ภาคผนวก

วิธีคำนวณหาค่า LD_{50} ของสารโคลชิซินในการทรีตเมล็ดจากสูตร Regression

วิธีการคำนวณค่า LD_{50} โดยวิธี Regression ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของต้นมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรกับความเข้มข้นของสารโคลชิซินมีรายละเอียดดังนี้

$y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

$y = 50$

x_{50} = ความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ LD_{50}

n = 5 (treatment)

ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (X)	ความอยู่รอด [% ของ control (Y)]	XY
0	100.00	0.00
0.5	50.00	25.00
1.0	73.91	73.91
1.5	60.87	91.30
2.0	47.83	95.56

$\sum x = 5 \qquad \sum y = 332.61$

$\bar{x} = 1 \qquad \bar{y} = 66.52$

$\sum x^2 = 7.5 \qquad \sum xy = 285.77$

$(\sum x)^2/n = 5 \qquad (\sum x)(\sum y)/n = 332.61$

$\sum x^2 = \sum x^2 - \sum x^2/n \qquad \sum xy = \sum xy - (\sum x)(\sum y)/n$

$= 2.5 \qquad = -46.84$

$b = \sum xy / \sum x^2 = -18.74$

$$Y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$$

$$50 = 66.52 + (-18.74)\ (x_{50} - 1)$$

$$X_{50} - 1 = 16.52/18.74$$

$$X_{50} = 0.88+1$$

$$= 1.88$$

พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้มะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออายุ 50 วัน จากสูตร Regression คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 1.88%

วิธีคำนวณหาค่า LD_{50} ของสารโคลชิซินในการทรีตปลายยอดจากสูตร Regression

วิธีการคำนวณค่า LD_{50} โดยวิธี Regression ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรกับความเข้มข้นของสารโคลชิซินมีรายละเอียดดังนี้

$y = \bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

$y = 50$

x_{50} = ความเข้นข้นของสารโคลชิซินที่ LD_{50}

n = 5 (treatment)

ความเข้มข้นของสารโคลชิซิน (X)	ความอยู่รอดเป็น % ของ control (Y)	XY
0	100.00	0.00
0.5	36.36	18.18
1.0	31.81	31.81
1.5	45.44	68.16
2.0	28.40	56.80

$\sum x$ = 5 $\sum y$ = 242.01

$\bar{x}$ = 1 $\bar{y}$ = 48.40

$\sum x^2$ = 7.5 $\sum xy$ = 174.95

$(\sum x)^2/n$ = 5 $(\sum x)(\sum y)/n$ = 242.01

$\sum x^2$ = $\sum x^2 - \sum x^2/n$ $\sum xy = \sum xy - (\sum x)(\sum y)/n$

= 2.5 = -67.06

b = $\sum xy / \sum x^2$ = -26.82

Y = $\bar{y} + b(x_{50} - \bar{x})$

50 = 48.40 + (-26.82 (x_{50} - 1)

X_{50} -1 = -1.6/26.82

X_{50} = -0.06+1

= 0.94

พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารโคลชิซินที่ทำให้ปลายยอดมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออายุ 30 วัน จากสูตร Regression คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซินที่ 0.94%

วิธีเทียบหาค่าของแต่ละช่องใน ocular micrometer

1. นำ stage micrometer วางบนแป้นรองรับสไลด์ใช้เลนซ์ใกล้วัตถุที่มีกำลังขยายต่ำตรวจดูขีดบน

2. ถอดเลนซ์ใกล้ตาออกจาก body tube หมุนเกลียวของเลนซ์ใกล้ตาออก ใส่ ocular micrometer

3. มองที่เลนซ์ใกล้ตาจะเห็นเส้นแบ่งขีดช่องๆ อยู่ 2 ชุด ปรับเส้นของ ocular micrometer ให้ขนานกับเส้นของ stage micrometer โดยหมุนเลนซ์ใกล้ตา เมื่อขนานกันแล้ว เลื่อน stage micrometer ให้ขีดใดขีดหนึ่งของ ocular micrometer ทับกับขีดหนึ่งของ stage micrometer แล้วนับไปว่าอีกกี่ช่องจึงจะมีเส้นทับกันอีกเป็นครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 จนถึง 5 ครั้ง จดบันทึกไว้แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จากค่าเฉลี่ยที่ได้นำมาคำนวณค่า 1 ช่อง ของ ocular micrometer ได้จากสูตร

$$\text{ค่า 1 ช่องของ O.M.} = \frac{\text{จำนวนช่องของ S.M. x ค่า 1 ช่องของ S.M.}}{\text{จำนวนช่องของ O.M.}}$$

O.M. = ocular micrometer

S.M. = stage micrometer

ค่า stage micrometer แต่ละช่องมีความกว้าง 10 ไมครอน หรือ 0.01 มม.

สูตรเปอร์เซ็นต์ความงอกคือ จำนวนเมล็ดที่งอกหารด้วยจำนวนเมล็ดทั้งหมด คูณด้วย 100

วิธีการเตรียมสารในการศึกษาโครโมโซม

1. Pretreatment (การหยุดวงชีพเซลล์)

คือ การนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาโครโมโซมแช่ในสารเคมีเพื่อหยุดการแบ่งนิวเคลียสให้อยู่ในระยะเมทาเฟส ซึ่งการทำ pretreatment กับรากพืชเพื่อที่จะทำให้เซลล์พืชหยุดการแบ่งเซลล์ระยะเมทาเฟสของไมโทซีส ซึ่งระยะนี้โครโมโซมมีขนาดสั้นมากที่สุด ทำให้สามารถนับจำนวนและศึกษารูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน สารที่ใช้ทำ pretreatment มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์เหมือนกันคือทำให้ spindle fiber ของเซลล์ไม่สามารถสร้างขึ้นมาได้การทำ pretreatment จะทำก่อนที่จะ fix เซลล์ด้วยน้ำยา fixative สารที่ใช้ทำ pretreatment มีดังนี้

1.1 8-hydroxyquuinoline : เตรียมที่ความเข้มข้น 0.002 M ในน้ำ เพื่อให้ละลายดีใช้วิธีอุ่นใน 60^0C เป็นเวลานาน 10-15 นาที บางครั้งอาจนานถึง 1 ชั่วโมง

1.2 Paradichlorobenzine : เตรียมให้ถึงระดับ saturated ใช้เตรียมจาก 5-10 กรัม paradichlorobenzine ในน้ำกลั่น 500 มล. ใส่สารละลายนี้ไว้ในขวดที่ปิดจุกและเก็บไว้ในตู้อบ 60 องศาเซลเซียส นานตลอด 1 คืน จึงนำมาใช้ การแช่รากอาจแช่อยู่นาน 15 นาที – 4 ชั่วโมง

1.3 Colchicine : ใช้ความเข้มข้น 0.2% W/V ในน้ำ แช่ปลายรากนานประมาณ 1-2 ชั่วโมง

ซึ่งในการทดลองใช้ 8-hydroxyquuinoline แช่รากมะนาวฝรั่งพันธุ์พิมพ์พรนาน 24 ชั่วโมง เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซสเซียส ในที่มืด และสารเคมีที่ใช้หยุดวงชีพเซลล์นี้มีคุณสมบัติช่วยให้โครโมโซมหดตัวได้ดีสะดวกในการนับจำนวนโครโมโซม

2. Fixative solution (การหยุดการทำงานของเซลล์)

คือ การใช้สารเคมีหยุดปฏิกิริยาเมทาบอลิซึมภายในเซลล์ทำให้เซลล์ตาย น้ำยาที่เป็น fixing หรือ killing เพื่อทำให้เซลล์พืชคงสภาพเดิม เหมือนเช่นการดองสัตว์ให้คงสภาพไม่เน่าเปื่อย น้ำยาประเภทนี้จำเป็นต้องเตรียมใหม่ๆ แล้วใช้ทันทีมีสูตรการผสมต่างกันแต่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีสัดส่วนดังนี้

2.1 Carnoy's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol หรือ methanol : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1

2.2 Farmer's fluid ประกอบด้วย absolute ethanol : chloroform : glacial acetic acid ในอัตราส่วน 6 : 3 : 1

3. Storage (การเก็บรักษาเนื้อเยื่อ)

ก่อนที่จะทำการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ต้องล้างกรดแอซีติกให้หมดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ แล้วจึงเก็บเนื้อเยื่อไว้ใน 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ได้นานตามต้องการ (ประมาณ 6-12 เดือน) โดยไม่ทำให้เซลล์เหี่ยวหรือเสียน้ำ

4. Stain (สีย้อมเซลล์)

ในการศึกษาโครโมโซมพืชทั้งจากเซลล์ปลายรากและเซลล์ microsporocyte นั้น นิยมใช้สี acetocarmine และโดยเฉพาะมีส่วนของสนิมเหล็กปนอยู่ในสีด้วยแล้วมีผลทำให้โครโมโซมติดสีเข้มมากขึ้น อาจเรียกเทคนิคว่า iron-acetocarmine วิธีการเติมเหล็กให้กับสีใช้เข็มเขี่ยปลายสนิมจุ่มในน้ำสีก็มีผลได้

การเตรียมสี acetocarmine โดยการอุ่น acetic acid 45% ที่ร้อนละลายสี carmine ลงไป โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของ carmine ในกรด acetic 200 มล. ต้มเดือดนาน 1-2 นาที หรือจนกระทั่งสีแดงของ carmine เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้น จากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง อาจใช้วิธีต้มเดือดให้ระเหยเป็นไอแล้วกลั่นเป็นหยดน้ำใน reflux condenser นาน 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นแล้วกรอง เก็บสารละลายนี้ในที่เย็นและมืด

ในการทดลองครั้งนี้เตรียมโดยถ้าใช้ acetic 50 มล. ต้องใช้ acetic 23 มล. + น้ำ 27 มล. ต้มให้เดือดด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปิดฝากันการระเหยด้วย เมื่อเดือดจึงเติม carmine 1 กรัมลงไป จะได้ carmine เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ คนด้วยตะปูขึ้นสนิม ประมาณ 2 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น จากนั้นทำการกรอง ด้วยกระดาษกรอง