โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate)เป็นต้น

3.2.3Protease treatment เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่อยู่รอบๆดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมาย สารที่นิยม เช่น โปรดิเนส เค (protinase K) โปรเนส (pronase) เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) เป็นต้น ความเข้มข้นและเวลาที่ใช้แปรตามความเหมาะสมเป็นกรณีๆไป

4. Prehybridization นิยมบ่มเซลล์หรือชิ้นเนื้อด้วย hybridization mixture (ภาคผนวกที่ 1) ซึ่งยังไม่ได้เติมตัวติดตามและเด็กซ์แทรนซัลเฟต (dextran sulfate) เรียกว่า prehybridization mixture เชื่อว่าช่วยลดและป้องกันการเกิด background staining

5. Denaturation of probe and target ในกรณีตัวติดตามที่ใช้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ หรือนิวคลีโอไทด์เป้าหมายเป็น chromosomal DNA จะต้องแยกให้เป็นสายเดี่ยวโดยวิธีการ denaturation ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น ใช้กรด ด่าง ความร้อน เป็นต้น

6. Hybridization เป็นขั้นตอนที่ตัวติดตามที่ถูกติดสัญญาณสี (labeled probe) จะเข้าจับกับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายภายใต้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งแตกต่างกันเป็นกรณีๆไป stringency คือ ภาวะที่ลดหรือส่งเสริมการจับกันของตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีกับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย การที่ตัวติดตามที่ถูกติดสัญญาณสีจับกับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายได้นั้น แสดงว่ามีการเรียงตัวเป็นคู่สมกันคือมีความจำเพาะต่อกัน การจับกันนี้สามารถลดหรือส่งเสริมได้โดยการปรับอุณหภูมิในขณะเกิด hybridization ปรับความเข้มข้นของสารละลายเกลือ ปรับความเข้มข้นของฟอร์มาไมด์ที่ใช้ในขณะเกิด hybridization หรือในขณะล้าง (posthybridization washing) high stringency คือ ภาวะที่ยอมให้เฉพาะตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีที่มีความจำเพาะสูง เช่น 100 เปอร์เซ็นต์ หรือ ใกล้เคียง 100 เปอร์เซ็นต์จับกับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายเกิดเป็น hybrid ที่มีเสถียรภาพสูง (high stability) low stringency คือ ภาวะที่ส่งเสริมให้เกิดการจับกันทั้งที่ตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีมีความจำเพาะต่ำ เช่น 70 เปอร์เซ็นต์ จับกับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายเกิดเป็น hybrid ที่มีเสถียรภาพต่ำ (low stability หรือ unstability)

7. Posthybridization washing เป็นขั้นตอนเพื่อล้างหรือกำจัดสารส่วนเกินต่างๆออกไปเพื่อลดการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (nonspecific reaction)

8. Detection of signal ในกรณีของ direct method สามารถตรวจหาสัญญาณได้หลังเกิด hybridization เรียบร้อยแล้ว โดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ ส่วนในกรณีของ indirect method นั้นจะต้องใช้แอนติบอดีหรือสารที่มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น avidin ติดด้วยสารเรืองแสงฟลูออโรโครม มาจับกับตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีก่อน ตัวติดตามที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงสีเดียวเรียกว่า singlecolor-labeled probe หรือเรียกว่าเทคนิค singlecolor FISH นอกจากนี้ยังมี multicolor FISH ซึ่งเกิดจากการใช้ combinatorial labeling หรือ ratio-labeled probes combinatorial labeling เป็นการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง หรือแฮปเทนมากกว่าหนึ่งสีที่ตัวติดตามตัวเดียวกันในอัตราส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือปริมาณที่เท่ากัน ส่วน ratio labeling เป็นการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงหรือแฮปเทนมากกว่าหนึ่งสีที่ตัวติดตามตัวเดียวกันในอัตราส่วนที่ไม่เท่ากัน วิธีการทั้ง combinatorial labeling และ ratio labeling นี้ ทำให้เกิดสีเพิ่มขึ้นหลายสีจากจำนวนสารเรืองแสงสีต่างๆ ที่นำมาใช้ ซึ่งทำให้สามารถตรวจความผิดปกติได้มากกว่าหนึ่งอย่างในการตรวจวิเคราะห์คราวเดียวกัน ในปัจจุบันมีรายงานว่าสามารถทำให้เกิดสีแตกต่างกันได้ถึง12 สี (นวพรรณ, 2541)

วิธีการตรวจสัญญาณสี (signal)

การตรวจสัญญาณสีโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ จะสามารถตรวจสอบสัญญาณสีได้โดยจะเห็นเป็นลักษณะของสีเรืองแสงซึ่งเกิดจากการ hybridization ของตัวติดตามและส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกัน (แสดงดังรูปที่ 23)

รูปที่ 22 แสดงการอ่านค่าจากสัญญาณสี XY ผิดปกติ, X ปกติ และ Y ปกติ ตามลำดับ
ที่มา : www.unav.es/ genetica/new/fish.jpg

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Robbins และคณะ (1997) ทำการตรวจอสุจิในผู้ชายที่เป็นอาสาสมัคร 45 คน มีอายุระหว่าง 19-35 ปี เพื่อศึกษาการเกิด aneuploidy และ diploid ของโครโมโซม X, Y และ แท่งที่ 18 โดยทำการแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนที่สูบบุหรี่ กลุ่มคนกินคาเฟอีน และกลุ่มคนที่ดื่มแอลกอฮอล์ ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ในการตรวจสอบ จากผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มคนที่กินคาเฟอีนจะทำให้เกิด aneuploidy แบบ 18,XX 18,XY เกิด diploid แบบ 18-18,XY และเกิดการ duplicate ของโครโมโซมแบบ 18-18,YY ในกลุ่มคนที่ดื่มแอลกอฮอล์จะทำให้เกิด aneuploidy แบบ 18,XX เกิด diploid แบบ 18-18,XY และเกิดการ duplicate ของโครโมโซมแบบ 18-18,XX สำหรับในผู้ที่สูบบุหรี่พบว่าอัตราการเกิดความผิดปกติยังไม่แน่นอนแต่ความผิดปกติที่เกิดมักจะเป็นแบบ 18,XX และพบว่าอัตราความผิดปกติจะเพิ่มขึ้นในผู้ที่มีอายุมากขึ้น โดยสรุปได้ว่าอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมในอสุจิระหว่างคนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูบบุหรี่ กินคาเฟอีน และดื่มแอลกอฮอล์จะมีรูปแบบการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมที่แตกต่างกัน

Shi และคณะ (2001) ทำการตรวจอสุจิในกลุ่มผู้ชายที่สูบบุหรี่และมีอสุจิที่เป็น aneuploidy โดยทำการศึกษาในผู้ชายจีน 31 คน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ผู้ชายที่ไม่สูบบุหรี่ 10 คน กลุ่มที่ 2 ผู้ชายที่สูบบุหรี่น้อยกว่า 20 มวนต่อวัน 11 คน และกลุ่มที่ 3 ผู้ชายที่สูบบุหรี่มากกว่า 20 มวนต่อวัน 10 คน ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Two multi-color fluorescence in situ hybridization (FISH) ตรวจสอบโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 21 และใช้เทคนิค Three multi-color FISH ตรวจสอบโครโมโซมเพศ ประสิทธิภาพในการ hybridize มี 99.78 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาพบว่าโครโมโซมแท่งที่ 13 มีอัตราการเกิด disomy มากที่สุด ทั้งในผู้ที่สูบบุหรี่มากและผู้ที่สูบบุหรี่น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ แต่ในโครโมโซมแท่งที่ 21, X และ Y พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการเกิด disomy ในผู้ชายทั้ง 3 กลุ่ม จึงสามารถสรุปได้ว่า บุหรี่อาจเพิ่มความเสี่ยงของการเกิด aneuploidy ในบางโครโมโซม

