บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ปลาที่ใช้ในการทดลอง

ปลาตะเพียนขาว(*Puntius gonionotus* Bleeker) วัยอ่อนจากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดพัทลุงขนาดความยาว 3-5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์บรรจุน้ำที่ปราศจากคลอรีนเพื่อปรับตัวจำนวน 400 ตัวต่อน้ำ 200 ลิตร ใช้ความหนาแน่นนี้เช่นเดียวกับการทดลองจริง ให้อากาศเต็มที่ เป็นเวลา 14 วันเปลี่ยนน้ำทุก 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำหรับปลากินพืชยี่ห้อไทยลักซ์ สูตร 8932 (โปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 %, ไขมันไม่ต่ำกว่า 4%, กากไม่มากกว่า 8%, ความชื้นไม่มากกว่า 12%) ในอัตราร้อยละ 3 ต่อน้ำหนักตัว โดยให้วันละ 2 เวลาคือ 10.00 น. และ 18.00 น.(เมฆ บุญพราหมณ์,2530)

2. วัสดุอุปกรณ์

- ขวดโหลแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร
- ถังไฟเบอร์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 เซนติเมตร
- แท่งแก้วคน
- ถาดหลุมกระเบื้อง
- เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
- สไลด์ขนาด 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร
- แผ่นปิดสไลด์ขนาด 24 x 50 มิลลิเมตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
- กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพรุ่น Phase contrast & DIC (Nikon) model Optiphot-2
- ฟิล์มขาว-ดำ (ISO 100)
- หลอดหยด
- Hotplate

3. **สารเคมี**

- สารละลายโคลชิซีน 0.01 %
- โปแทสเซียมไดโครเมต
- สีย้อมคาร์บอล ฟูชิน (carbol fushsin)
- สารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ 0.4 %
- คานาดาบาลซัม
- กรดอะซีติก 50 %
- เกลเซียลอะซีติก (glacial acetic acid)
- เมทานอล 100 %

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 เป็นการสำรวจเบื้องต้น (Exploratory test) เพื่อหาความเข้มข้นระดับที่ทำให้โครโมโซมมีการเปลี่ยนแปลง และส่วนที่ 2 เป็นการทดสอบความเข้มข้นที่ต่ำลง (Full scale test) โดยทดสอบความเข้มข้นในช่วงที่กฎหมายกำหนดจนถึงระดับต่ำสุดของการทดสอบส่วนที่ 1 ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ทำการทดลองดังนี้

1. **การสำรวจเบื้องต้น**

นำปลาที่เลี้ยงในถังไฟเบอร์ครบ 14 วัน มาทดลองโดยเลี้ยงในขวดโหลปริมาตรน้ำ 5 ลิตร จำนวน 10 ตัวต่อขวดโหล ให้อากาศเต็มที่ ให้อาหารเม็ด จำนวนครั้งและปริมาณเช่นเดียวกับที่เลี้ยงในถังไฟเบอร์ ชุดทดสอบใช้ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 2 ระดับคือ 0.3 และ 0.7 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พบในเขตอุตสาหกรรมฟอกหนัง (สำนักงานเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน,2540) และการทดลองควบคุมซึ่งไม่ใส่โพแทสเซียมไดโครเมต วัดพีเอชของน้ำก่อนและหลังทุกการทดลอง เมื่อครบกำหนด 72 ชั่วโมงนำปลาจากแต่ละการทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วนโดยเลี้ยงในขวดโหลใหม่ที่ใส่น้ำที่ปราศจากคลอรีน 2.5 ลิตรโหลละ 5 ตัว เพื่อศึกษาผลของสารต่อการแบ่งเซลล์โดยศึกษาไมโตติกอินเด็กซ์ (mitotic index) และผลของสารต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมต่อไป

2 . การทดสอบหาความเข้มข้นที่ต่ำลงไป

จากการสำรวจเบื้องต้นนำความเข้มข้นระดับต่ำที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมมาศึกษาต่อและเพิ่มช่วงความเข้มข้นอีก 2 ความเข้มข้นคือ 0.05 ppm ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่กฎหมายกำหนด และ 0.15 ppm วิธีการทดลองเช่นเดียวกับการสำรวจเบื้องต้น

3. วิธีการศึกษาไมโตติกอินเด็กซ์

ปลาที่นำมาศึกษาไม่ต้องฉีดสารละลายโคลชิซีน นำปลาแต่ละตัวมาเตรียมสไลด์ตามขั้นตอนในข้อ 4 ตรวจสอบและนับจำนวนเซลล์จากปลาแต่ละตัว ตัวละประมาณ 5000 เซลล์ (Anitha,2000) โดยนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส โปรเฟส เมตาเฟส แอนาเฟส และเทโลเฟส นำมาคำนวณค่าเปอร์เซนต์ไมโตติกอินเด็กซ์ ดังนี้

$$\%\text{ไมโตติกอินเด็กซ์} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ในระยะ โปรเฟส เมตาเฟส แอนาเฟส เทโลเฟส}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

4. วิธีการศึกษาโครโมโซม

ดัดแปลงจากวิธีของ Kligerman และ Bloom (1977) ดังนี้

4.1การเตรียมเนื้อเยื่อ

4.1.1 นำปลามาฉีดสารละลายโคลชิซีน 0.01 % เข้าช่องท้องปริมาณ 25 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักตัวปล่อยปลาไว้ 8 ชั่วโมง เพื่อยับยั้งการสร้างสายใยสปินเดิลให้เซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟส

4.1.2 ฆ่าปลาโดยการตัดหัว ผ่าตัดเอาเหงือก ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำเนื้อเยื่อไปแช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.4 % ซึ่งเป็นสารละลายไฮโปโทนิก เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เซลล์พอง

4.1.3 นำเนื้อเยื่อแช่ในน้ำยาคงสภาพ (3 เมทานอล100 % : 1 เกลเซียลอะซีติก)เพื่อรักษาสภาพเซลล์ โดยเตรียมน้ำยาใหม่ทุกครั้ง แช่อย่างน้อย 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที โดยเปลี่ยนน้ำยาคงสภาพใหม่ เนื้อเยื่อสามารถเก็บไว้ในน้ำยาคงสภาพประมาณ 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4^0 C

4.2 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

4.2.1 นำเนื้อเยื่อออกจากน้ำยาคงสภาพวางบนกระดาษกรองเพื่อซับเอาน้ำยาคงสภาพที่ตกค้างออก

4.2.2 หลังซับเอาน้ำยาคงสภาพ ออกจากเนื้อเยื่อแล้ว วางเนื้อเยื่อบนถาดหลุม หยดกรดอะซีติก 50 % 2-3 หยด บดด้วยแท่งแก้วคนเพื่อทำให้เนื้อเยื่อกระจายจากกัน ส่วนที่ยังเป็นชิ้นอยู่เอากลับไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ ใหม่ ใช้หลอดหยดดูดเข้าออกจะช่วยให้เซลล์กระจายดี

4.2.3 ดูดส่วนที่ใสไปเป่าให้แห้งบนสไลด์ที่สะอาดอุณหภูมิ 40-50 ^{0} C บน Hot plate การเป่าต้องให้บางที่สุดเพื่อให้เซลล์กระจายไม่ทับกันหนาทึบ เส้นผ่าศูนย์กลางของหยดใสบนสไลด์ประมาณ 1 เซนติเมตร

4.3 การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่เป่าแห้งแล้วแช่ในสีคาร์บอล ฟูชินนาน 20 นาทีนำสไลด์ขึ้นจากสี ล้างสีที่เกินพอด้วยน้ำสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทำเป็นสไลด์ถาวรด้วยคานาดาบาลซัม นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การตรวจสอบเซลล์และโครโมโซม

ในการตรวจโครโมโซมจะทำในเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟสเท่านั้นโดยตรวจสอบจากทุกเซลล์บนแผ่นสไลด์ที่โครโมโซมมีการซ้อนทับกันน้อยที่สุด บันทึกภาพเซลล์กำลังขยายเลนส์วัตถุ 100 เท่า ด้วยฟิล์มขาวดำ อัดขยายภาพขนาด 3.5 x 5.5 นิ้ว แล้วนำไปถ่ายเอกสารขยายขนาด 2 เท่า นับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์และตรวจสอบความผิดปกติของโครงสร้างโครโมโซม

5.1 กรณีสารทดสอบอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

นับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์ แบ่งกลุ่มเซลล์ตามจำนวนโครโมโซมโดยดัดแปลงจากวิธีของ Ohshima (2001) ดังนี้

เซลล์ดิพลอยด์ (diploid) ได้แก่เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมของเซลล์ที่ได้จากชุดการทดลองควบคุมบวกหรือลบด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

เซลล์ไฮโปดิพลอยด์ (hypodiploid) ได้แก่เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมน้อยกว่าเซลล์ดิพลอยด์ (น้อยกว่า Mean - SD)

เซลล์ไฮเปอร์ดิพลอยด์ (hyperdiploid) ได้แก่เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าเซลล์ดิพลอยด์ (มากกว่า Mean + SD)

รายงานผลเป็นเปอร์เซนต์ของกลุ่มเซลล์ที่พบในแต่ละความเข้มข้น

5.2 กรณีสารทดสอบอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างโครโมโซม

ศึกษาโครงสร้างของโครโมโซมจดบันทึกความเสียหายดังนี้

- ชิ้นส่วนโครโมโซม(acentric fragment) เป็นความผิดปกติที่โครมาติดเกิดการหักและขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิงโดยชิ้นส่วนนั้นจะมีขนาดเล็กกว่าโครโมโซมที่ไม่ผิดปกติอย่างชัดเจนและไม่มีเซนโตรเมียร์
- ช่องว่างในโครมาติด (chromatid gap) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในส่วนโครมาติดแต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกันทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาติน(chromatin) ยึดให้เห็นบางๆ
- โครโมโซมเป็นวง (ring chromosome) เป็นความผิดปกติที่โครโมโซมเกิดการหักในระยะ G_1 สองตำแหน่งและมีการเชื่อมต่อของปลายทั้งสองเมื่อมีการแบ่งเซลล์จนถึงระยะเมตาเฟสจะเห็นโครโมโซมเป็นวง

รายงานผลเป็นเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่เสียหายในแต่ละความเข้มข้น

6. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-Way ANOVA และตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่เมื่อพบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ค่าสถิติ least significant difference (LSD)เป็นค่าทดสอบเทียบกับผลต่างค่าเฉลี่ยของการทดลองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ตามวิธีของ Zar (1996)

7. **ระยะเวลาที่ใช้ในงานวิจัย**

เริ่ม ตุลาคม 2543
สิ้นสุด ตุลาคม 2544

8. **สถานที่ทำการวิจัย**

- ห้องปฏิบัติการทางน้ำ B110 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- ห้องปฏิบัติการ B311 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- ห้องเครื่องมือและวิจัย B206 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- ห้องปฏิบัติการล้างอัดรูป B306 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่