ภาคผนวก ก

วัสดุอุปกรณ์และการเตรียมน้ำเพาะเลี้ยง

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. AUTOFLOW CO_2 Water-Jacked Incubator (NUAIRE)
2. Hot air oven(Precision, Thelco, Model 18, Scientific Co.)
3. Laminar Flow Hood (NUAIRE)
4. stereomicroscope (Olympus, Japan)
5. Inverted microscope (Olympus)
6. Inverted microscope (Olympus CK2, Japan)
7. Photomicroscope III (ZEISS, West Germany)
8. Phase contrast microscope (ZEISS, West Germany)
9. pH meter (HANNA)
10. Centrifuge (ECCO)
11. Analytical balance (Precisa 200A)
12. Hemacytometer (Neubauer)
13. Steriled cellulose acetate membrane filter, pore size 0.22 micrometers (Sartorius)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

14. 4 well multidish (Nunclone, Denmark)
15. Dish 35x12 mm (Nunclone, Denmark)
16. Dish (Cel-Cult, Sterilin LTD, Feltham, England)
17. Pasteur pipette
18. Glass slide
19. Cover slip
20. mouthpiece and rubber tube
21. Conical centrifuge tube (14x120 mm)
22. Screw-capped tube (15x100 mm)
23. Diamond pencil
24. Hot plate (MEDAX Nogel KG, Kiel, W, Germany)
25. Automatic pipette 5-40 µl, 40-200 µl (Finnpipet Digital, Finland)
26. Needle #26 $G^{3/8}$
27. Equipments for operating hamster
    - Scissors
    - Forceps
28. Sodium chloride (NaCl)
29. Potassium chloride (KCl)
30. Calcium Chloride ($CaCl_2$)
31. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
32. Magnesium sulfate 7-hydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
33. ∝D-Glucose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

34. Sodium pyruvate (Sigma)
35. Ampicillin
36. Streptomycin sulfate
37. Phenol red
38. Hepes (Sigma)
39. Sodium hydroxide (NaOH)
40. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
41. DL-Lactic acid
42. Human serum albumin (Fraction V, Sigma)
43. Bovine serum albumin (Sigma)
44. Solf wax (10 parts vaseline: 1 part paraffin)
45. Bovine testicular hyaluronidase (Type 1-S, Sigma)
46. Bovine pancreatic trypsin (Type XII-S, Sigma)
47. Mineral oil (M-3516, Sigma)
48. Ham's F10 powder (GIBCO)
49. Gonadotropin pregnant mare's serum (G-4877, Sigma)
50. Human chorionic gonadotropin(A.P.L., Ayerst Laboratories, NewYork, N.Y.)
51. Fetal calf serum (Seromed, Germany)
52. Glacial acetic acid
53. 95% Ethanol
54. Sodium citrate
55. Food for hamster: CP 082 (Bangkok Feedmill Co., LTD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

56. 1 N HCl

57. Quinacrine dihydrochloride

58. McIlvaine`s buffer

59. Colcemid (Seromed, Stock=10 ug/ml)

60. 2xSSC

61. Trypsin(Seromed)

62. GIEMSA'S solution(MERCK)

<u>วิธีเตรียม Biggers-Whitten-Whittingham</u> (Biggers, Whitten และ Whittingham, 1971)

BWW ใช้ในการเตรียมตัวอสุจิ capacitation เตรียมไข่ของหนูแฮมสเตอร์ใช้ในการผสมของไข่หนูและตัวอสุจิ BWWที่เตรียมได้จะสามารถเก็บไว้ใช้ได้ 2 อาทิตย์ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยส่วนประกอบของ BWW มีดังต่อไปนี้

NaCl	5.540	gm
KCl	0.356	gm
$CaCl_2$	0.189	gm
KH_2PO_4	0.162	gm
$MgSO_4.7H_2O$	0.294	gm
D-Glucose	1.000	gm
Sodium pyruvate	0.028	gm
Antibiotic stock	1.0	ml

(ampicillin 25 mg/ml and streptomycin sulfate 50 mg/ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Phenol red (0.5%)	0.5	ml
Hepes, free acid (2M)	10.0	ml
Hepes (2M in 3 M NaOH)	10.0	ml
double distilled water to	1	litre

ในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องเตรียม BWW ในวันที่จะใช้ทำการทดลอง โดย BWW 30 มล. จะเติม $NaHCO_3$ 0.0632 กรัม และ DL-Lactic acid 0.11 มล. จากนั้นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 15 มล. ส่วนหนึ่งเติม Human serum albumin (HSA) 0.075 กรัม (0.5%)ส่วนที่เหลือเติม Bovine serum albumin (BSA) 0.075 กรัม (0.5%) นำ BWW ที่เตรียมได้มาปรับ pH ด้วย acid หรือ base Hepes ที่ใช้เตรียม BWW โดยให้ pH อยู่ระหว่าง 7.4 ถึง 7.5 จากนั้นนำไปกรองเพื่อให้ไร้เชื้อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณ CO_2 5% ความชื้น 95%

BWW ที่เติม BSA จะใช้ในการเตรียมตัวอสุจิ ส่วน BWW ที่เติม HSA จะใช้ใน capacitation การเตรียมไข่ และการผสมระหว่างไข่หนูกับตัวอสุจิ

<u>วิธีเตรียม Ham's F10</u>

ใช้ในการเพาะเลี้ยงไข่หลังจากให้ไข่ co-incubation กับตัวอสุจิ เตรียมโดยใช้ Ham's F10 จากผงสำเร็จรูปละลายในน้ำกลั่น 800 ml แล้วเติม $NaHCO_3$ 2 กรัม Ampicillin 30 ไมโครกรัม Streptomycin sulfate 100 ไมโครกรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปกรองให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 °C ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง เติม Fetal calf serum จำนวน 15% และ Human serum albumin 3 มก./มล.ปรับ pH ให้เป็น 7.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วย 1 N HCl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ก่อนใช้ Ham's F10 นำมากรองให้ปราศจากเชื้อ

วิธีเตรียม 0.5% Quinacrine dihydrochoride

ชั่ง Quinacrine dihydrochoride 0.15 กรัม ละลายสีในน้ำกลั่น 7 มล. ก่อนแล้วจึงละลายด้วย McIlvaine's buffer 23 มล. มีอายุการใช้นาน 2 อาทิตย์ โดยเก็บไว้ที่ 4°C ในที่มืด

วิธีเตรียม McIlvaine's buffer

เตรียม stock solution โดย

- $Na_2HPO_4.2H_2O$ (35.6 gm/L) 4 ส่วน
- Citric acid (21 gm/L) 1 ส่วน

ปรับ pH เป็น 7 ก่อนใช้จะนำ stock solution มาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:9

วิธีเตรียม 2xSSC

Trisodium citrate	8.82	กรัม
Sodium chloride	17.53	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

วิธีเตรียม 0.5% Trypsin

เตรียม stock โดยชั่ง Trypsin 3 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซนต์ปริมาณ 120 มล.จะได้ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เก็บไว้โดยการแช่แข็ง ก่อนใช้นำ stock trypsin มาละลายที่ 37°C โดยใช้ 2.5% Trypsin 8 มล. ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซนต์ จำนวน 32 มล. สารที่เตรียมได้นี้จะใช้ภายในวันเดียว

วิธีเตรียม GIEMSA'S solution

เตรียม Weiss buffer โดยชั่ง KH_2PO_4 0.49 กรัม และ $Na_2HPO_4.2H_2O$ 1.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.2 เวลาใช้ ใช้สี GIEMSA (1 L = 0.99 kg) 1 มล.ละลายใน Weiss buffer 45 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

คาริโอไทป์ของหนูแฮมสเตอร์

ก่อนที่จะสามารถวิเคราะห์โครโมโซมของคนได้ ผู้ตรวจวิเคราะห์ต้องมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมทั้งของหนูแฮมสเตอร์และของคน ดังนั้นผู้เขียนจึงได้เตรียมโครโมโซมจากผิวหนังใบหูของหนูแฮมสเตอร์ โดยการตัดเอาผิวหนังที่บริเวณใบหูของหนูออกมาขนาดประมาณ 3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ซึ่งประกอบด้วย RPMI 1640 ผสมกับ fetal calf serum (20%) และ antibiotics โดยการเลี้ยงในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เมื่อเซลล์เจริญแบ่งตัวมากพอจึงทำการเตรียมโครโมโซม หลังจากเตรียมโครโมโซมได้แล้ว จะทำการย้อมด้วยวิธี Q- และ G-banding แล้วจึงฝึกตรวจวิเคราะห์โครโมโซมโดยอาศัย idiogram ของ Popescu และ Dipaolo ค.ศ.1972 (รูป 18) และอาศัยภาพคาริโอไทป์ที่ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก Prof. R.H. Martin ที่ University of Calgary, Alberta, Canada กรุณาส่งมาให้เป็นภาพประกอบ โครโมโซมของหนูแฮมสเตอร์มีทั้งหมด 44 แท่งแบ่งเป็น metacentric submetacentric และ acrocentric รูปแสดงคาริโอ-ไทป์ของหนูแฮมสเตอร์คือรูป 19-21

Metacentric chromosomes ได้แก่โครโมโซมคู่ที่

5, 10, 14, 20

Submetacentric chromosomes ได้แก่โครโมโซมคู่ที่

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15

Acrocentric chromosomes ได้แก่โครโมโซมคู่ที่

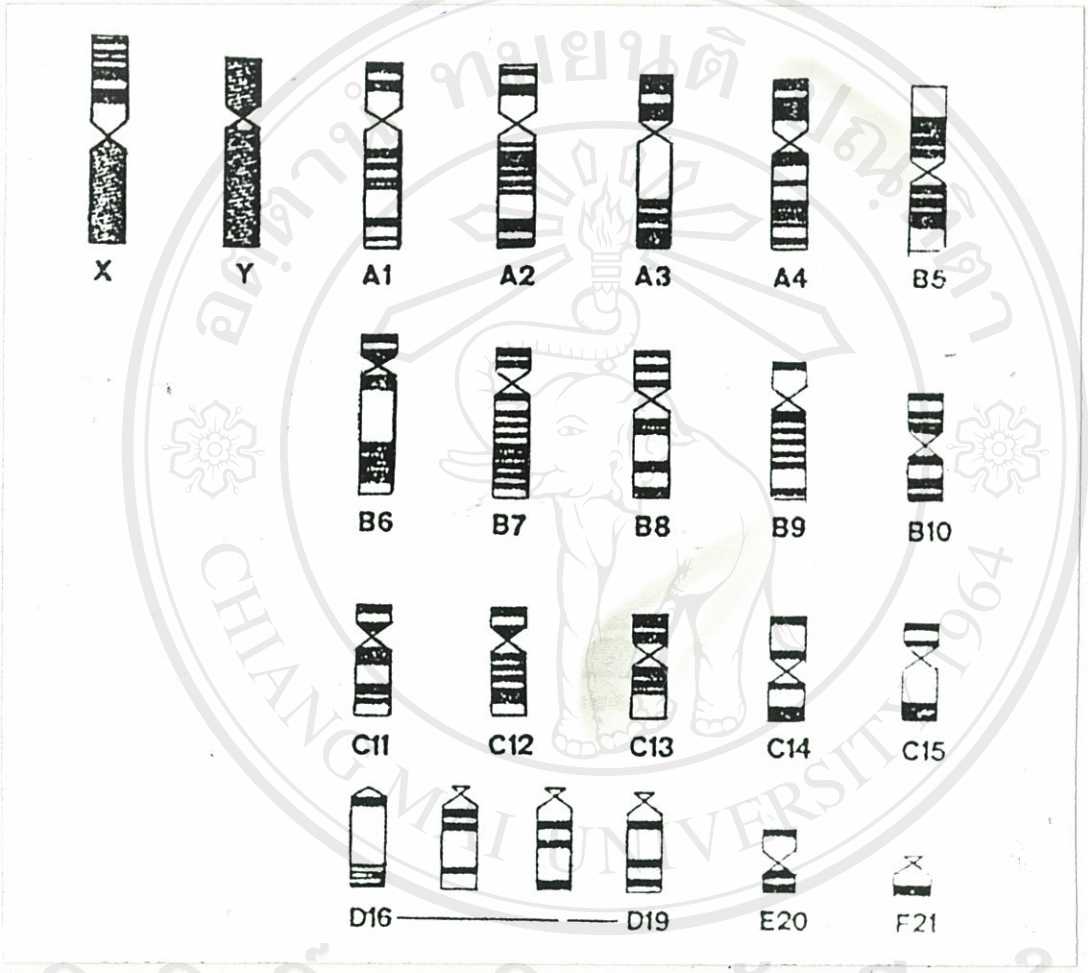
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16, 17, 18, 19, 21

X chromosome เป็น metacentric chromosome ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด

Y chromosome เป็น submetacentric chromosome ที่มีขนาดใหญ่

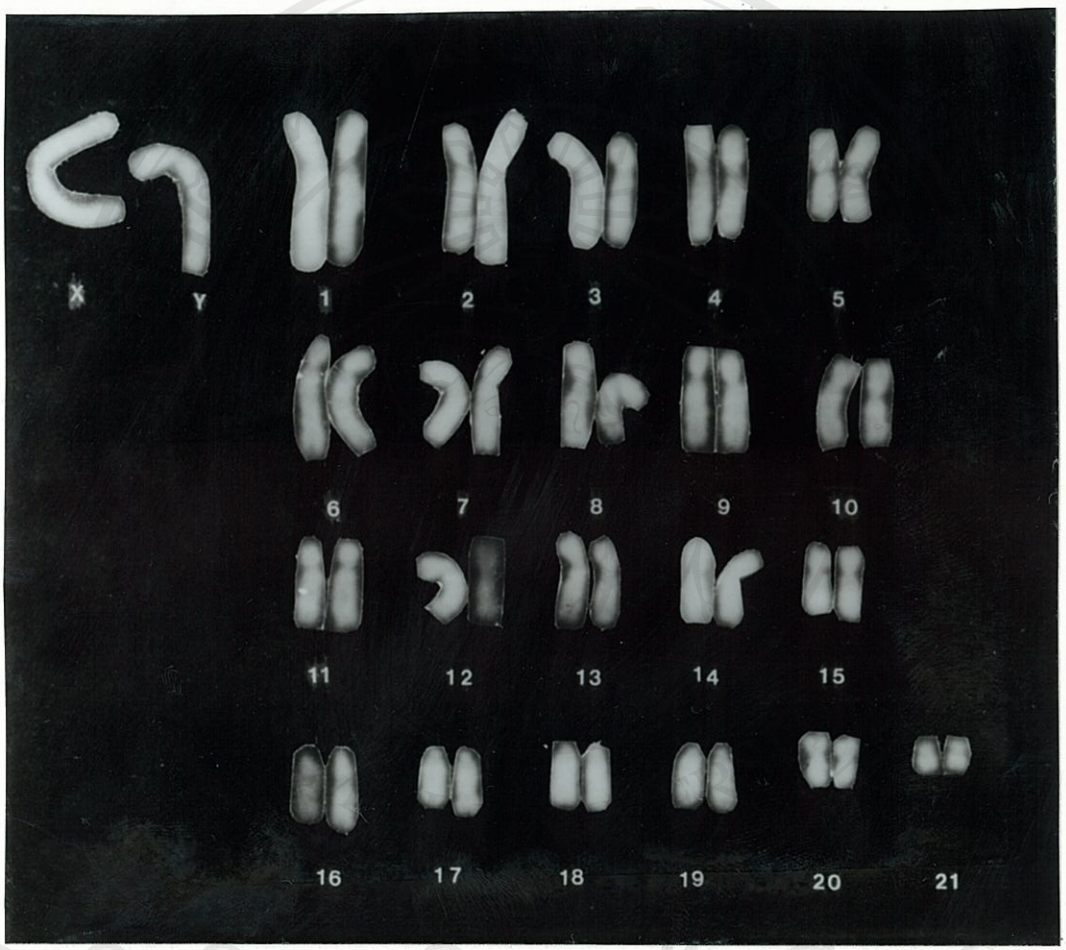
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

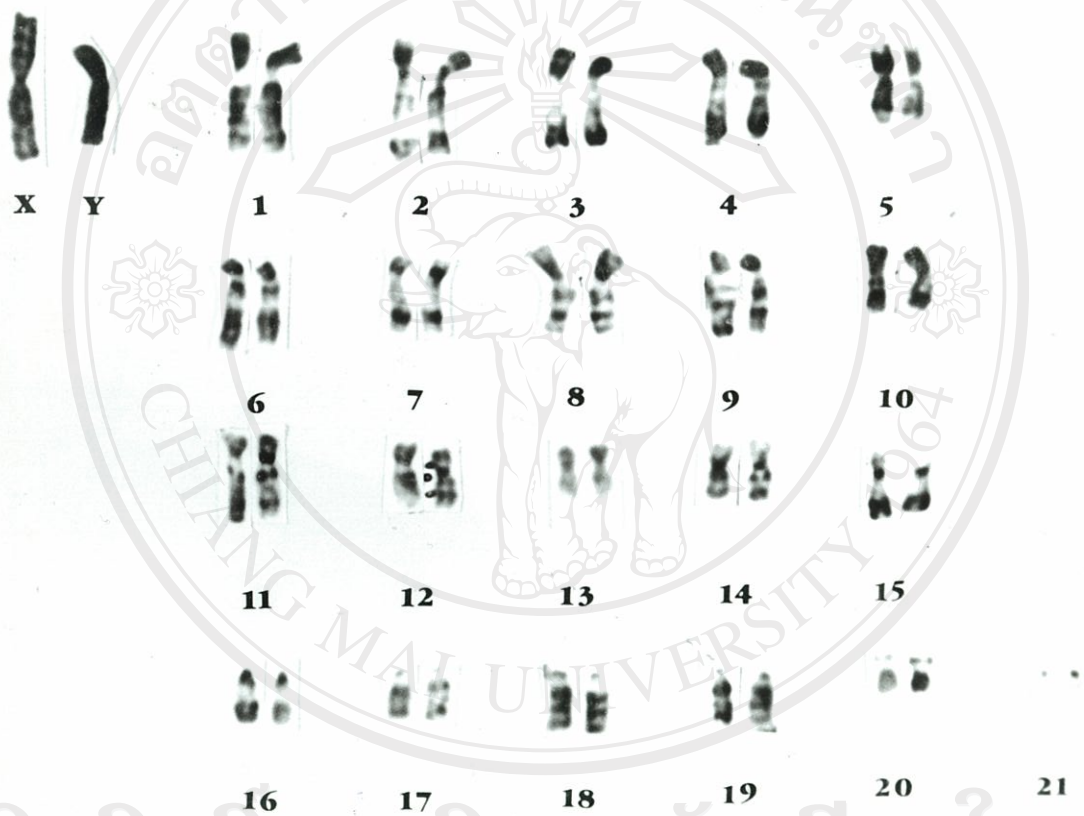
รูป 18 แสดง idiogram ของหนูแฮมสเตอร์

(Popescu and Dipaolo, 1972)



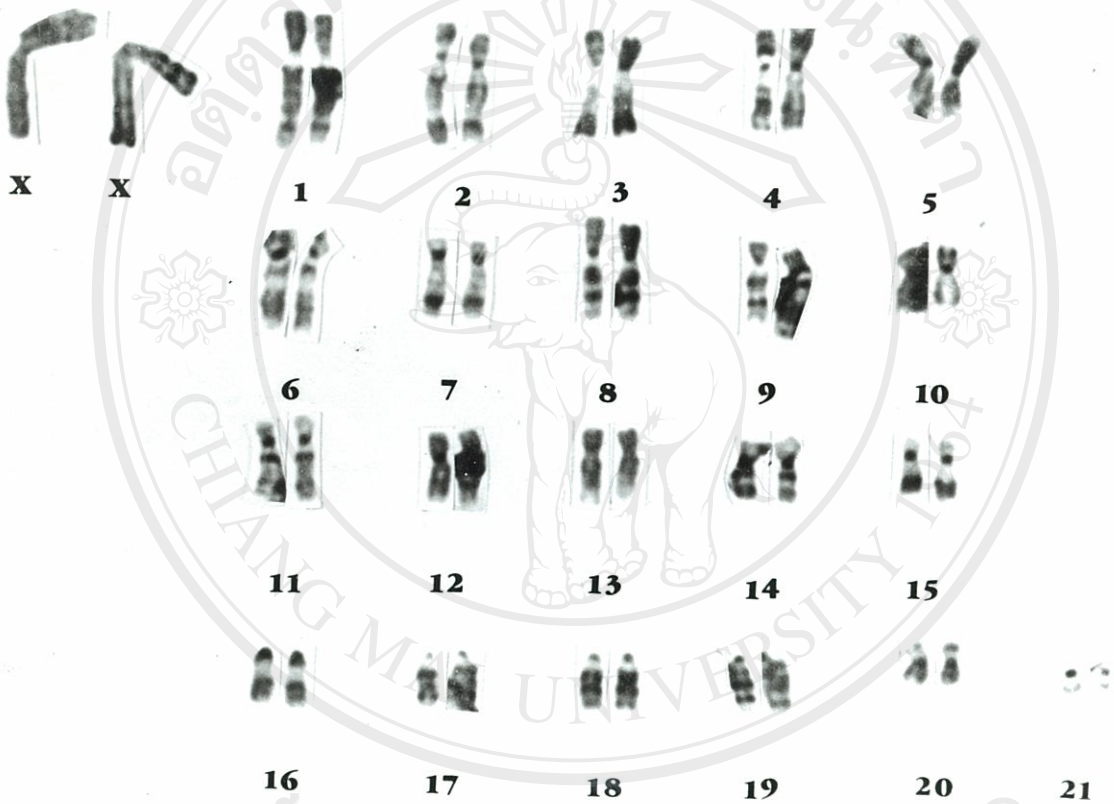
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 19 แสดงคาริโอไทป์จากผิวหนังบริเวณใบหูของหนูแฮมสเตอร์ตัวผู้; 44,XY (Q-bands)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 20 แสดงคาริโอไทป์ปกติจากผิวหนังบริเวณใบหูของหนูแฮมสเตอร์ตัวผู้; 44,XY(G-bands)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 21 แสดงคาริโอไทป์ปกติจากผิวหนังบริเวณใบหูของหนูแฮมสเตอร์ตัวเมีย; 44,XX (G-bands)

ภาคผนวก ค

การคำนวณทางสถิติ

ใช้ X^2-contingency test ที่ระดับนัยสำคัญ p=95

$$X^2 = \frac{(|ad-bc| - 0.5xK)^2 xK}{efgh}$$

ข้อมูล

	A	B	รวม
กลุ่มอายุ 19-25 ปี	a	b	h (a+b)
กลุ่มอายุ 39-45 ปี	c	d	g (c+d)
รวม	e (a+c)	f (b+d)	K (h+g หรือ e+f)

หมายเหตุ: A และ B เป็นสัญญลักษณ์แทนข้อมูลที่นำมาคำนวณโดยข้อมูลนี้สามารถแยกเป็นสองเงื่อนไข เช่น โครโมโซมปกติและผิดปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอัจฉราสักษณ์ สงศิริ
วัน เดือน ปี เกิด	14 ธันวาคม 2510
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมปีที่ 3 ที่โรงเรียนวัฒโนทัยพายัพ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2524
	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมปีที่ 6 ที่โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2527
	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิชาเอกเทคนิคการแพทย์ จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2531

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved