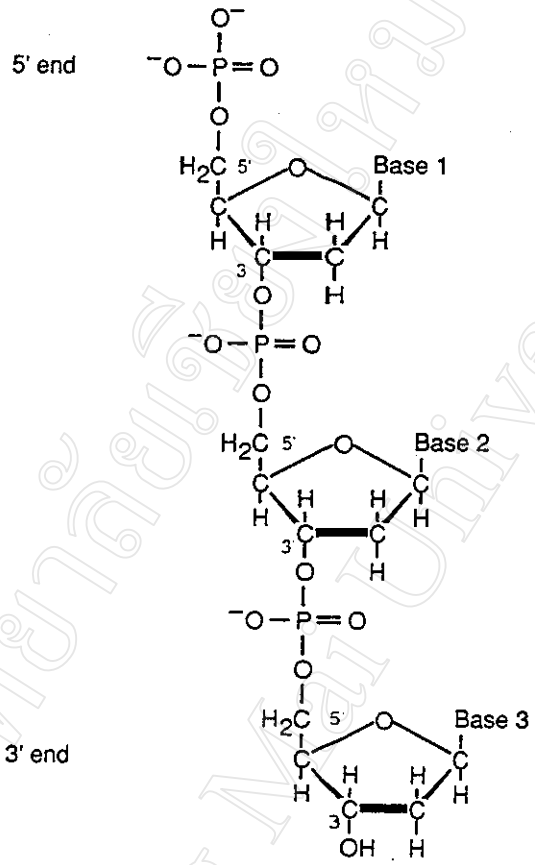
บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาความถี่ของความผิดปกติของโครโมโซม 13, 18, 21, X และ Y ในตัวอสุจิ โดยวิธี Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) ด้วยการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับโครโมโซม 13, 18, 21, X และ Y นำไปไฮบริไดซ์บนตัวอสุจิซึ่งได้จากอาสาสมัครในกลุ่มผู้มีบุตรยาก อายุระหว่าง 22-39 ปี ที่มีปริมาณตัวอสุจิในน้ำอสุจิอยู่ระหว่าง 46 ถึง 210 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ที่มารับบริการการตรวจที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โครงสร้างพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก

กรดนิวคลีอิกเป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid หรือ DNA) และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid หรือ RNA) ประกอบด้วยโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์มาต่อกันเป็นเส้นยาวต่อๆ กันเป็นโมเลกุลใหญ่ เรียกว่า Polynucleotide

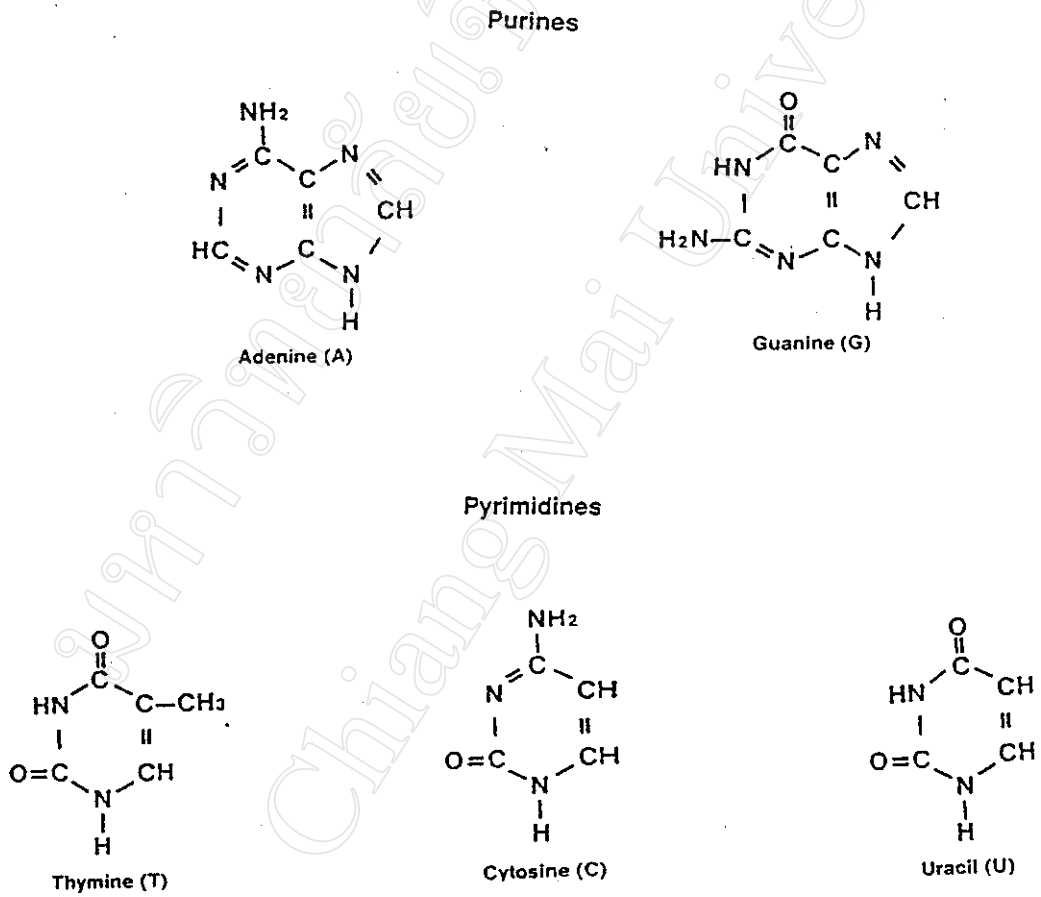


รูปที่ 7 แสดงโมเลกุลของ DNA (Thompson และคณะ, 1991)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

โครงสร้างพื้นฐานของนิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

1. เบสไพริมิดีน (Pyrimidine) base) หรือ เบสพิวรีน (Purine base)
   - เบสไพริมิดีน แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ไซโตซีน (cytosine ใช้อักษรย่อ C) ไธมีน (thymine ใช้อักษรย่อ T) และ ยูราซิล (uracil ใช้อักษรย่อ U) ซึ่งเบสไซโตซีนและไธมีนพบใน DNA ส่วนเบสไซโตซีนและยูราซิลพบใน RNA
   - เบสพิวรีน (Purine base) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ อะดีนีน (Adenine ใช้อักษรย่อ A) และกวานีน (Guanine ใช้อักษรย่อ G) ซึ่งพบได้ทั้งใน DNA และ RNA



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของเบสไพริมิดีนและพิวรีน (Thompson และคณะ, 1991)

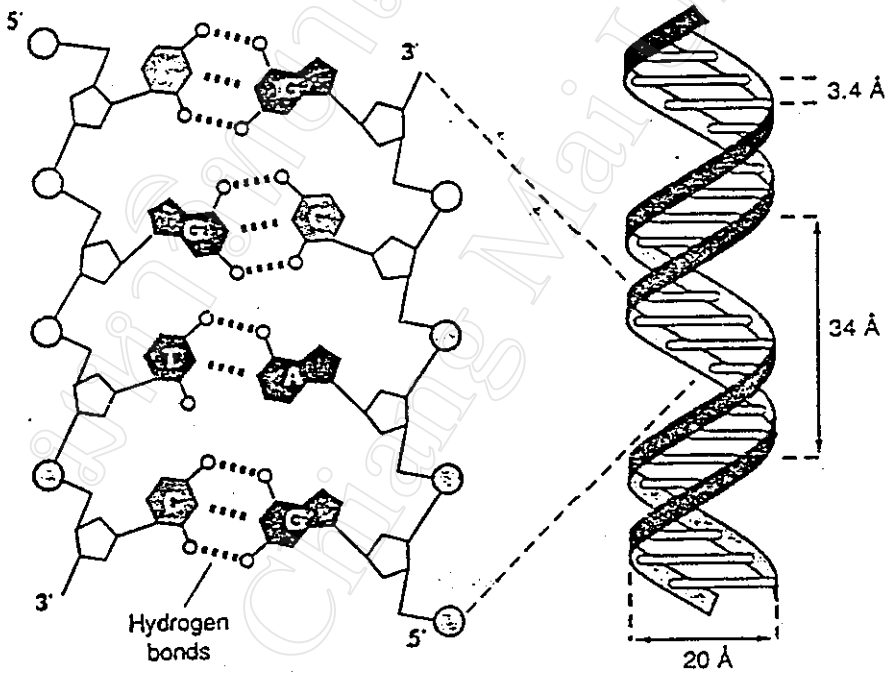
2. น้ำตาลเพนโตส (Pentose sugar)
น้ำตาลเพนโตสใน DNA คือ deoxyribose ส่วนใน RNA คือ ribose

3. กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid)
เบสในนิวคลีโอไทด์จับกับน้ำตาลเพนโตสด้วยพันธะ glycosidic bond ส่วนโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์เชื่อมต่อกันด้วย 3′, 5′ phosphodiester bond โมเลกุลที่สมบูรณ์ของ DNA ประกอบด้วย polynucleotide chain 2 เส้น ยึดเกาะกันโดยพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบส โดยพันธะไฮโดรเจนนี้จะมีความจำเพาะเจาะจง คือ กวานีนกับไซโตซีน (G-C) และอะดีนีนกับไธมีนเท่านั้น มีการบิดตัวเป็นเกลียวคล้ายบันไดวน ซ่อนเบสไว้ด้านใน หันแกนน้ำตาล-ฟอตเฟตออกด้านนอก โดยลักษณะนี้จึงทำให้เกิดเป็นโมเลกุลแบบเกลียวคู่ (double helix) แต่ละสายที่ประกอบเป็นเกลียวคู่นั้นเรียกว่า สาย Watson และสาย Crick ตามชื่อนักวิทยาศาสตร์ 2 ท่านที่เสนอแบบโครงสร้างนี้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

หลักการพื้นฐานของ Nucleic Acid Hybridization

เมื่อทำให้ DNA สายคู่สูญเสียสภาพ (denature) โดยการใช้ความร้อนหรือการใช้สารเคมี เช่น ด่าง หรือ formamide DNA สายคู่จะแยกออกจากกัน (dissociation) เป็นสายเดี่ยว และเมื่อทำให้ DNA นั้นกลับคืนสู่สภาพเดิม (renature) โดยการลดอุณหภูมิหรือขจัดสารเคมีดังกล่าวออกไป DNA สายเดี่ยวจะกลับมาจับคู่ (hybridize) กันเป็น DNA สายคู่ดังเดิม การจับคู่กันเกิดได้ทั้ง DNA กับ DNA หรือระหว่าง DNA กับ RNA รวมทั้ง RNA กับ RNA ที่มีเบสคู่สมกัน (complementary) โดยลักษณะของสายคู่ที่จับกันจะเป็นแบบ antiparallel สายหนึ่งมีทิศทางของ phosphodiester bond จาก 5′ ไป 3′ ส่วนอีกสายหนึ่งมีทิศทางจาก 3′ ไป 5′



รูปที่ 9 ภาพซ้ายโมเลกุลของ DNA สายคู่ มีทิศทางเป็นแบบ antiparallel โดยสายหนึ่ง มีทิศทางจาก 5′ ไป 3′ อีกสายหนึ่งมีทิศทางจาก 3′ ไป 5′ base pairs ทั้งสองสายจะ complementary กัน โดย A จับกับ T และ G จับกับ C โดยพันธะ Hydrogen bords ภาพขวา polynucleotide 2 สาย (สาย Watson และสาย Crick) มีการบิดตัวเป็นเกลียวคล้ายบันไดวน (double-helix) ขั้นบันไดแทน bases ที่จับคู่กัน (Thompson และคณะ, 1991)

hydrogen bond ซึ่งเกิดจากเบสที่เป็นคู่สมกัน เป็นแรงสำคัญที่ยึดให้กรดนิวคลิอิกทั้งสองสายอยู่เป็นคู่ โดยเบสอะดินีนจับคู่กับไธมีน (ใน DNA) หรืออะดินีนกับยูราซิล (ใน RNA) ด้วย hydrogen bond 2 bonds และเบสกวานีนจับกับไซโตซีนด้วย hydrogen bond 3 bonds การ hybridization เกิดเป็นสายคู่ หรือ hybrid จะเกิดได้ดีและมีความเสถียร (stability) มากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับจำนวนเบสคู่สมบนกรดนิวคลิอิกทั้งสองสายมีมากน้อยเพียงใด ถ้ากรดนิวคลิอิกทั้งสองสายมีลำดับเบสคู่สมอย่างสมบูรณ์ hybrid จะเกิดได้ดีและมีความเสถียรสูง แต่ถ้ากรดนิวคลิอิกมีลำดับเบสคู่สมไม่สมบูรณ์ ความเสถียรลดลง โอกาสเกิดและความเสถียรของ hybrid จะขึ้นกับสภาวะในขณะนั้นว่าเป็นเช่นไร เรียกสภาวะที่เป็นตัวกำหนดโอกาสเกิดความเสถียรของ hybrid นี้ว่า stringency ซึ่งถูกกำหนดโดยอุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออน ความยาวของกรดนิวคลิอิก และสารเคมีจำพวกที่ helix-destabilizing เช่น formamide ที่ผสมใน hydridization buffer ในสภาวะ high stringency จะมีเฉพาะกรดนิวคลิอิกที่มีลำดับเบสคู่สมอย่างสมบูรณ์ กรดนิวคลิอิกทั้งที่มีลำดับเบสคู่สมอย่างสมบูรณ์และที่แตกต่างกันมาก สามารถจับคู่เกิด hybrid ได้ ความเสถียรของ hybrid ยังขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเบสคู่สม คือเมื่อเปรียบเทียบ hybrid ที่มีตำแหน่งเบสคู่สมอยู่ใกล้กันหรืออยู่ติดๆ กัน จะมีความเสถียรมากกว่า hybrid ที่มีตำแหน่งเบสคู่สมที่อยู่กระจายห่างกัน

Nucleic acid probes

Nucleic acid probes คือชิ้นส่วนของ DNA หรือ RNA ที่ถูกติดฉลาก (label) ด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดกัมมันตภาพรังสี เพื่อนำไป hybridize กับกรดนิวคลิอิกเป้าหมายที่มีเบสคู่สมกับ probes การที่ต้องติดฉลาก probes เพื่อทำให้สามารถตรวจผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ probes อาจมีความยาวแตกต่างกันตั้งแต่ 20-1000 เบส probes ที่มีความยาวไม่เกิน 50 เบส เรียกว่า probe สายสั้น หรือ oligonucleotide probes probes ที่มีความยาวมากกว่า 50 เบส เรียกว่า probe สายยาว หรือ polynucleotide probes probes สายสั้นมีความจำเพาะสูงกว่าและระยะเวลาในการ hybridize สั้นกว่า probes สายยาว แต่ probes สายยาวมีความไวสูงกว่า

การติดฉลาก probes สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือตัวติดฉลากเป็นสารรังสีหรือสารปลอดรังสี ปัจจุบันเกือบทั้งหมดเปลี่ยนมาใช้สารปลอดรังสีแม้ว่าสารรังสีจะมีความไวสูง แต่มีข้อเสีย มีอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้ร่วมงาน สภาพแวดล้อม สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงในการเก็บและจัดกากรังสี และขณะเดียวกันได้มีการพัฒนาการตรวจที่ใช้สารปลอดรังสีให้มีความไวสูงขึ้น

- ตัวติดฉลากชนิดสารรังสี ใช้ไอโซโทปของธาตุที่มีคุณสมบัติปลดปล่อยรังสี เรียกว่า radionuclides โดยนำเอา radionuclides เหล่านี้เข้าไปแทนที่ตัวไอโซโทปในธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบของ nucleoside triphosphate ตัวอย่างเช่น Tritium (^{3}H) หรือ ^{32}P

- ตัวติดฉลากชนิดสารปลอดรังสี ได้แก่ dinitrophenol (Keller และคณะ, 1988) 5-Bromodeoxyuridine (Traincard และคณะ, 1983), biotin (Langer และคณะ. 1981) fluorescent dye (Urdea และคณะ, 1988), digoxigenin (Holtke และคณะ, 1990)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การเตรียมดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA)

วิธีการเตรียมดีเอ็นเอเป้าหมายนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และรูปแบบที่ต้องทำและลักษณะของตัวอย่างที่จะตรวจด้วย จุดสำคัญต้องเตรียมดีเอ็นเอเป้าหมายให้มากพอและต้องคำนึงถึงคุณภาพของเซลล์หรือเนื้อเยื่อว่ายังคงอยู่ในสภาพเดิม

ปัจจัยที่มีผลต่อการ hybridization

อุณหภูมิ

เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วของการ hybridization ที่อุณหภูมิต่ำ อัตราเร็วการ hybridization จะต่ำ และโอกาสเกิด hybridization ข้ามพวก (cross hybridization) กับสายกรดนิวคลิอิกที่คล้ายคลึงกันเกิดเป็น mismatched hybrid จะมีมาก อัตราเร็วสูงสุดของการ hybridization ระหว่าง DNA-DNA hybrid จะเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า Tm ประมาณ 20-25°C (Tm = melting temperature หมายถึงอุณหภูมิที่ hybrid จำนวน 50% แยกตัวออกเป็นสายเดี่ยว) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นกว่านี้ อัตราการ hybridization จะลดลง เนื่องจาก hybrid จะเริ่มแยกตัวออกจากกันในกรณี DNA-RNA hybrid อัตราเร็วสูงสุดจะอยู่ที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า Tm ประมาณ 10-15°C

ความเข้มข้นของอิออน

ความเข้มข้นของอิออนใน hybridization buffer มีผลต่อความเร็วของการ hybridization มากเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Na^+ ในช่วง 0-0.1 M แต่มีผลน้อยมากเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Na^+ ในช่วง 1.0-1.5 M อัตราเร็วสูงสุดของการ hyridization จะเกิดเมื่อมี Na^+ เท่ากับ 1.5 M

Mismatches

สายของกรดนิวคลิอิกที่มีลำดับเบสคู่สมอย่างสมบูรณ์ จะมีอัตราเร็วของการ hybridization เร็วกว่าของสายกรดนิวคลิอิกที่มีลำดับเบสคู่สมไม่สมบูรณ์

ความหนืด

การเพิ่มความหนืดของ hybridization buffer จะลดอัตราเร็วใน hybridization ลง น่าจะเกิดจากการลดอัตราการปะทะ (collision) ของเบสคู่สมลง (Wetmur and Dauidson, 1968)

การเติมสาร inert polymer ได้แก่ dextran sulfate (Wahl, Stern and Stark, 1979) และ polyethylene glycol (PEG) (Amasino, 1986)

Formamide

จัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติลดค่า Tm ของ hybrid ทำให้มีผู้นิยมใส่ formamide ร่วมไปใน hybridization buffer เพื่อให้สามารถทำการ hybridization ในอุณหภูมิที่ต่ำลง ซึ่งมีผลดีคือ probe จะมีความเสถียรมากขึ้น การหลุดของกรดนิวคลิอิกเป้าหมายจากสไลด์หรือแผ่นค้ำจุนจะลดลง ปริมาณของ formamide 30-50% มีผลต่อความเร็วของการ hybridization น้อยมาก formamide 20% ลดอัตราเร็วลง 1 ใน 3 และ formamide 80% ลดอัตราเร็วของ DNA-DNA และ DNA-RNA hybridization ลง 3 เท่า และ 12 เท่า ตามลำดับ

Probe complexity

กรดนิวคลิอิกที่มี complexity มากคือมีช่วงลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน (repetitive sequence) น้อย จะ hybridize ได้ช้ากว่ากรดนิวคลิอิกที่มี complexity น้อย คือมีช่วงลำดับเบสซ้ำ ๆ กันมาก

ความยาวของ probe

ในกรณี liquid phase hybridization อัตราเร็วของการ hybridization จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความยาวของกรดนิวคลิอิก

การตรวจผล (detection)

หลังจากทำการ hybridization ขั้นตอนสุดท้ายคือการตรวจผล ในปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1. ปฏิกิริยาแบบ chemiluminescence (Beck et al, 1989) และ bioluminescence (Hanber et al, 1989)

Chemiluminescence เป็นปฏิกิริยาที่มีการปลดปล่อยแล้วจากปฏิกิริยาเคมีที่มีการสลายตัวของสารไม่เสถียรไปเป็นสารเสถียร ซึ่งสามารถบันทึกผลด้วยฟิล์มเอกซ์เรย์ ปฏิกิริยา bioluminescence เป็นปรากฏการณ์ธรรมชาติที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Herring et al, 1987) แต่ละชนิดมีปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์สับสเตรท cofactors ตลอดจนกลไกการปลดปล่อยแสงที่แตก

ต่างกันออกไปทั้ง chemiluminescence และ bioluminescence เป็นปฏิกิริยาที่มีความไวสูงมาก ขั้นตอนง่าย รวดเร็ว เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย

2. ปฏิกิริยาแบบเกิดสี (Colorimetric reaction)

เป็นปฏิกิริยาการตรวจผลที่ใช้เอนไซม์ไปย่อยสับสเตรทเกิดผลผลิตที่มีสี อาจเป็นแบบละลายน้ำหรือแบบไม่ละลายน้ำก็ได้ แล้วแต่แบบการทดลอง เช่น 4-nitrophenyl phosphate (PNP) เป็น สับเสตรทของ AP เมื่อ PNP ถูกดึงหมู่ฟอสเฟตออกโดย AP จะให้สีเหลืองถึงเขียว 2, 2′-azino-bis (3-ethybenz-thiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) และ 3, 3′-5, 5′-tetramthylgenzidine (TMB) เป็นสับสเตรทของ horseradish peroxidase ปฏิกิริยาการย่อย ABTS จะเกิดสีเขียว 5′bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) และ nitroblue tetrazolum chloride (NBT) เป็นสับเสตรทของ AP ผลผลิตจะได้ตะกอนสีน้ำเงินหรือม่วงแก่

3. ปฏิกิริยาแบบ fluorescence

ใช้กันมากในงาน fluorescent in situ hybridization (FISH) (Lichter et al, 1992) โดยการติดฉลากที่ probe หรือ binding proteins ด้วยสารเรืองแสง (fluorophore) แล้วดูผลด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์ สารเรืองแสงที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC) จะเรืองแสงสีเขียว rhodamine หรือ Texas red จะเรืองแสงสีแดง และถ้าเป็น coumarin จะเรืองแสงสีฟ้า ทั้งนี้ในการตรวจวิเคราะห์ต้องใช้ฟิลเตอร์ที่เหมาะสมจึงจะเห็นสัญญาณที่ชัดเจน (Hozier and Davis, 1992)

หลักการทำงานของกล้องฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope)

เมื่อสารถูกกระตุ้นด้วยแสง (excitation energy) อิเล็กตรอนภายในสารเมื่อถูกกระตุ้นจาก ground stage ไปสู่ excited stage จะคายพลังงานออกมาจำนวนหนึ่งในรูปพลังงานแสง คือ fluorescence เพื่อกลับเข้าไปใน ground stage ตามเดิม ปฏิกิริยานี้เรียกว่า luminescence

ลักษณะเฉพาะของ Fluorescnece

1. สารมีความสามารถในการดูดกลืนแสงเพื่อปล่อยออกมาเป็นแสง fluorescence
2. ความยาวคลื่น (wave length) ของ fluorescence จะยาวกว่าความยาวคลื่นของแสงที่มากระตุ้น (excitation light) ตามกฎของ Strokes' low

$$\lambda \text{ em} > \lambda \text{ ex}$$

3. ความเข้ม (intensity) ของ fluorescence จะน้อยกว่าของแสงกระตุ้น (excitation light)
4. fluorescent จะกระจายตัว (radiates) ในรูปวงรี (spherical) จากสาร emitting substance) โดยไม่ขึ้นอยู่กับทิศทางของแสงที่มากระตุ้น (excitation light)
5. แสง fluorescent ความชัดเจนจะลดลงได้ (Fading)
6. สารแต่ละชนิดจะให้ fluorescnece spectrum เฉพาะของสารนั้น ๆ
7. Absorption spectrum และ fluorescence spectrum มีความสัมพันธ์กันในภาพการสะท้อน (reflected images)

หลักพื้นฐานใหญ่ของการทำงานของ Fluorescence

1. มีแสงที่มีความยาวคลื่นช่วงหนึ่งเท่านั้นที่กระตุ้น (exciting light) ให้สารปล่อยพลังงานแสง (light emission) ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด
2. มีแสง fluorescence บางส่วนเท่านั้นที่จำเป็นสำหรับการศึกษาหรือ photomicrography ดังนั้นการเลือกความยาวคลื่นแสงจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ฉะนั้นฟิลเตอร์ (filter) จึงมีบทบาทสำคัญในการทำงานของกล้องฟลูออเรสเซนซ์ ส่วนประกอบที่สำคัญของกล้องฟลูออเรสเซนซ์

2.1 แหล่งกำเนิดแสง (light source) จะให้แสงซึ่งมีความยาวคลื่นแตกต่างกันจาก ultraviolet ไปถึง infrared

2.2 Excitation filter ฟิลเตอร์ชนิดนี้จะคัดเลือกแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสมให้ผ่านไปกระตุ้นยังสารตัวอย่างให้ปล่อยแสง fluorescence ออกมา ซึ่งคลื่นแสงที่ถูกคัดเลือกส่วนใหญ่จะมีความยาวคลื่นช่วงสั้น ส่วนคลื่นช่วงอื่นจะถูกตัดไป

2.3 สารตัวอย่าง (fluorescent specimen) สารตัวอย่างที่ต้องการศึกษาจะมีสาร fluorescence ติดอยู่ ซึ่งสารนี้จะมีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยา illumination ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา

2.4 Barrier filter ฟิลเตอร์ชนิดนี้จะทำหน้าที่คัดเลือกเฉพาะแสง fluorescence บางความยาวคลื่นให้ผ่านได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างน้ำอสุจิอยู่ในเกณฑ์ปกติของ WHO (1992) ของชายจำนวน 11 ราย จากห้องปฏิบัติการชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของน้ำอสุจิของอาสาสมัคร 11 ราย

กลุ่มตัวอย่าง (ราย)	Volumn (ML)	Concentration X 10^6/ml	Progressive Motility (%)	Normal Morphology (%)
1. อายุ 31 ปี	2.7	106	30	55
2. อายุ 22 ปี	2.0	90	30	55
3. อายุ 39 ปี	4.0	92	30	55
4. อายุ 34 ปี	2.0	160	30	50
5. อายุ 37 ปี	4.0	111	30	50
6. อายุ 29 ปี	1.5	46	25	60
7. อายุ 32 ปี	3.0	192	25	60
8. อายุ 38 ปี	2.0	62	30	55
9. อายุ 26 ปี	3.0	210	20	50
10. อายุ 34 ปี	3.8	150	25	50
11. อายุ 31 ปี	3.1	160	30	55

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

วิธีทำการทดลอง

การแยกกลุ่มอสุจิ

นำน้ำอสุจิที่ตั้งทิ้งอุณหภูมิห้องให้เหลว (ไม่เกิน 24 ชั่วโมง) นำมาแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งคืออสุจิก่อนการแยกชั้นอสุจิ (กลุ่ม control) จำนวนประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ไว้ในหลอดทดลอง ส่วนที่สองประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Biggers-Whitten- Whittingham (BWW) ประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยหยดอย่างระมัดระวังไม่ให้สารละลายไปผสมปนกับน้ำอสุจิที่อยู่เบื้องล่าง แล้วนำหลอดทดลองไปตั้งเอียง 45 องศา นาน 1 ชั่วโมง ตัวอสุจิส่วนหนึ่งจะว่ายขึ้นไปที่สารละลาย (กลุ่ม swim up) เรียกการแยกอสุจิโดยวิธีนี้ว่า Swim-up technique หลังจากครบ 1 ชั่วโมงดูดชั้นสารละลาย BWW ใส่ลงในหลอดทดลองโดยระวังอย่าให้น้ำอสุจิส่วนล่าง (กลุ่ม neat) ติดมา นำน้ำอสุจิทั้งสามหลอดทดลองไปเติม Phosphate Buffer solution (PBS) ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นล้างที่ 1,600 rpm 10 นาที เพื่อให้อสุจิตกตะกอนแล้วดูด solution ส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งที่ปะปนมากับตัวอสุจิ แล้วจึงนำไปเตรียมสไลด์

รูปที่ 10 แสดงการแยกอสุจิโดยวิธี Swim-up technique

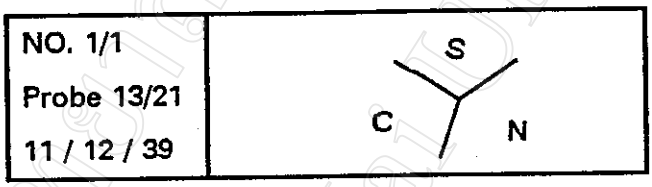
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การเตรียมสไลด์

สไลด์ที่จะใช้นำไปเคลือบน้ำยา AES (3-amino propyl-triethoxysilane) ก่อนเพื่อทำให้อสุจิติดกับสไลด์ดียิ่งขึ้นเนื่องจากการทำ *in situ* hybridization ต้องผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน เช่น การย่อยผนังเซลล์ด้วย Proteinase K และการล้างหลังการ hybridization อาจจะทำให้ตัวอสุจิหลุดจากสไลด์ได้

นำสไลด์ที่เคลือบด้วย AES แล้ว มากั้นแบ่งพื้นที่เป็น 3 ส่วน โดยใช้แถบกาวพลาสติกใส ใช้ปากกาปลายเพชรขีดเส้นแนวกั้นใต้สไลด์ตามแนวแถบกาวพลาสติกใส

นำตัวอย่างอสุจิแต่ละกลุ่มประมาณ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ smear บาง ๆ ให้เต็มพื้นที่สไลด์ ทิ้งสไลด์ที่ smear แล้วทิ้งให้แห้งอุณหภูมิห้องค้างคืน



รูปที่ 11 แสดงการกั้นแบ่งสไลด์ออกเป็น 3 กลุ่ม

C = กลุ่มก่อนการแยก (control)

S = กลุ่ม swim up (swim up)

N = กลุ่มอยู่ส่วนล่าง (neat)

การคลายความอัดแน่น (decondensation) ของโครมาติน (โครโมโซม) ในนิวเคลียสของตัวอสุจิ

1. จุ่มสไลด์ตัวอย่างอสุจิลงในสารละลาย 10 mM dithiotreitol (DTT) โดยวาง Coplin Jars ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที (Wyrobek และคณะ, 1990)
2. เมื่อครบเวลานำสไลด์มาจุ่มลงในสารละลาย 4 mM lithium diiodosalicylate (LIS) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง 30 นาที (Wyrobek และคณะ, 1990)

ย่อยผนังเซลล์

1. หยดสารละลาย 20 ไมโครกรัม proteinase K ใน 1 x PBS ให้ท่วมสไลด์ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที
2. หยุดปฏิกิริยาของ proteinase K โดยใช้ 0.2% glycine จุ่มสไลด์ลงใน 0.2% glycine ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

Denature target DNA

หยด denature solution 100 ไมโครลิตรบนสไลด์ ปิด cover slip นำไปอบที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส (slide thermocycle COY NO. II) นาน 5 นาที

Dehydrate target DNA

นำสไลด์มาจุ่มลงใน ethanol alcohol 70%, 85% และ absolute alcohol ตามลำดับครั้งละ 1 นาที ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

รูปที่ 12 แสดงขั้นตอนการ denature target DNA ใน slide thermocycle (COY NO. II)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

เตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe mixture)

Probes ที่ใช้มี 4 หลอด หลอดที่ 1 CEPX (Xp11.1-q11.1 spectrum orange) หลอดที่ 2 CEPY (Yq11.1-q11.1 spectrum green) หลอดที่ 3 CEPX/CEPY/CEP 18 (Xp11.1-q11.1 spectrum green, Yp11.1-q11.1 spectrum orange, 18p11.1-q11.1 spectrum aqua) หลอดที่ 4 LSI 13/21 (13q14 spectrum green, 21q22.13-q22.2 spectrum orange) ผสมโดยใช้ hybridization buffer 7 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 1 ไมโครลิตร DNA probes 2 ไมโครลิตร (probe X 1 ไมโครลิตร, probe Y 1 ไมโครลิตร) แต่สำหรับ probes ของโครโมโซม X/Y/18 และ 13/21 เป็น probe สำเร็จรูปทำการผสมเรียบร้อยแล้ว นำมาใช้ได้เลยโดยใช้ครั้งละ 10 ไมโครลิตร

Probe denaturation

- ใช้ mixed probe จำนวน 10 ไมโครลิตร incubate ที่ 75 องศาเซลเซียส (Thermocycle COY NO. II) นาน 5 นาที

Hybridization

หยด probes ที่ denatured แล้วหยดลงบนสไลด์ (target DNA ที่ denatured แล้ว) ปิด cover slip ขนาด 22 x 22 มิลลิเมตร ใช้ fixogum ปิดรอบขอบ ceverslip วางลงใน moist chamber หุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์เพื่อป้องกันแสงซึ่งอาจจะทำให้สาร fluorescein ที่ติดฉลากมากับ probes เกิดสีจางลงได้ นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator SL SHEL LAB) นาน 24 ชั่วโมง สำหรับ aneuscreen CEP X / CEP Y / CEP 18 และ CEP X / CEP Y แต่สำหรับ probes LSI 13/21 จะใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นำไป incubate นาน 24 ชั่วโมง

รูปที่ 13 แสดงการนำ moist chamber หุ้มกระดาษฟลอยด์ incubate ใน Incubator SL SHEL LAB ในขั้นตอน hybridization

การล้าง (Washing)

- เพื่อทำให้ probe ที่จับอยู่อย่างไม่จำเพาะหลุดออกไป
  - นำสไลด์มาแกะเอา coverslip ออก
  - จุ่มสไลด์ใน 0.4 x SSC ใน 0.3% NP-40 อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส (ใน waterbath SHEL-LAB Model 1202) นาน 2 นาที

    (สำหรับ probe LSI 13/21 ลดอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส)
  - จุ่มสไลด์ใน 2 x SSC ใน 0.1% NP-40 ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วินาที
  - ทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การย้อมสี (Counter stain)

- หยดสีย้อม DAPI (4′, 6-diamidine - 2′- Phenylindole Dihydrochloride) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิด cover slip ให้ DAPI ซึมจนเต็มพื้นที่ cover slip ทาขอบ cover slip ด้วยยาทาเล็บ

การตรวจวิเคราะห์ (Analysis)

- ใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Axioskop) ใช้ฟิลเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับ spectrum ของสารเรืองแสงที่ติดฉลากกับดีเอ็นเอตรวจสอบ โดยใช้ฟิลเตอร์เบอร์ 02 สำหรับ DAPI (สีน้ำเงิน) ฟิลเตอร์เบอร์ 09 สำหรับ FITC (spectrum green, สีเขียว) ฟิลเตอร์เบอร์ 15 สำหรับ TRITC (spectrum orange, สีแดง) Aqua filter set (Vysis) สำหรับ spectrum aqua (สีน้ำเงิน) อสุจิปกติมีจำนวนโครโมโซมเป็น 23 โครโมโซม ดังนั้นจึงให้สัญญาณ (signal) สำหรับโครโมโซมแต่ละตัวเพียง 1 ตำแหน่ง ถ้าพบจำนวนสัญญาณมากกว่า 1 ตำแหน่งถือว่ามีความผิดปกติ ในกรณีใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP 18 / CEP X / CEP Y ถ้าพบสัญญาณของ 18 1 ตำแหน่งแล้วพบสัญญาณของ XY, XX, YY จัดให้เป็น disomy ของโครโมโซมเพศ แต่ในกรณีพบสัญญาณ 18 2 ตำแหน่งจัดให้เป็นอสุจิที่มีโครโมโซมเป็น diploidy ถ้าพบสัญญาณของ 18 2 ตำแหน่งและพบ X หรือ Y ตัวใดตัวหนึ่งจัดให้เป็น disomy ของโครโมโซม 18 ในกรณีสัญญาณ (signal) มีสองตำแหน่งใกล้กันมาก ระยะห่างระหว่างสองสัญญาณจะต้องมากกว่าครึ่งหนึ่งของเส้นผ่าศูนย์กลางของสัญญาณที่อยู่ชิดกันจึงนับเป็นสองตำแหน่ง (Robbins et al, 1993)

การคำนวณทางสถิติ

การวิเคราะห์เปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซมที่ตรวจพบในแต่ละกลุ่ม จะใช้ Student's T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ $P<0.05$ และพิจารณาให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