Potts และคณะ (1999) ทำการตรวจอสุจิระหว่างผู้ชายที่สูบบุหรี่ 35 คน และผู้ชายที่ไม่สูบบุหรี่ 35 คน ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Sperm chromatin structure assay (SCSA) เพื่อดูบริเวณดีเอ็นเอที่ถูกชักนำให้เกิดการ denature และใช้วิธี Terminal deoxynucleotidyl transferase assay (TdTA) เพื่อดูบริเวณดีเอ็นเอที่เกิดการแตกหัก โดยเติม biotinyllate nucleotide dUTP ซึ่งติดสารเรืองแสง fluoresciented avidin (FITC-avidin) เข้าไปที่บริเวณปลาย 3'-OH ของดีเอ็นเอ ผู้ที่สูบบุหรี่จะทำให้คุณภาพของน้ำอสุจิลดลง จำนวนอสุจิลดลง การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง และมีจำนวนอสุจิที่มีความความผิดปกติเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาได้ทำการนับอสุจิจำนวน 10,000 เซลล์ในแต่ละคน พบว่าอสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่จะถูกชักนำให้เกิดการ denature ของดีเอ็นเอมากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ($p<0.02$) และมีการแตกหักของดีเอ็นเอมากกว่าผู้ที่ไม่ได้สูบบุหรี่ ($p<0.05$) จึงสามารถสรุปได้ว่าบุหรี่อาจเป็นตัวทำลายโครงสร้างของโครมาตินและทำให้เกิดการแตกหักภายในสายดีเอ็นเอ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในอสุจิ อาจทำให้ลูกที่เกิดมามีความเสี่ยงที่จะพิการหรือมีความผิดปกติทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 การเลี้ยงเชื้อ

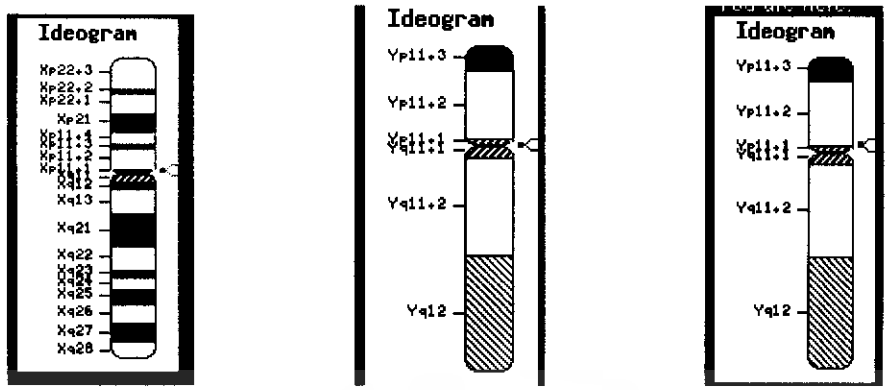
- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar
- อาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth
- ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล
- เชื้อ E.Coli

เชื้อ E.Coli ที่ใช้ในการทำโพรบได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันราชานุกูล (หน่วยพันธุศาสตร์โครโมโซม) เชื้อ E.Coli ที่ใช้มี 3 ตัว คือ (แสดงดังตารางที่ 1 และ รูปที่ 24)

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของตัวติดตาม

รหัส	ตำแหน่งบนโครโมโซม	FISH	ขนาดพลาสมิด	โคลน	Gene Bank
RP 13-971o21	Xp 11.1	Interphase FISH	58 Mb	CBAC	AL 591645.35
RP 11-75f5	Yq11.1	Interphase FISH	12 Mb	CBAC	AL011293.5
RP11-1126s10	Yp11.1	Interphase FISH	11 Mb	CBAC	AL069323.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A) (B) (C)

รูปที่ 23 Ideogram แสดงตำแหน่งการจับของตัวติดตามบนโครโมโซม รูป (A) Xp 11.1 (B) Yq11.1 และ (C) Yq11.1

3.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ (โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin)

- หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- Water bath 50 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- สารละลาย A1
- บัฟเฟอร์ A2
- สารละลาย A3
- Nucleospin plasmid column
- สารละลาย AW
- สารละลาย A4
- สารละลาย AE

3.1.3 การเตรียมสไลด์

- สไลด์
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- พาราฟิล์ม
- พาสเจอร์ปิเปต
- หลอด centrifuge ขนาด 10 มิลลิลิตร
- 0.01 M Tris-0.9% NaCl
- Fixative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 การทำ Nick Translation

ได้ทำการหาวิธีที่เหมาะสมในการในการทำตัวติดตาม โดยทำการทดลอง 2 วิธี ดังนี้

3.1.4.1 การทำ Nick translation ด้วยวิธี conventional

- หลอด eppendorf ขนาด 0.4 มิลลิลิตร
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- Water bath 70 องศาเซลเซียส
- vortex
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 10X NT buffer
- Beta-mercaptone (ß-me) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
- dNTPs ที่ประกอบด้วย dATP dCTP และ dGTP ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิโมลาร์
- dTTP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์
- Biotin-16-dUTP หรือ Digoxigenin-11-dUTP
- DNase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 1:4000
- DNA polymerase ความเข้มข้น11.8 ยูนิตต่อไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.1.4.2 การทำ Nick translation โดยใช้ชุดทำ Nick translation สำเร็จรูปของ Vysis

- หลอด eppendorf ขนาด 0.4 มิลลิลิตร
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- Water bath 70 องศาเซลเซียส
- vortex
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- Biotin-16-dUTP หรือ Digoxigenin-11-dUTP
- dTTP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์
- dNTPs
- 10X nick translation buffer
- nick translation enzyme

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.1.5 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

- เครื่องอีเลคโตร โฟรีซีส
- อะกาโรสเจล
- สารละลายทีบีอี ความเข้มข้น 1X
- สีย้อม
- เอธิเดียมโบรไมด์

3.1.6 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

ได้ทำการทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการทำ FISH เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบสัญญาณได้อย่างชัดเจน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี คือ วิธี Indirect FISH และใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปของ vysis

3.1.6.1 Pretreatment slide

ขั้นตอนในการทำ pretreatment slide ในแต่ละวิธีการทดลองจะใช้วิธีการเดียวกัน

- Water bath 37 และ 73 องศาเซลเซียส
- Glass jar 14 ใบ
- DTT ความเข้มข้น 0.1 และ 0.01 โมลาร์
- 2X SSC พีเอช 7.0
- RNase ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- Pepsin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
- 1 N HCl
- น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- PBS
- $MgCl_2$
- Formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์
- แอลกอฮอลล์ 70, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.6.2 การทำเทคนิค FISH ด้วยวิธี Indirect

3.1.6.2.1 การตกตะกอนตัวติดตาม

- หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- Water bath 75 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
- ดีเอ็นเอตัวติดตาม 300-500 นาโนกรัม
- Salmon sperm DNA
- แอลกอฮอลล์ 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- Potassium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์
- Deionize formamide
- Human Cot-1 DNA
- น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.1.6.2.2 Hybridization

- Cover slip
- Rubber glue
- ถาดสำหรับ hybridize
- Moister chamber
- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
- ตัวติดตามที่ติดสารเรืองแสง
- สไลด์ตัวอย่าง
- 70 เปอร์เซนต์ formamide/2X SSC

3.1.6.2.3 การ Post hybridize

- Water bath 45 และ 70 องศาเซลเซียส
- Glass jar 9 ใบ
- 0.4X SSC/0.3 เปอร์เซ็นต์ tween20
- 2X SSC/0.1 เปอร์เซ็นต์ tween20
- 4X SSC/0.2 เปอร์เซ็นต์ tween20
- blocking solution
- detection solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- sheep anti-DIG หรือ sheep anti-BIOTIN
- FITC หรือ TRITC
- DAPI (1mg/ml)
- PBS
- antifade

3.1.6.3 การทำเทคนิค FISH โดยใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปของ Vysis

สำหรับการใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปไม่ต้องทำการตกตะกอนตัวติดตาม สามารถนำตัวติดตามไปทำการ hybridize ได้ทันที

3.1.6.3.1 Hybridization

- Cover slip
- Rubber glue
- ถาดสำหรับ hybridize
- Moister chamber
- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
- ตัวติดตามที่ติดสารเรืองแสง

3.1.6.3.2 Post hybridize

- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- Glass jar 5 ใบ
- 0.4X SSC/0.3 เปอร์เซ็นต์ NP-40
- 2X SSC/0.1 เปอร์เซ็นต์ NP-40
- แอลกอฮอล์ 70, 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- DAPI II

3.2 ตัวอย่างอสุจิ

เก็บน้ำอสุจิจากอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 19-22 ปี ที่สูบบุหรี่ไม่น้อยกว่า 10 มวนต่อวัน และไม่เกิน 20 มวนต่อวัน มาเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 ปี (แสดงดังตารางที่ 2) ด้วยวิธี Masturbation และเก็บตัวอย่างอสุจิไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่เก็บทั้งหมด

Type number	อายุ (ปี)	จำนวนการสูบบุหรี่ (มวน/วัน)	ระยะเวลาที่สูบ (ปี)
A1	21	-	-
A2	21	-	-
A3	21	-	-
A4	22	-	-
B1	19	11	3
B2	21	10	4
B3	22	20	9
B4	21	10	4
B5	19	15	3
B6	21	20	3

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อ E.Coli ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล

เพื่อนำเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร
2. นำเชื้อ E.Coli ที่ต้องการมา Cross streak ลงบนเพลท
3. นำเพลทที่ streak เชื้อแล้วไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส 1 วัน
4. เขี่ยโคโลนีเดี่ยวจากเพลทแรกมาทำการ Cross streak ลงบนเพลทที่ 2
5. นำเพลทที่ streak เชื้อรุ่นที่ 2 ไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส 1 วัน
6. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร
7. ทำการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวรุ่นที่ 2 ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้
8. นำหลอดอาหารที่เขี่ยเชื้อแล้วไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 วัน
9. เทอาหารเหลวลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 2 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. นำหลอด eppendorf ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที
11. เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จะได้ตะกอนเซลล์อยู่ด้านล่าง

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin มีขั้นตอนดังนี้

1. แบ่งอาหารเหลวใส่หลอด eppendorf หลอดละ 1.5 ml (เชื้อหนึ่งตัวใช้ eppendorf 2 หลอด)
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ ที่ 11,000 รอบต่อนาที
3. เทส่วนใสด้านบนทิ้ง
4. เติมสารละลาย A1 250 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendrof 1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ ปิเปต
5. ดูดสารละลาย A1 ในหลอด eppendorf 1 มาใส่ในหลอด eppendorf 2 ของเชื้อตัวเดียวกัน แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต
6. เติมสารละลาย buffer A2 250 ไมโครลิตร
7. ทำการผสมให้เข้ากัน 6-8 ครั้ง ห้าม vortex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
8. เติมสารละลาย A3 300 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน 6-8 ครั้ง ห้าม vortex
9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 5-10 นาที
10. ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ ใส่ลงใน plasmid column
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
12. เทสารละลายด้านล่างใน column ทิ้ง
13. เติมสารละลาย AW ที่บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร ลงไปใน plasmid column
14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
15. เทสารละลายด้านล่างใน column ทิ้ง
16. เติมสารละลาย A4 600 ไมโครลิตร
17. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
18. เทสารละลายด้านล่างใน column ทิ้ง
19. นำ plasmid column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง
20. นำ plasmid column ไปใส่ในหลอด eppendorf ใหม่
21. เติมสารละลาย AE 50 ไมโครลิตร
22. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที
23. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ส่วนใสที่อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร คือดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.3.3 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจางและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอหาได้จากความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) = A x 50 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)x B

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง (เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.65-2.00 ถ้าค่าที่ได้มีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่าปนเปื้อน ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม หรือ อาร์เอ็นเอ แต่ถ้าค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่าปนเปื้อนโปรตีน

3.3.4 การเตรียมสไลด์

สามารถทำได้โดยนำตัวอย่างอสุจิที่ได้มาล้างเซลล์ให้สะอาดแล้วนำไปเตรียมลงบนสไลด์ มีขั้นตอนดังนี้

1. นำน้ำอสุจิตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตร ทำให้เป็นสารละลายโดยนำน้ำอสุจิ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.01 M Tris-0.9% NaCl 3.5 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างเซลล์อสุจิ
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 1,500 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง
4. ทำการล้างอสุจิด้วย 0.01 M Tris-0.9 เปอร์เซนต์ NaCl ซ้ำอีก 3 รอบ ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง เติม fixative ลงไปประมาณ 2 มิลลิลิตร นำไป vortex เพื่อให้เซลล์กระจายได้ดีไม่เกาะกันเป็นก้อน
5. นำสารละลายอสุจิที่ได้ไปหยดลงบนสไลด์ประมาณ 1-2 หยด แล้วหยด fixative ตามลงไป 1-2 หยด เพื่อให้เซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น ใช้ดินสอขีดข้างสไลด์บริเวณพื้นที่ที่หยดตัวอย่างลงไป ทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
6. นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้อง phase-contrast เพื่อดูการกระจายตัวและรูปร่างของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การทำ Nick translation

การทำ nick translation คือการนำดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราสกัดได้มาติดสารเรืองแสง แล้วตัดด้วยเอนไซม์ เพื่อให้โพรบมีขนาดชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการ hybridize ได้ทำการหาวิธีที่เหมาะสมในการทำ nick translation โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี คือ การทำ Nick translation ด้วยวิธี conventional และใช้ชุดทำ nick translation สำเร็จรูปของ vysis

3.3.5.1 การทำ Nick translation ด้วยวิธี conventional

1. ทำการผสมสารที่ใช้ในการทำ nick translation ลงไปในหลอด eppendorf ขนาด 0.4 มิลลิลิตร โดยให้ใส่สารที่เป็นเอนไซม์ลงไปตัวสุดท้าย

สารที่ใช้ในการทำ nick translation ด้วยวิธี conventional มีดังนี้

NT-buffer	5	ไมโครลิตร
Beta-mercaptone (ß-me)	5	ไมโครลิตร
dNTPs 10X	5	ไมโครลิตร
Biotin-16-dUTP หรือ Digoxigenin-11-dUTP	1.5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	X	ไมโครลิตร
DNA polymerase	1	ไมโครลิตร
DNase ความเข้มข้น 1:4000	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	11.5-X	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	30	ไมโครลิตร

2. นำหลอด eppendorf ไปทำการ vortex และปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมกัน
3. นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ทำการหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อหาขนาดของโพรบที่เหมาะสมในการนำไป hybridize
4. นำมาหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. นำดัวติดตามที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.5.2 การทำ Nick translation โดยใช้ชุดทำ Nick translation สำเร็จรูปของ Vysis

1. ทำการผสมสารที่ใช้ในการทำ nick translation ลงไปในหลอด eppendorf ขนาด 0.4 มิลลิลิตร โดยให้ใส่สารที่เป็นเอนไซม์ลงไปตัวสุดท้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารที่ใช้ในการทำ nick translation ด้วยชุดทำ nick translation สำเร็จรูป มีดังนี้

Biotin-16-dUTP หรือ Digoxigenin-11-dUTP	1.5	ไมโครลิตร
dTTP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์	2.5	ไมโครลิตร
dNTPs	5	ไมโครลิตร
10X nick translation buffer	2.5	ไมโครลิตร
nick translation enzyme	5	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	X	ไมโครลิตร
Nuclease free water	8.75 – X	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	25	ไมโครลิตร

2. นำหลอด eppendorf ไป vortex และปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมกัน
3. นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-16 ชั่วโมง ทำการหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเพื่อหาขนาดของตัวติดตามที่เหมาะสมในการนำไป hybridize
4. นำมาหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. นำตัวติดตามที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การทำอีเลคโตรโฟรีซิส

นำตัวติดตามมที่ได้มาทำอีเลคโตร โฟรีซีสเพื่อหาขนาดของตัวติดตามที่เหมาะสมในการนำไป hybridize ขนาดของตัวติดตามที่เหมาะสมในการนำไป hybridize ควรมีขนาดประมาณ 300-500 bp โดยเทียบขนาดจากแถบดีเอ็นเอ marker 100 bp แยกขนาดบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์แล้วนำไปตรวจแถบดีเอ็นเอ มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมอะกาโรสเจล 1-2 เปอร์เซ็นต์
2. ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 1-2 ชม. โดยให้สีวิ่งไปประมาณร้อยละ 80 ของความยาวของเจล
3. นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นานประมาณ 5 นาที
4. หลังจากนั้นนำเจลไปล้างด้วยน้ำกลั่น นานประมาณ 5 นาที
5. นำเจลที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 การทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบโครโมโซม โดยใช้ตัวติดตามที่ติดสารเรืองแสงไป hybridize กับตัวอย่างเซลล์ที่เราต้องการ จะเกิดการเข้าคู่ของบริเวณที่จำเพาะเจาะจงของโครโมโซมและตัวติดตาม ทำให้สามารถตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมได้ การทำเทคนิค FISH จะแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนตัวติดตาม (precipitate probe) การเตรียมสไลด์ (Pretreatment slide), Hybridization และ Post hybridize ดังนี้

การตกตะกอนตัวติดตามทำเพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินและสิ่งเจือปนต่างๆออก และเพื่อบล็อกส่วนที่เป็น repetitive DNA ของตัวติดตาม

ขั้นตอน Post hybridize เป็นขั้นตอนในการล้างสไลด์ เพื่อกำจัดตัวติดตามส่วนเกินและสิ่งสกปรกต่างๆออกไป ทำให้สามารถตรวจสอบสัญญาณได้ชัดเจน มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

โดยได้ทำการทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการทำเทคนิค FISH เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบสัญญาณที่ได้อย่างถูกต้องแม่นยำและมีประสิทธิภาพ จึงได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 วิธี คือ Indirect method, Direct method และใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปของ vysis

3.3.7.1 การทำ Pretreatment slide

มีจุดประสงค์เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินและกำจัดสิ่งสกปรกต่างๆออกจากสไลด์ และทำให้ตัวติดตามสามารถ hybridize กับโครโมโซมของตัวอย่างได้ง่ายขึ้น

ขั้นตอนการเตรียมสไลด์จะใช้วิธีการเดียวกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. วางสไลด์บน glass jar ใน water bath 37 องศาเซลเซียส หยด 0.I โมลาร์ DTT ใน 0.1 โมลาร์ Tris 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ปิดพาราฟิล์ม ทิ้งไว้นาน 10 นาที
2. หยด 0.01 โมลาร์ DTT ใน 0.1 โมลาร์ Tris 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ที่วางอยู่บน glass jar ปิดพาราฟิล์ม ทิ้งไว้นาน 10 นาที
3. ล้างสไลด์ใน 2X SSC พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
4. เตรียม RNase 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 2X SSC 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf
5. หยดสารละลาย RNase ที่เตรียมไว้ลงบนสไลด์ที่วางอยู่บน glass jar ใน water bath 37 องศาเซลเซียส ปิดพาราฟิล์ม ทิ้งไว้นาน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ล้างสไลด์ใน 2X SSC ที่ 37 องศาเซลเซียส 3 จาร์ จาร์ละ 5 นาที เขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที
7. เตรียม 10 เปอร์เซนต์ Pepsin 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 N HCl 500 ไมโครลิตร และผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 49.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน glass jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แช่สไลด์นาน 10 นาที เขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที
8. ล้างสไลด์ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที
9. เตรียม PBS 47.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 37 เปอร์เซนต์ formaldehyde 1.3 มิลลิลิตรและผสมกับ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในจาร์ ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บไว้ในที่มืด แช่สไลด์นาน 12 นาที
10. แช่สไลด์ใน PBS ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
11. แช่สไลด์ในแอลกอฮอลล์ 70, 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จาร์ละ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ
12. ตากสไลด์ให้แห้ง

3.3.7.2 การทำเทคนิค FISH ด้วยวิธี Indirect

precipitate

1. นำตัวติดตามที่ทำ nick translation มา 300-500 นาโนกรัม ใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. ใส่ salmon sperm DNA ลง 1 ไมโครลิตร
3. ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปเพื่อปรับปริมาตรให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน
4. เติมแอลกอฮอลล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 2.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และ 3M potassium acetate 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรทั้งหมดลงไปในหลอด
5. แช่ที่ -20 องศาเซลเซียส 45 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วดูดส่วน
   ใสด้านบนออก
7. เติมแอลกอฮอลล์ 85 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร (ระวังอย่าให้ตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอหลุด) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง ตากตะกอนให้แห้ง

8. เติม deionize formamide 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
9. เติม Human Cot-1 DNA 2 ไมโครลิตร และ hybridization buffer 5 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน
10. denature probe ใน water bath ที่ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
11. นำตัวติดตามไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
12. นำตัวติดตามที่ได้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Hybridization

เป็นขั้นตอนที่โพรบจะเข้าไป hybridize กับโครโมโซมในตำแหน่งที่เราต้องการ ทำให้สามารถตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมได้ ในการทำขั้นตอนนี้ควรระมัดระวังอย่าให้โพรบที่มีสารเรืองแสงติดอยู่ถูกแสงมากเกินควร เพราะจะทำให้สารเรืองแสงเสียคุณสมบัติไป

1. นำสไลด์ไป denature โดยหยด 70%formamide/2X SSC 1 มิลลิลิตร ใน water bath ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที
2. แช่สไลด์ในแอลกอฮอลล์ที่เย็น 70, 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จาร์ละ 3 นาที ตามลำดับ ตากสไลด์ให้แห้ง
3. หยดตัวติดตามที่ denature แล้วลงบนสไลด์ 10 ไมโครลิตร ปิดด้วย cover slip แล้วปิดขอบด้วย rubber glue
4. นำสไลด์ใส่ใน moister chamber แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

Post hybridize

1. นำสไลด์ออกจาก moister chamber แล้วดึง rubber glue ออกจากสไลด์ ระวังอย่าให้ cover slip เคลื่อน
2. ล้างสไลด์ใน 0.4X SSC/0.3 เปอร์เซ็นต์ tween20 ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขณะทำการล้างสไลด์ให้เขย่าสไลด์จน cover slip หลุดออกไป
3. ล้างสไลด์ใน 2X SSC/0.1 เปอร์เซ็นต์ tween20 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที เขย่าสไลด์ตลอดเวลา

4. หยด blocking solution 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์ นำสไลด์ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที
5. ล้างสไลด์ใน 4X SSC/0.2 เปอร์เซ็นต์ tween20 นาน 2 นาที เขย่าสไลด์ตลอดเวลา
6. ผสม Sheep anti-DIG หรือ Mouse anti-BIOTIN 1 ไมโครลิตร กับ detection solution 40 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์แล้วปิดด้วย cover slip
7. นำไปบ่มใน moist chamber ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
8. ล้างสไลด์ใน 4X SSC/0.2 เปอร์เซ็นต์ tween20 ที่ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที โดยทำการเขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที
9. ผสม FITC หรือ TRITC 1 ไมโครลิตร กับ detection solution 40 ไมโครลิตร หยดสารลงบนสไลด์แล้วปิดด้วย cover slip
10. นำไปบ่มใน moist chamber ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
11. ล้างสไลด์ใน 4X SSC/0.2 เปอร์เซ็นต์ tween20 ที่ 45 องศาเซลเซียส 3 จาร์ จาร์ละ 5 นาที เขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที หยดสารละลาย DAPI 1 มล. ลงบนสไลด์บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที (ทำในที่มืด) ล้างสไลด์ด้วยน้ำและตากสไลด์ให้แห้ง
12. หยด antifade solution 5 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip แล้วปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เพื่อตรวจสอบสัญญาณสี

3.3.7.3 การทำเทคนิค FISH โดยใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปของ vysis

สามารถนำตัวติดตามที่ได้มาจากชุดสำเร็จรูปมาใช้ได้ทันที โดยไม่ต้องนำตัวติดตามไปตกตะกอน ดังนั้นวิธีการทดลองโดยใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูปจึงไม่มีขั้นตกตะกอนตัวติดตาม

Hybridization

1. นำตัวติดตามจากชุดสำเร็จรูปจำนวน 3 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ตามด้วย cover slip และปิดขอบด้วย rubber glue ทั้ง 4 ด้าน
2. นำสไลด์ไป denature ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำสไลด์ที่ได้ใส่ไน moister chamber แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

Post hybridize

1. นำสไลด์ออกมาจาก moister chamber แล้วดึง rubber glue ออกจากสไลด์ ระวังอย่าให้ cover slip เคลื่อน
2. ล้างสไลด์ใน 0.4X SSC/0.3 เปอร์เซ็นต์ NP-40 ใน water bath ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขณะทำการล้างสไลด์ ให้แกว่งสไลด์จน cover slip หลุดออกไป
3. ล้างสไลด์ใน 2X SSC/0.1 เปอร์เซ็นต์ NP-40 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
4. แช่สไลด์ในแอลกอฮอลล์ 70, 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ ตากสไลด์ให้แห้ง ระวังอย่าให้สไลด์โดนแสง
5. หยด DAPI II 4 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip แล้วปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บทั้ง 4 ด้าน
6. นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เพื่อตรวจสอบสัญญาณสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเตรียมสไลด์

ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสไลด์ เพื่อใช้ในการทำ fluorescence in situ hybridization โดยทำการหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการล้างอสุจิ ได้ทำการทดลองโดยทำการล้างอสุจิจำนวน 2 3 และ 4 รอบ โดยใช้ 0.01 M Tris-0.9% NaCl ในการล้าง หลังจากทำการล้างอสุจิจำนวน 2 และ 3 รอบ แล้วนำไปตรึงลงบนไลด์ เมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ายังมีตะกอนขยะ และอสุจิยังมีคราบสกปรกอยู่ จึงได้ทำการล้างอสุจิจำนวน 4 รอบ แล้วนำไปตรึงลงบนไลด์ เมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสไลด์ไม่มีตะกอนขยะ และอสุจิสะอาดไม่มีคราบสกปรก ทำให้สามารถตรวจสอบสัญญาณสีได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการเตรียมสไลด์ทุกครั้งจึงล้างอสุจิจำนวน 4 รอบ ก่อนการตรึงลงบนสไลด์

4.2 การสกัดพลาสมิด

ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพลาสมิด โดยทำการทดลอง 2 วิธี คือ การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี conventional และ สกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Nucleospin พบว่าการสกัดโดยใช้วิธี conventional ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อยมากและมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่มาก เมื่อนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิสจึงไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ แต่เมื่อทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมาก และมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่น้อย จึงเลือกใช้การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

4.3 การทำ Nick translation

ได้ทำการศึกษาหาสภาวะเหมาะสมในการทำ nick translation โดยทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ DNase และ ทำการหาวิธีที่เหมาะสมในการทำ nick translation

4.3.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ DNase

ได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ DNase เพื่อใช้ในการทำ nick translation โดยทดลองใช้ค่าความเข้มข้นของ DNase ที่ 1:1000 1:2000 1:3000 1:4000 1:5000 และ 1:6000 ตามลำดับ โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายควรมีขนาดประมาณ 300-500 คู่เบส จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ DNase 1:4000 มีความเหมาะสมมากที่สุด ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณพอเหมาะและเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายกับขนาดชิ้นส่วนตัวบ่งชี้ดีเอ็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้มีขนาดประมาณ 200 ถึง 300 คู่เบส ดังนั้นจึงใช้ DNase ที่ความเข้มข้น 1:4000 ในการศึกษาขั้นต่อไป

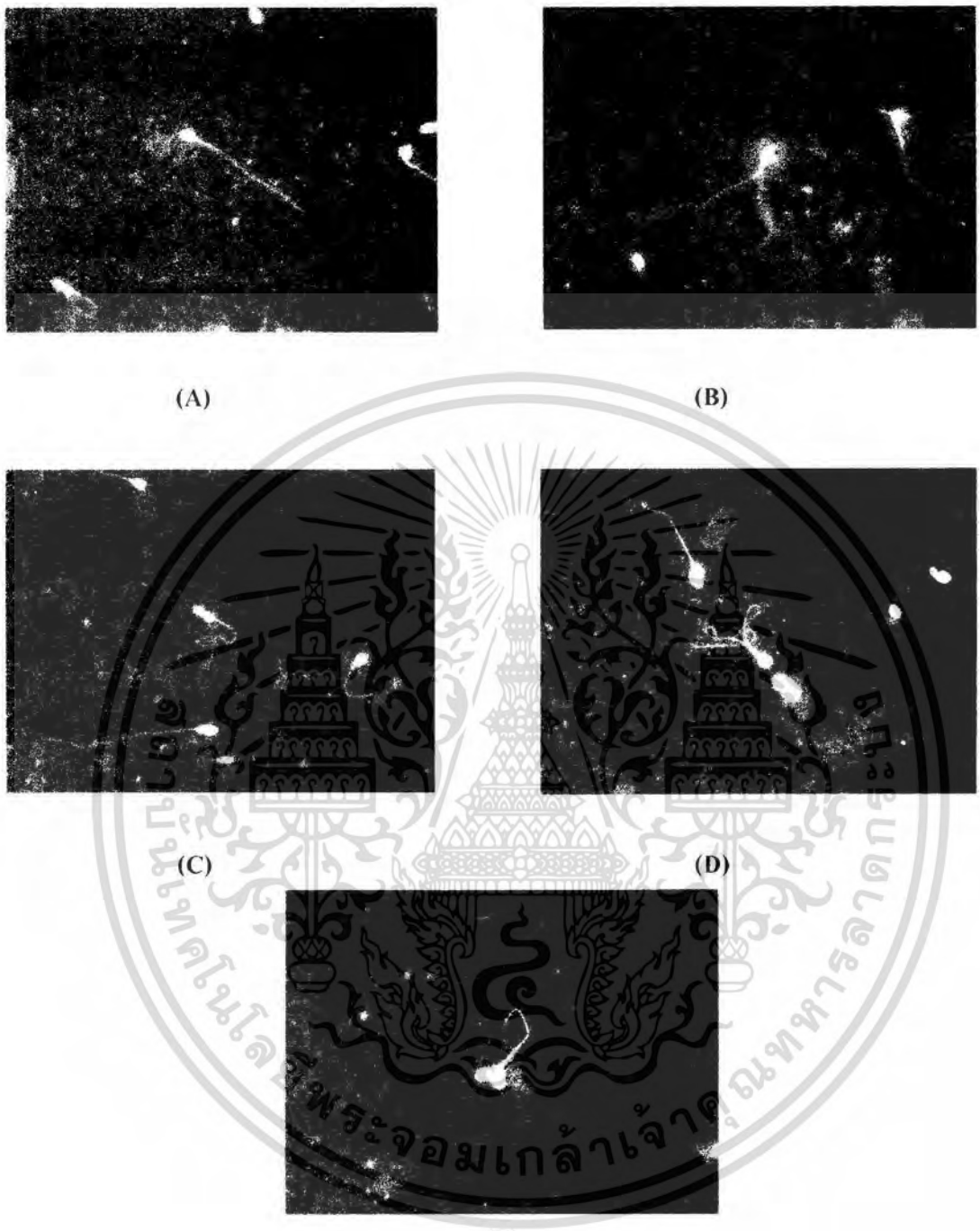
4.3.2 การหาวิธีที่เหมาะสมในการทำ Nick translation

ได้ทำการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการทำ nick translation โดยทำการทดลองด้วยวิธี conventional และวิธีที่ใช้ชุดสำเร็จรูปในการทำ nick translation จากการทดลองพบว่าการทำ nick translation ด้วยวิธี conventional นั้น เมื่อนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซิสจะไม่เห็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่เมื่อทำการทดลองโดยใช้ชุดสำเร็จรูปในการทำ nick translation และตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้มีขนาดประมาณ 200 ถึง 400 คู่เบส โดยขนาดที่เหมาะสมของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการควรมีขนาดประมาณ 300 ถึง 500 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมในการนำไป hybridize ดังนั้นจึงใช้ชุดสำเร็จรูปในการทำ nick translation ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.4 รูปร่างของอสุจิก่อนการทำ Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของอสุจิระหว่างอสุจิของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และอสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่ จากการทดลองพบว่าอสุจิของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จะมีรูปร่างปกติ และอาจมีรูปร่างที่ผิดปกติบ้างเล็กน้อยซึ่งเป็นลักษณะที่ปกติ แต่อสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่ส่วนใหญ่มักจะมีรูปร่างที่ผิดปกติ เช่น อสุจิหางงอ อสุจิหางสั้น อสุจิสองหาง หัวอสุจิโตกว่าปกติ หัวอสุจิเล็กกว่าปกติ อสุจิมีสองหัว เป็นต้น (แสดงดังรูปที่ 25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 รูป A แสดงให้เห็นอสุจิของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ โดยอสุจิจะมีรูปร่างปกติ ส่วนรูป B C D และ E เป็นรูปอสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่โดยรูป B อสุจิมี 2 หาง รูป C อสุจิมี acrosome ผิดปกติ รูป D อสุจิมี 4 หาง และรูป E อสุจิมี 2 หัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การตรวจโครโมโซมเพศด้วยเทคนิค Fluorescence In Situ hybridization (FISH)

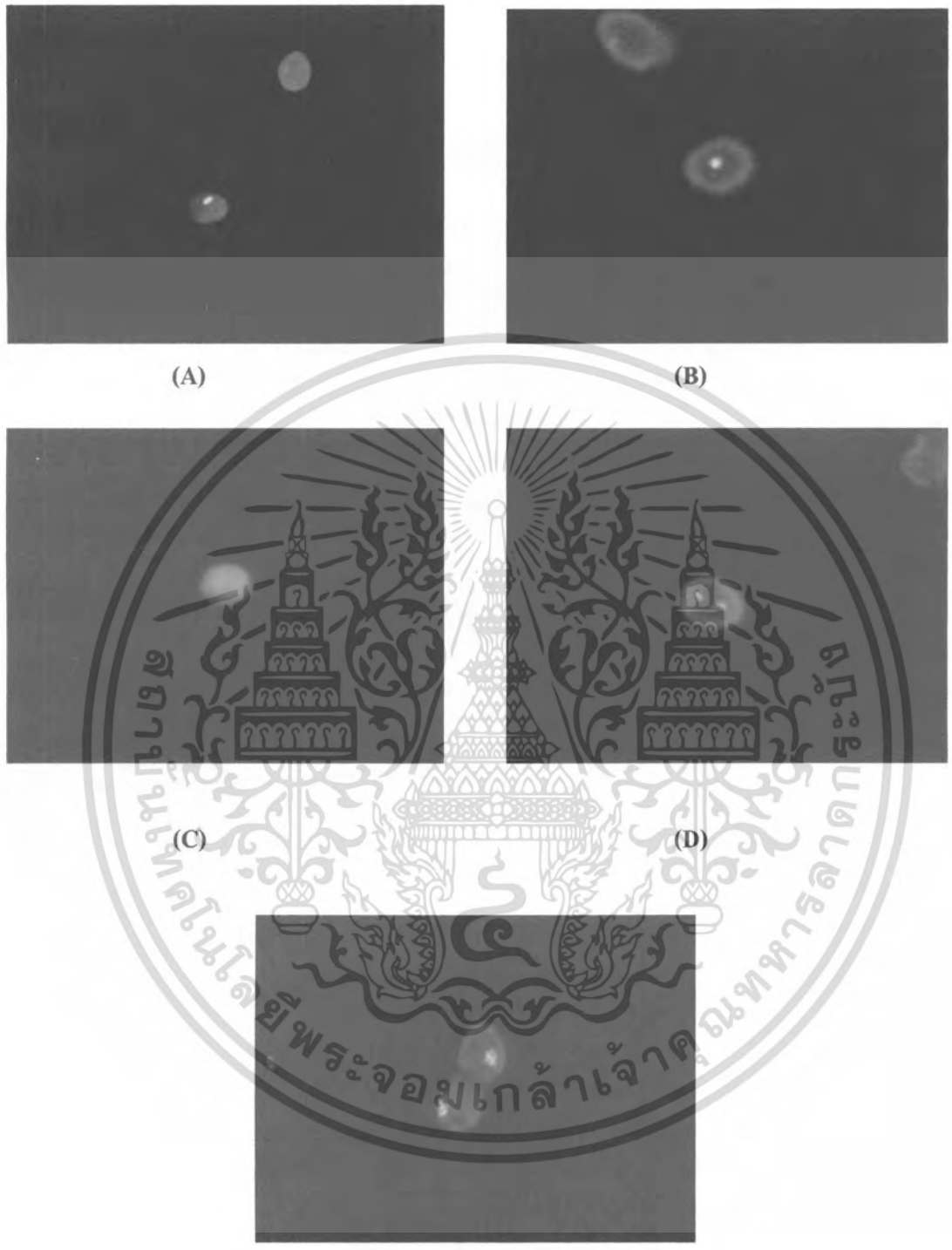
ได้ทำการศึกษาโครโมโซมเพศในอสุจิระหว่างอสุจิของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และอสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่โดยใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างอสุจิมาทั้งหมด 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างของผู้ที่สูบบุหรี่ 6 ตัวอย่าง หลังจากนำไปตรวจสอบโครโมโซมด้วยเทคนิค FISH แล้ว สามารถตรวจสอบสัญญาณสีได้เพียง 5 ตัวอย่าง จากผลที่ได้พบว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จะมีอัตราความผิดปกติของโครโมโซมเพียง 0.58 เปอร์เซ็นต์ แต่ในผู้ที่สูบบุหรี่พบว่ามีอัตราความผิดปกติเฉลี่ย 6.45 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงอัตราความผิดปกติของโครโมโซมเพศ (%) ในผู้ที่ไม่สูบบุหรี่และผู้ที่สูบบุหรี่

