บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

สัตว์ทดลอง

ปลาปู่ทรายระยะวัยอ่อนอายุแรกเกิดถึง 45 วัน

สารเคมี

- เอทิลแอลกอฮอล์ 100 % (absolute ethanol alcohol)
- เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (95 % ethanol alcohol)
- เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % (70 % ethanol alcohol)
- อะซิโตน 100% (absolute acetone)
- ไซลิน (xylene)
- ฟอร์มาลีน 10% (10 % formalin)
- Bouin's fluid
- acetic acid
- ลิเทียมคาร์บอเนต (lithium carbonate)
- พาราพาส พลัส (paraplast plus)
- hematoxylin
- eosin
- carmine
- alcian Blue
- cobolt nitrate

อุปกรณ์

- เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (rotary microtome)
- เครื่องฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (embedding center)
- อ่างปรับอุณหภูมิ (water bath)
- แผ่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
- ตู้อบ (oven)

- สไลด์ขนาด 25.4x76.2 มิลลิเมตร
- แผ่นปิดสไลด์ขนาด 24x50 มิลลิเมตร
- กล้องจุลทรรศน์
- กล้องถ่ายสไลด์สำเร็จรูป
- เครื่องแก้ว

2.วิธีดำเนินการ

2.1 การเตรียมตัวอย่างปลาบู่ทราย

เก็บตัวอย่างลูกปลาบู่ทราย จากบ่อเพาะเลี้ยงปลาของภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี จังหวัดปัตตานี

ทำการเก็บตัวอย่างลูกปลา ตั้งแต่ออกจากไข่จนกระทั่งมีอายุได้ 45 วัน โดยมีความถี่ในการเก็บดังตาราง

กลุ่มที่	อายุปลา (วัน)	ความถี่ในการเก็บ	จำนวน (ตัว / ครั้ง)
1	1 - 7	เก็บทุกวัน	15
2	8 - 21	เก็บทุก 2 วัน	15
3	22 - 30	เก็บทุก 3 วัน	15
4	31 - 45	เก็บทุก 5 วัน	15

แบ่งตัวอย่างปลาแช่ทั้งตัวในน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อ 3 ชนิดๆละ 5ตัว

น้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อมี 4 ชนิด ดังนี้

Bouin's fluid สำหรับศึกษา acid mucosubstance

absolute ethanol สำหรับศึกษา glycogen

absolute acetone สำหรับศึกษา alkaline phosphatase

2.2 **ศึกษาความสัมพันธ์ของอายุปลาและขนาดปลา**

วัดขนาดลำตัวทั้งสิ้น (total length) ของปลาทุกกลุ่ม ด้วยเวอร์เนีย หาค่าเฉลี่ย และทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาว โดยใช้วิธีทดสอบทางสถิติแบบ linear regression ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และศึกษาความแตกต่างของการเจริญของปลาในแต่ละช่วงของอายุ ด้วยวิธีทดสอบทางสถิติแบบ T-test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

2.3 **การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา**

แช่ปลาทั้งตัวใน Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่าน ethanol ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 70% ไปจนถึง 100% เพื่อทำการขับน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) จากนั้นนำเนื้อเยื่อผ่าน xylene และฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (embedded) ใน paraffin นำเนื้อเยื่อไปตัดตามยาว ให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ จากนั้นย้อมด้วย Harris's hematoxylin & eosin (Humason,1979) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ผ่านเนื้อเยื่อใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
2. ผ่าน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
3. ผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
4. ผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
5. ย้อมสีด้วย Harris's hematoxylin ประมาณ 7 นาที
6. จุ่มในน้ำประปา 2 นาที
7. Differentiate ใน1% acid alcohol 5 วินาที
8. จุ่มในน้ำประปา 2 นาที
9. ผ่านใน saturated lithium carbonate ประมาณ10 วินาที
10. ล้างด้วยน้ำประปา 1-2 นาที
11. ย้อมด้วย eosin ประมาณ 1 นาที
12. ผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
13. ผ่าน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
14. ผ่าน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
15. ปิดสไลด์ด้วย permount

จากนั้นตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพ

2.4 การศึกษาทางฮีสโตเคมี

2.4.1 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase

แช่ปลาทั้งตัวใน absolute acetone ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็น absolute ethanol ครึ่งชั่วโมงต่อด้วย light petroleum จากนั้นฝังเนื้อเยื่อลงใน paraffin ตัดเนื้อเยื่อตามยาว ให้มีความหนา 6 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ นำไปศึกษา alkaline phosphatase ด้วยวิธี calcium cobalt ตามขั้นตอนตาม (Chayan *et al.*, 1969)ดังนี้;

1. ผ่านเนื้อเยื่อลงใน light petroleum เป็นเวลา 2-3 นาที
2. ผ่าน absolute acetone แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
3. นำไป incubate ใน incubating medium ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
4. ผ่านใน 2 % cobalt nitrate 5นาที ล้างน้ำกลั่น
5. จุ่มใน 1% yellow ammonium sulphide เป็นเวลา 1 นาที
6. ผ่านลงใน 95% และ absolute ethanol อย่างละ 2 ครั้งๆละ 2 นาที
7. ผ่าน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
8. ปิดสไลด์ด้วย permount

จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และบันทึกภาพ บริเวณที่แสดงปฏิกิริยาของ alkaline phosphatase จะเห็นตะกอนสีดำหรือสีน้ำตาลของ calcium cobalt

2.4.2 การศึกษาปริมาณ glycogen

แช่ปลาทั้งตัว ใน absolute ethanol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อผ่าน xylene และฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (embedded) ใน paraffin นำเนื้อเยื่อไปตัดตามยาวและตามขวาง ความหนา 6 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ จากนั้นย้อมด้วย Best's carmine ตามขั้นตอนต่อไปนี้ (Chayan *et al.*, 1969)

1. ผ่านเนื้อเยื่อใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
2. ผ่าน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
3. ผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
4. ผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
5. ย้อมสีด้วย Harris's hematoxylin ประมาณ 2 นาที
6. Differentiate ใน 1% acid alcohol 5 วินาที
7. ผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 2 นาที
8. ย้อมสีด้วย carmine solution ประมาณ 5 ถึง 15 นาที

9. ล้างด้วย Best's differentiator
10. ผ่านลงใน absolute ethanol 3 ครั้งๆละ 2 นาที
11. ผ่าน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
12. ปิดสไลด์ด้วย permount

2.4.3 **การศึกษาปริมาณ acid mucosubstance**

แช่ปลาทั้งตัว ใน Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่าน ethanol ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 70% ไปจนถึง 100% เพื่อทำการขับน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) จากนั้นนำเนื้อเยื่อผ่าน xylene และฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (embedded) ใน paraffin นำเนื้อเยื่อไปตัดตามยาวความหนา 6 ไมโครเมตร ติดลงบนสไลด์ จากนั้นย้อมด้วย alcian blue ตามขั้นตอนต่อไปนี้ (Chayan *et al.*, 1969)

1. ผ่านเนื้อเยื่อใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
2. ผ่าน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
3. ผ่าน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
4. ผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
5. ย้อมสีด้วย Harris's hematoxylin ประมาณ 7 นาที
6. ผ่านน้ำประปาเป็นเวลา 2 นาที
7. ย้อมสีด้วย alcian blue ประมาณ 5 ถึง 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำ
8. ผ่านลงใน 95% และ absolute ethanol อย่างละ 2 ครั้งๆละ 2 นาที
9. ผ่าน xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
10. ปิดสไลด์ด้วย permount

จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และบันทึกภาพ บริเวณที่มี acid mucosubstance จะเกิดปฏิกิริยาสีฟ้าเขียว