

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

ในที่นี้วิธีการ เลี้ยงและดำเนินการทดลองคัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ
WURMBACH (1952 - 1968) (จาก Pooput, 1966, 1968)

1. การนำตัวอ่อนมาเลี้ยงในอ่างทดลอง

นำไข่ของคางคกชนิด Bufo melanostictus จากพ่อแม่คู่เดียวกัน ที่ผสมพันธุ์ใหม่ ๆ มาเลี้ยงในห้องทดลอง เมื่อตัวอ่อนฟักออกจากไข่แล้ว 3 วัน แยกมาเลี้ยงในอ่างกระจกขนาดยาว 30 x กว้าง 20 x สูง 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร อ่างละ 100 ตัว โดยคัดเลือกให้มีขนาดเท่า ๆ กัน ในอ่างทดลองบรรจุน้ำอยู่ 3 ลิตร (ครั้งแรกใช้น้ำจากที่นำไข่มา 1 ลิตร และน้ำจากห้องทดลอง 2 ลิตร) นำเลี้ยงที่ไซในห้องทดลองเป็นน้ำประปา (แผนกชีววิทยา จุฬาฯ) ซึ่งใส่ทิ้งไว้ในถังพลาสติกขนาดใหญ่อ่างกินไว้ 2 - 3 คืน โดยมีออกซิเจนผ่านตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อไล่อากาศอื่นที่มีอยู่ในน้ำประปาออกให้หมด และให้น้ำมีปริมาณของออกซิเจนมาก เหมาะในการเลี้ยงตัวอ่อน อ่างทดลองที่ไซอยู่ในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิห้องประมาณ 29 - 35 องศา เซ็นติเกรด และมีแสงสว่างจากหลอดไฟ (day-light lamp) วันละ 12 ชั่วโมง หลอดไฟนี้อยู่เหนืออ่างทดลองประมาณ 2 เมตร น้ำในอ่างทดลองทุกอ่างต้องมีออกซิเจนผ่านตลอดเวลา โดยไซท่อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ปลายข้างหนึ่งเป็นลูกปัดลอยอากาศซึ่งจุ่มลงในอ่างทดลอง ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งติดต่อกับเครื่องปั๊มพ้อากาศ ไซกลีปหนีบท่อพลาสติกเพื่อปรับให้อากาศหรือออกซิเจนออกพอสมควร ทั้งนี้เพราะปริมาณของออกซิเจนต่ำน้อยหรือมากเกินไปจะมีผลต่อการเจริญเติบโตตามปกติของตัวอ่อนสัตว์ทดลอง บิดอ่างทดลองด้วยผ้ากอส เพื่อป้องกันยุงหรือสัตว์อื่นลงไปไซ หรือรบกวนตัวอ่อนของสัตว์ทดลอง และป้องกันไม่ให้ตัวสัตว์ในระยะตัวสำเร็จ (ระยะมี 4 ขา และหางหดสั้น) กระโดดหนีออกจากอ่างทดลองได้

2. การให้อาหารและน้ำยาทดลอง

การให้อาหารและน้ำยาทดลอง เริ่มค่นภายหลังจากที่เหงือกภายนอกของตัวอ่อนหลุดหมดแล้ว เมื่อตัวอ่อนมีอายุได้ 3 วัน ระยะนี้เป็นระยะที่ปากของตัวอ่อนเริ่มมีการเจริญคี่ที่จะกินอาหารได้ ให้ใบผักกาดหอมค้มกันวันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ใบ เช้าและเย็น ส่วนน้ำยาทดลองให้วันละครั้ง

น้ำยาทดลองใช้ Steroid hormone 2 ชนิด

Hydrocortisone acetate (Cortison, Schering, Western Germany) 10 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute alcohol 10 มิลลิลิตร

Oestradiol (Schering, Western Germany.) 10 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute alcohol 10 มิลลิลิตร

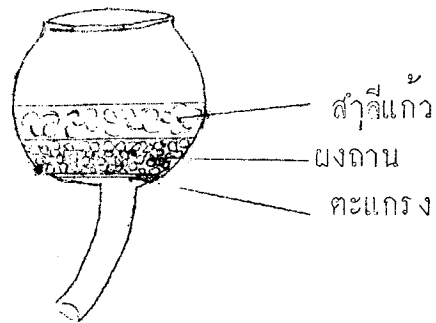
การให้น้ำยาทดลอง ให้โดยฉีดลงไปใต้น้ำเลี้ยงตัวอ่อน ด้วยกระบอกฉีดยาขนาดบรรจุ 1 มิลลิลิตร สำหรับ Hydrocortisone acetate ความเข้มข้นที่ใช้มี 2 ค่า คือ 0.2 และ 0.05 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 1 ลิตร ส่วน Oestradiol ใช้ความเข้มข้น 0.2 มิลลิลิตร ต่อ น้ำ 1 ลิตร การให้น้ำยานี้ให้ทุกวันพร้อมกับการให้อาหารในตอนเช้า หลังจากที่มีการล้างทำความสะอาดอ่างทดลองประจำวันแล้ว

3. การล้างทำความสะอาดอ่างทดลอง

ใช้หลอดแก้วโป่งกลางตุกเศษอาหารที่เหลือ และของเดียบที่สัตว์ทดลองถ่ายออกมาที่ตกอยู่ตามพื้นอ่างออกทุกวัน เป็นปริมาณประมาณ 0.5 - 1 ลิตร แล้วแคววอ่างจะสกปรกมากน้อยเพียงใด แล้วเติมน้ำจากห้องทดลองที่เก็บไว้ลงไปเท่ากับปริมาณที่คูกออก การเอาน้ำออกและ การใส่น้ำเข้าตองคอย ๆ ทำอย่างระมัดระวัง และไม่ควรรทำพร่าเพื่อ เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การทำความสะอาดพิเศษนอกเหนือไปจากปกติ ทำ 3 วันต่อครั้ง โดยใช้แผนฉายาว ๆ แบน ๆ ซูกเช็ดตามขอบอ่างและก้นอ่าง ซึ่งสกปรกเนื่องจากคราบอาหาร

และสิ่งสกปรกจากสัตว์ทดลองติดค้างอยู่ เมื่อตัวอ่อนโตมากขึ้นกินอาหารมากขึ้นและถ่ายของเสียมากขึ้น น้ำในอ่างทดลองจะต้องถูกถ่ายและกรองให้สะอาด เพื่อป้องกันการสะสมของแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อผลการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ เครื่องมือที่ใช้กรองเป็นหลอดแก้วปลายงอ ทรงปลายวางตะแกรงพลาสติกเล็กๆ มีผงถ่าน (active coal) และสำลีแก้ว (glass cotton) วางซ้อนอยู่ตามลำดับ ดังรูป



ในกรณี ที่อ่างทดลองใส่น้ำยาทดลอง ต้องวัดปริมาณน้ำที่เอาออกทุกครั้ง แล้วเติมน้ำที่มีปริมาตรเท่ากัน เติม ฮอร์โมน ลงไปให้มีความเข้มข้นเท่ากับ ความเข้มข้นที่ใสแล้วจึงค่อย ๆ รินน้ำนี้ลงไป ในอ่างทดลอง

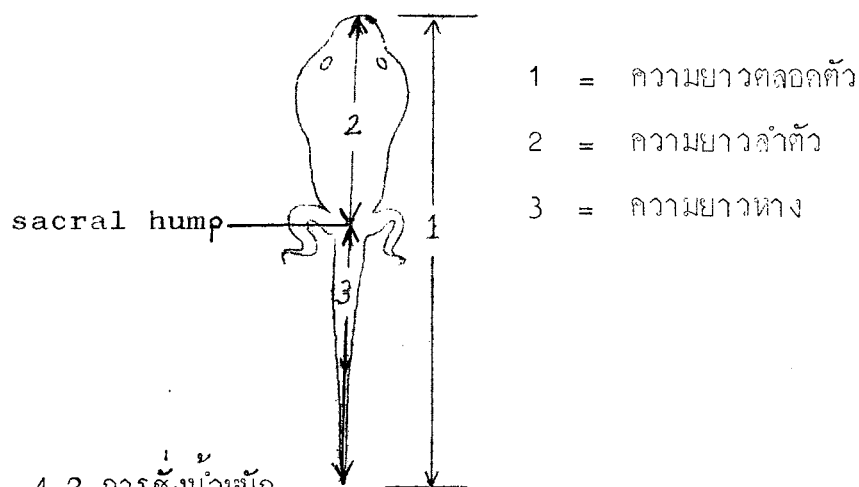
4. การนำสัตว์ทดลองมาเพื่อวัดผลการเจริญเติบโต

คัดเลือกคู่สัตว์ทดลองจากขนาดที่มีมากที่สุด ในอ่าง ครั้งละ 4 ตัว เท่า ๆ กัน ทำให้สลบด้วยน้ำยาสลบ (Ethyl alcohol : Ether : Chloroform = 1 : 2 : 3) แล้วนำมาวัดความยาวโดยใช้กระดาษมิลลิเมตรวางใต้จานแก้วที่ใส่สัตว์ทดลอง นำสัตว์ทดลองไปชั่งน้ำหนัก 2 ตัว ส่วนอีก 2 ตัว ที่เหลือนำมาถ่ายรูปและเก็บไว้สำหรับทำหุ้ปร่างคงที่ ในการถ่ายรูปทุกครั้งใช้กระดาษมิลลิเมตรวางติดกับสัตว์ทดลอง โดยวางใต้จานแก้วที่ใส่สัตว์ทดลอง แล้วจึงถ่ายรูป

ในกรณีที่มีการเจริญรวดเร็วมาก ในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Metamorphosis) ระยะเวลาที่เลือกจับสัตว์ทดลองของแต่ละอ่างจะแตกต่างกันไป

4.1 การวัดขนาดความยาว

ความยาวที่วัด คือ ความยาวตลอดตัว (Total length) ความยาวลำตัว (Trunk length) และความยาวหาง (Tail length)



4.2 การซังน้ำหนัก

ใช้ช้อนพลาสติกเล็ก ๆ ช้อนสัตว์ทดลอง 2 ตัว ที่สลบแล้ววางบนกระดาษซับเพื่อซับน้ำตามตัวออก แล้ววางบนกระดาษซับแห้งที่ลงรายการ (label) และซังน้ำหนักไว้ก่อนแล้ว ซังน้ำหนักทันทีด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ส่วนน้ำหนักที่เกินเป็นน้ำหนักเปียกรวมทั้งกระดาษที่วาง คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเปียกที่แท้จริง ต่อจากนั้นนำกระดาษซับที่มีสัตว์ทดลองและซังแล้ว ไปเข้าเตาอบอุณหภูมิประมาณ 60 – 70 องศา เซนติเกรด อบทิ้งไว้ 5 วัน แล้วจึงนำมาซังเป็น น้ำหนักแห้งครั้งที่ 1 นำไปอบอีก 2 วัน แล้วเอามาซังน้ำหนักแห้งครั้งที่ 2

5. การทำให้รูปร่างคงที่

นำสัตว์ทดลองอีก 2 ตัว ตัดหางออกแล้วใช้ปลายเข็มเล็ก ๆ แหว่งที่ท้อง ทำให้รูปร่างที่ควายน้ำยา Bouin's fixative เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วนำสัตว์ทดลองไปฝัง Paraffin โดยผ่านไปในน้ำยาต่าง ๆ ดังนี้ 70 %, 80 %, 95 % ethyl alcohol, Butyl alcohol และ Xylol

6. การศึกษาทาง Histology

นำตัวอ่อนปกติ และตัวอ่อนที่ถูกทดลองด้วยฮอร์โมน Hydrocortisone acetate (0.2 มิลลิลิตร/ลิตร), Hydrocortisone acetate (0.05 มิลลิลิตร/ลิตร) และ Oestradiol (0.2 มิลลิลิตร/ลิตร) ระยะเวลาหลังโตเต็มที่ ระยะเวลาหน้า ระยะเวลาหลังสิ้น และระยะตัวสำเร็จที่ฝัง Paraffin ไว้ อย่างละ 2 ตัว มาตัด serial section หนา 6 ไมครอน ย้อมด้วยสี English Haematoxylin และ Eosin นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อศึกษาลักษณะของคอมไทรอยด์ แล้วทำ Photomicrograph