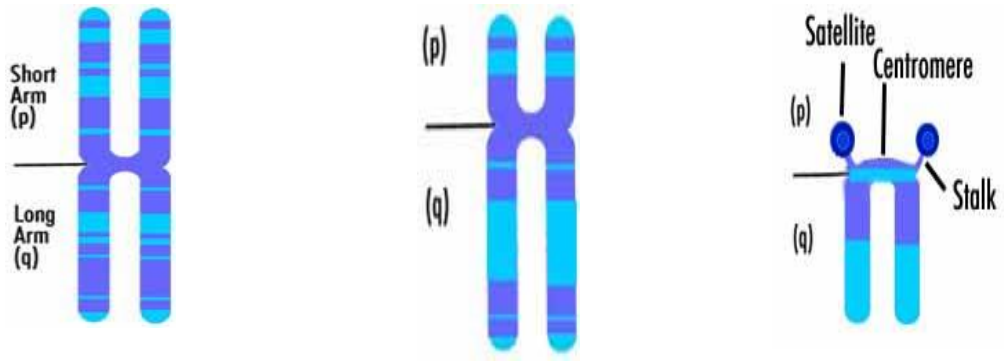
การศึกษาโครโมโซมของมนุษย์ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ลิมโฟซัยส์ (Lymphocyte culture)

โครโมโซม (chromosome) คือ โครงสร้างทางพันธุกรรมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของสิ่งมีชีวิต โครโมโซมประกอบด้วยดีเอนเอ (DNA) และโปรตีน บนแท่งโครโมโซมจะมีตำแหน่งของยีน (genes) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่น จำนวนและรูปร่างของโครโมโซมในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์หนึ่งๆ จะมีความจำเพาะและเป็นเอกลักษณ์ประจำสปีชีส์นั้นๆ โครโมโซมในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิตจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโครโมโซมที่ไม่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ เรียกว่า ออโตโซม (autosome) และกลุ่มโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ เรียกว่า อัลโลโซม (allosome) หรือ โครโมโซมเพศ (sex chromosome) โดยในมนุษย์มีจำนวนออโตโซมเท่ากับ 44 แท่ง และมีจำนวนอัลโลโซม 2 แท่ง คือ โครโมโซม X และ โครโมโซม Y ดังนั้นเพศชายจึงมีสัญญาลักษณ์แสดงโครโมโซมเป็น 46,XY หรือ 44+XY และ เพศหญิงจึงมีสัญญาลักษณ์แสดงโครโมโซมเป็น 46,XX หรือ 44+XX

ด้วยเทคนิคการเตรียมโครโมโซมในสมัยก่อนยังไม่ดีพอ จึงทำให้เรามีความเข้าใจผิดเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมของมนุษย์ว่ามีจำนวนเท่ากับ 48 แท่ง (2n=48) มาอย่างยาวนานถึง 30 กว่าปี จนกระทั่งเมื่อนายแพทย์ Tjio และ นายแพทย์ Levan ได้ค้นพบจำนวนโครโมโซมที่ถูกต้องของมนุษย์ว่า มีจำนวนเท่ากับ 46 (2n=46) เมื่อปี ค.ศ. 1956 ตั้งแต่นั้นมาวิทยาการความก้าวหน้าการศึกษาโครโมโซมในมนุษย์ก็เจริญขึ้นตามลำดับ

รูปร่างโครโมโซมของมนุษย์แบ่งตามตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ แบ่งออกได้ 3 รูปร่าง คือ

1. metacentric chromosome เซนโทรเมียร์จะอยู่บริเวณกลางโครโมโซม ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 1 3 19 20
2. submetacentric chromosome เซนโทรเมียร์อยู่ค่อนไปปลายด้านใดด้านหนึ่ง ได้แก่ โครโมโซม คู่ที่ 2 4 5 6 7 8 9 10 11 12 16 17 18 และ X
3. acrocentric chromosome เซนโทรเมียร์อยู่ชิดปลายแท่งโครโมโซม จะมีกระเปาะเล็กๆเป็นส่วนหนึ่งของแขนสั้น เรียกว่า satellite ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 13 14 15 21 22 และ Y สำหรับโครโมโซม Y จะเป็นโครโมโซมที่มีรูปร่าง acrocentric เพียงแท่งเดียวที่ไม่มี satellite



1. metacentric 2. submetacentric 3. acrocentric

รูปที่ 1 รูปร่างโครโมโซมของมนุษย์แบ่งตามตำแหน่งเซนโตรเมียร์ ได้ 3 รูปร่าง

โครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของมนุษย์คือ โครโมโซมคู่ที่ 1 (มีรูปร่าง metacentric) ส่วนโครโมโซมที่มีขนาดเล็กที่สุดของมนุษย์คือ โครโมโซมคู่ที่ 21 (มีรูปร่าง acrocentric) (ไม่ใช่คู่ที่ 22 เป็นโครโมโซมคู่ที่เล็กที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เพราะความเข้าใจผิดตั้งแต่แรกเริ่ม แม้ต่อมาจะทราบว่ามีความเข้าใจคลาดเคลื่อน ก็ปล่อยเลยตามเลย)

รูปที่ 2 ภาพโครโมโซมของกลุ่มอาการ Double Y syndrome (47,XYY) ลูกศรชี้โครโมโซมวาย 2 แท่ง

การศึกษาโครโมโซมของมนุษย์ มีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ โดยเฉพาะการวินิจฉัยโรคพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม โดยการนำตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจโครโมโซม (specimen) ของคนป่วยมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจที่นิยมนำมาเตรียมโครโมโซมคือ ตัวอย่างเลือด (peripheral blood) ซึ่งจะใช้วิธีการเพาะเซลล์ลิมโฟซัยส์ (lymphocyte culture) เพราะมีความสะดวกและประหยัดเวลาที่สุด มีขั้นตอนดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดประมาณ 2– 3 ซีซี จากหลอดเลือดดำใต้แขนพับ ด้วยกระบอกฉีดยาและเข็มแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง (disposable syringe) ที่มีสารป้องกันเลือดแข็ง (heparin) เคลือบอยู่ภายในกระบอกฉีดยา หลังจากเจาะเลือดเสร็จแล้ว ให้กลับกระบอกฉีดยาไปมา เพื่อให้เลือดกับ heparin ผสมกันอย่างทั่วถึง ขั้นตอนนี้หากเลือดแข็งตัวเกาะกลุ่มกัน (blood clotting) จะทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ล้มเหลว (culture failure)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ลิมโฟซัยต์

ใส่เลือดที่ได้จากข้อ 1 ประมาณ 15 หยด (หลังจากเอาเข็มเจาะเลือดออกแล้ว) ลงในขวดเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยสารต่อไปนี้ โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

- น้ำยาเพาะเลี้ยง (chromosome media) ชนิด RPMI 1640 4 ซีซี
- ซีรัมจากลูกวัวอ่อน (fetal bovine serum) 1 ซีซี
- ยาปฏิชีวนะ (penicillin - streptomycin) 0.3 ซีซี
- สารกระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัว (phytohaemagglutinin) 0.1 ซีซี

ปิดฝาให้แน่น เขย่าเบาๆให้สารผสมกันอย่างทั่วถึง บ่มขวดเพาะเลี้ยงไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ในระหว่างเพาะเลี้ยงควรเขย่าขวดเลี้ยงเซลล์อย่างน้อยวันละครั้ง เพื่อเพิ่มปริมาณเมตาเฟสให้มากขึ้น

3. การเก็บเกี่ยวโครโมโซม

นำขวดเลี้ยงเซลล์มาเติม colchicine (0.2 mg/ml) หรือ colcemid ประมาณ 0.1 ซีซี เขย่าให้สารผสมกันอย่างทั่วถึง แล้วบ่มต่ออีก 30 นาที จากนั้นจึงนำออกมาเทสารละลายลงในหลอดปั่น เพื่อเตรียมโครโมโซม

การเตรียมโครโมโซม มีขั้นตอนดังนี้

1. นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป เหลือสารละลายไว้เหนือตะกอนเซลล์ ประมาณ 1 มิลลิลิตร
2. เติม 0.075 M KCl ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันดีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป เหลือสารละลายไว้เหนือตะกอนเซลล์ ประมาณ 1 มิลลิลิตร

3. ผสมเซลล์และสารละลายที่เหลือให้ผสมกันอย่างดี แล้วเติมน้ำยาคงสภาพ (fixative) โดยเติมช้าๆพร้อมกับเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เซลล์ผสมกับสารละลายคงสภาพอย่างทั่วถึง เติมสารละลายคงสภาพจนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 2,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายคงสภาพส่วนบนทิ้งไป

4. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 อีก 2 รอบ เพื่อล้างตะกอนจนเซลล์และกำจัดเศษขยะของเซลล์ (cell debris) ออกจนได้ตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด

5. หลังจากปั่นครั้งสุดท้าย ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไปเกือบหมด เหลือสารละลายไว้เหนือตะกอนเซลล์ (cell pellet) ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร เติม สารละลายคงสภาพ อีกประมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมตะกอนและน้ำยาคงสภาพให้เข้ากันดี (resuspension) ด้วย pasteur pipette จะเห็นเซลล์สีขาวๆลอยอยู่ในน้ำยาคงสภาพ (cell suspension)

6. ใช้ pasteur pipette หยดสารละลายเซลล์ 1 หรือ 2 หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด โดยหยดให้สูงจากสไลด์ประมาณ 2 – 3 ฟุต

7. วางสไลด์ลงบน hot plate หรือฝา water bath ที่ตั้งอุณหภูมิ ไว้ที่ 80 – 90 °C เมื่อสไลด์แห้งดีแล้วนำมาย้อมสี giemsa หรือย้อมแถบโครโมโซมแบบมาตรฐาน เช่น ย้อมแถบแบบจี (G-banding) จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การย้อมโครโมโซมด้วยสี Giemsa

1. การเตรียมสี Giemsa ให้ละลายผงสี giemsa 0.75 กรัมในกลีเซอรอล 25 มิลลิลิตร และ absolute methanol 75 มิลลิลิตร โดยบดและผสมผงสี giemsa ให้ละลายจนหมด จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 คืน สารละลายสี giemsa ที่เตรียมได้นี้คือ stock giemsa solution

2. การเตรียม phosphate buffer pH 6.8 (sorensen' s buffer)

2.1 ชั่ง K_2HPO_4 anhydrous 9.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร สารละลายที่ได้นี้เรียก stock A

2.2 ชั่ง NaH_2PO_4 anhydrous 9.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร สารละลายที่ได้นี้เรียก stock B

เมื่อนำสารละลาย stock A ปริมาตร 50.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย stock B ปริมาตร 49.2 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือ phosphate buffer pH 6.8 (sorensen' s buffer)

3. ในการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา (conventional staining) จะใช้ 15% giemsa ในสารละลาย phosphate buffer pH 6.8 โดยใช้ phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 85 มิลลิลิตร ผสมกับ stock giemsa solution ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้ ย้อมสีนาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด ผึ่งสไลด์ให้แห้ง

4. ในการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี (G-banding) ให้นำสไลด์มาจุ่มในสารละลาย 0.25% trypsin solution เป็นเวลา 10-15 วินาที แล้วล้างออกด้วย phosphate buffer แล้วย้อมด้วยสี giemsa นาน 15 นาที ครบเวลาล้างออกด้วยน้ำสะอาด ผึ่งสไลด์ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สรุปขั้นตอนการเตรียมโครโมโซม

ตัวอย่างเลือด (whole blood)

↓

เพาะเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte culture)

บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 72 ชั่วโมง

↓

เก็บเกี่ยวเซลล์ (harvest)

เติมสาร colchicine เพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวที่ระยะเมทาเฟส (metaphase)

↓

หยดสารละลายเซลล์ลงบนสไลด์ (slide making)

↓

ย้อมด้วยสีจิมซา (giemsa staining)

↓

ส่องดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopy)

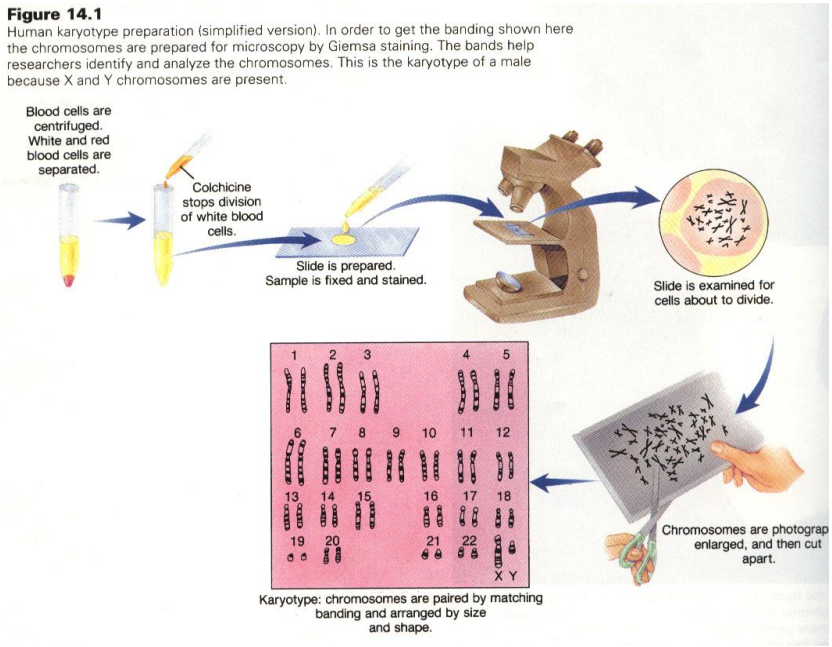


Figure 14.1
Human karyotype preparation (simplified version). In order to get the banding shown here the chromosomes are prepared for microscopy by Giemsa staining. The bands help researchers identify and analyze the chromosomes. This is the karyotype of a male because X and Y chromosomes are present.