ตัวอย่าง	จำนวนการสูบบุหรี่ (มวน/วัน)	ระยะเวลาการสูบ (ปี)	X (แดง)	Y (เขียว)	XY (แดง, เขียว)	XX (แดง, แดง)	YY (เขียว, เขียว)	XXY (แดง, แดง, เขียว)	จำนวนรวม	ความผิดปกติ (%)
A 3	-	-	283	231	3	-	-	-	517	0.58
B 1	11	3	291	183	20	4	2	-	500	5.2
B 2	10	4	189	194	6	2	4	-	395	3.03
B 4	10	4	253	217	24	6	-	3	503	6.56
B 5	15	3	136	98	14	8	7	-	263	11.02

ในอสุจิที่ปกติเมื่อตรวจโครโมโซมเพศด้วยเทคนิค FISH แล้วจะเห็นสัญญาณสีแดงหรือสัญญาณสีเขียวอย่างใดอย่างหนึ่ง โดยสัญญาณสีแดงคือ โครโมโซม X และสัญญาณสีเขียวคือโครโมโซม Y จากการทดลองความผิดปกติที่ตรวจพบในผู้ที่สูบบุหรี่ คือ แดง-เขียว แดง-แดง เขียว-เขียว และ แดง-แดง-เขียว (แสดงดังรูปที่ 26) รูป A คือ อสุจิของผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ โดยจะตรวจพบสัญญาณสีเขียวหรือสัญญาณสีแดงอย่างใดอย่างหนึ่ง รูป B C D และ E คือ อสุจิของผู้ที่สูบบุหรี่ โดยจะตรวจพบสัญญาณที่ผิดปกติคือ แดง-เขียว แดง-แดง เขียว-เขียว และ แดง-แดง-เขียว ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 รูป A แสดงสัญญาณสีของอสุจิที่มีโครโมโซมเพศปกติ รูป B C D และ E แสดงสัญญาณสีของอสุจิที่มีโครโมโซมเพศผิดปกติ โดยสัญญาณสีแดงคือ โครโมโซม X และ สัญญาณสีเขียวคือ โครโมโซม Y

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองการตรวจสอบหาความผิดปกติของโครโมโซมเพศในผู้ที่สูบบุหรี่พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกับ Rubes และคณะ (1998) ที่ได้ศึกษาในวัยรุ่นชายที่ได้สูบบุหรี่เป็นประจำ จำนวน 10 คน (20 มวนต่อวันและสูบบุหรี่มาอย่างน้อยเป็นเวลา 2 ปี) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้พบว่าวัยรุ่นชายที่สูบบุหรี่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของ sperm aneuploidy รวมถึงงานวิจัยของ Robbins และคณะ (1997) ทำการตรวจอสุจิในผู้ชายที่เป็นอาสาสมัคร 45 คน มีอายุระหว่าง 19-35 ปี เพื่อศึกษาการเกิด aneuploidy และ diploid ของโครโมโซม X, Y และ แท่งที่ 18 โดยทำการแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มคนที่สูบบุหรี่ กลุ่มคนกินคาเฟอีน และกลุ่มคนที่ดื่มแอลกอฮอล์ ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ในการตรวจสอบ จากผลการศึกษาพบว่า กลุ่มคนทั้ง 3 กลุ่มมีความผิดปกติที่เกิดขึ้นในรูปแบบที่แตกต่างกันไป

แต่สำหรับงานวิจัยของ Shi และคณะ (2001) ได้ผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกับงานทดลองที่ได้ทำมาเนื่องจาก Shi และคณะ ได้ทำการตรวจอสุจิในกลุ่มผู้ชายที่สูบบุหรี่และมีอสุจิที่เป็น aneuploidy โดยทำการศึกษาในผู้ชายจีน 31 คน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ผู้ชายที่ไม่สูบบุหรี่ 10 คน กลุ่มที่ 2 ผู้ชายที่สูบบุหรี่น้อยกว่า 20 มวนต่อวัน 11 คน และกลุ่มที่ 3 ผู้ชายที่สูบบุหรี่มากกว่า 20 มวนต่อวัน 10 คน ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Two multi-color fluorescence in situ hybridization (FISH) ตรวจสอบโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 21 และใช้เทคนิค Three multi-color FISH ตรวจสอบโครโมโซมเพศ ประสิทธิภาพในการ hybridize มี 99.78 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาพบว่า โครโมโซมแท่งที่ 13 มีอัตราการเกิด disomy มากที่สุด ทั้งในผู้ที่สูบบุหรี่มากและผู้ที่สูบบุหรี่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ แต่ในโครโมโซมแท่งที่ 21, X และ Y พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการเกิด disomy ในผู้ชายทั้ง 3 กลุ่ม

จึงสามารถสรุปได้ว่าการสูบบุหรี่อาจจะส่งผลให้อสุจิเกิดความผิดปกติด้านพันธุกรรมที่มีลักษณะแตกต่างกันไป ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม สุขภาพ ระยะเวลาการสูบ จำนวนการสูบและความรุนแรงของบุหรี่ที่สูบ อย่างไรก็ตามการสูบบุหรี่จะส่งผลให้มีความผิดปกติของอสุจิด้านพันธุกรรมมากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาโครงงานพิเศษนี้ พบว่าในผู้ชายที่สูบบุหรี่จะมีอัตราความผิดปกติของโครโมโซมมากกว่าผู้ชายที่ไม่สูบบุหรี่ จากการทดลองพบว่าผู้ชายที่ไม่สูบบุหรี่จะมีอัตราความผิดปกติของโครโมโซมเพศเฉลี่ย 0.58 เปอร์เซ็นต์ ผู้ชายที่สูบบุหรี่จะมีอัตราความผิดปกติของโครโมโซมเพศโดยเฉลี่ย 6.45 เปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติของโครโมโซมเพศที่ตรวจพบคือ XX YY XY และ XXY สาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดปกติอาจเนื่องมาจากในบุหรี่มีสารนิโคติน ซึ่งเป็นสารคาร์ซิโนเจน และมิวทาเจน ซึ่งอาจชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติในเซลล์สืบพันธุ์ เมื่ออสุจิที่มีเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ เด็กที่เกิดมาจะมีความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น Klinefelter's syndrome Turner's syndrome เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

5.1 ตัวอย่างที่นำมาทำควรมากกว่านี้ ในการวิเคราะห์ผลข้อมูลจะได้มีความน่าเชื่อถือ

5.2 สารที่ใช้ทำมีราคาแพง จึงไม่สามารถทำหลายตัวอย่างได้

5.3 ตัวอย่างอสุจิหายาก

5.4 กล้องที่ใช้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นิตยสารแม่และเด็ก ปีที่ 22 ฉบับที่ 326-327 เมษายน-พฤษภาคม 2542.

นิตยสารแม่และเด็ก ปีที่ 24 ฉบับที่ 349 มีนาคม 2544.

นเรศร สุขเจริญ. 2543. การตรวจน้ำอสุจิและการทำงานของอสุจิ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ.บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอนัล พับลิเคชั่น จำกัด.

นวพรรณ จารุรักษ์. 2541. Fluorescence In Situ Hybridization. ใน อณูชีววิทยาทางการแพทย์, 53. นเรศร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรางกูร และ ยง ภู่วรรณ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอนัล พับลิเคชั่น จำกัด.

สมาคมเจริญพันธุ์. 1999-2001. Reproductive Health Society (Thai). All Rights Reserved.

สมาน แก้วไวยุทธ. 2537. ชีววิทยา ม.5 เล่ม 4. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. เทพนิมิตการพิมพ์

Barroso, G., Mercan, R., Ozgur, K., Morshedi, M., Kolm, P., Coetzee, K., Kruger, T. and Oehninger, S. 1999. Intra- and inter-laboratory variability in the assessment of sperm morphology by strict criteria: impact of semen preparation, staining techniques and manual versus computerized analysis. *Human Reproduction.*, 14(8), 2036-2040.

Hclen, G.T., Sheryl, T.H., Maria, D., Dimitra, C., David, W., Xiao, P.Z. and Darren, K.G. 2004. The association between male infertility and sperm disomy: Evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs., 282.

Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, J. and Jefferies, T.M. 1999. Sperm chromatin damage associated with male smoking. School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath.

Robbins, WA., Vine, MF., Truong, KY., and Everson, RB. 1997. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen.*, 30(2), 175-83.

Rogelio, R., Wendy, A.R., Guadalupe, O., Victor, B., Javier, M., John, R.F., Rosa, Ma.G., Garcia, H. and Marriano, E.C. 2001. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect.*, 109, 1237-1240.

Rubes, J., Lowe, X., Moore, D., Perreault, S., Slott, V., Evenson, D., Selevan, S.G. and Wyrobek, A.J. 1998. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril.*, 70(4), 715-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shi, Q., Ko, E., Barclay, L., Hoang, T., ademaker, A. and Martin, R. 2001. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev.*, 59(4), 417-21.

Viloria, T., Rubio, M.C., Rodrigo, L., Calderon, G., Mercader, A., Mateu, E., Meseguer, M., Remohi, J. and Pellicer, A. 2005. Smoking habits of parents and male: female ratio in spermatozoa and preimplantation embryos. *Human Reproduction.*, 20(9), 2517-2522.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

www.alphascientists.com/ images/embryology/52.jpg

www.anotherthink.com/ my_graphics/down.jpg

www.catalog.nucleusinc.com/ generateexhibit.php?ID...

www.downsyn.com/ whatisds.html

www.dynagene.com/images/digeorgesml.jpg http://www.gen.cam.ac.uk/newdept/images/farr/FRACyto.jpg

www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/meiosisover.html

www.fermentek.co.il/ struct/Chromomycin_A3.png

www.geneticsolutions.com/ PageReq?id=3152:1873

www.gslc.genetics.utah.edu/. ../klinefelter.cfm

www.humpath.com/article. php3?id_article=4517

www.hybridmedicalanimation.com/mediajj_/figure1.jpg

www.hybridmedicalanimation.com/mediajj_/hybridization.jpg)

www.jp.amershambiosciences.com/products/kouryaku_/electrochap_/6162imgtec1.gif

www.med.utah.edu/.../ images/thumbnail/TUNEL3.jpg

www.med.utah.edu/.../ images/thumbnail/TUNEL5.jpg

www.mdanderson.org/depts/pathology/fish/images/MCLNEG.JPG

www.omlc.ogi.edu/.../ str_gif/acridineorange

www.omlc.ogi.edu/.../ str_gif/Biotin

www.omlc.ogi.edu/.../ str_gif/photodigoxigen

www.roche-applied-science.com/dUTP/images/label02.gif

www.tecn.rutgers.edu/ bio342/sperm_meiosis.html

www.unav.es/ genetica/new/fish.jpg

www.waynesword.palomar.edu/ images/sperm4.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

- **20 X SSC (pH 7)** **เตรียม 500 มิลลิลิตร**

NaCl	87.66	กรัม
Tri-Na-citrate	44.12	กรัม

นำไปปรับ pH 7.0 (HCl) และ auto clave

- **Blocking solution** **เตรียม 30 มิลลิลิตร**

BSA	0.9	กรัม
4 X SSC/0.2 เปอร์เซ็นต์ tween 20	30	มิลลิลิตร

ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

- **Detection solution** **เตรียม 10 มิลลิลิตร**

BSA	0.1	กรัม
4 X SSC/0.2 เปอร์เซ็นต์ tween 20	10	มิลลิลิตร

ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

- **Deionized formamide** **เตรียม 10 มิลลิลิตร**

Rasin	0.5	กรัม
Formamide	10	มิลลิลิตร

คนสาร 30 นาที และ กรองเอาเรซินออก แบ่งใส่ eppendorf
เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- **Hybridization buffer** **เตรียม 5 มิลลิลิตร**

2 X SSC	5	มิลลิลิตร
Dextran sulfate	1	กรัม

แบ่งใส่ eppendorf เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- **70 เปอร์เซ็นต์ formamide/2X SSC** **เตรียม 10 มิลลิลิตร**

Formamide	7	มิลลิลิตร
2 X SSC	3	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **PBS เตรียม 500 มิลลิลิตร**

$MgCl_2$	2.5	มิลลิลิตร
Potassium dihydrogen phosphate	625	ไมโครลิตร
H_2O	500	มิลลิลิตร

autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้