ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

# บทที่ 2
# วิธีการวิจัย

## 2.1 วัสดุ

**สัตว์ทดลอง**

ปลากดเหลืองตัวเต็มวัยเพศผู้ จำนวน 72 ตัว

**สารเคมี**

1. 0.5% sodium metabisulfite
2. 1% ammonium sulfide
3. 1% aqueous periodic acid
4. 1% lithium carbonate
5. 2% methyl green
6. 10% formalin
7. 10% formol saline
8. alcohol
9. acetate buffer
10. acetic acid
11. Bouin's fluid
12. dehydroepiandrosterone
13. dry ice ($CO_2$)
14. Eosin
15. formol calcium
16. gelatin
17. glucose – 6 – phosphate (disodium salt)
18. glycerin jelly

19. Harris's Hematoxylin
20. hydrochloric acid
21. lead nitrate
22. magnesium chloride
23. nicotinamide
24. nicotinamide adenine dinucleotide
25. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt
26. nitro blue tetrazolium
27. normal saline
28. paraplast
29. permount
30. phosphate buffer
31. potassium cyanide
32. Schiff's reagent
33. sodium β - glycerophosphate
34. tris buffer
35. tissue embeding medium
36. uridine diphosphoglucose
37. xylene

**วัสดุวิทยาศาสตร์**

1. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (filter papers)
2. กรวยกรอง (funnel)
3. ขวดใส่ตัวอย่าง (bottom)
4. เข็มเขี่ย (loop)
5. ตัวบล๊อกชิ้นเนื้อ (mold and ring)
6. ถุงมือ (gloves)
7. ถาดอลูมิเนียม (aluminium tray)

8. เวอร์เนีย (vernier)
9. แผ่นปิดสไลด์ ขนาด 24 x 40 มิลลิเมตร (cover slide)
10. สไลด์ ขนาด 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร (slide)

## 2.2 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
2. กล้องถ่ายสไลด์สำเร็จรูป (microphotography)
3. กระบอกฉีดยาพร้อมเข็ม (disposable syringe with needle)
4. แกนสำหรับติดชิ้นเนื้อ (stub)
5. เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (embedding center)
6. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome)
7. เครื่องตัดชิ้นเนื้อด้วยความเย็น (cryostat)
8. เครื่องชั่ง (precision measure)
9. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
10. ชุดเครื่องมือผ่าตัด (surgical set)
11. ตู้อบ (oven)
12. ตู้ปรับอุณหภูมิ (incubator)

## 2.3 วิธีดำเนินการ

### การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลากดเหลืองสมบูรณ์เพศผู้ ที่มีความยาวทั้งสิ้นของลำตัวตั้งแต่ 25 เซนติเมตรขึ้นไป จากแหล่งน้ำธรรมชาติในเขตอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา โดยจะเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ที่ 2 ของทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้งๆ ละ 6 – 8 ตัว เป็นเวลา 13 เดือน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2545 ถึง เดือนธันวาคม 2546 และแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. **การศึกษาด้านกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ (Anatomy)**

นำปลากดเหลืองมาแช่แข็ง (freeze shock) วัดความยาวทั้งสิ้น (total length) และชั่งน้ำหนักของปลาทุกตัว จดบันทึกผล จากนั้นทำการเปิดช่องท้องปลา เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปภายนอกของอวัยวะสืบพันธุ์ และศึกษาระบบท่อของทางผ่านของเชื้อสืบพันธุ์ โดยการฉีดสีเข้าทางช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จดบันทึกผลและบันทึกภาพ

2. **ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology)**

หลังจากเปิดช่องท้องปลา นำอัณฑะ มาตัดแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนต้น ส่วนกลาง ส่วนปลาย และส่วนท้าย เก็บรักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่ออัณฑะในน้ำยา Bouin's fluid นาน 18 - 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (processing tissue) (Bancroft *et al.*, 2002) คือ

1. dehydration ในแอลกอฮอล์ ดังนี้

| | |
|---|---|
| 70% alcohol | 2 ชั่วโมง |
| 95% alcohol (1) | 2 ชั่วโมง |
| 95% alcohol (2) | 2 ชั่วโมง |
| absolute alcohol (1) | 2 ชั่วโมง |
| absolute alcohol (2) | 12 - 14 ชั่วโมง |

2. clearing

| | |
|---|---|
| xylene (1) | 2 ชั่วโมง |
| xylene (2) | 2 ชั่วโมง |

3. infiltration

| | |
|---|---|
| xylene : melted paraplast = 1 : 1 | 1 ชั่วโมง |
| melted paraplast (1) | 1 ชั่วโมง |
| melted paraplast (2) | 1 ชั่วโมง |

4. embedding ฝังชิ้นเนื้อเยื่ออัณฑะด้วย melted paraplast
5. sectioning ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ด้วยขนาด ความหนา 6 ไมโครเมตร แล้ววางชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์

6. staining นำสไลด์ที่ได้มาย้อมสี Hematoxylin and Eosin ซึ่งมีกระบวนการดังนี้

    1. deparaffinization section ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
    2. ล้าง xylene ออกใน absolute alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
    3. hydration ผ่านสไลด์ไปยัง 95% alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
    4. ล้างด้วยน้ำประปา ประมาณ 5 นาที
    5. ย้อมสี Harris's Hematoxylin เป็นเวลา 6 นาที ล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา ประมาณ 1 – 2 นาที
    6. differentiate ใน 1% acid alcohol ประมาณ 5 วินาที
    7. ล้างด้วยน้ำประปา ประมาณ 2 นาที
    8. neutralize หรือ ทำให้มีสีน้ำเงิน ด้วย 1% lithium carbonate ประมาณ 30 วินาที
    9. ล้างด้วยน้ำประปา ประมาณ 2 นาที
    10. ย้อมสี Eosin เป็นเวลา 1 – 2 นาที
    11. ล้างสี Eosin ด้วย 95% alcohol 2 ครั้งๆ ละ 5 –10 จุ่ม
    12. dehydration ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
    13. clearing ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
    14. mount ด้วย permount

ผลที่ได้ : นิวเคลียส ติดสีน้ำเงิน

ไซโตพลาสซึม ติดสีชมพู – ส้ม

เม็ดเลือดแดง ติดสีส้ม

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) โดยแบ่งการเจริญและการพัฒนาของอัณฑะซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Suwanjarat *et al.* (2005) ได้ 5 ระยะ ดังนี้

(1)ระยะอัณฑะพักตัว (resting stage)

(2)ระยะอัณฑะพัฒนา หรือ สร้างอสุจิ (developing stage)

(3)ระยะอัณฑะเจริญเต็มที่ (maturing stage)

(4)ระยะปล่อยอสุจิ (spawning stage)

(5)ระยะหลังปล่อยอสุจิ (spent stage)

เปรียบเทียบความแตกต่างของอัณฑะ และเซมินัล เวสิเคิลในแต่ละระยะ และในแต่ละเดือน บันทึกผล วิเคราะห์ผล และถ่ายภาพสไลด์ในแต่ละระยะ

3. ศึกษาทางฮีสโตเคมี (Histochemistry)

นำชิ้นเนื้อเยื่อของอัณฑะ และเซมินัล เวสิเคิล แช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ทันทีหลังจากเปิดช่องท้องปลา จากนั้นตัดชิ้นเนื้อสดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อด้วยความเย็น (cryostat) ที่ขนาดความหนา 30 ไมโครเมตร แล้วติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ นำเนื้อเยื่อไปศึกษาด้วยกระบวนการทางฮีสโตเคมี โดยแบ่งเป็น 5 วิธีการ ดังนี้

3.1 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์แอสิด ฟอสฟาเตส

(Acid phosphatase )

ตามวิธี Gomori lead method (Bancroft and Gamble, 2002)

หลักการ : การศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์แอสิด ฟอสฟาเตส นี้ เป็นการทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์สารตั้งต้น (substrate) ซึ่งได้แก่โซเดียมเบต้ากลีเซอโรฟอสเฟส (sodium β - glycerophosphate) ทำให้ได้ฟอสเฟสอิออน จากนั้นผลผลิตจากปฏิกิริยาแรกจะทำปฏิกิริยากับแคลเซียมอิออน ได้เป็นแคลเซียมฟอสเฟส ซึ่งจะทำปฏิริยากับเลตอิออน ทำให้ได้ตะกอนของเลตฟอสเฟส ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จึงจำเป็นต้องทำให้เกิดปฏิกิริยากับแอมโมเนียมซัลไฟด์ ให้ได้ตะกอนสีสีดำของ เลตซัลไฟด์ ขึ้น ดังปฏิกิริยา

sodium β - glycerophosphatase (substrate) $\xrightarrow{\text{acid phosphatase}}$ phosphate ion

phosphate ions + calcium ions $\longrightarrow$ calcium phosphate

calcium phosphate + lead ions $\longrightarrow$ lead phosphate

lead phosphate + sulfide ions $\longrightarrow$ lead sulfide (fine brown black precipitate)

มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์แล้วไป incubate ใน incubation media ที่ 37°c ประมาณ 30 นาที – 2 ชั่วโมง
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
3. แช่สไลด์ ใน 1% ammonium sulfide (fresh) 2 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
5. ย้อมด้วย 2% methyl green 5 นาที
6. ล้างด้วยน้ำประปา 2 นาที
7. mount ด้วย glycerin jelly

สไลด์ควบคุม : incubate ใน incubation media ที่ไม่ใส่สารตั้งต้น

ผลที่ได้ : ปฏิกิริยาของเอนไซม์แอสิด ฟอสฟาเตส ติดสีดำ
นิวเคลียส ติดสีเขียว

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปรียบเทียบกับสไลด์ควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

**3.2 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลุ่มดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase)**

**หลักการ :** เอนไซม์กลุ่มนี้มีคุณสมบัติที่สามารถดึงไฮโดรเจนออกจากสารตั้งต้นได้ ก่อนจะส่งเข้าไปยังกระบวนการออกซิเดชั่น โดยไฮโดรเจนอิออนจะไปจับกับ tetrazolium salt ทำให้เกิดตะกอนสีม่วง (formazan) ซึ่งจะปรากฏที่บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้เท่านั้น

ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ 3 ชนิด ได้แก่

**3.2.1 เอนไซม์กลูโคส 6 ฟอสเฟส ดีไฮโดรจีเนส (Glucose 6 phosphate dehydrogenase, G6PD)**

ตามวิธี Bancroft (1975) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์แล้วมา incubate ใน incubation media ที่ 37 °c ประมาณ 30 นาที – 1 ชั่วโมง
2. แช่ใน 10% formol saline 10 – 15 นาที

3. ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที

4. ย้อมด้วย 2% methyl green 5 นาที

5. ล้างด้วยน้ำประปา 2 นาที

6. mount ด้วย glycerin jelly

สไลด์ควบคุม : incubate ใน incubation media ที่ไม่ใส่สารตั้งต้น

ผลที่ได้ : ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคส 6 ฟอสเฟส ดีไฮโดรจีเนส ติดสีม่วง - ดำ (black formazan)

นิวเคลียส ติดสีเขียว

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปรียบเทียบกับสไลด์ควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

### 3.2.2 เอนไซม์ 3 เบต้า ไฮดรอกซีสเตอรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (3β - hydroxysteriod dehydrogenase, 3β-HSD)

ตามวิธีของ Levy *et al.* (1959) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์แล้วมา incubate ใน incubation media ที่ 37 °c ประมาณ 5 - 60 นาที
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
3. fix ด้วย 50% ethanol ผสม 10% formalin 30 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
5. mount ด้วย glycerin jelly

สไลด์ควบคุม : incubate ใน incubation media ที่ไม่ใส่สารตั้งต้น

ผลที่ได้ : ปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 เบต้า ไฮดรอกซีสเตอรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส ติดสีม่วง (formazan)

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปรียบเทียบกับสไลด์ควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

3.2.3 เอนไซม์ยูริดีน ไดฟอสโฟกลูโคส ดีไฮโดรจีเนส

**(Uridine diphosphoglucose dehydrogenase, UDPGD)**

ตามวิธีของ Stiller และ Gorski (1969) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์แล้วมา incubate ใน incubation media ที่ 37 °c ประมาณ 60 นาที
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
3. postfix ใน formol calcium 1 ชั่วโมง
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
5. mount ด้วย glycerin jelly

สไลด์ควบคุม : incubate ใน incubation media ที่ไม่ใส่สารตั้งต้น

ผลที่ได้ : ปฏิกิริยาของเอนไซม์ยูริดีน ไดฟอสโฟกลูโคส ดีไฮโดรจีเนส ติดสีม่วง (formazan)

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปรียบเทียบกับสไลด์ควบคุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

3.3 ศึกษาการสร้างสารพวกมิวโคโพลีแซคคาไรด์ **(mucopolysaccharide)**ด้วยวิธี Periodic Acid Schiff Reaction (PAS) ตามวิธีของ Mowry (1952) โดยใช้เนื้อเยื่อที่ผ่าน paraffin section

**หลักการ :** ปฏิกิริยานี้เกิดเนื่องจาก periodic acid จะออกซิไดซ์ 1 , 2 – glycol กรุ๊ฟให้ได้เป็นอัลดีไฮด์ซึ่งจะติดสี Schiff's reagent

มีขั้นตอนดังนี้

1. deparaffinize แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที
2. ออกซิไดซ์ ด้วย 1% aqueous periodic acid 45 นาที
3. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 1 นาที แล้วสะบัดน้ำออก
4. ย้อมด้วย Schiff's reagent 45 นาที
5 ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที

6. ย้อมสี Harris's Hematoxylin เป็นเวลา 6 นาที ล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา ประมาณ 1 – 2 นาที
7. differentiate ใน 1% acid alcohol ประมาณ 5 วินาที
8. ล้างด้วยน้ำประปา ประมาณ 2 นาที
9. neutralize หรือ ทำให้มีสีน้ำเงิน ด้วย 1% lithium carbonate ประมาณ 30 วินาที
10. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที
11. dehydrate ด้วย graded alcohol
12. clear ด้วย xylene
13. mount ด้วย permount

ผลที่ได้ : นิวเคลียส ติดสีน้ำเงิน
ไซโตพลาสซึม ติดสีชมพู – ส้ม
เม็ดเลือดแดง ติดสีส้ม

วิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