วัสดุและวิธีการ

ใช้กบ : *(Rana pipiens)* เพศผู้ที่โตเต็มวัย จำนวน ๑๕ ตัว เลี้ยงในaquarium และให้จิ้งหรีดเป็นอาหาร เมื่อทำการทดลอง สลบกบด้วย ๑๐ % tricaine methanesulfonate (MS-222) เมื่อกบสลบดีแล้วผ่าบริเวณหน้าอก ใช้ท่อ polyethylene ขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง ๐.๐๒๓ นิ้ว) สอดเข้าไปใน conus arteriosus infuse normal saline (๐.๙ %) เข้าสู่หัวใจกบโดยผ่านทางท่อ polyethylene ใช้กรรไกรตัดที่ ventricle ของหัวใจให้เป็นช่องขนาดพอประมาณ เพื่อให้เลือดไหลผ่านได้ infuse normal saline จนกระทั่งน้ำที่ออกจาก ventricleใส แสดงว่าล้างเลือดออกจากส่วนต่างๆ ของลำตัวหมดแล้ว จึงเปลี่ยนสารละลายที่ infuse เป็น phosphate buffered (0.10M, ph 7.3) fixative infuse ประมาณ ๒๐ นาที ใช้กรรไกรตัดส่วนหัวของกบออกเพื่อแกะสมอง fix สมองใน phosphate-buffered Bouin's fixative อีก ๒ วัน หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งสีเหลืองของ fixative หายไป แล้วจึงนำไป embed ใน paraffin ตัด serial section(8 μm) ในแนวตามขวางและตามยาวและ mount tissue บนสไลด์ที่เคลือบด้วย gelatin (0.5% gelatin + 0.05% chrome alum).

หาตำแหน่งของ ir-LHRH ที่อยู่บนเนื้อเยื่อสมองบน sectionโดยใช้วิธี unlabeled antibody enzyme technique (Sternberger, 1974)ใช้ paraffin section ที่เตรียมได้จาก hypothalamus ของหนูเป็น preliminary experiment(ผลการทดลองไม่ได้แสดงไว้) เพื่อให้แน่ใจถึง immunocytochemical technique โดยเปรียบเทียบกับผลงานที่ Crimและคณะ(1979) ได้ศึกษาไว้ และเพื่อที่จะใช้วิธีการย้อมสไลด์ให้ได้ภาพที่เด่นชัดสยกระหว่างตำแหน่งที่มี LHRH กับ background

Immunocytochemical techniqueในการย้อมสไลด์

ลำดับขั้นตอนของ Immunocytochemical techniqueในการย้อมสไลด์มีดังต่อไปนี้

๑. Hydrate สไลด์

๒. ผ่านสไลด์ลงไปใน Tris buffer (0.05M,pH 7.6)ที่มี ๐.๙ % NaCl และ ๑ % normal sheep serum (๓ นาที, ที่อุณหภูมิ ๔°C.) สารละลายนี้ยังใช้สำหรับเจือจาง antiserum อีกด้วย

๓. ผ่านสไลด์ลงไปใน ๑๐๐ % normal sheep serum (๒๐ นาที, อุณหภูมิห้อง; Gibco)

๔. ผ่านสไลด์ลงไปใน rabbit anti-LHRH serum (๑: ๑,๕๐๐,๔๘ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ ๔°C, Miles-Yeda) สารละลายนี้ทำหน้าที่เป็น primary antibody

๕. ล้างสไลด์ด้วย Tris buffer (0.05M,pH 7.6) ที่มี ๐.๔ % NaCl และ ๑ % normal sheep serum (๓ ครั้งๆ ละ ๓ นาที, ที่อุณหภูมิ ๔°C)

๖. ผ่านสไลด์ลงไปใน sheep anti-rabbit serum (๑: ๒๐๐, ๑๐ นาที, ที่อุณหภูมิห้อง; Cappel) สารละลายนี้ทำหน้าที่เป็น secondary antibody

๗. ล้างสไลด์ด้วย Tris buffer (0.05M,pH 7.6) ที่มี ๐.๔ % NaCl และ ๑ % normal sheep serum (๓ ครั้งๆ ละ ๓ นาที, ที่อุณหภูมิ ๔°C)

๘. ผ่านสไลด์ลงไปใน rabbit anti-peroxidase peroxidase soluble complex (๑ : ๒๐๐, ๑๐ นาที, ที่อุณหภูมิห้อง; Cappel)

๙. ล้างสไลด์ด้วย Tris buffer (0.05M, pH 7.6) (๓ ครั้งๆ ละ ๓ นาที, ที่อุณหภูมิ ๔°C)

๑๐. ผ่านสไลด์ลงไปในสารละลาย Hanker-Yates (0.15%,Hanker) ที่มี H_2O_2 (๐.๐๑ %) (๕ นาที ที่อุณหภูมิห้อง)

๑๑. ล้างสไลด์ด้วย Tris buffer (0.05M,pH 7.6) (๓ ครั้งๆ ละ ๓ นาที,ที่อุณหภูมิ ๔°C)

๑๒. Dehydrate สไลด์

๑๓. Mount ด้วย balsm

สไลด์ที่เป็น control

เตรียมสไลด์ที่เคลือบด้วย gelatin หมายเลขเรียงกันจำนวน ๖ แผ่น mount serial paraffin section ที่ตำแหน่งเรียงติดกันจากสมองของกบตัวเดียวกันบนสไลด์ที่เคลือบด้วย gelatin แต่ละแผ่น แผ่นละ ๑ section เรียงติดต่อกัน แล้วนำสไลด์นี้ไปย้อมตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น แต่แทนที่จะผ่านสไลด์ลงไปใน rabbit anti-LHRH serum (1°Ab)

สไลด์แผ่นที่ ๑ ผ่านลงไปใน normal rabbit serum

สไลด์แผ่นที่ ๒ ผ่านลงไปใน rabbit anti-LHRH serum(สำหรับเปรียบเทียบ)

สไลด์แผ่นที่ ๓ ผ่านลงไปในสารละลายที่เติมฮอร์โมน LHRH สังเคราะห์(1 µg/ml; Beckman) ลงไปใน rabbit anti-LHRH serum.

สไลด์แผ่นที่ ๔ ผ่านลงไปในสารละลายที่เติมฮอร์โมน Thyrotropin-releasing hormone (TRH)สังเคราะห์(1 µg/ml; Beckman) ลงไปใน rabbit anti-LHRH serum

สไลด์แผ่นที่ ๕ ผ่านลงไปในสารละลาย rabbit anti-LHRH serum (สำหรับเปรียบเทียบ)

สไลด์แผ่นที่ ๖ ผ่านลงไปในสารละลายที่เติมฮอร์โมน Somatostatin สังเคราะห์ (1 µg/ml; Beckman)ลงไปใน anti-LHRH serum