บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

สารเคมี

1. 0.5% toludine blue
2. 1% lithium carbonate
3. 1% osmium tetraoxide
4. 4% paraformaldehyde
5. 70% alcohol
6. 95% alcohol
7. absolute alcohol
8. acetic acid
9. Bouin's fluid
10. developer
11. eosin
12. epoxy
13. fixer
14. Gilson's fluid
15. hematoxylin
16. hydrochloric acid
17. jelatin
18. lead acetate
19. Mollary I, II
20. normal saline
21. osmium tetroxide

22. paraplast
23. permount
24. phosphate buffer
25. propylene oxide
26. 2% และ 5%uranyl acetate
27. xylene

วัสดุวิทยาศาสตร์

1. ถุงมือ (gloves)
2. ถาดอลูมิเนียม (aluminium tray)
3. ตัวบล๊อกชิ้นเนื้อ (mold and ring)
4. เจลลาติน แคปซูล (gelatin capsule)
5. เข็มเขี่ย (loop)
6. ไม้บรรทัด (ruler)
7. ตัวช่วยนับ (counter)
8. ขวดใส่ตัวอย่าง (bottom)
9. กรวยกรอง (funnel)
10. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (filter papers)
11. สไสด์ขนาด 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร (slide)
12. แผ่นปิดสไลด์ขนาด 24 x 50 มิลลิเมตร (cover slide)

2.2 อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัด (surgical set)
2. เครื่องชั่ง (precision measure)
3. เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (embedding centre)
4. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome and ultramicrotome)
5. อ่างปรับอุณหภูมิ (water bath)

6. เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
7. ตู้อบ (oven)
8. กล้องสเตอริโอ (stereo microscope)
9. กล้องจุลทรรศน์ (ligth microscope)
10. กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)
11. เครื่องอัดรูป (enlarger)
12. กล้องถ่ายสไลด์สำเร็จรูป (microphotography)

2.3 วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาบู่ทรายเพศเมียที่เป็นตัวโตเต็มวัย มีความยาวทั้งสิ้นของตัวปลามากกว่า 15 เซนติเมตร ขึ้นไป จากแหล่งธรรมชาติในเขตจังหวัดปัตตานี โดยจะเก็บตัวอย่างปลาสัปดาห์ที่ 2 ของทุกเดือนๆ ละ 1 ครั้งๆ ละ 6 ตัว เป็นเวลาติดต่อกัน 12 เดือน และแบ่งการศึกษาออกเป็น 5 ส่วน

1. การหาค่าดัชนีการเจริญพันธุ์ (Gonadosomatic index, GSI)

นำปลาบู่ทรายมาแช่แข็ง (freeze shock) วัดความยาวทั้งสิ้น (total length) และชั่งน้ำหนักของปลาทุกตัว จดบันทึกผล ทำการเปิดช่องท้องปลา ตัดอวัยวะส่วนของรังไข่ทั้งหมดซึ่งมี 2 พู ออกมาชั่งน้ำหนักทันที บันทึกผล เพื่อนำมาคำนวณค่าดัชนีการเจริญพันธุ์ (Tomasini, Collart and Guignard, 1996; Fouda, Hanna and Fouda, 1993)

$$GSI = \frac{\text{wet weight of ovary}}{\text{wet weight of fish}} \times 100$$

วิเคราะห์ค่า GSI ที่ได้ในแต่ละเดือน เพื่อให้ทราบฤดูกาลวางไข่ของปลาบู่ทราย วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีการเจริญพันธุ์กับน้ำหนักรังไข่ น้ำหนักของตัวปลา และความยาวทั้งสิ้นของตัวปลา ด้วย correlation

2. ค่าความดกของไข่ (Fecundity)

แบ่งรังไข่ออกมา 1 พู มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น (anterior part) ส่วนกลาง (middle part) และส่วนปลาย (posterior part) สุ่มเอาไข่สุกแก่จากทั้ง 3 ส่วนๆ ละ 10 % ของน้ำหนักรังไข่ นำมาเก็บรักษาสภาพ (fixation) ในน้ำยา Gilson's fluid นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3-5 ครั้ง และนับจำนวนตัวอย่างไข่ ด้วยกล้องสเตอริโอบันทึกผล (Jons and Miranda, 1997; Ntiba and Jaccarini, 1990) คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่จากทั้ง 3 ส่วน จากนั้นคำนวณหาค่าความดกของไข่ทั้งรังไข่ และวิเคราะห์ผลด้วย regression เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าความดกของไข่กับน้ำหนักของรังไข่ น้ำหนักของตัวปลา และความยาวทั้งสิ้นของตัวปลา (Yoneda *et al*., 1998; Fouda, Hanna and Fouda, 1993)

3. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histology)

นำรังไข่อีก 1 พู มาตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย เก็บรักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ในน้ำยา Bouin's fluid นาน 18-24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (processing tissue) (Elorduy-Garay and Ramirez-Luna, 1994) คือ

1. dehydration ในแอลกอฮอล ดังนี้

   70% alcohol 2 ชั่วโมง

   95% alcohol (1) 2 ชั่วโมง

   95% alcohol (2) 2 ชั่วโมง

   100% alcohol (1) 2 ชั่วโมง

   100% alcohol (2) 12-14 ชั่วโมง

2. clearing

   xylene (1) 2 ชั่วโมง

   xylene (2) 2 ชั่วโมง

3. infiltration

   xylene : melted paraplast = 1:1 1 ชั่วโมง

   paraplast (1) 1 ชั่วโมง

   paraplast (2) 1 ชั่วโมง

4. embedding ฝังชิ้นเนื้อรังไข่ด้วย melted paraplast
5. sectioning ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ให้มีขนาด

ความหนา 5 ไมโครเมตร แล้ววางชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์

6. staining นำสไลด์ที่ได้มาย้อมสี Hematoxylin and Eosin ซึ่งมีขบวนการดังนี้

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 Hematoxylin เป็นเวลา 6 นาที ล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา ประมาณ 1-2 นาที
6. differentiate ใน 1% acid alcohol ประมาณ 5 วินาที
7. ล้างน้ำประปา ประมาณ 2 นาที
8. ทำให้มีสีน้ำเงิน หรือ Neutralize ด้วย 1% Li_2CO_3 ประมาณ 5-10 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. dehydratation ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
13. clearing ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
14. mount ด้วย permount

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) โดยแบ่งพัฒนาการของรังไข่ตามการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไข่ได้ 5 ระยะ ตามวิธีการของ Mayer, Shackley and Ryland (1988)

(1) ระยะไข่อ่อน (immature stage)

(2) ระยะไข่พัฒนาขั้นต้น (early developing stage)

(3) ระยะไข่พัฒนาขั้นปลาย (late developing stage)

(4) ระยะไข่สุก (gravid stage)

(5) ระยะไข่หลังวางไข่ (spent stage)

แยกความแตกต่างของระยะโอโอไซต์ในตัวเดียวกัน และเปรียบเทียบในแต่ละเดือน บันทึกผล วิเคราะห์ผล และถ่ายภาพสไลด์

4. การศึกษาปริมาณการสะสมของโยล์ค (Yolk)

คงสภาพชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ไว้ใน Bouin's fluid ไว้นาน 18-24 ชั่วโมง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย นำชิ้นเนื้อเยื่อผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (ขั้นตอนจะเหมือนกับหัวข้อ 3) แล้วนำมาย้อม Mallory's trichrome เพื่อศึกษาการสะสมของโยล์ค ตามวิธีของ Pantin method (1946) ซึ่งมีขบวนการดังนี้

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. นำลงน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
5. ย้อมสี Mallory I นาน 15 วินาที
6. ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 5 จุ่ม
7. ย้อมสี Mallory II นาน 2 นาที
8. ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ 5 จุ่ม
9. dehydratation ใน 95% alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
10. ผ่าน absolute alcohol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
11. clearing ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
12. mount ด้วย permount

วิเคราะห์การเกิดและปริมาณของโยล์ค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

คงสภาพชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ไว้ใน 4% paraformaldehyde in 0.1 M. phosphate buffer นาน 24 ชั่วโมง โดยเก็บไว้ที่ 4°C นำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อดังนี้

1. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อใน 0.1 M. phosphate buffer pH 7.2 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
2. post fixation ใน 1% OsO_4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. ล้างชิ้นเนื้อเยื่อในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. block-staining ด้วย 2% uranyl acetate เป็นเวลา 20 นาที
5. dehydration

   70% alcohol (1) 5 นาที

70% alcohol (2) 5 นาที

70% alcohol (3) 5 นาที

80% alcohol (1) 5 นาที

80% alcohol (2) 5 นาที

80% alcohol (3) 5 นาที

90% alcohol (1) 5 นาที

90% alcohol (2) 5 นาที

90% alcohol (3) 5 นาที

100% ethanol (1) 15 นาที

100% ethanol (2) 15 นาที

6. infiltration

propylene oxide (1) 15 นาที

propylene oxide (2) 15 นาที

propylene oxide : epoxy resin = 1:1 1 ชั่วโมง

propylene oxide : epoxy resin = 1:2 1 ชั่วโมง

epoxy resin 3 ชั่วโมง

7. embedding โดยนำชิ้นเนื้อมาฝังด้วย epoxy resin ใน gelatin capsule

8. polymerization ที่ปรับอุณหภูมิ 70-80°C 12-24 ชั่วโมง

9. sectioning ตัดเนื้อเยื่อด้วยอัลตร้าไมโครโตม (ultramicrotome)

- thick section ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 300-400 นาโนเมตร วางบนสไลด์ นำมาย้อมสี 0.5% toludine blue เพื่อหาบริเวณที่ต้องการศึกษา

- thin section ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 60-90 นาโนเมตร วางไว้บนกริด (grid) ย้อมสีแบบ floating method 5% uranyl acetate และ lead acetate

ศึกษาโครงสร้างละเอียดของโอวาเรียนฟอลลิเคิล (ovarian follicle) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน