สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวางแผนการทดลองโดยใช้สารสกัดฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 จากแม่เพรียงทราย เพื่อกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ โดยนำแม่เพรียงทรายและแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมาสกัดและวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนทั้งสองชนิด เมื่อทราบระดับฮอร์โมนในแม่เพรียงทรายและแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ จึงนำสารสกัดจากแม่เพรียงทรายบ่มเลี้ยงกับเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไข่ จากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและองค์ประกอบภายในเซลล์ไข่

1. การสกัดฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4

1.1 การเตรียมตัวอย่างแม่เพรียงทราย อาหารธรรมชาติ และแม่กุ้งกุลาดำ

ซื้อแม่เพรียงทรายจากเกษตรกรที่รวบรวมแม่เพรียงจากบริเวณชายหาด จังหวัด ชลบุรี และแม่เพรียงทรายฟาร์มเพาะเลี้ยง จากอนัตตชัยโพลีคัลเจอฟาร์ม จังหวัดระยอง ขนส่งมีชีวิต มาเลี้ยงต่อยังศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปรับสภาพ แม่เพรียงทรายก่อนการทดลองโดยเลี้ยงในถังไฟเบอร์ ขนาด 10 ลิตร ที่มีชั้นทรายละเอียด และระดับน้ำลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ที่ความเค็มน้ำทะเล 30 ส่วนในพัน ให้อาหารปั่นสำหรับลูกกุ้งกุลาดำละลายในน้ำ จำนวน 1 ครั้งต่อวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกวัน

อาหารธรรมชาติของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลอง คือ กุ้งก้ามกราม *(Macrobrachium rosenbergii)* หมึก (*Logigo* sp.) หอยลาย (*Paphia* sp.) กุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon)* เพรียงเลือด (*Marphysa* sp.) และ เพรียงทราย (*Perinereis* sp.)

แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากเฟิร์สท ฟาร์ม จังหวัดภูเก็ต ผ่าตัดแยกอวัยวะของแม่กุ้งเป็น 3 ส่วน คือ เลือด รังไข่ และกล้ามเนื้อ โดยดูดเลือดกุ้งบริเวณด้านท้ายเปลือกคลุมหัว (Carapace) หรือบริเวณโคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 ผสมกับ 1% Na-EDTA (Anticoagulant) จากนั้นตัดบริเวณกึ่งกลางเปลือกคลุมหัว และเปลือกบริเวณลำตัวออกเพื่อหาตำแหน่งรังไข่ รังไข่มีลักษณะแผ่เป็นปีกคล้ายผีเสื้อและทอดแนวยาวตลอดลำตัวคู่กับลำไส้ ใช้กรรไกรเลาะตามท่อรังไข่จนถึงบริเวณขาวายน้ำคู่สุดท้าย ใช้ปากคีบดึงรังไข่ออก ตัดกล้ามเนื้อน้ำหนักประมาณ 5 กรัม ตัวอย่างทั้งหมดทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°c เพื่อสกัดฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 ต่อไป

1.2 วิธีการสกัดฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4

ทำความสะอาดแม่เพรียงทรายด้วยน้ำกลั่น บดเนื้อเยื่อแม่เพรียงทั้งตัวใช้ Tissue Homogenizer ใน 4% โซเดียมคลอไรด์ (4% NaCl) ชั่งตัวอย่างที่บด 1 กรัมใส่ในหลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร สกัดตัวอย่างด้วย ไดเอททิล อีเธอร์ (Diethyl ether) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นแยกส่วนผสมทั้งสองที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที เมื่อตัวอย่างแยกชั้นจึงเก็บส่วนน้ำใสชั้นบน ทำให้แห้งด้วย Vacuum dryer และเก็บที่อุณหภูมิ –80°c สำหรับอาหารธรรมชาติ และแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ อวัยวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ เลือด รังไข่ และกล้ามเนื้อ โดยขั้นตอนการสกัดใช้วิธีเดียวกับการสกัดในแม่เพรียงทราย

1.3 วิธีการวัดระดับโปรตีน (Bradford, 1976)

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานบีเอสเอ (Bovin serum albumin ; BSA) 1 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เจือจางสารมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.05 0.06 0.08 0.1 0.2 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้น เตรียม dye reagent อัตราส่วนระหว่าง dye reagent ต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1 ต่อ 4 และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ปริมาณ 0.01 กรัมผสมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง อย่างละ 10 ไมโครลิตร ลงในเพลท 96 หลุม (96 well) และปิเปต dye reagent 200 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 5-60 นาที แล้วจึงนำเข้าเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน P4 โดยเทคนิค เรดิโอ อิมมูโน เอสเส (Radioimmunoassay; RIA) (Kamonpatana *et al.*, 1979)

ทำการทดลองที่โครงการ ใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตว์แพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำตัวอย่างของฮอร์โมนสกัดที่ทำแห้ง มาละลายใน Phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Anti-Progesterone (Antibody ; As-P) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที และเติมสารกัมมันตรังสีทริเทียม [(1,2,6,7-^{3}H)P4] ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°C อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จึงเติม ice-cold dextran-coated charcoal ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที และแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกตัวอย่าง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 15°C จำนวน 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสด้านบนและปิเปต Scintillation [0.01% 1,4 –bis-214 Methyl-5-Phenyloxyzolyl-Benzole (POPOP), 0.3%

P-Terphynyl (pTP) ละลายใน Toluene ปริมาตร 2.5 ลิตร] ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนP4โดยเครื่อง Liquid Scintillation Counter (Beckman, USA) คำนวณระดับของฮอร์โมนเทียบกับกราฟมาตรฐานสารตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน 17α-OHP4 โดยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมน ลิควิด โครมาโทกราฟฟี (High performance liquid chromatography ; HPLC) (Warrier *et al.*, 2001)

นำตัวอย่างที่สกัดตามวิธีข้างต้นละลายด้วยเมธานอล 1 มิลลิลิตร และกรองตัวอย่างผ่านเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Supor^{R}-450 Membrane, Waters, USA) แล้วฉีดตัวอย่างผ่าน Reversed phase-HPLC (คอลัมน์ Prevail C18 column ขนาด 0.46x15 เซนติเมตร, Alltech, USA) สารตัวพา (mobile phase) คือ เมธานอล ต่อ น้ำกลั่น อัตราส่วน 85:15 (v/v) ปรับอัตราไหลของสารตัวพา (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC Dual λ Absorbance detector (Waters 2487, USA) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4. การแยกสารสกัดฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 จากแม่เพรียงทราย

ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Warrier *et al.* (2001) โดยนำตัวอย่างแม่เพรียงทรายที่สกัดตามวิธีข้างต้น เพื่อแยกสารสกัดฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 ด้วย HPLC เนื่องจากต้องการสารที่มีความบริสุทธิ์สำหรับการทดลองเหนี่ยวนำเซลล์ไข่ภายในรังไข่แม่กุ้งทะเล ดังนั้น จึงแยกสารสกัดทั้งสองจากค่า retention time (RT) สารสกัด 17α-OHP4 และ P4 มีค่า retention time เท่ากับ 6 และ 12.8 นาที ตามลำดับ เมื่อแยกส่วนของสารสกัดที่ต้องการได้แล้ว นำไประเหยแห้งโดยก๊าซไนโตรเจนและเก็บที่อุณหภูมิ –80°c เพื่อใช้บ่มเลี้ยงเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ

5. การเตรียมความเข้มข้นของสารสกัด P4 17α-OHP4 และ รังไข่แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ เพื่อศึกษาการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ โดยวิธี *in vitro*

เมื่อแยกสารสกัดทั้งสองออกจากกัน เก็บส่วนที่ได้ระเหยแห้งโดยก๊าซไนโตรเจน สำหรับการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองชนิดเพื่อบ่มเลี้ยงกับเซลล์ไข่ภายในรังไข่ จะใช้ระดับฮอร์โมนที่พบในรังไข่แม่กุ้งเป็นตัวกำหนด โดยแบ่งระดับฮอร์โมนออกเป็น ฮอร์โมน P4 ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.4 0.7 และ 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และฮอร์โมน 17α-OHP4 ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ1.0 2.0 และ 3.0 นาโนกรัมต่อมิลลิตร การเตรียมรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ดัดแปลงการทดลองจาก Tsukimura (1991) ผ่าตัดรังไข่อ่อนของแม่กุ้งกุลาดำ (Previtellogenic oocytes) แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกนำชิ้นรังไข่ตรึงในน้ำยาตรึงเดวิดสัน (Davidson's fixative) เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมก่อนการทดลอง (Fixed) และส่วนที่สองนำชิ้นรังไข่บ่มกับฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำโดยตัดชิ้นรังไข่ขนาด 5 มิลลิเมตร ลงใน 24 well culture plate โดยมีปริมาตรของน้ำเลี้ยง (M199) (ประกอบด้วย NaCl 26.7; KCl 1.11; $MgCl_2$ 0.36; $MgSO_4$ 0.62 และ $CaCl_2.2H_2O$ 3.4 กรัมต่อลิตร) 1 มิลลิลิตร (Webster, 1986) น้ำเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองกรองด้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นผสมกับสารสกัดหรือฮอร์โมนสังเคราะห์ และบ่มเลี้ยงกับเซลล์ไข่บนเครื่องเขย่า (Incubater shaker) ที่อุณหภูมิ 25°c โดยไม่มีการเติมอากาศ การทดลองใช้เวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำเลี้ยงผสมฮอร์โมนทุก 1 ชั่วโมง เมื่อบ่มเลี้ยงจนครบ 24 ชั่วโมง จึงนำชิ้นรังไข่ตรึงใน Davidson's fixative เพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของชิ้นรังไข่

6. การทดลองความเข้มข้นฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 จากสารสกัดแม่เพรียงทรายและฮอร์โมนสังเคราะห์ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ

ออกแบบการทดลองเป็นแบบ Complete randomized design (CRD) โดยทดลองความเข้มข้นฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 จากสารสกัดแม่เพรียงทรายและฮอร์โมนสังเคราะห์ แบ่งการทดลองเป็น 12 กลุ่ม โดยกลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4

กลุ่มการทดลอง	สารสกัด	ฮอร์โมนสังเคราะห์
1	P4 0.4 ng/ml	-
2	P4 0.7 ng/ml	-
3	P4 1.0 ng/ml	-
4	-	P4 0.4 ng/ml
5	-	P4 0.7 ng/ml
6	-	P4 1.0 ng/ml
7	17α-OHP4 1.0 ng/ml	-
8	17α-OHP4 2.0 ng/ml	-
9	17α-OHP4 3.0 ng/ml	-
10	-	17α-OHP4 1.0 ng/ml
11	-	17α-OHP4 2.0 ng/ml
12	-	17α-OHP4 3.0 ng/ml

หมายเหตุ กลุ่มควบคุมที่1 ตรึงชิ้นรังไข่ในน้ำยารักษาสภาพ

กลุ่มควบคุมที่2 บ่มเลี้ยงชิ้นรังไข่ในอาหารเลี้ยงไม่เติมฮอร์โมน

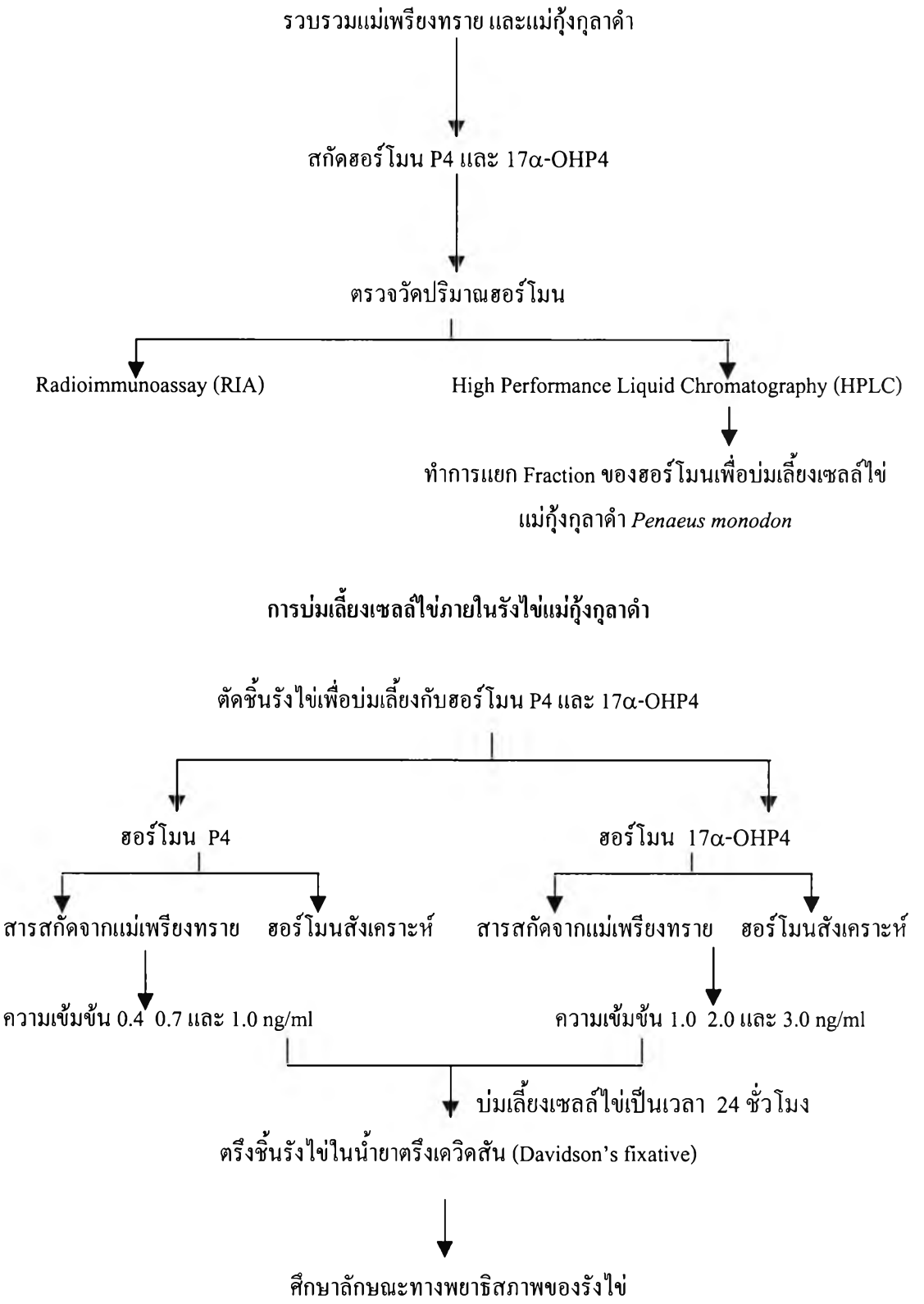
7. การศึกษาผลของสารสกัด P4 และ 17α-OHP4 ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ

ติดตามผลการพัฒนาของเซลล์ไข่ภายในรังไข่ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระยะเซลล์ไข่และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นรังไข่ตรึงในน้ำยาตรึงเดวิดสัน (Davidson's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนั้นนำชิ้นรังไข่ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ และนำชิ้นรังไข่แช่พาราฟินเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้พาราฟินผ่านเข้าช่องว่างของชิ้นรังไข่ จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวตัดด้วยเครื่อง Microtome ขนาด 3-5 ไมโครเมตร และย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) (Tsukimura, 1991) สังเกตผลจากระยะของเซลล์ไข่และความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Yano, 1985) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดและฮอร์โมนสังเคราะห์ สรุปขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 3

8. การวิเคราะห์

ทดสอบผลของสารสกัด P4 และ17α-OHP4 จากแม่เพรียงทราย ต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์แม่กุ้งกุลาดำโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ขั้นตอนการวิเคราะห์และการทดลองผลของฮอร์โมน P4 และ 17α-OHP4 ต่อการพัฒนาไข่กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*