วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการเตรียมโครโมโซมจากตัวอสุจิ โดยให้ตัวอสุจิของคนผสมกับไข่ของหนูแฮมสเตอร์ที่ไม่มี zona pellucida โดยดัดแปลงจากวิธีของ Martin ค.ศ.1983 ในปีแรกของการทดลองนั้นได้ทำการเตรียมโครโมโซมจากตัวอสุจิได้มากกว่า 100 ตัว แต่เนื่องจากการกระจายของโครโมโซมที่เตรียมได้ไม่ดีพอและความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ยังไม่มากพอ ทำให้ผลการตรวจมีความผิดพลาดได้ง่าย จึงได้ตัดเอาผลการศึกษาในปีแรกออกเพื่อให้ความผิดพลาดจากการตรวจมีน้อยที่สุด

<u>กลุ่มตัวอย่างสำหรับใช้ในการศึกษา</u>

1. อาสาสมัครชายอายุระหว่าง 19 ถึง 25 ปี จำนวน 16 ราย
2. ชายอายุระหว่าง 39 ถึง 45 ปี จากห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 30 ราย

หมายเหตุ ทั้งสองกลุ่มตัวอย่างคัดเลือกน้ำอสุจิให้อยู่ในเกณฑ์ปกติของ WHO ค.ศ.1987

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การเตรียมหนูแฮมสเตอร์และการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ</u>

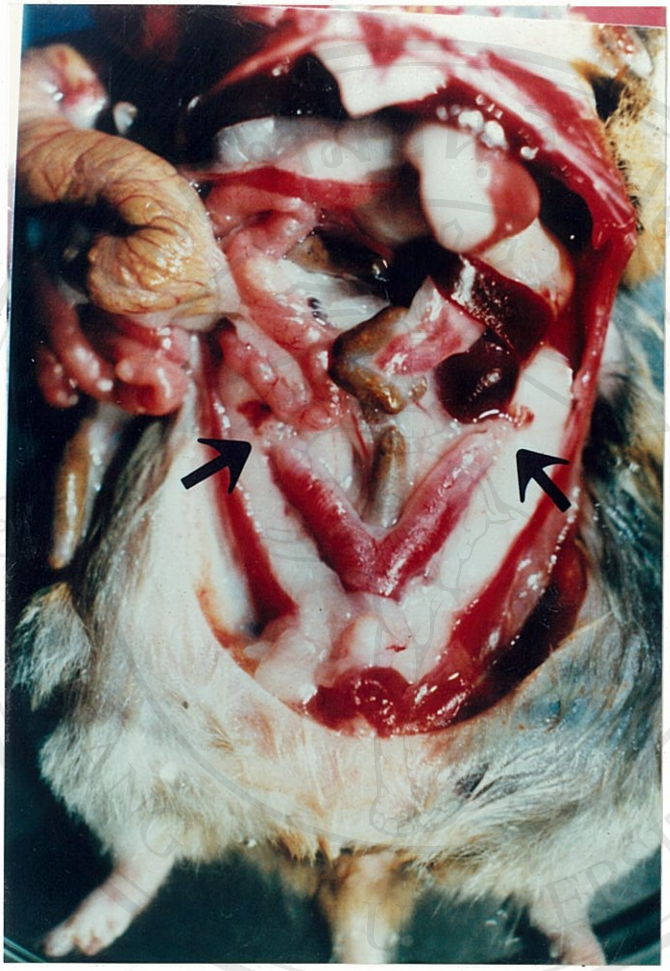
หนูแฮมสเตอร์ที่ใช้เป็นพันธุ์สีทอง (golden hamster) ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ <u>Mesocricetus</u> <u>auratus</u> นำหนูตัวเมียมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องโดย

ควบคุมการได้รับแสงคือ แสงสว่าง 14 ชั่วโมง (8.00 น. ถึง 22.00 น.) ไม่ได้รับแสงสว่าง 10 ชั่วโมง (22.00 น.ถึง 8.00 น.)ให้อาหาร (CP 082) และน้ำตลอดเวลา วงจรแสงที่ใช้ในการควบคุมนี้ มีผลต่อหนูโดยมีผลต่อการตกไข่ อายุของหนูที่นำมาใช้ในการทดลองอยู่ในช่วง 2 ถึง 6 เดือน ตรวจสอบระยะการตกไข่ให้สม่ำเสมออย่างน้อย 2 รอบก่อนนำมาใช้ทำการทดลอง การตรวจสอบการตกไข่ทำได้โดยใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้กดลงไปเบาๆ บริเวณสองข้างของช่องคลอด สังเกตดูว่ามี เมือกข้นเหนียว สีเหลือง มีกลิ่นแรงออกมาจะนับเป็นวันแรกของวงจร วงจรการตกไข่ของหนูชนิดนี้มีระยะเวลา 4 วันในวันที่ 2-4 ของวงจรอาจพบเมือกข้นหรือไม่ก็ได้ ถ้าหากพบก็จะมีปริมาณน้อยกว่าในวันแรก วงจรนี้จะสม่ำเสมอเป็นเวลาหลายเดือนในสภาพแวดล้อมเช่นเดิม ทำการกระตุ้นให้ไข่สุกหลายใบโดยการฉีด Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) ปริมาณ 30 IU ทาง intraperitoneal ในเช้าวันแรกของวงจรการตกไข่(9.00 -11.00 น.) ตามด้วยการฉีด Human Chorionic Gonadotropin (HCG) ปริมาณ 25 IU ทาง intraperitonealในตอนกลางคืนของวันที่ 3 ของวงจรการตกไข่(22.00 -23.00 น.)เพื่อกระตุ้นการตกไข่ การทดลองหนึ่งครั้งจะใช้หนู 3 ตัวหลังจากฉีด HCG ไป 16-18 ชั่วโมง (14.00 น-16.00 น.ของวันต่อไป) นำหนูมาสลบด้วย Ether แล้วฆ่าโดยวิธี cervical dislocation แล้วผ่าท้องแยกเอาท่อนำไข่ใส่ลงใน BWW(Biggers-Whitten-Whittingham)(รูป 2 และ 3)ในระหว่างการเตรียมไข่ควรให้ไข่ได้รับแสงจากหลอดไฟฟ้าน้อยที่สุด หรือหากจะได้รับแสงก็ควรเป็นแสงสีแดง เพราะแสงจะไปรบกวนต่อขบวนการ meiosis และ pronuclear (Hirao and Yanagimachi, 1978) นำท่อนำไข่ที่ได้มาล้างเลือดออกด้วย BWW ทำการกรีดท่อนำไข่ในส่วนที่มีลักษณะโป่งและใสกว่าบริเวณอื่นจะได้ cumulus cell mass(รูป 4) แล้วนำไปใส่ใน 0.1% Hyaluronidase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

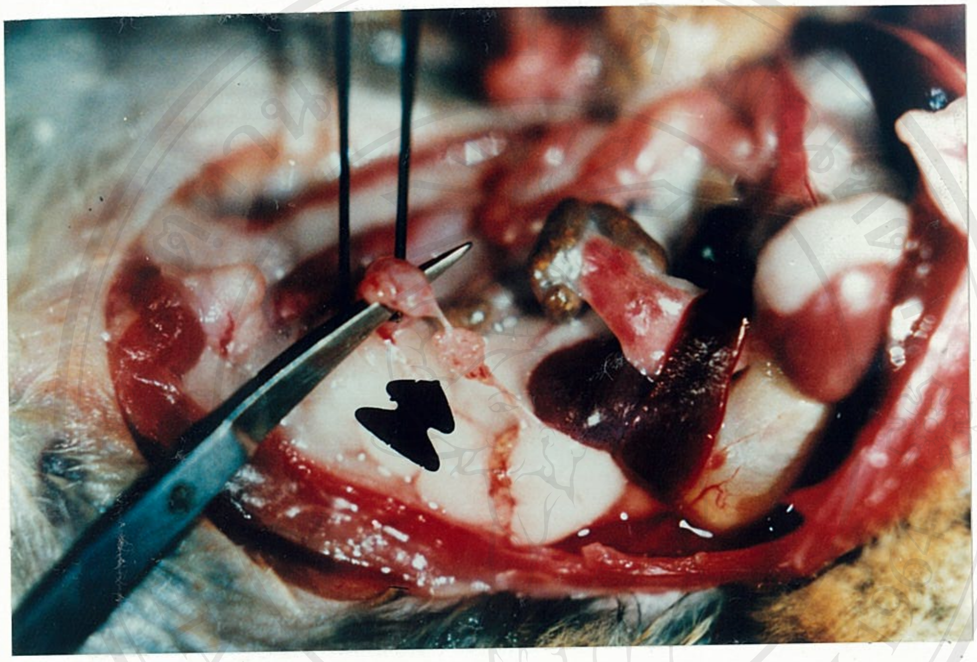
โดยใช้ pasteur pipette เพื่อย่อย cumulus cell ใช้เวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 10-15 นาที แยกไข่ที่หลุดออกมาจาก cumulus cell ไปใส่ยัง BWW โดยใช้ micropipette ดูดรวบรวมไข่ไว้ (รูป 5) micropipette ที่ใช้นี้เตรียมโดยการเผาปลาย pasteur pipette แล้วดึงปลายให้ยาวออกและมีขนาดเล็กลง ทำการล้างไข่ด้วย BWW รวมทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อกำจัด cumulus cell ที่ติดมา และอาจจะทำให้เกิดการจับกันเป็นก้อนได้อีก หนูหนึ่งตัวจะเตรียมไข่ได้ประมาณ 30-70 ใบ จากนั้นนำไข่ไปใส่ในสารละลาย 0.1% Trypsin เพื่อย่อย zona pellucida(รูป 6) ใช้เวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 1 นาทีโดยสังเกตไข่จะพบว่าไข่มีลักษณะบิดเบี้ยวจากนั้นรีบล้างไข่ด้วย BWW รวมทั้งหมด 3 ครั้งไข่จะกลับมามีลักษณะกลมเช่นเดิมนำไข่ที่เตรียมได้ใส่ลงใน BWW ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใน 4-well multidish เติมตัวอสุจิที่เตรียมไว้ลงไปอีกประมาณ 100-200 ไมโครลิตร(ตัวอสุจิ 10^5-10^6 ตัว/ไมโครลิตร) คลุมทับด้วย light mineral oil ไม่ควรให้ไข่อยู่ใกล้กันเป็นกลุ่มเพราะจะทำให้ไข่ติดกันได้ จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้อบ CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอสุจิเจาะเข้าไปเวลาที่ใช้ในการเตรียมไข่ตั้งแต่แยกท่อนำไข่ออกมาจากตัวหนูจนกระทั่งอยู่ใน 4-well multidish ไม่ควรเกิน 45 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



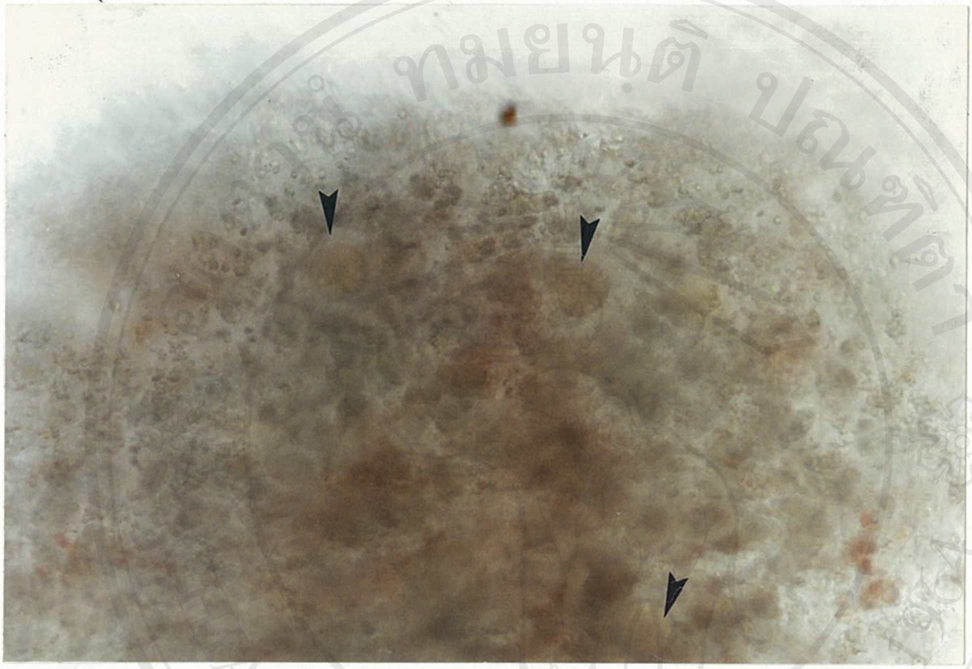
รูป 2 แสดงท่อนำไข่ในช่องท้อง (ลูกศรชี้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



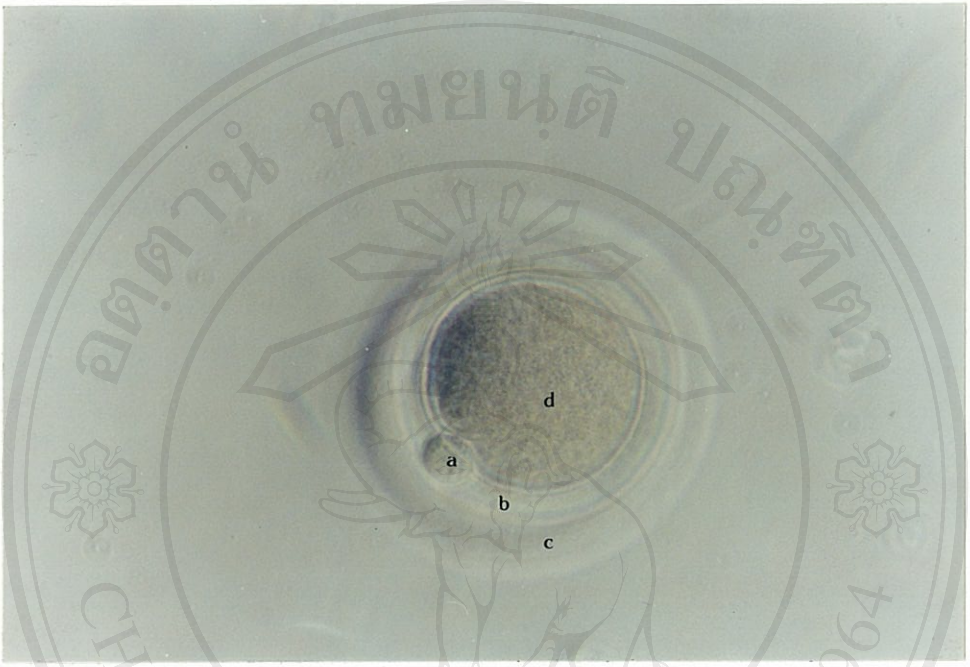
รูป 3 แสดงการตัดแยกท่อนำไข่ (ลูกศรชี้)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 4 แสดง cumulus cell mass ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่
(ลูกศรชี้แสดงเซลล์ไข่)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 5 แสดง free egg

a = polar body

b = vitelline space

c = zona pellucida

d = ovum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 6 แสดงไข่ที่ไม่มี zona pellucida

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมตัวอสุจิ

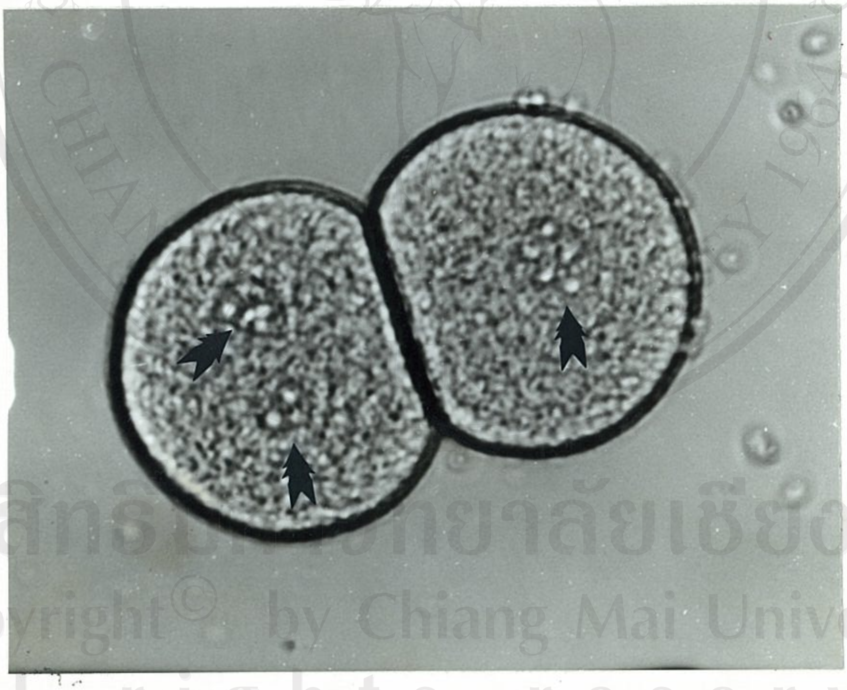
ทำการเก็บน้ำอสุจิจากอาสาสมัครโดยใช้ขวดที่สะอาดปราศจากเชื้อโรค โดยวิธี masturbationโดยอาสาสมัครงดเว้นการหลั่งน้ำอสุจิอย่างน้อย 48 ชั่วโมงก่อนให้ตัวอย่างน้ำอสุจิ นำน้ำอสุจิที่ได้มาทิ้งไว้ให้ liquefy ประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาตรวจสอบ ปริมาตร ความเข้มข้น และเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ แบ่งน้ำอสุจิที่ liquefy ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มล. แล้วค่อย ๆ หยด BWW ลงไปเหนือชั้นน้ำอสุจิในปริมาตร 2 มล. ปิดฝาหลอดทดลอง นำไปวางเอียง 45 องศา ที่อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณ CO_2 5% ความชื้น 95% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอสุจิว่ายขึ้นมาอยู่ในชั้น BWW เป็นการแยกตัวอสุจิจาก seminal plasma เรียกการแยกอสุจิโดยวิธีนี้ว่า Swim-up technique หลังจากครบเวลาก็นำมาดูดชั้น BWW รวมกันใน Centrifuge tube โดยระวังอย่าให้ตะกอนส่วนล่างติดมา นำไปปั่นที่ 1,600 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องจากนั้นดูดน้ำส่วนบนทิ้งนำตะกอนไปปั่นล้างอีกครั้งด้วย BWW เพื่อกำจัด Seminal fluid ที่อาจจะมีผลรบกวน capacitation หลังจากนั้นปรับจำนวนตัวอสุจิให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 ตัว/มล.แล้วเก็บไว้ใน Centrifuge tube ที่มีฝาปิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้อบ CO_2 เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมงเพื่อให้มี capacitation ก่อนนำไปผสมกับไข่หนู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบการเจาะเข้าไปในไข่ของตัวอสุจิ

