บทที่ 1
ปฏิบัติการเรื่อง การแบ่งเซลล์

วัตถุประสงค์ เมื่อเรียนบทปฏิบัติการนี้จบแล้วจะสามารถ

1. เตรียมสไลด์เซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์
2. อธิบายกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบโมโตซิสและไมโอซิส
3. อธิบายถึงผลของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสที่มีต่อการแปรผันลักษณะทางพันธุกรรม

วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา
- ภาพยนตร์ (พร้อมอุปกรณ์การฉาย) หรือ ภาพจากสไลด์หรือภาพถ่าย แสดงระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ไมโตซิสและไมโอซิส

สารเคมี
- 2% aceto – orcein
- 9 : 1 2% aceto – orcein : INHCL
- absolute ethyl alcohol
- euparal

วัสดุอื่นๆ
- ปลายรากหัวหอมใหญ่สด หรือ แช่ใน 70 % absolute ethyl alcohol
- ดอกกุ่ยช่าย หรือ ดอกหอมหัวใหญ่ หรือ ดอกหัวใจม่วง หรือ ดอกพวงทองสด
- อัณฑะตั๊กแตนแช่ใน 3 : 1 absulute ethyl alcohol : acetic acid
- สไลด์ถาวรแสดงการแบ่งเซลล์ไมโตซิสของตัวอ่อน white fish ที่เจริญในระยะ blastula หรือ ตัวอ่อนที่เจริญระยะแรกของหนอนตัวกลม ascaris

- สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์
- ตะเกียงอัลกอฮอร์
- ใบมีดโกน
- เข็มผ่าตัด
- น้ำแข็งแห้ง
- กระดาษเยื่อ

- กระดาษสีขาวสำหรับวางโครโมโซมที่ปั้นด้วยดินน้ำมัน
- ดินน้ำมัน 6 สี เช่น แดง เขียว เหลือง ส้ม น้ำเงิน และม่วง
-

บทนำ

การสืบพันธุ์เป็นการผลิตหน่วยใหม่ของสิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ทำให้เผ่าพันธุ์นั้นดำรงอยู่ต่อไป

ในระดับเซลล์ มีการสะสมสารอินทรีย์และอนินทรีย์ต่างๆ จากนั้นมีการแบ่งเซลล์ โดยมีการแบ่งทั้ง nucleus และ cytoplasm การแบ่ง nucleus มี 2 แบบ คือ mitosis และ meiosis

Mitosis เป็นการแบ่ง nucleus ที่ได้ nucleus ของเซลล์ที่เกิดใหม่เหมือน nucleus ของเซลล์เดิมทุกประการ พบในการแบ่งเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ที่กำลังเจริญ mitosis ในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์มีหลักเกณฑ์เช่นเดียวกัน แตกต่างกันเพียงรายละเอียดบางประการ

ระยะก่อนที่จะเกิด mitosis เรียกระยะ interphase เป็นระยะที่มีการสะสมสารต่างๆ ภายในเซลล์ และที่สำคัญคือ ระยะนี้มีการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรม (DNA replication) เป็นการเตรียมพร้อมสำหรับการแบ่ง nucleus ต่อไป แบ่งเป็นระยะต่างๆ ดังนี้ prophase metaphase anaphase และ telophase

Meiosis เป็นการแบ่ง nucleus ของเซลล์ที่จะเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (gametes หรือ sex cells) ผลจากการแบ่งได้ nucleus ที่มีจำนวน chromosome ลดจากเดิมครึ่งหนึ่ง การแบ่งแบบ meiosis นี้จะมีการแบ่ง nucleus และ cytoplasm สองขั้นตอนต่อเนื่องกัน โดยมีการจำลองตัวเองของสารพันธุกรรมในระยะ interphase

เช่นเดียวกับ mitosis meiosis แบ่งเป็นระยะต่างๆ เช่นเดียวกัน mitosis แต่ในขั้นแรก (first meiotic division) ระยะ prophase I กินเวลานานกว่า prophase ของ mitosis

โปรเฟส I ระยะนี้แบ่งออกเป็น 5 ระยะย่อย คือ leptotene zygotene pachytene diplotene และ diakinesis พฤติกรรมที่สำคัญของโครโมโซมคือ มีการจัดคู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซม (synapsis) ในระยะ zygotene และเกิดการแลกส่วนของซิสเตอร์โครมาติดที่มิใช่คู่กัน (non-sister chromatid) ในระยะแพคไคธีน

Metaphase I โครโมโซมที่จับคู่กันมาเรียงตัวแนวศูนย์สูตรของเซลล์

Anaphase I คู่ของโครโมโซมแยกจากกันไปยังขั้วของเซลล์

telophase I โครโมโซมอยู่ที่ขั้วของเซลล์ ระยะนี้จะได้สองเซลล์ แต่ละเซลล์มีโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์เริ่มต้น

การแบ่งไมโอซิสขั้นที่สอง (meiosis II) แบ่งออกเป็นระยะต่างๆ ดังนี้คือ prophase metaphase II anaphase II และ telophase II การแบ่งเซลล์ในระยะเหล่านี้คล้ายคลึงกับการแบ่งไมโตซิส คือ มีการแยกโครมาติดของแต่ละโครโมโซมไปสู่เซลล์ใหม่สองเซลล์หลังจากนี้จะได้เซลล์ 4 เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเพียงครึ่งหนึ่งของเซลล์เดิม

มีปรากฏการณ์ 2 อย่างที่เกิดขึ้นระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่ทำให้เกิดการผันแปรทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต คือ

ก. การแยกตัวอย่างอิสระของโฮโมโลกัสโครโมโซม (independent segregate of homologous chromosomes) ไปสู่เซลล์สืบพันธุ์และการจับคู่กันอย่างอิสระของโครโมโซมที่แยกกัน (independent assortment)

ข. การแลกเปลี่ยนยีน (genetic exchange) จะเกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของซิสเตอร์โครมาติดที่ไม่ใช่คู่กัน โดยการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ในระยะโปรเฟส

วิธีปฏิบัติ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ตอนที่ 1 ชมภาพยนตร์ภาพจากสไลด์หรือดูภาพที่แสดงระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์

ตอนที่ 2 ปั้นดินน้ำมันแสดงการแบ่งเซลล์ระยะต่างๆ ของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสและไมโอซิส

ตอนที่ 3 ทำสไลด์เพื่อศึกษาระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์

ตอนที่ 1 หลังจากนักศึกษาได้ชมภาพยนตร์หรือภาพจากสไลด์หรือดูภาพถ่ายแล้ว นักศึกษาจะเข้าใจหลักการ และพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ได้ดีขึ้น

ตอนที่ 2 ปั้นดินน้ำมันแสดงการแบ่งเซลล์ระยะต่างๆ

1. กำหนดให้สิ่งมีชีวิตสปีชีส์หนึ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n=4 นั่นคือ มีโฮโมโลกัสโครโมโซม 2 คู่

2. ปั้นดินน้ำมันสีแดงขนาดเท่าแท่งดินสอ 2 แท่ง ดินน้ำมันสีแดง 2 แท่งนี้ใช้แทนโครโมโซมที่มาจากแม่ สมมติว่าโครโมโซมที่กำลังนับนี้อยู่ในระยะ prophase ดังนั้นโครโมโซมแต่ละแห่งจึงประกอบด้วย 2 โครมาติดซึ่งยึดติดกันที่เซนโตรเมียร์ (เซนโตรเมียร์แทนด้วยดินน้ำมันสีแดงที่ปั้นเป็นรูปวงแหวนพันรอบแท่งโครมาติดทั้งสอง) ให้โครโมโซมแท่งที่หนึ่งเป็นแบบ metacentric คือมีเซตโตรเมียร์อยู่ตรงกลางโครโมโซม สำหรับโครโมโซมแท่งที่ 2 มีเซนโตรเมียร์อยู่ปลายโครโมโซม คือ เป็นแบบ telocentric

3. ปั้นดินน้ำมันสีเขียว 2 แท่ง ให้มีขนาดและความยาวเท่ากับโครโมโซมที่ปั้นด้วยดินน้ำมันสีแดง ดินน้ำมันสีเขียวสองแท่งนี้ใช้แทนโครโมโซมที่มาจากท่อและอยู่ในระยะ prophase เช่นกัน (เซนโตเมียร์ปั้นด้วยดินน้ำมันสีเขียวเช่นกัน) และเป็นโฮโมโลกัสของโครโมโซมสีแดงจากแม่นั่นคือ โครโมโซมสีเขียวแท่งที่ 1 จะมีลักษณะเหมือนกับโครโมโซมสีแดงแท่งที่ 1 ในทำนองเดียวกันโครโมโซมแท่งที่ 2 ซึ่งปั้นด้วยดินน้ำมันสีแดงและสีเขียวจะมีลักษณะเหมือนกัน

4. ให้ยีน A เป็นยีนอยู่บนโครโมโซมสีแดงแท่งที่ 1 และแทนด้วยดินน้ำมันสีเหลือง (ปั้นเป็นเม็ดกลมเล็กๆ ติดบนโครโมโซม) สำหรับโครงโมโซมสีเขียวแท่งที่ 1 ใช้เม็ดดินน้ำมันสีส้มแทนยีน a

5. ในทำนองเดียวกันให้ยีน B อยู่บนโครโมโซมสีแดงแท่งที่ 2 และแทนด้วยดินน้ำมันสีน้ำเงินดินน้ำมันสีม่วงใช้แทนยีน bซึ่งอยู่บนโครโมโซมสีเขียวแท่งที่ 2

6. ให้มีการแลกส่วนของซิสเตอร์โครมาติดที่ไม่ใช่คู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1 ในระยะ pachytene ของ prophase I

6.1 โฮโมโลกัสโครโมโซมที่ปั้นด้วยดินน้ำมัน 2 คู่

6.2 แสดงการแลกส่วนของซิสเตอร์โครมาติดที่มิใช่คู่กันของโฮโมโลกัสโครโมโซมคู่ที่ 1 ในระยะ pachytene

7. แบ่งนักศึกษาเป็นกลุ่มๆ ละ 4 คน เริ่มจากโครโมโซมสองคู่ตามที่กำหนดให้ในข้อที่ 6 ให้นักศึกษาแต่ละคนในกลุ่มปั้นดินน้ำมันแสดงพฤติกรรมของ chromosome ในระยะต่างๆ ของการแบ่งนิวเคลียสดังนี้

นักศึกษาคนที่ 1 prophase metaphase anaphase และ telophase ของ mitosis

คนที่ 2 reptotene sygotene pachytene (เกิดการแลกส่วนกันของซิสเตอร์ โครมาติด)

คนที่ 3 diptotene diakinasis metaphase I และ anaphase I

คนที่ 4 prophase II metaphase II anaphase II และ telophase II

8. ใช้ดินสอวาดกรอบแสดงเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส และเส้นใยบีนเดิลบนกระดาษ

ผล จงเปรียบเทียบพฤติกรรมของโครโมโซมและจำนวนโครโมโซม (2n หรือ n ในระยะต่างๆ ของการ

แบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสและไมโอซิส

ไมโตซิส	ไมโอซิส
โปรเฟส	โปรเฟส I
เมตาเฟส	เมตาเฟส I
อะนาเฟส	อะนาเฟส I
ทีโลเฟส	ทีโลเฟส I

<u>ตอนที่ 3</u> วิธีการทำสไลด์สำหรับศึกษาการแบ่งเซลล์

ก. การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสโดยย้อมเซลล์ปลายรากหอมหัวใหญ่

ก. 1 ตัดปลายรากหอมยาวประมาณ 2-3 มม. วางบนสไลด์ที่สะอาด และมีสารละลาย aceto – orcein : IN HCl (9 : 1) อยู่ประมาณ 1 – 2 หยด

ก. 2 นำสไลด์ลนไฟจากตะเกียงอัลกอฮอล์พอร้อน ระวังอย่าให้เดือด

ก. 3 ซับสารละลายออกให้หมดด้วยกระดาษทิสชู่

ก. 4 หยด 1 – 2 หยด 2% aceto – orcein บนปลายรากหอม

ก. 5 ใช้ปลายด้าม (ด้านทู่) เข็มผ่าตัดบดขยี้ปลายรากหอมให้เนื้อเยื่อแตกออกให้เซลล์กระจายออกจากกัน

ก. 6 วางแผ่นแก้วปิดหยดสีบนสไลด์ ต้องแน่ใจว่ามีเซลล์อยู่ภายในแผ่นแก้ว และปริมาณสีเพียงพอ (สีต้องถึงขอบสไลด์) ถ้าสีไม่พอให้หยดสีอีกเล็กน้อยที่ขอบแผ่นแก้วปิดสไลด์

ก. 7 วางสไลด์ไว้ระหว่างกระดาษเยื่อที่พับหนา 3-4 ชั้น จักขอบข้างหนึ่งของแผ่นแก้วปิดสไลด์ และใช้หัวแม่มือกดลงบนกระดาษเยื่อหุ้มแผ่นแก้วปิดสไลด์ (ระวังอย่างให้แผ่นแก้วปิดสไลด์เลื่อน) เรียกวิธีการนี้ว่า squashing

ก. 8 ค่อยๆ เช็ดสีตามขอบแผ่นแก้วปิดสไลด์ตรวจสอบสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้ออฟเจกทีฟกำลังขยายต่ำ (4x หรือ 10x) เพื่อหาตำแหน่งของเซลล์ แล้วเปลี่ยนใช้ออฟเจกทีฟที่มีกำลังขยายสูง (40x) เพื่อศึกษาพฤติกรรมของโครโมโซมในระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์

ข.การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสโดยย้อมเซลล์อัณฑะตั๊กแตนและเซลอับเรณูดอกกุ่ยซ่าย หรือดอกหอมหัวใหญ่ หรือดอกหัวใจม่วงหรือดอกพวงทองอย่างใดอย่างหนึ่ง

ข. 1 หยดสี 2% aceto – orcein 1 หยดบนสไลด์ที่สะอาด

ข. 2 วางอัณฑะตั๊กแตน 2-3 พู (follicle) หรือ 1-2 อับเรณูของดอกไม้ชนิดใดๆ ที่มีไว้ให้ในห้องปฏิบัติการ

ข. 3 ใช้ปลายด้าม (ด้านทู่) เข็มบดขยี้พูของอัณฑะตั๊กแตนหรืออับเรณูของดอกไม้ให้แตก และปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

ข. 4 อุ่นสไลด์ให้ร้อนเหนือเปลวไฟตะเกียง ระวังอย่างให้เดือนนำสไลด์ออกจากเปลวไฟเมื่อเห็นฟองอากาศเริ่มเคลื่อนมาที่ของแผ่นแก้วรีบปิดสไลด์

ข. 5 วิธีการ เหมือนข้อ ก.7 – ก.8 ของไมโตซิส

โอกาสที่นักศึกษาจะเห็นการแบ่งเซลล์ทุกระยะภายในหนึ่งสไลด์นั้นยาก จึงควรขอเพื่อนนักศึกษาใกล้เคียงดูระยะการแบ่งเซลล์ที่ยังไม่เห็น

พยายามแยกระยะต่างๆ ของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสและไมโอซิสให้มากที่สุดโดยเปรียบเทียบกับภาพถ่ายที่แสดงให้ดู ให้สังเกตตำแหน่ง chiasma ที่ซึ่งโครโมโซมมีการแลกส่วนกัน

เปรียบเทียบการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซิสระหว่างเซลล์พืชและเซลล์สัตว์โดยดูการแบ่งเซลล์ไมโตซิสของเซลล์สัตว์ (ตัวอ่อนของ white fish หรือ ascaris) ที่ตั้งแสดงไว้

ผลการทดลอง

1. วาดรูป แสดงระยะเมตาเฟส อะนาเฟส และทีโลเฟสของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซีส

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. วาดรูประยะ pachytene diplotene diakinesis metaphase I metaphase II anaphase II และ telophase II ของการแบ่งนิวเคลียสแบบ meiosis

.....

.....

.....

.....

วิจารณ์และสรุป

การแลกส่วนกันของโครโมโซม การแยกและการจับคู่อย่างอิสระของโครโมโซมมีผลทำให้เกิดการผันแปรลักษณะทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตหรือไม่อย่างไร

คำถาม

1. ถ้าต้องการทราบจำนวนโครโมโซมภายในเซลล์ ควรจะนับโครโมโซมระยะใดของการแบ่งเซลล์เพราะเหตุใด ?

2. ทำไมจึงไม่มีการลดจำนวนโครโมโซมในกระบวนการแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis ?

3. ขณะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ meiosis พฤติกรรมแบบใดของโครโมโซมที่ทำให้จำนวนโครโมโซมในนิวเคลียสของเซลล์ใหม่ มีจำนวนลดลงครึ่งหนึ่ง ?

4. สังเกตได้อย่างไรว่าเซลล์ที่เห็นเป็นเซลล์พืชหรือเซลล์สัตว์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะ telophase ของ mitosis

5. ในระยะ diplotene และ diakinesis จะเห็นโครโมโซมมีรูปร่างต่างๆ กัน เช่น รูปกากระบาดและรูปวงกลม ทำไมโครโมโซมจึงมีรูปร่างต่างกันเช่นนี้?

6. จงบอกความแตกต่างระหว่างเมตาเฟส I และ II และระหว่างอะนาเฟส I และ II

7. ถ้าจำนวนเซลล์ภายในพูของอัณฑะตั๊กแตนมี 100 เซลล์ เมื่อผ่านกระบวนการไมโอซิสจะมีจำนวนสเปิร์มที่ถูกสร้างขึ้นเท่าไร

วิธีเตรียมสารละลาย

1N HC1 ผสม 16 มิลลิลิตร HC1 เข้มข้น (12N) กับ 18.6 มิลลิลิตรน้ำกลั่น 60% acetic acid ผสม

60 มิลลิลิตร acetic acid (ความเข้มข้น 100%) กับ 40 มิลลิลิตร น้ำกลั่น

2% aceto – orcein ละลาย 2 กรัม orcein ใน 100 มิลลิลิตร 60% acetic acid อุ่นให้ร้อนเพื่อช่วยให้ orcein ละลายดีขึ้นทิ้งให้เย็นแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง

9 : 1 2% aceto – orcein : 1N HC1 ผสม 90 มิลลิลิตร 2% aceto – orcein กับ 10 มิลลิลิตร 1N HC1

วิธีเตรียมปลายรากหอมหัวใหญ่

นำหัวหอมใหญ่แช่น้ำในแก้วหรือขวดโดยเอาด้านหัวลงแช่ล่วงหน้าก่อนใช้เป็นเวลา 4 วันเมื่อรากงอกยาว 3-4 ซม. ตัดปลายรากออกยาวประมาณ 1 ซม. (ควรตัดเวลา 18.00 – 19.00 น. เพราะเป็นช่วงที่เซลล์รากหอมมีการแบ่งตัวดี) ปลายรากหอมสดสามารถนำมาทำสไลด์ศึกษาการแบ่งเซลล์ได้ทันที แต่ถ้ายังไม่ทำมีวิธีที่จะเก็บรักษาปลายรากหอมได้โดยที่เนื้อเยื่อและเซลล์จะยังอยู่ในสภาพเติมด้วยการนำปลายรากหอมแช่ในน้ำยา carnoy's solution (ประกอบด้วย 1 ส่วน actic acid 3 ส่วน chloroform และ 6 ส่วน sbsalute ethyl alcohol) หรือแช่ในน้ำยา Mcclintock's solution (1 ส่วน acetic acid และ 3 ส่วน absolute ethyl alcohol) เป็นเวลา 14 – 24 ซม. แล้วล้างปลายรากหอมด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แช่ใน 70% ethyl alcohol เก็บไว้ในตู้เย็นช่องแข็ง วิธีนี้สามารถจะเก็บปลายรากหอมไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน

วิธีทำสไลด์การแบ่งเซลล์แบบกึ่งถาวร (semipermanent slide)

และแบบถาวร (permanent slide)

ก. แบบกึ่งถาวร ทำได้โดยใช้ยาทาเล็บทาขอบแผ่นแก้วปิดสไลด์โดยรอบเพื่อกันการระเหยของสี เก็บสไลด์ในกล่องและเก็บที่อุณหภูมิประมาณ -19 ^{0}C (ตู้เย็นช่องแข็ง) วิธีการนี้สามารถเก็บสไลด์ได้อย่างน้อยเป็นเวลา 6 เดือน

ข. แบบถาวร โดยวางสไลด์บนก้อนน้ำแข็งแห้งเป็นเวลา 60 นาที หรือนานกว่านี้ความเย็นจะทำให้เซลล์แข็งติดสไลด์แล้วใช้ใบมีดโกนค่อนๆ ยกแผ่นแก้วปิดสไลด์ออก (ทำขณะที่สไลด์ยังอยู่บนก้อนน้ำแข็งแห้ง) หรือจุ่มแผ่นสไลด์ใน absolute ethyl alcohol โดยเร็วและทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นยกแผ่นสไลด์ใส่ในกระบอกแก้วที่บรรจุ absolute ethyl alcohol ทิ้งไว้ 2.5 นาที ทำซ้ำเช่นนี้อีกครั้ง สุดท้ายยกสไลด์ออกจาก ethyl aloohol แล้วหยด euparal 1 หยด บนสไลด์ค่อยๆ ปิดด้วยแผ่นแก้ว ปิดสไลด์ที่สะอาด (ระวังอย่าให้เซลล์แห้งก่อนที่จะหยด euparal) วิธีนี้สามารถจะเก็บสไลด์ได้ตลอดไป