

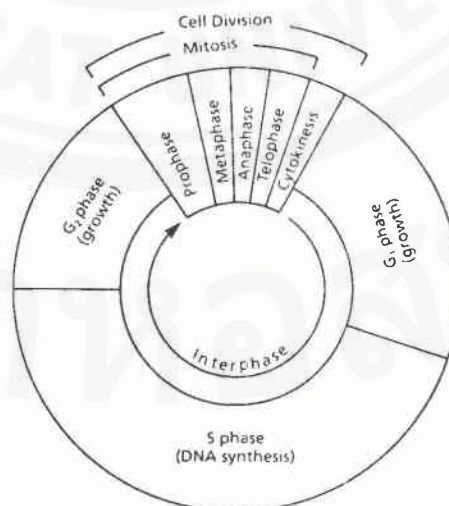
บทที่ 2

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

การเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเป็นการเพิ่มขนาด (มวล) และจำนวนของเซลล์ เซลล์จะเพิ่มจำนวนได้ด้วยการแบ่งตัวของนิวเคลียส (karyokinesis) และไซโตพลาสซึม (cytokinesis) โดยเมื่อสิ้นสุดการแบ่งตัวของนิวเคลียสแล้วก็จะเริ่มมีการแบ่งตัวของไซโตพลาสซึมทันที การแบ่งตัวของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ร่างกาย (somatic cell) เรียกว่า “ไมโทซิส” (mitosis) ซึ่งไมโทซิสในพืชและสัตว์จะมีการแบ่งตัวของนิวเคลียสเหมือนกัน แต่การแบ่งตัวของไซโตพลาสซึมแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากองค์ประกอบของเซลล์พืชมีผนังนอกสุดเป็นผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งเป็นส่วนที่แข็งและยืดหยุ่นได้น้อย ดังนั้นในการแบ่งตัวของไซโตพลาสซึมในพืชจึงไม่มีการคอดเว้าของไซโตพลาสซึมเข้าหากันจนหลุดออกจากกันเป็น 2 เซลล์เช่นเดียวกับในสัตว์ แต่จะมี phragmoplast ทำหน้าที่สร้าง cell plate ซึ่งเป็นสารประกอบของเพคติน (pectin) ชั้นบริเวณตรงกลางเซลล์และชั้นกลางระหว่างนิวเคลียสทั้งสอง แล้วจะมีเซลลูโลส (cellulose) มารวมกับ cell plate กลายเป็นผนังเซลล์

วัฏจักรของเซลล์

ก่อนที่เซลล์จะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสต้องมีการสังเคราะห์สารประกอบต่าง ๆ รวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซมจาก 1 เป็น 2 โครมาทิด (chromatid) ให้เรียบร้อยเสียก่อน ซึ่งระยะนี้เรียกว่า “อินเตอร์เฟส” (interphase) เป็นระยะที่ใช้เวลานานที่สุด อาจใช้เวลา 3-174 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับระยะของเซลล์และสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วย 3 ระยะ (รูปที่ 2-1) ดังนี้



รูปที่ 2-1 แผนภาพแสดงวัฏจักรของเซลล์

1. ระยะเวลา G_1 เป็นระยะที่นิวเคลียสและไซโตพลาสซึมขยายตัว มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน เซลล์ที่แบ่งตัวเร็วมากอาจไม่มีระยะนี้เลยก็ได้ เช่น ยีสต์ เป็นต้น แต่เซลล์ที่แบ่งตัวช้า เช่น เซลล์ของรากข้าวโพดใช้เวลา 151 ชั่วโมง เป็นต้น

2. ระยะเวลา S เป็นระยะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีนฮิสโตน (histone) โดยดีเอ็นเอจะมีปริมาณเพิ่มเป็น 2 เท่า ระยะนี้จะใช้เวลามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และสิ่งมีชีวิต

3. ระยะเวลา G_2 จะมีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวของนิวเคลียส

เมื่อเซลล์สังเคราะห์สารต่าง ๆ พร้อมแล้ว ก็จะเริ่มมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสต่อไป โดยเซลล์จะมีวัฏจักร (life cycle) ตั้งแต่ระยะ $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ (ไมโทซิส) แล้วกลับเข้าสู่ระยะอินเตอร์เฟสอีกครั้ง และวัฏจักรของเซลล์จะดำเนินเช่นนี้ต่อไปเรื่อย ๆ ปรากฏการณ์ที่หยุดการแบ่งตัวอย่างถาวร โดยเซลล์ที่หยุดการแบ่งตัวจะอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ที่เราพบในพืชและสัตว์จะอยู่ในระยะนี้ ในวัฏจักรของเซลล์ลำไส้ของหนูนั้น พบว่าในแต่ละขั้นจะใช้ระยะเวลาแตกต่างกัน คือ ระยะ G_1 ใช้เวลา 37.5% ระยะ S ใช้เวลา 50% ระยะ G_2 ใช้เวลา 7.5% และระยะ M ใช้เวลา 5%

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

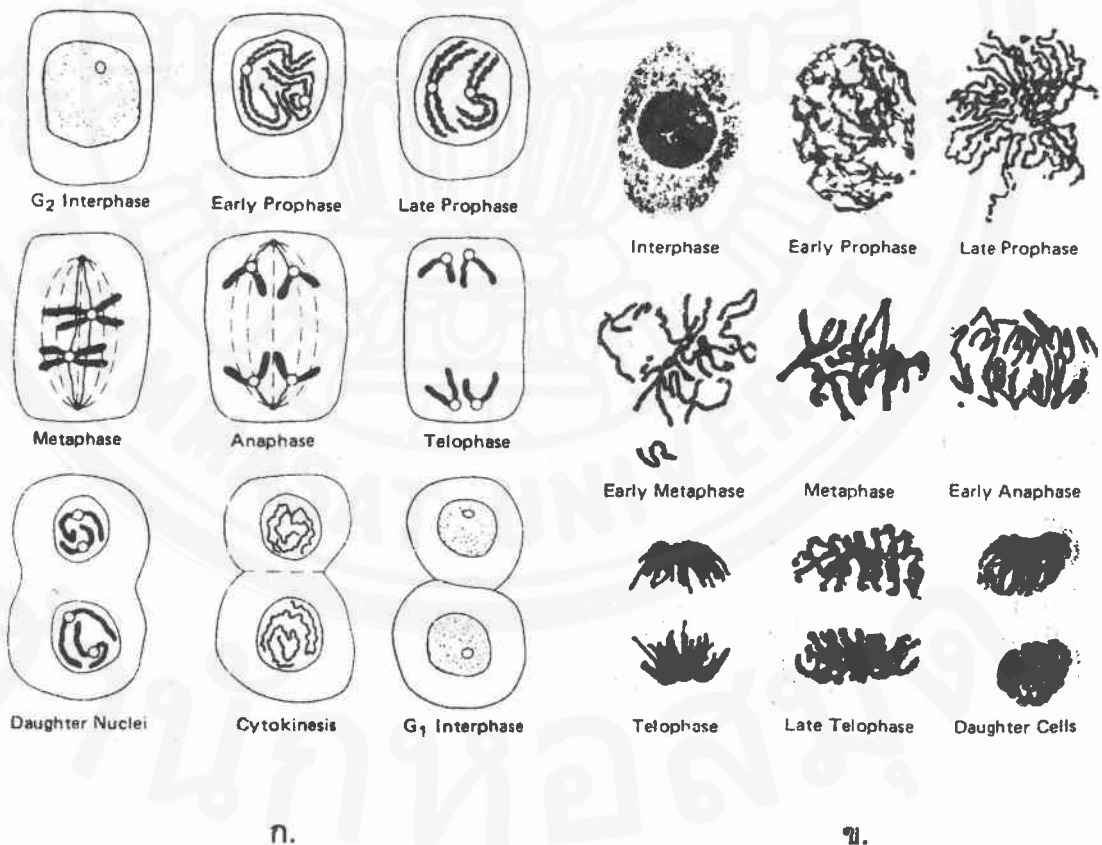
การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเป็นการแบ่งตัวของเซลล์ร่างกายเพื่อจะเพิ่มจำนวนเซลล์หรือเพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายไป โดยทั่วไปเซลล์ร่างกายทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว คือ ไซโกต (zygote) ไซโกตจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสหลาย ๆ ครั้งทำให้ได้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากมายจนกลายเป็นเอ็มบริโอ (embryo) และจะมีการพัฒนา (differentiation) ไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งเซลล์เดิม (mother cell) แต่ละเซลล์จะแบ่งตัวให้เซลล์ใหม่ (daughter cell) จำนวน 2 เซลล์ที่มีโครโมโซมและยีน (gene) เหมือนกันและเหมือนกับเซลล์เดิม การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ (รูปที่ 2-2) ดังนี้

1. โปรเฟส (prophase) โครโมโซมจะหดสั้นและหนาขึ้นทำให้มองเห็นโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ชัดเจน โดยแต่ละโครโมโซมจะมี 2 โครมาติดที่เกิดจากโครโมโซมเดียวกัน (sister chromatid) และมีส่วนที่ติดกันตรงบริเวณเซนโตรเมียร์ (centromere) ในเซลล์สัตว์เซนตริโอล

(centriole) ทั้งสองจะเคลื่อนที่ไปยังทิศทางตรงข้ามกันทำหน้าที่เป็นขั้วเซลล์ นิวคลีโอลัส (nucleolus) และเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) จะค่อย ๆ จางหายไป ในช่วงปลายระยะโปรเฟสนั้น จะเริ่มมีสปินเดิลไฟเบอร์ (spindle fiber) เกิดขึ้นและจะเชื่อมระหว่างเซนทริโอลกับไคเนโทคอร์ (kinetochore) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเซนโทรเมียร์

2. **เมตาเฟส (metaphase)** โครโมโซมจะหดสั้นที่สุด เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะหายไป โครโมโซมทั้งหมดจะเคลื่อนที่มายู่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ (equatorial plate) มีสปินเดิลไฟเบอร์เชื่อมระหว่างเซนโทรเมียร์กับเซนทริโอล และจะมีการแบ่งตัวของเซนโทรเมียร์ออกเป็น 2 ส่วน ระยะนี้เป็นระยะที่เหมาะสมในการตรวจดูโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. **แอนาเฟส (anaphase)** เป็นระยะที่ใช้เวลาสั้นที่สุด โครมาติดของโครโมโซมหนึ่ง ๆ



รูปที่ 2-2 การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (ก) เป็นแผนภาพที่มีเพียง 2 โครโมโซม (ข) เป็นการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของข้าวไรย์ที่มีโครโมโซม 7 คู่ (จาก Gordon Kimber)

จะแยกตัวออกจากกันและถูกดึงไปยังแต่ละขั้วของเซลล์ด้วยการหดตัวของสปินเดิลไฟเบอร์ ซึ่งจะ
ทำให้บริเวณเซนโตรเมียร์ของแต่ละโครโมโซมเคลื่อนที่นำหน้าไปก่อน

4. **ทีโลเฟส (telophase)** เมื่อโครโมโซมเคลื่อนที่ไปถึงขั้วเซลล์ทั้งสองด้าน สปินเดิลจะ
ค่อย ๆ จางหายไปพร้อมกับมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสปรากฏขึ้นมาล้อมรอบโครโมโซมที่ขั้วเซลล์แต่ละ
กลุ่ม เซลล์ในระยะนี้จะมี 2 นิวเคลียสและโครโมโซมจะค่อย ๆ ยึดตัวออกทำให้มีสีจางลง และมี
นิวคลีโอลัสปรากฏขึ้นใหม่ในบริเวณ nucleolar organizer ของโครโมโซม

หลังจากการแบ่งนิวเคลียสแล้ว จะเกิดการแบ่งไซโตพลาสซึมได้เซลล์ลูก 2 เซลล์ที่มี
จำนวนโครโมโซมและยีนเหมือนเซลล์แม่ทุกประการ แต่ใน 1 โครโมโซมจะมีเพียง 1 โครมาติด
เท่านั้น

การศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

การศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสทำได้โดยใช้ปลายรากของพืชซึ่งเป็นบริเวณที่เนื้อเยื่อ
เจริญที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน รากของพืชที่นิยมนำมาใช้ศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ได้แก่
รากของหอมหัวใหญ่ (*Allium cepa*; $2n=2x=16$) รากของถั่วปากอ้า (*Vicia faba*; $2n=2x=12, 14$)
เป็นต้น นอกจากนี้อาจใช้พืชอื่น ๆ ที่มีจำนวนโครโมโซมไม่มากนัก เพื่อให้สามารถดูโครโมโซมได้
อย่างชัดเจน ในปฏิบัติการนี้จะใช้รากของหอมแดง ($2n=2x=16$) เป็นตัวอย่างในการศึกษาการแบ่ง
เซลล์แบบไมโทซิส

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์ปลายรากหอม

วิธีเตรียมปลายรากหอม

นำหัวหอมที่ตัดบริเวณโคนรากออกแล้วไปแช่ในน้ำ ประมาณ 4 วันรากจะงอกออกมายาว
ประมาณ 2.5-5 เซนติเมตร ปัญหาที่พบรากหอมไม่ค่อยงอกเนื่องจากหัวหอมที่ซื้อมาจากตลาดได้
ผ่านกรรมวิธีป้องกันการงอกของรากมาแล้ว ตัดส่วนของปลายรากหอมยาว 1 เซนติเมตรในช่วง
เวลาประมาณ 9.00-11.00 น. แล้วแช่ในน้ำยาคงสภาพ เพราะเป็นช่วงเวลาที่มีการแบ่งเซลล์แบบ
ไมโทซิสมากที่สุด

น้ำยาคงสภาพ

น้ำยาคงสภาพมีหลายชนิด การเลือกใช้จึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้ โดยน้ำยา



คงสภาพแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมี 2 ชนิดหรือมากกว่าซึ่งจะส่งเสริมกัน คือ สารเคมีที่มีคุณสมบัติทำให้เซลล์บวมหรือขยายขนาดขึ้น และสารเคมีที่มีคุณสมบัติทำให้เซลล์เหี่ยว โดยทั่วไป น้ำยาคงสภาพจะมีคุณสมบัติดังนี้

1. ทำให้กระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์หยุดลงทันที
2. ทำให้ส่วนต่าง ๆ ของเซลล์คงสภาพและอยู่ในระยะนั้นตลอดไป โดยที่โครงสร้างของสารต่าง ๆ ในเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

น้ำยาคงสภาพที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ

1. Farmer's fixative หรือ McClintock solution ประกอบด้วยเอธานอล 100% (absolute ethyl alcohol) 3 ส่วน และกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) 1 ส่วน
2. Carnoy's fixative ประกอบด้วยเอธานอล 100% 6 ส่วน คลอโรฟอร์ม (chloroform) 3 ส่วน และกรดอะซิติกเข้มข้น 1 ส่วน

ทั้งแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก และต่างทำให้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์โดยเฉพาะสารพวกโปรตีนเกิดการแข็งตัว แต่แอลกอฮอล์ทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งและแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ช้ากว่ากรดอะซิติก กรดอะซิติกเมื่อซึมเข้าสู่เซลล์จะทำให้เซลล์พองโตและทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม

น้ำยาคงสภาพทั้ง 2 ชนิดต้องเตรียมสด ๆ คือ ต้องแยกสารเคมีแต่ละชนิดไว้ก่อน เมื่อได้รากล้อมมาแล้วจึงค่อยผสมสารเคมีทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยต้องแช่ปลายรากล้อมในน้ำยาคงสภาพนี้ประมาณ 18-24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงย้ายไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70% และเก็บในตู้เย็นสามารถเก็บรักษาได้นาน 2-3 ปี

สีย้อมโครโมโซม

สีย้อมโครโมโซมที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ

1. อะซีโตคาร์มีน (acetocarmine) ประกอบด้วยสีคาร์มีน 0.5 กรัมละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 45% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. อะซีโตออร์ซิน (acetoorcein) ประกอบด้วยสีออร์ซิน 2.0 กรัมละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 45% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร



ห้องสมุด
ทันยวีรวิสิ

การทดลอง

การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในเซลล์ปลายรากหอม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาเรียนรู้รูปร่างลักษณะของโครโมโซมและเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส
2. เพื่อให้นักศึกษาฝึกฝนการเตรียมสไลด์และสามารถตรวจหาเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. สไลด์และกระจกปิดสไลด์
3. สีย้อมโครโมโซมอะซีโตคาร์มีน (acetocarmine) หรืออะซีโตออร์ซีน (acetoorcein)
4. กรดไฮโดรคลอริก 5%
5. เข็มเย็บปลายแบน
6. ใบบีมิดโคน
7. ปากคีบ
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. กระดาษหิซซู
10. รากหอมที่แช่อยู่ในน้ำยาคงสภาพ

วิธีการทดลอง

1. นำปลายรากหอมที่เตรียมไว้ในน้ำยาคงสภาพมาวางบนแผ่นสไลด์โดยใช้ปากคีบ แล้วใช้ใบบีมิดโคนตัดเอาส่วนปลายรากหอมสีขาวขุ่นยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร บริเวณปลายรากหอมสีขาวขุ่นนี้เป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก เซลล์บริเวณนี้มีคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์แบบ ไมโทซิสตลอดเวลา

2. หยดกรดไฮโดรคลอริก 5% ลงไปบนปลายรากหอม 2-3 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อละลายผนังเซลล์ที่ติดกันซึ่งประกอบด้วยเพกตินและเซลลูโลส ทำให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และทำให้เซลล์อ่อนนุ่มง่ายต่อการขยี้ให้เซลล์หลุดออกจากกัน

3. ใช้กระดาษทิชชูซับกรดออกให้หมด โดยระวังอย่าให้มีเศษกระดาษทิชชูติดลงบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนปลายรากหอมทิ้งไว้สักครู่ แล้วใช้กระดาษทิชชูซับออกให้หมด เพื่อล้างกรดไฮโดรคลอริกออกจากปลายรากหอม

4. หยดสีย้อมโครโมโซมลงบนปลายรากหอม 2-3 หยด แล้วใช้เข็มเย็บปลายแบนขยี้ปลายรากหอมให้ละเอียดเพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันให้มากที่สุด

5. แยกเอาส่วนของปลายรากหอมที่มีขนาดใหญ่และขยี้ต่าง ๆ ทิ้งไปโดยใช้ปากคีบ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาทีเพื่อให้สีย้อมติดโครโมโซมจนอิมตัว

6. นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์พออุ่น ๆ ขนาดที่เอามาแตะกับหลังมือแล้วพอทนได้ เพื่อให้เซลล์ของรากหอมติดกับสไลด์และโครโมโซมแผ่กระจายดีขึ้น ระวังอย่าให้ความร้อนสูงเกินไป เพราะจะทำให้เซลล์และโครโมโซมถูกทำลายจนไม่สามารถตรวจดูการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้

7. ใช้เทคนิค squash คือ พับกระดาษทิชชูครึ่งแผ่นวางไว้บนโต๊ะปฏิบัติการ วางสไลด์ที่ย้อมสีแล้วลงบนกระดาษทิชชูให้ด้านที่มีกระจกปิดสไลด์อยู่ด้านบน พับกระดาษทิชชูอีกครั้งหนึ่งให้แผ่นสไลด์อยู่ตรงกลางระหว่างกระดาษทิชชู แล้วใช้นิ้วแม่มือกดลงบนกระดาษทิชชูให้ตรงกับตำแหน่งของกระจกปิดสไลด์ โดยใช้แรงกดมากพอที่จะทำให้เนื้อเยื่อแบนราบ ระวังอย่ากดแรงเกินไปเพราะจะทำให้กระจกปิดสไลด์แตกได้

8. ดึงแผ่นสไลด์ออกจากกระดาษทิชชู จะเห็นสีที่ล้นออกมาถูกซับด้วยกระดาษทิชชู หากบางส่วนที่ยังไม่แห้งดีให้ใช้กระดาษทิชชูซับออกให้เรียบร้อย

9. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาระยะต่าง ๆ ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ผลการทดลอง

เซลล์	รูปร่างลักษณะ	แผนภาพ
1. อินเทอร์เฟส		

เซลล์	รูปร่างลักษณะ	แผนภาพ
2. โพรเฟส		
3. เมตาเฟส		
4. แอนาเฟส		
5. ทีโลเฟส		

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

คำถาม

1. เนื้อเยื่อบริเวณ cell of elongation ใช้ศึกษาการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้หรือไม่ ? เพราะเหตุใด ?
2. เซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะใด ? เพราะเหตุใด ?
3. จากกล้องจุลทรรศน์จะเห็นสปีนเดิลไฟเบอร์หรือไม่ ? เพราะเหตุใด ?
4. สิ่งที่เห็นได้อย่างเด่นชัดว่าเซลล์อยู่ในระยะทีโลเฟส คือ อะไร ?
5. ท่านคิดว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะทีโลเฟสกับอินเตอร์เฟสต่างกันหรือไม่ ? เพราะเหตุใด ?

THAMMASAT UNIVERSITY
สำนักหอสมุด