ในการทดลองนี้จะตรวจสอบการเจาะเข้าไปในไข่ของตัวอสุจิเฉพาะในการทดลองที่มีปัญหา เช่น มีเม็ดเลือดขาวมากในน้ำอสุจิ การตรวจสอบทำได้โดย

หลังจากปล่อยให้ไข่และตัวอสุจิอยู่ด้วยกันเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการแยกไข่จำนวน 10-15 ใบมาล้างด้วย Ham's F10 เพื่อกำจัดตัวอสุจิที่ติดมาด้วย นำไข่ใส่ในหยดของ Ham's F10 บนสไลด์ วาง soft wax ลงบน 4 มุมของ cover slip กด cover slip ลงบนสไลด์เบา ๆ เพื่อให้ไข่แบนพอที่จะสังเกตได้ด้วยกล้อง phase contrast กำลังขยาย 400 เท่า ถ้าตัวอสุจิเจาะเข้าไปในไข่จะพบว่าส่วนหัวของตัวอสุจิจะบวมโตภายในครึ่งชั่วโมงหลังการเจาะเข้าไปอาจพบตัวอสุจิหลายตัวในไข่ใบเดียวอาจพบลักษณะ pronuclear คือกลมและมี nucleoli มากมายข้างในโดยจะเห็นเป็นลักษณะจุดสีดำขนาดต่าง ๆ กัน (รูป 7)



รูป 7 แสดง pronuclei (ลูกศรชี้)ในเซลล์ไข่ (4200x)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพาะเลี้ยง

หลังจากให้ตัวอสุจิผสมกับไข่นานครบ 3 ชั่วโมงนำไข่มาล้างตัวอสุจิส่วนเกินออกด้วย Ham's F10 ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำไปใส่ใน 4-well multidish ที่มี Ham's F10 อยู่ 300 ไมโครลิตรคลุมทับด้วย light mineral oil ระวังอย่าให้ไข่เกาะกลุ่มกัน นำไปเก็บไว้ในตู้อบ CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 13-14 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไข่ใส่ใน Ham's F10 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มี Colcemid อยู่ 4.0ไมโครกรัม/มล. คลุมทับด้วย light mineral oil จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้อบ CO_2 ที่ 37 °Cเป็นเวลา 4-7 ชั่วโมง

การเตรียมโครโมโซม

สไลด์ที่ใช้ควรจะทำความสะอาดด้วยเอธานอล 95% และ dish ที่ใช้ในการเตรียมต้องเคลือบด้วย hypotonic solution เพื่อป้องกันไข่เกาะติดผิวของ dish โดยหยด hypotonic solution ลงไป ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องครึ่งชั่วโมงแล้วดูดออก hypotonic ที่ใช้คือ 1% sodium citrate ที่มี bovine serum albumin 3 มก./มล. ดูดไข่จำนวน 10-20 ใบ นำมาล้างใน hypotonic solution ทั้งหมด 3 ครั้งเพื่อกำจัด mineral oil (ถ้าหากมี oil มากไปจะมีผลต่อการ fix ไข่และการกระจายของโครโมโซม) จากนั้นแช่ไข่ไว้ใน hypotonic ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที แล้วย้ายไข่มาวางบนสไลด์โดยให้มีปริมาณ hypotonic ติดมาน้อยที่สุดเพราะถ้าหากมี hypotonicมากเกินไปจะมีผลต่อการ fix และการย้อมโครโมโซม ก่อนวางไข่ลงบนสไลด์ หยด fixative ลงไปก่อนประมาณ 40 ไมโครลิตร fixative ที่ใช้เป็นเอธานอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

95% ผสมกับ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 และเก็บในตู้เย็นที่ 4°C ก่อนใช้แล้ววางไข่ลงไปทันทีโดยวางอย่างเบาและช้าเพื่อป้องกันไข่แตก ใช้ปากเป่าเบาๆเพื่อให้โครโมโซมกระจายในช่วงนี้เราสามารถจะใช้ดินสอเขียนแก้ววงบริเวณที่ไข่อยู่ เมื่อ fixative เริ่มแห้ง ก็หยด fixative ตามลงไปอีก 20 ไมโครลิตร ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 3 ครั้ง โดยระหว่างการหยดแต่ละครั้งควรใช้ปากเป่าเบา ๆ บนสไลด์ โดยเฉพาะหยดสุดท้ายจะใช้ปากเป่าเบา ๆ จนแห้งโดยถือสไลด์ ห่างจากปากประมาณ 6 นิ้ว การหยด fixative ลงบนสไลด์ แต่ละครั้งควรหยดให้ห่างจากสไลด์ ประมาณ 1 เซนติเมตร และการหยดแต่ละครั้งจะใช้กระดาษทิชชูซับรอบๆบริเวณที่ fixative แผ่ออกไป นอกจากนี้ fixative และ hypotonic solution ที่ใช้ จะต้องเตรียมในวันที่ใช้เตรียมโครโมโซม สไลด์ที่เตรียมเสร็จแล้วนำมาตรวจสอบโครโมโซมโดยใช้กล้อง phase contrast ถ้าพบว่าโครโมโซมกระจาย มากเกินไปอาจเกิดจาก

1) หยด fixative มากเกินไป

2) เป่าแรงเกินไป

3) ปล่อยไข่วางบนสไลด์แรงเกินไป

ถ้าโครโมโซมกระจายน้อยเกินไปอาจเกิดจาก

1) เวลาที่ให้ไข่อยู่ใน hypotonic solution น้อยเกินไป

2) เช็ด fixative ใกล้โครโมโซมเกินไป อาจแก้โดยเช็ดเมื่อ fixative แผ่ออกไปกว้างขึ้น

3) การเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมยังไม่เหมาะสมกับเวลาที่เตรียมในขณะนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การย้อมสีโครโมโซม

Q-banding technique มีขั้นตอนการย้อมดังนี้

ดัดแปลงจากวิธีของ Martin ค.ศ.1983

1) ทิ้งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 อาทิตย์
2) นำสไลด์ไปแช่ในเอธานอล 95% 5 นาที
3) แช่ในเอธานอล 70% 5 นาที
4) แช่ในเอธานอล 50% 5 นาที
5) แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที
6) ล้างด้วย working McIlvaine's buffer (น้ำกลั่น 9 ส่วน และ McIlvaine's buffer 1 ส่วน) 3 ครั้ง
7) แช่ใน 0.5% Quinacrine dihydrochloride 20 นาที
8) ล้างด้วย working McIlvaine's buffer 3 ครั้ง
9) ปิดด้วย cover glass แล้ว seal ด้วยสีทาเล็บ
10) นำไปตรวจวิเคราะห์โดยใช้กล้อง fluorescent

G-banding technique มีขั้นตอนการย้อมดังนี้

ดัดแปลงจากวิธีของ Benet และคณะ ค.ศ.1986

1) ทิ้งสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 37 วัน
2) นำสไลด์ไปแช่ใน 2xSSC ที่ 65 °C 7 นาที
3) แกว่งสไลด์ใน 0.5% Trypsin ที่ 37 °C 16 วินาที (ถ้าเมทาเฟสมีไซโทพลาสซึมมากจะใช้เวลานานมากขึ้น)
4) ย้อมสีด้วย 2% GIEMSA'S solution 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การตรวจวิเคราะห์โครโมโซม</u>

ตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescent ถ้าเป็นสไลด์ที่ย้อมวิธี Q-bands และใช้ light microscope ถ้าเป็นสไลด์ที่ย้อมวิธี G-bands

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved