บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. การทดลอง

1.1 เก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด ***Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*** และ ***Pseudodon vondembuschianus ellipticus*** จากคลองลำตะคอง ตำบลลาดบัวขาว อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ขนาดความยาวเปลือกจากด้านหน้า (anterior) ถึงด้านท้าย (posterior) ตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ใน ***H. (H.) bialatus*** และตั้งแต่ 8 เซนติเมตร ใน ***P. vondembuschianus ellipticus***

1.2 นำหอยมุกที่ได้มาปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ โดยใช้เนื้อเยื่อชิ้นแมนเทิล ซึ่งมีขนาดและรูปร่างต่าง ๆ กัน โดยใช้จำนวนหอยในการทดลองดังรายละเอียดตามตารางที่ 2

รูปร่างและขนาด / ชนิด	สามเหลี่ยมด้านเท่า				วงกลม (รัศมี)				สี่เหลี่ยมจตุรัส				กลุ่มควบคุม	รวม
	2 มม.	4 มม.	6 มม.	8 มม.	1 มม.	2 มม.	3 มม.	4 มม.	2 มม.	4 มม.	6 มม.	8 มม.		
H. (L.) bialatus	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1300
P.vondembuschianus ellipticus	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1300

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนหอยในแต่ละวิธีการทดลอง

โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแมนเทิลให้เป็นชิ้นที่มีรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กันจะทำด้วยโลหะ ซึ่งมีลักษณะแสดงดังรูปที่ 1 และชิ้นแมนเทิลที่ตัดได้จะมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2 โดยชิ้นแมนเทิลที่ตัดแล้วจะแช่อยู่ใน normal saline การปลูกถ่ายชิ้นแมนเทิลจะปลูกถ่ายไว้ในชั้นแมนเทิลของหอยตัวรับและบริเวณที่ปลูกถ่ายจะอยู่บริเวณด้านท้ายของหอยตัวรับ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. การทดลอง

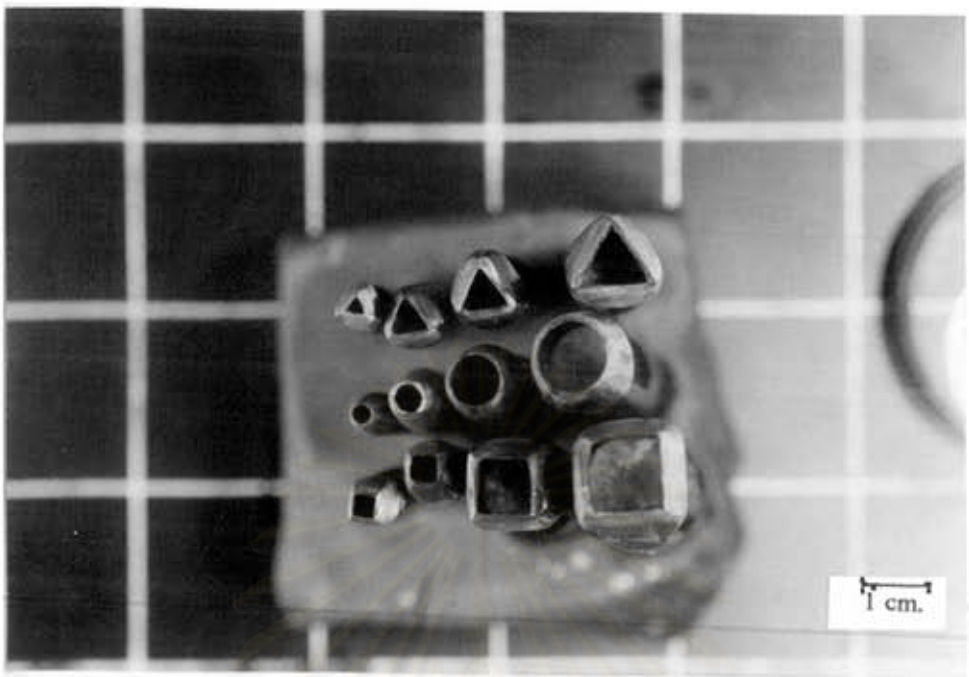
1.1 เก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด ***Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus*** และ ***Pseudodon vondembuschianus ellipticus*** จากคลองลำตะคอง ตำบลลาดบัวขาว อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้ขนาดความยาวเปลือกจากด้านหน้า (anterior) ถึงด้านท้าย (posterior) ตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ใน ***H. (H.) bialatus*** และตั้งแต่ 8 เซนติเมตร ใน ***P. vondembuschianus ellipticus***

1.2 นำหอยมุกที่ได้มาปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ โดยใช้เนื้อเยื่อชิ้นแมนเทิล ซึ่งมีขนาดและรูปร่างต่าง ๆ กัน โดยใช้จำนวนหอยในการทดลองดังรายละเอียดตามตารางที่ 2

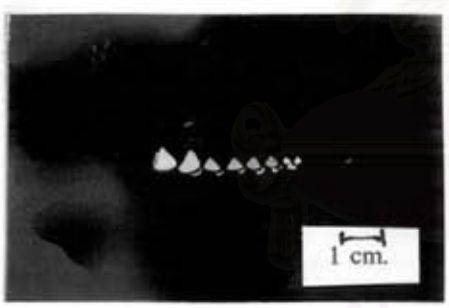
รูปร่างและขนาด / ชนิด	สามเหลี่ยมด้านเท่า				วงกลม (รัศมี)				สี่เหลี่ยมจตุรัส				กลุ่มควบคุม	รวม
	2 มม.	4 มม.	6 มม.	8 มม.	1 มม.	2 มม.	3 มม.	4 มม.	2 มม.	4 มม.	6 มม.	8 มม.		
H. (L.) bialatus	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1300
P.vondembuschianus ellipticus	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1300

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนหอยในแต่ละวิธีการทดลอง

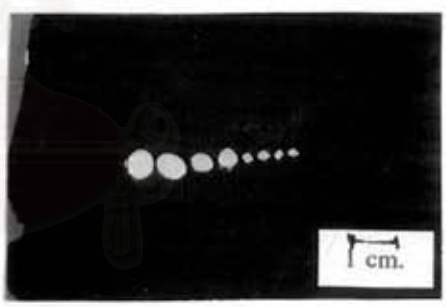
โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแมนเทิลให้เป็นชิ้นที่มีรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กันจะทำด้วยโลหะ ซึ่งมีลักษณะแสดงดังรูปที่ 1 และชิ้นแมนเทิลที่ตัดได้จะมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2 โดยชิ้นแมนเทิลที่ตัดแล้วจะแช่อยู่ใน normal saline การปลูกถ่ายชิ้นแมนเทิลจะปลูกถ่ายไว้ในชั้นแมนเทิลของหอยตัวรับและบริเวณที่ปลูกถ่ายจะอยู่บริเวณด้านท้ายของหอยตัวรับ



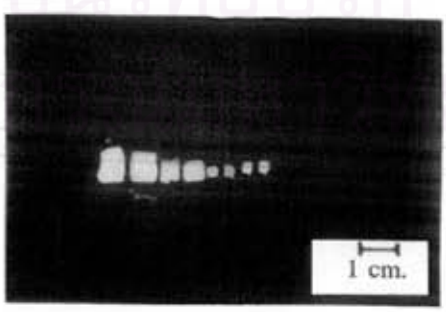
รูปที่ 1 เครื่องมือที่ใช้ในการตัดชิ้นแมนเทิลเป็นรูปต่าง ๆ



A



B



C

รูปที่ 2 ชิ้นแมนเทิลที่ใช้ในการปลูกถ่ายรูปร่างต่างๆ

A สามเหลี่ยมด้านเท่า B วงกลม C สี่เหลี่ยมจตุรัส

1.3 นำหอยที่ผ่านขั้นตอนการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อมาใส่กระชังซึ่งมีขนาด 90ซม.X 120ซม. กระชังละ 300 ตัวแล้วนำไปเลี้ยงในบริเวณสถานที่เลี้ยงหอยของงานวิจัยการเลี้ยงไข่มุกน้ำจืด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คลองลำตะคองอำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา คลองนี้มีความกว้างประมาณ 6 เมตร โดยกระชังจะวางอยู่บนพื้นคลองที่มีความลึกประมาณ 2.5 เมตร ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคมและลึกประมาณ 1 เมตร ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน

1.4 สุ่มตัวอย่างหอยมาตรวจสอบการเกิดถุงไข่มุก (pearl sac) และไข่มุกในระยะเวลา 4 เดือนแรกจะเก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยวิธี parafin section และวัดขนาดของถุงไข่มุก การสุ่มตัวอย่างหอยจะสุ่มครั้งละ 10 ตัว ต่อ 1 การทดลองและคัดเลือกหอย 2 ตัวต่อ 1 การทดลองมาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อชิ้นแมนเทิลที่ปลูกถ่ายหลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเดือนละ 1 ครั้งเพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไข่มุก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) การเก็บตัวอย่างทุกครั้งจะวัดขนาดของถุงไข่มุก จะทำวัดขนาดของถุงไข่มุกตามความยาวของเปลือกหอย

2. การตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

หลังจากที่สุ่มตัวอย่างหอยจากบริเวณสถานที่เลี้ยงหอย โดยทำการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายเข้าไปดังนี้

2.1 การตรวจสอบด้วยตาเปล่า โดยดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่าย ที่มีการสร้างเป็นถุงไข่มุกและไข่มุก สังเกตลักษณะและบันทึกภาพ

2.2 การตรวจสอบด้วยวิธี parafin section โดยการย้อมด้วยสี Haematoxylin-Eosin และ Alizarin Red S เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของถุงไข่มุก โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 Fixation

ตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นถุงไข่มุกแช่ลงใน Bouin's fluid 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเนื้อเยื่อจาก Bouin's fluid ลงใน 70% ethyl alcohol

2.2.2 Dehydration

ถ่ายเนื้อเยื่อจาก 70% ethyl alcohol ลงใน 90% ethyl alcohol 6 ชั่วโมง 95% ethyl alcohol 3 ชั่วโมง และ n-butyl alcohol 1 ชั่วโมง

2.2.3 Clearing

ล้างเนื้อเยื่อใน xylene 1 ชั่วโมง

2.2.4 Impregnation

ถ่ายเนื้อเยื่อที่ล้างด้วย xylene แล้วลงใน xylene+molten wax อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายลง wax_1 ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นถ่ายลง wax_2 ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

2.2.5 Embedding

embed เนื้อเยื่อลงใน parafin ทิ้งไว้ให้เย็น

2.2.6 Section

นำเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอน embedding แล้วมาตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 7 ไมโครเมตรจากนั้นนำไปติดบนแผ่นสไลด์

2.2.7 Hydration

นำเนื้อเยื่อที่ติดบนแผ่นสไลด์มาล้าง parafin ด้วย xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นถ่ายลงใน n-butyl alcohol, 95%, 90%, 70% ethyl alcohol, น้ำประปาตามลำดับ ขั้นตอนละ 3 นาที

2.2.8 Staining

การย้อมด้วย Haematoxylin-Eosin

นำสไลด์จากขั้นตอน 2.2.7 มาย้อมด้วยสีย้อม Haematoxylin 10-20 นาที differentiate (70% ethyl alcohol 100 ml.+ 2-3 หยด HCl (conc.)) 5-10 วินาที จากนั้นล้างในน้ำประปา 5-10 นาที ถ่ายลงใน 70%, 90% ethyl alcohol ตามลำดับ ขั้นตอนละ 3 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี Eosin (ใน 95% ethyl alcohol) 3-5 นาที ล้างสีด้วย 95% ethyl alcohol 15-30 วินาที จากนั้นถ่ายลง n-butyl alcohol, $xylene_1$, $xylene_2$ ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที แล้ว mount ด้วย Cannada balsam

การย้อมด้วย Alizarin Red S

นำสไลด์จากขั้นตอน 2.2.7 มาย้อมด้วยสี Alizarin Red S (2% aqueous) 3 นาที ล้างสีด้วย acetone 30 วินาที acetone+xylene อัตราส่วน 1:1 15 วินาที ถ่ายลงใน xylene $_1$ และ xylene $_2$ ตามลำดับ ขั้นตอนละ 5 นาที แล้ว mount ด้วย Cannada balsam

นำสไลด์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพ

2.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของถุงไข่มุกและไข่มุกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

2.3.1 ตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นถุงไข่มุกแช่ลงใน 3% paraformaldehyde ผสมกับ 2% glutaraldehyde ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium phosphate เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง

2.3.2 ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium phosphate 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

2.3.3 แช่ตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ที่ความเข้มข้น 35%, 50%, 70% และ 95% ตามลำดับ ขั้นตอนละ 10 นาที จากนั้นแช่ลงใน butanol 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

2.3.4 ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต โดยใช้เครื่องตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer) และใช้ butanol หรือ acetone เป็นสารละลายตัวกลาง (intermediate fluid) ระหว่างสารละลายลดน้ำ (dehydrant) กับสารละลายตัวเปลี่ยน (transitional fluid) คือ คาร์บอนไดออกไซด์เหลว ซึ่งเปลี่ยนจากสถานะของเหลวเป็นก๊าซ

2.3.5 นำตัวอย่างที่แห้งวางบนแท่นทองเหลืองนำไฟฟ้า (stub) ติดด้วยกาวนำไฟฟ้า (electroconductive paint) เช่น กาว silver หรือ carbon colloildal

2.3.6อาบผิวตัวอย่างด้วยทองโดยใช้เครื่องทำโลหะให้เป็นไอออน (ion sputter) เมื่อตัวอย่างสามารถเป็นสื่อไฟฟ้า แล้วจึงนำเข้าศึกษาในกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดที่กำลังไฟฟ้า 10-20 กิโลโวลต์

2.3.7 บันทึกภาพ

<u>หมายเหตุ</u> สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (ไข่มุก) จะเริ่มจากขั้นตอนที่ 2.3.4

3. วิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชิ้นแมนเทิลที่ปลูกถ่ายเข้าไปที่ระยะเวลาต่าง ๆ จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการทำ parafin section

3.2 ตรวจนับจำนวนถุงไข่มุกที่เกิดขึ้นแล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหาค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA เพื่อเปรียบเทียบหอยที่นำมาทดลองทั้งหมดทุกวิธีการทดลอง

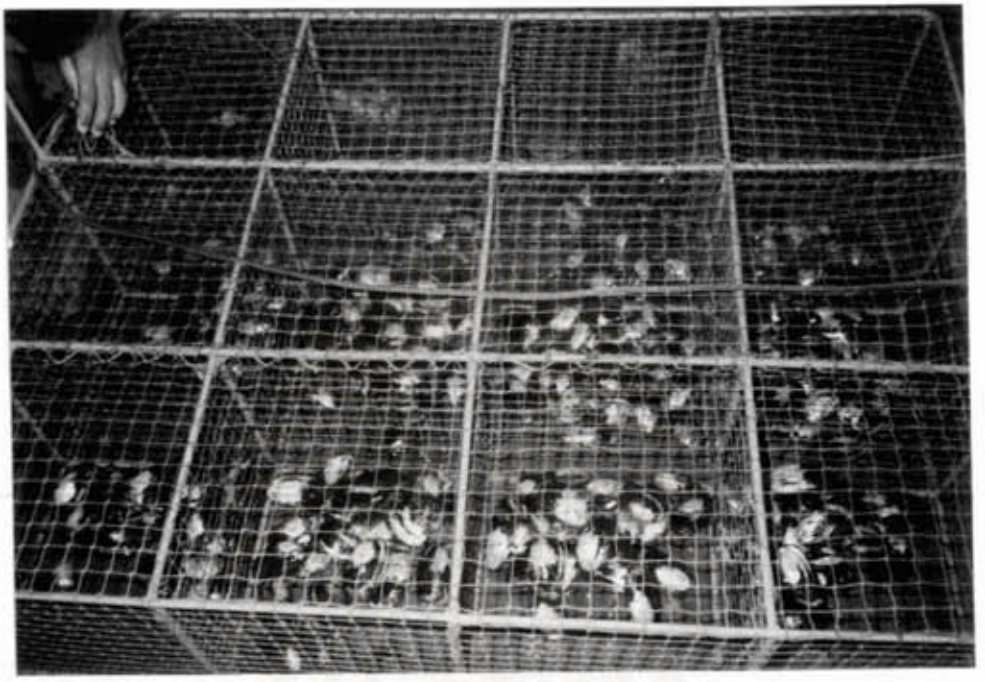
3.3 วัดขนาดถุงไข่มุกที่เกิดขึ้นในแต่ละเดือนแต่ละวิธีเขียนกราฟขนาดถุงไข่มุกที่เกิดขึ้นจนได้ไข่มุก

3.4เปรียบเทียบระยะเวลาที่เกิดผลึกสารมุกในแต่ละวิธีด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

3.5 เปรียบเทียบลักษณะไข่มุกที่เกิดขึ้นในแต่ละวิธีการทดลอง

รูปที่ 3 ชนิดหอยที่ใช้ในการทดลอง

(บน) *H. (H.) bialatus* (ล่าง) *P. vondembuschianus ellipticus*



รูปที่ 4 กระชังที่ใช้ในการเลี้ยงหอยของการทดลอง

รูปที่ 5 แสดงบริเวณสถานที่เลี้ยงหอยของงานวิจัยการเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งตั้งอยู่ที่คลองลำตะคอง อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา