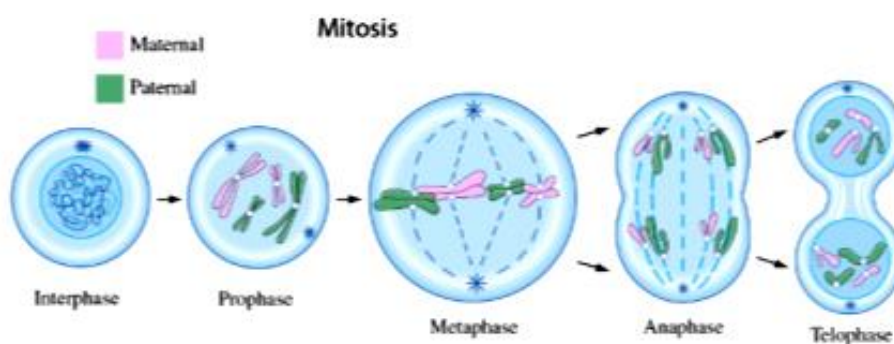


บทปฏิบัติการ การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส เริ่มต้นด้วยการเตรียมความพร้อมของเซลล์ โดยการสร้างสารประกอบต่างๆ และมีการจำลองของโครโมโซมแต่ละโครโมโซมแต่ละโครโมโซมจากหนึ่งเป็นสองโครมาทิดให้เรียบร้อยเสียก่อน ซึ่งระยะนี้เรียกว่า อินเทอร์เฟส (Interphase) หลังจากที่เซลล์สร้างสารต่างๆ พร้อมแล้ว การแบ่งเซลล์ไมโทซิสจะเกิดขึ้น ซึ่งมีระยะต่างๆ เกิดขึ้นเป็นลำดับดังนี้ คือ G_1 -S - G_2 - Mitosis และเมื่อได้เซลล์ลูกอาจจะเข้าสู่วงจรนี้อีกเรียกว่า วงจรของเซลล์ (Cell Cycle)



ภาพแสดงขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

การแบ่งเซลล์ไมโทซิสจะเกิดขึ้นกับเซลล์ร่างกาย (Somatic Cell) โดยทั่วไป เซลล์ร่างกายทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว คือ ไซโกต ไซโกตแบ่งเซลล์ไมโทซิสหลายๆ ครั้งเพิ่มจำนวนเซลล์กลายเป็นออมบริโอ (Embryo) และมีการพัฒนาไปเป็นอวัยวะต่างๆ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาเข้าใจกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส
2. เพื่อให้นักศึกษาสามารถเตรียมสไลด์เพื่อใช้ศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. น้ำยารักษาสภาพ (Fixative)
3. ปลายรากหอม
4. สีย้อม Acetocamine
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
7. สไลด์และ กระจกปิดสไลด์
8. ไบมีดโกน
9. เข็มเขี่ย
10. HCl ร้อยละ 5
11. กระดาษขาว

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมปลายรากหอม (ห้องปฏิบัติการจัดเตรียมให้)

นำหัวหอมที่ตัดบริเวณโคนรากออกแล้วไปแช่น้ำประมาณ 3 - 4 วัน รากจะงอกออกมายาวประมาณ 1 - 2.5 เซนติเมตร จากนั้นตัดรากแช่ในน้ำในน้ำยาคงสภาพ (Fixative Solution)

น้ำยาคงสภาพเซลล์มีหลายชนิด ทั้งนี้แล้วแต่จุดประสงค์ที่ต้องการใช้แต่ละชนิด ก็จะประกอบด้วยสารเคมีอย่างน้อยสองชนิด สมบัติของน้ำยาคงสภาพเซลล์โดยทั่วไป คือ ทำให้กระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดลงทันที และทำให้ส่วนต่างๆ ของเซลล์คงสภาพและอยู่ในระยะสั้นตลอดไป โดยที่โครงสร้างภายในเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

น้ำยาคงสภาพที่นิยมใช้ มี 2 ชนิด ดังนี้

1) Farmer's Solution หรือ McClintock Solution ประกอบด้วย เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (Absolute ethyl alcohol) 3 ส่วน และกรดน้ำส้มเข้มข้น (Glacial acetic acid) 1 ส่วน

2) Carnoy's Solution ประกอบด้วย เอทิลแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ (Absolute Ethyl Alcohol) 6 ส่วน คลอโรฟอร์ม (Chloroform) 3 ส่วน และกรดน้ำส้มเข้มข้น (Glacial Acetic Acid) 1 ส่วน

ทั้งแอลกอฮอล์และกรดน้ำส้มทำให้ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกโปรตีนเกิดการจับตัวกันเป็นตะกอน นอกจากนี้แอลกอฮอล์ยังช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อจึงทำให้เนื้อเยื่อ มีความแข็ง และกรดน้ำส้มทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม น้ำยาคงสภาพเซลล์ทั้งสองชนิด ต้องเตรียมสารเคมีแยกส่วนกัน เมื่อได้รามาแล้วจึงค่อยผสมสารเคมีเข้าด้วยกัน แช่ปลายรากหอมในน้ำยาคงสภาพเซลล์ ประมาณ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เปลี่ยนน้ำยาเป็นแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เก็บในตู้เย็น สามารถเก็บรักษาได้นาน 2-3 ปี

2. การเตรียมสไลด์การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสจากปลายรากหอมโดยวิธี Squash

1) นำปลายรากหอมที่เตรียมไว้ในน้ำยาคงสภาพตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากสีขาวขุ่นยาวประมาณ 2 – 3 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่สะอาด 1 – 2 ราก ส่วนของปลายรากสีขาวขุ่นเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก เซลล์บริเวณนี้มีการแบ่งเซลล์ไมโทซิสตลอดเวลา

2) หยดกรดเกลือ (HCl) ลงไปบนส่วนของราก 1 – 2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อละลายส่วนของผนังเซลล์ที่ติดกันซึ่งประกอบด้วยเพกตินและเซลลูโลส ทำให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และทำให้เซลล์อ่อนนุ่มง่ายต่อการขยี้ให้เซลล์หลุดออกจากกัน

3) ชั้บรูดอกให้หมด อาจจะหยดน้ำลงไปเพื่อล้างกรดแล้วชั้บน้ำออก หยดสีย้อมโครโมโซมลงไป 1 – 2 หยด สีที่ใช้ย้อมคือ อะซิโทคาร์มีน (สีย้อมคาร์มีน 0.5 กรัม ละลายในกรดน้ำส้มร้อยละ 45 จำนวน 100 มิลลิลิตร)

4) ใช้เข็มเขี่ยปลายแบนขยี้ปลายรากให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แยกออกจากกันได้มากที่สุด แยกเอาส่วนของรากที่มีขนาดใหญ่และขยี้ต่างๆ ทิ้งไป ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ใช้เวลา 3 – 5 นาที สำหรับการย้อมสี

5) นำสไลด์ผ่านบนเปลวไฟ (พออุ่น ๆ ขนาดที่เอามาแตะกับหลังมือจะทนได้) เพื่อให้เซลล์ของรากหอมติดกับสไลด์และโครโมโซมแผ่กระจายดีขึ้น

6) ใช้เทคนิค Squash ซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคลได้แก่ การคว่ำสไลด์ลงบนกระดาษซับแล้วใช้นิ้วหัวแม่มือกดตรงบริเวณเนื้อเยื่อให้แบนลง สีที่ล้นออกมาจะถูกกระดาษซับดูดซับไว้ หรืออาจใช้กระดาษซับ (กระดาษกรอง หรือ กระดาษทิชชู) พับครึ่งวางบนพื้นโต๊ะ สอดสไลด์ให้ด้านที่มีกระจกปิดสไลด์หงายขึ้นและให้อยู่ระหว่างกระดาษซับ ใช้นิ้วหัวแม่มือกดบนกระจกปิดสไลด์ที่อยู่ใต้กระดาษ แรงกดที่มากพอจะทำให้เนื้อเยื่อแบนราบ

7) นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาระยะต่างๆ ของการแบ่งเซลล์ไมโทซิส บันทึกผลพร้อมลงรายละเอียดในตาราง

8) ให้นักศึกษาสืบค้นภาพระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส พร้อมบรรยาย

บันทึกผลการทดลอง

ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า	ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า
ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า	ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า
ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า	ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า
ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า	ระยะ.....กำลังขยายภาพ.....เท่า

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

คำถามท้ายปฏิบัติการ

1. เพราะเหตุใดจึงเลือกปลายรากหอมในการศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส
2. วัตถุประสงค์ของการใช้น้ำยาคงสภาพในการเตรียมเซลล์ปลายรากหอม คือ
3. วัตถุประสงค์ของการเติมกรดเกลือ (HCl) ลงไปขั้นตอนการเตรียมสไลด์ตัวอย่าง คือ

ทบทวนปฏิบัติการ

<https://www.youtube.com/watch?v=pMKS1kZookA>