

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

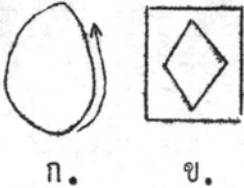
1. นกหงส์หยก Melopsittacus undulatus ที่ใช้ในการทดลอง เป็นนกมาจากแหล่งเพาะพันธุ์นกในเมืองไทยอายุตั้งแต่ 2-- 8 เดือน จำนวน 12 คู่ มีสีต่าง ๆ กันคือ เขียว เหลือง และขาว
2. เครื่องมือที่ใช้เลี้ยงไก่แก
 - 2.1 กรงนกขนาด 2 x 3 x 2 เมตร
 - 2.2 อาหารนกไก่แก ข้าวฟ่าง ข้าวเมล็ดมะเขือ ผักหอม ถั่วลิสง
 - 2.3 รังสำหรับนกไข่ ไผ่มะพร้าวแห้ง 2 ซีกประกบกันมีข้อลัดดังภาพที่ 2
3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา
 - 3.1 ขวดขนาด 2.5 x 4 ซม. จำนวน 24 ใบ
ขวดขนาด 3.5 x 5.5 ซม. จำนวน 24 ใบ
สำหรับใช้ในการ fix และดอง specimen
 - 3.2 Watch glass ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. จำนวน 3 อัน เพื่อใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อ สำหรับ fix
 - 3.3 กรรไกรปลายโค้ง สำหรับตัด
 - 3.4 Forceps สำหรับยกเนื้อเยื่อขึ้นจากไข่แดง
 - 3.5 กระจกครอบเบอร์ 42 ใช้ในการซึ่งตัวอ่อนให้ตั้ง
 - 3.6 ตูพักไข่ สำหรับพักไข่ ชนิดใช้ไฟฟ้า ไม่มีพัดลม และไอน้ำของบริษัทรวมทอง
 - 3.7 Bouin fixative และ FAA fixative สำหรับ fix ตัวอ่อน
 - 3.8 Xylene และ แอลกอฮอล์ สำหรับ dehydrate ตัวอ่อน
 - 3.9 Paraplast สำหรับ embed tissue
 - 3.10 Canada balsm สำหรับ mount tissue
 - 3.11 สี Haematoxylin และ Eosin สำหรับย้อม section และ whole mount
 - 3.12 กล้องจุลทัศน์ ใช้กล้องจุลทัศน์ที่ติดกับกล้องถ่ายรูป (Nikon F)
Ocular lens ขนาด 2.5x , 5x , และ 10x
Objective lens ขนาด 2x , 4x , และ 10x
กล้อง Stereo zoom ที่มีกำลังขยายตั้งแต่ 7 - 30 เท่า

วิธีดำเนินงาน

1. นานกที่มีอายุ 2 - 8 เดือนมาเลี้ยงในกรงขนาด 2 x 3 x 2 เมตร ให้อาหารและเปลี่ยนน้ำทุกวัน 3 - 4 วันให้ผักกาดหอมครึ่งหนึ่ง เมื่อนกจับคู่จะตกไข่ครั้งละ 5 - 7 ฟอง

2. นำไขนกที่อยู่ในระยะ gastrulation มาฟักที่อุณหภูมิ 100°ฟ (โดยทำการทดลองฟักที่อุณหภูมิตั้งแต่ 96 ถึง 103°ฟ พบว่าที่ 100°ฟ นกจะฟักออกจากไข่ได้อย่างปกติ) และในตู้ฟักไข่ลาดพื้นที่หน้าตัด 495 ตารางเซนติเมตร ใส่ น้ำสูง 1.5 ซม. เพื่อเป็นการเพิ่มความชื้นในตู้ฟัก

3. นำไข่ที่ฟักได้ในระยะต่าง ๆ ดังกล่าวในข้อ 2 มาศึกษาตามวิธีของ Humerson (1967) โดยวางไข่ในแนวนอน เอาทางด้าน air space เข้าหา ตัว ไข่กรรไกรคอย ๆ เคาะไข่ด้าน air space เพียงเบา ๆ พอให้ไข่บวม แล้วไข่ กรรไกรตัดเปลือกไข่ไปรอบ ๆ เพียงครั้งเดียว ดังรูป ก. ข่ายมือ เปิดเปลือกไข่ออก จะเห็น germinal disc เทไข่ใส่ใน petridish ให้ตัวอ่อนอยู่ ด้านบน ตัดกระดาษกรองออกให้เป็นรูปสี่เหลี่ยม ขนาดพอดีกับขนาดของไข่แดง หรือประมาณ 1 x 1



ถึง 1.5 x 1.5 ซม. ตัดตรงกลางของกระดาษออกดังรูป ข. นำกระดาษกรอง ที่ได้ไปวางบนไข่แดง โดยให้บริเวณที่เป็นตัวอ่อนอยู่ตรงกลางของกระดาษกรองที่ ตัดออก สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งการเตรียมเนื้อเยื่อออกเป็น 2 แบบคือ

3.1 ไข่ FAA fixative หยดลงบนตัวอ่อนทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วแช่น้ำ 2 นาที ย้อมด้วยสี Haematoxylin นำไปล้างสีที่ติดมากเกินไป ด้วยน้ำปุ้ปะปาที่ไหลตลอดเวลา จนสี Haematoxylin เปลี่ยนเป็นสี deep blue แล้วจึงนำมา dehydrate ด้วยแอลกอฮอล์ 70%, 80%, 90%, 95%, n-butyl, xylene clear ด้วย Cedra wood oil และ mount ด้วย Canada balsm.

3.2 ไข่ Bouin fixative หยดลงบนตัวอ่อนทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ไข่กรรไกรปลายโค้งคอย ๆ ตัดตัวอ่อนให้แยกจากไข่แดง ตามรอยของกระดาษ กรอง จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีเนื้อเยื่อขึ้นมา นำเนื้อเยื่อที่ได้ ใส่ลงใน Bouin fixative ทิ้งไว้ประมาณ 4 - 6 ชั่วโมง ถ้าตัวอ่อนอยู่ในระยะต้นของการ เจริญเติบโตประมาณ 1 ชั่วโมงจนถึง 48 ชั่วโมง ให้แช่ทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง สำหรับตัวอ่อนที่เจริญมากขึ้นประมาณ 50 - 96 ชั่วโมง ให้แช่ทิ้งไว้ประมาณ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมา dehydrate โดยใส่แอลกอฮอล์ 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, n-butyl, xylene แล้ว clear ด้วย Cedra wood oil (Rugh, 1962) ในการ dehydrate ต้องล้างเอาสีเหลืองของ picric acid ที่มีอยู่ใน Bouin ออกให้หมด โดยเติม NH_4OH 3% โดยปริมาตร ผสม

ลงใน 70% แอลกอฮอล์ จะทำให้สีของ picric acid ออกได้ดียิ่งขึ้น (Rugh, 1962) นำเนื้อเยื่อที่ dehydrate แล้วไป embeded ด้วย paraplast โดยตัดเอากระดาดากรองออกก่อน แลวนำไปตัด section ย้อมด้วยสี

Haematoxylin และ Eosin

4. สำหรับตัวอ่อนที่มีอายุได้ 5 วันขึ้นไปทำเฉพาะ whole mount โดยนำไปแช่ใน FAA 48 ชั่วโมง แลวนำไปดองใน 70% แอลกอฮอล์ จากนั้นนำมาตรวจดูลักษณะต่างๆ