บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

1. การฟักไข่นกกระทา

1.1 การเตรียมตู้ฟัก

ปรับอุณหภูมิของตู้ฟักที่ 38 องศาเซลเซียส ใส่น้ำในถาดโลหะสูงประมาณ 2 เซนติเมตร ให้ความชื้นจากชั้นล่างของตู้ฟัก วัดความชื้นสัมพัทธ์ในขณะฟักได้ประมาณ 78-85 %

1.2 วิธีฟักไข่

คัดเลือกไข่ขนาดเท่า ๆ กัน วางเรียงในตะแกรงตามแนวนอนก่อนเอาเข้าตู้ฟักที่เตรียมไว้ ในระหว่างฟักต้องกลับไข่ทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง (เวลาเช้าประมาณ 8.00 - 9.00 น. และเวลาเย็นประมาณ 16.00-17.00 น.) ยกเว้น 2 วันแรกของการฟัก เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจะศึกษา จึงนำไข่ออกจากตู้ฟักเท่าที่ต้องการ การนับเวลาฟักเริ่มหลังจากฟักไข่ไปแล้ว 3 ชั่วโมง ตามวิธีของ Padgett และ Ivey (1959)

2. การแยกเอ็มบริโอและต่อมไทรอยด์

ในการศึกษาลักษณะฮีสโตโลยี แยกเอ็มบริโออายุฟัก 1 - 8 วัน ทุกวัน และ อายุฟัก 10-16 วัน วันเว้นวัน (อายุฟัก 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 วันและ 10, 12, 14, 16 วัน) โดยแยกวันละ 6 ฟอง ส่วนการศึกษาฮีสโตเคมี แยกเอ็มบริโอเช่นกัน แต่ไม่ศึกษาในเอ็มบริโออายุฟัก 1, 2 วัน เพราะจากการทดลองย้อม ไม่พบการทำงานของแอสิด ฟอสฟาเตส และเอสเตอเรส สำหรับการศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอ ศึกษาทุกวันของอายุฟัก (1 - 16 วัน) เมื่อถึงเวลาที่กำหนด นำไข่ออกจากตู้ฟัก ใช้กรรไกรปลายแหลมโค้งเปิดเปลือกไข่ด้านบนเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-2 ซม. ระวังอย่าให้ถูกไข่แดง เปิดเปลือกไข่ออกเทใส่ใน Petri dish พยายามให้เอ็มบริโออยู่ด้านบน ในกลุ่มอายุฟัก 1 - 2 วันใช้กระดาษกรองที่ตัดเป็นช่องรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1.5 X 1.5 ตารางเซนติเมตร วางกระดาษกรองที่ตัดนี้บนไข่แดง

ให้เอ็มบริโออยู่ตรงกลาง ใช้กรรไกรปลายแหลมตัดเยื่อวิเทลลีน (Vitelline membrane) รอบ ๆ กระดาษกรองแยกเอ็มบริโอจากไข่แดง ตามวิธีของ Humerson (1967) (แผ่นภาพที่ 1a) ล้างเอ็มบริโอที่ติดมากับกระดาษกรองด้วยน้ำเกลือ 0.85 % ใช้เข็มและกรรไกรปลายแหลมตัดเยื่อวิเทลลีนที่เหลือให้ชิดเอ็มบริโอที่สุดก่อนชั่งน้ำหนัก ส่วนกลุ่มอายุฟัก 3-16 วัน แยกเอ็มบริโอโดยไม่ต้องใช้กระดาษกรอง ตัดเยื่อวิเทลลีนและแยกเอ็มบริโอจากไข่แดง แยกถุงน้ำคร่ำและถุงอะลันตอยส์ (แผ่นภาพที่ 1b) แช่เอ็มบริโอในน้ำเกลือ 0.85 % ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักต่อไป สำหรับเอ็มบริโอที่ใช้ศึกษาลักษณะทั่วไปและฮีสโตเคมี กลุ่มอายุฟัก 1-2 วัน Fix เอ็มบริโอที่อยู่บนไข่แดงก่อนแยกด้วยกระดาษกรอง กลุ่มที่มีอายุฟัก 3-8 วัน ช้อนเอ็มบริโอที่อยู่ในน้ำเกลือ 0.85 % วางบนถาด Paraffin ที่มีน้ำเกลือ 0.85 % สูงประมาณ 1.0 เซนติเมตร ใช้มีดโกนคม ๆ ตัดส่วนคอ ตั้งแต่ใต้แมนดิเบิล (Mandible) ถึงหัวใจ (แผ่นภาพที่ 1c) Fix ทันทีในน้ำยาซึ่งมีส่วนผสมเป็น 2% แคลเซียมอะซีเตทละลายใน 10% ฟอร์มาลินที่อุณหภูมิ 4°C ส่วนกลุ่มอายุฟัก 10-16 วัน (อายุฟัก 16 วัน จะฟักเป็นตัวใช้สลบด้วยอีเธอร์ก่อน) ช้อนเอ็มบริโอวางบนถาด Paraffin ที่มีน้ำเกลือ 0.85 % สูงประมาณ 1 ซม. ใช้กรรไกรตัดเปิดหน้าอกถึงใต้อ่าง (แผ่นภาพที่ 1d) ค่อย ๆ ตัดไทรอยด์ออกมาพร้อมกับหลอดอาหารและเส้นเลือดที่อยู่ใกล้เคียง Fix ทันทีในน้ำยาที่ 4°C เช่นเดียวกัน ทำ Paraffin section เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปและฮีสโตเคมี

3. <u>การวัดผลการเจริญของเอ็มบริโอ</u>

นำเอ็มบริโอจำนวน 8 ตัวที่แช่ฟักอยู่ในน้ำเกลือ 0.85 % มาชั่งน้ำหนักเปียก โดยการช้อนเอ็มบริโอขึ้นมาทีละตัว ให้ติดน้ำยาน้อยที่สุด ใช้กระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แตะซับน้ำออก วางเอ็มบริโอบนกระดาษไขสำหรับชั่งน้ำหนักซึ่งได้อบแห้ง และชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าเรียบร้อยแล้ว ชั่งน้ำหนักเปียกของเอ็มบริโอและกระดาษ คำนวณน้ำหนักเปียกจริงของเอ็มบริโอ นำเอ็มบริโอพร้อมทั้งกระดาษไขเข้าอบที่ 60°C จนกระทั่งชั่งน้ำหนักแห้งได้คงที่ 3 ครั้ง กลุ่มอายุฟัก 1 - 4 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งหลังจากอบ 1 วัน, 2 วัน และ 3 วัน พบว่ามีน้ำหนักคงที่ กลุ่มอายุฟัก 5 - 8 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งทุกวัน พบว่าคงที่หลังจากอบ 2 วัน กลุ่มอายุฟัก 9-10 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งทุกวันหลังจากอบได้ 2 วัน พบว่าคงที่หลังจากอบ 4 วัน กลุ่มอายุฟัก 11-13 วัน

ชั่งน้ำหนักแห้งทุกวันหลังจากอบได้ 5 วัน พบว่าคงที่หลังจากอบ 10 วัน กลุ่มอายุฟัก 14–16 วัน ชั่งน้ำหนักแห้งทุก 3 วัน หลังจากอบได้ 7 วัน พบว่าคงที่หลังจากอบ 24 วัน จากผลที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนมาตรฐานของน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้งของเอ็มบริโอแต่ละกลุ่ม แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนมาตรฐานของน้ำหนักเปียก และน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นต่อวันในแต่ละกลุ่มอายุ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงการเจริญสะสมของเอ็มบริโอ (Cumulative Growth) และการเจริญที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Daily increment of Growth) การศึกษาความแตกต่างของการเพิ่มน้ำหนัก ทดสอบโดยใช้ t- test และใช้ค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 90% ($p>0.10$) คือ $T > t\ (n_1 + n_2 - 2, \alpha)$ รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีการคำนวณดูที่ภาคผนวกหน้า 76

4.. การศึกษาลักษณะทางฮีสโตโลยีและฮีสโตเคมี

4.1 การทำ Paraffin section

4.1.1 Fixative

ใช้น้ำยาซึ่งมีส่วนผสมเป็น 2 % แคลเซียม อะซีเตทละลายใน 10% เฟอร์มาลิน

4.1.2 การทำสไลด์

รักษาสภาพเนื้อเยื่อโดยแช่ในน้ำยาซึ่งมีส่วนผสมเป็น 2% แคลเซียม อะซีเตทละลายใน 10% ฟอร์มาลินนาน 18 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วแช่ไว้ 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำกลั่น 2, 3 ครั้ง เพื่อล้างฟอร์มาลีนที่หลงเหลืออยู่และช่วยให้ปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ดีขึ้น (Pearse 1968; Chayen, 1973) แล้วดึงน้ำออกด้วยเอธิลอัลกอฮอล์ 80 %, 95 % และ 100% แต่ละขั้นตอนต้องเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง ช่วงเวลาที่แช่ครั้งละครึ่งชั่วโมง ทำให้ใสด้วยบิโตรเลียม อีเธอร์ นานครึ่งชั่วโมง ขั้นตอนทั้งหมดนี้ทำที่อุณหภูมิ 4°C แล้วเอามาไว้ที่อุณหภูมิ 24 (±2)°C เปลี่ยนบิโตรเลียม อีเธอร์และแช่ไว้นานครึ่งชั่วโมง (Wollman, 1964) จากนั้นนำไปแช่ในส่วนผสมของบิโตเลียม อีเธอร์กับพาราพลาสท์ (Paraplast m.p. = 56–57°C) อย่างละเท่า ๆ กัน ในตู้อบอุณหภูมิประมาณ 60°C นาน 15 นาที เปลี่ยนเป็นพาราพลาสท์ 2 ครั้ง ช่วงเวลาที่แช่ครั้งละ 15 นาที ในตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 60°C เช่นกัน แล้วนำไปฝัง และทำให้เป็นแท่ง

ในพาราพลาสท์ เมื่อแข็งดีแล้วตัดเนื้อเยื่อหนา 8 ไมครอนด้วยเครื่องโรตารี ไมโครโตม ติดบนสไลด์โดยการแบ่งแถวของชิ้นเนื้อเยื่อ (section) ออกเป็นส่วน ๆ ส่วนที่ 1 ติดบนสไลด์แผ่นที่ 1 ส่วนที่ 2 ติดบนสไลด์แผ่นที่ 2 จนกระทั่งได้จำนวนสไลด์ตามต้องการ แล้วติดบนสไลด์ตั้งแต่แผ่นที่ 1 อีกจนกระทั่งหมดชิ้นเนื้อเยื่อย้อมศึกษาเปรียบเทียบผลทางฮีสโตโลยีและฮีสโตเคมีของต่อมไทรอยด์

4.2 การศึกษาฮีสโตโลยีของต่อมไทรอยด์

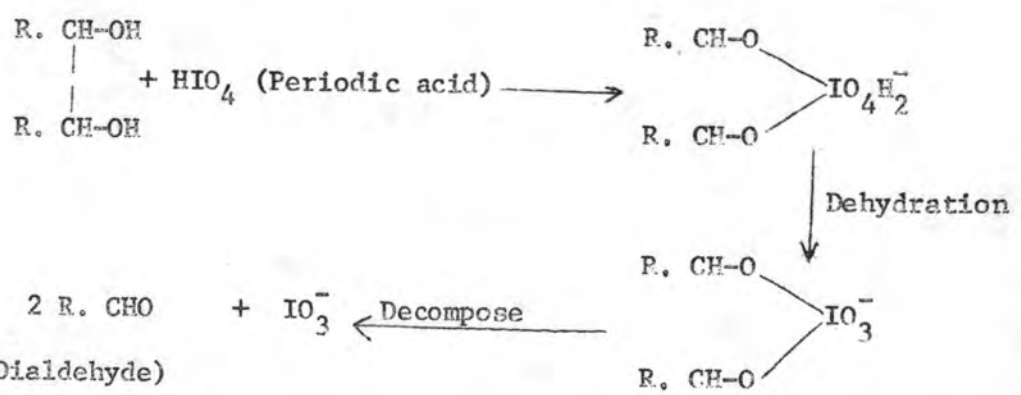
ย้อมเนื้อเยื่อต่อมไทรอยด์ของเอ็มบริโอนกกระทาอายุฟัก 1 - 16วัน ด้วยสีฮีมาโตไซลินและอีโอซิน คอลลอยด์ในช่องฟอลลิเคิลติดสีแดงของอีโอซิน การมีคอลลอยด์แวคคิวโอล์ในคอลลอยด์เป็นปรากฏการณ์อันหนึ่งที่แสดงว่ามีขบวนการเอ็นโดไซโตซิสเกิดขึ้น

4.3 วิธีการศึกษาทางฮีสโตเคมีของไธโรโกลบูลิน

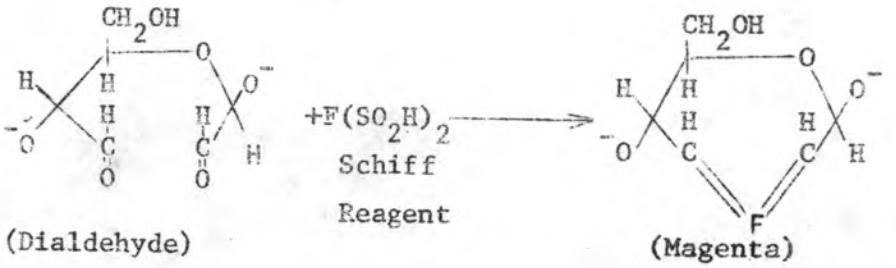
ใช้วิธีเพอไอออดิค แอสิด-ชิฟฟ์ (Periodic Acid-Schiff) ของ McManus (1946)

หลักการ (Pearse, 1972)

เพอไอออดิค แอสิด เป็นตัวออคซิไดซ์ (Oxidise) ซึ่งทำลายบอนด์ระหว่างคาร์บอนของ 1-2 glycol groups (CHOH-CHOH) ในที่สุดจะได้ไดอัลดีไฮด์ (Dialdehyde)



อนุพันธ์อะมิโนหรืออัลไคล์อะมิโน (amimo or alkylamino derivatives) ของ 1-2 glycols ก็สามารถถูกออคซิไดซ์เป็นไดอัลดีไฮด์ได้เช่นกัน ไดอัลดีไฮด์จะถูกตรึง (localize) โดยการทำปฏิกิริยากับน้ำยาชิฟฟ์ให้สารสีม่วงแดง (Magenta)



(Dialdehyde) (Magenta)

ปริมาณของสีที่เกิดขึ้นอยู่กับปริมาณของ glycol group ในเนื้อเยื่อนั้นและไดอัลดีไฮด์ที่ได้จากการออคซิเดชันต้องไม่ถูกเติมน้ำ (hydrate) หรือจับเป็นวง (Cyclization) ทำให้เกิดเป็นเฮมิอัลดีไฮด์ (hemialdehyde) ซึ่งจะไม่สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำยาชิฟฟ์ได้

ในการศึกษานี้ใช้วิธีอะเซททิเลชัน (Acetylation, Lillie, 1954) ในกลุ่มควบคุม (Control section) เพื่อบอกผลลบคือ ไม่ติดสี เพราะ 1-2 glycol group ถูกอะเซททิเลชันก่อนออคซิไดซ์ด้วยเพอไอออดิค แอสิด

วิธีการ

1. ผ่านชิ้นเนื้อเยื่อลงไซลีน บิวทานอล เอธิลอัลกอฮอล์ จนถึงน้ำกลั่น
2. ออคซิไดซ์ด้วย 1% เพอไอออดิค แอสิดในน้ำนาน 10 นาที
3. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น
4. แช่ในน้ำยาชิฟฟ์ นาน 20 นาที
5. ผ่านลงในน้ำยาซัลไฟท์ 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 นาน 1 นาที ครั้งที่ 2 และนานครั้งละ 2 นาที

006360

6. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลาอีก 10 นาที
7. ดึงน้ำออกโดยผ่านในอัลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ จากต่ำไปสูง แล้วทำให้ใสด้วยไซลีน ปิดด้วยคานาดา บัลซัม

สำหรับกลุ่มควบคุมโดยการทำอะเซททิเลชัน หลังจากผ่านชิ้นเนื้อเยื่อถึงน้ำกลั่นให้แช่ในส่วนผสมของอะซีติค แอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride) 16 มล.กับไพริดีน (Pyridine) 24 มล. ที่อุณหภูมิ 22°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างน้ำก่อนนำไปย้อมต่อตามวิธีการตั้งแต่

i 18213595

ข้อ 2 – 6 เนื่องจากผลของการย้อมไม่ติดสีเลย จึงย้อมซ้ำด้วยฮีมาโตไซลิน 10 นาที ล้างแยกสีด้วย 0.5 % HCl และแช่ในน้ำประมาณ 10 นาที เพื่อให้เป็นสีน้ำเงิน และดึงน้ำออกทำให้ใส และปิดด้วยคานาดา บัลซัม

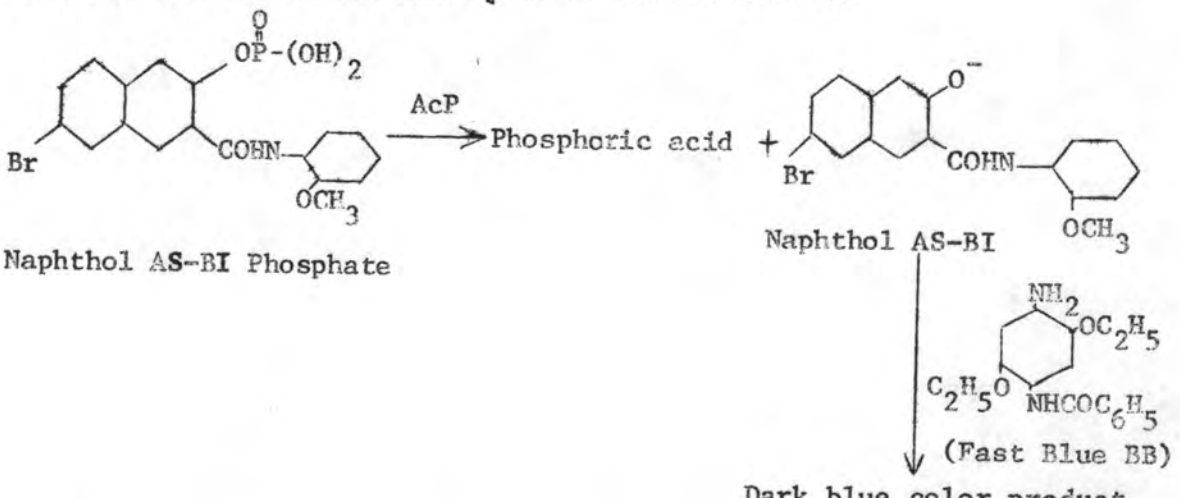
จากการย้อม PAS สีม่วงแดงจาง ๆ ของปฏิกิริยาในเซลล์ไทรอยด์ (แผ่นภาพที่ 7a) หมายถึงมีปริมาณของไทโรโกลบูลินน้อย สีม่วงแดงเข้มในช่องฟอลลิเคิล (แผ่นภาพที่ 7b) หมายถึงมีปริมาณของไทโรโกลบูลินสะสมอยู่มาก การที่ตรวจเจทภายในเซลล์ฟอลลิเคิลซึ่งเกิดจากการดึงเอาไทโรโกลบูลินกลับเข้าสู่เซลล์มีปฏิกิริยาของ PAS การเกิดคอลลอยด์แวคคิวโอล์และปฏิกิริยาของ PAS ในช่องฟอลลิเคิลลดลง แสดงถึงการเกิดขบวนการเอ็นโดไซโตซิส

4.4 วิธีการศึกษาทางฮีสโตเคมีของเอ็นไซม์ แอสิด ฟอสฟาเตส

ใช้วิธีสเปเชียล แนฟธอล เอเอส โพส-คัพพลิง (Special Naphthol AS Post-Coupling Method) ของ Burstone (1960 และ 1962)

หลักการ

แอสิด ฟอสฟาเตส จะไฮโดรไลส์ (Hydrolyse) แนฟธอล เอเอส-บีไอ ฟอสเฟต ได้ฟอสฟอริค แอสิด และแนฟธอล เอเอส-บีไอ ซึ่งแนฟธอล เอเอส-บีไอ มีคุณสมบัติไม่ละลายและสามารถจับกับเนื้อเยื่อได้ดี (Burstone, 1962) เมื่อทำปฏิกิริยาแคบเซอร์ (Capture reaction) กับสารละลายเกลือฟาสท์ บลู บีบี จะได้ผลสีฟ้าหรือสีน้ำเงิน



วิธีการ

1. ผ่านชิ้นเนื้อเยื่อ ลงปิโตรเลียม อีเธอร์, อะซีโตน 100%, 95%, 90%, 80% และ 70% ขั้นตอนละ 3 นาที

2. นำลงในซับสเตรทซึ่งประกอบด้วยแนฟธอล แอเอส-บีไอ ฟอสเฟตละลายด้วย DMF และปรับสภาพน้ำยาด้วยอะซีเตทบัฟเฟอร์ (Acetate buffer pH 5.2) ที่ 37°C นาน 6 ชั่วโมง (ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ได้จากการทดลองในระยะเริ่มต้นของการวิจัยนี้ว่าให้ปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ดีที่สุด)

3. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลาประมาณ 10 นาที แล้วนำลงในสารละลายฟาสท์ บลู บีบี นาน 10 นาที

4. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลาประมาณ 10 นาที บีต ด้วยกลีเซอรีน เจลลี

สำหรับกลุ่มควบคุม (Control section) ใช้วิธีการเหมือนกันทุกอย่าง โดยใส่ DMF แต่ไม่ใส่แนฟธอล เอเอส-บีไอฟอสเฟตซึ่งเป็นซับสเตรท

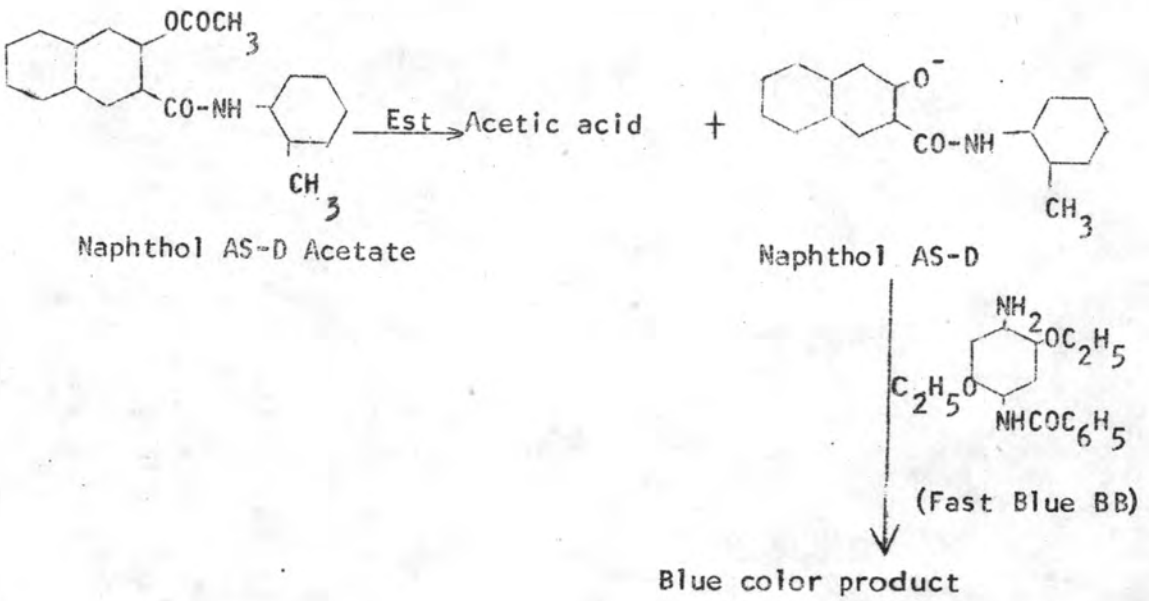
การย้อมศึกษาเอ็นไซม์แอสิดฟอสฟาเตส ให้สีฟ้าอ่อนในต่อมไทรอยด์ที่มีการทำงานของแอสิด ฟอสฟาเตสน้อย (แผ่นภาพที่ 8a) และให้สีน้ำเงินในต่อมที่มีการทำงานของแอสิด ฟอสฟาเตสมาก (แผ่นภาพที่ 8b) การทำงานของแอสิด ฟอสฟาเตส จะแสดงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

4.5 วิธีการศึกษาทางฮีสโตเคมีของเอ็นไซม์เอสเตอเรส

ใช้วิธีแนฟธอล เอเอส-ดี อะซีเตท (Naphthol AS-D Acetate method) ของ Burstone (1962)

หลักการ

เอสเตอเรสจะไฮโดรไลส์ แนฟธอล เอเอส-ดี อะซีเตท ได้อะซีติค แอสิดและแนฟธอล เอเอส-ดี ซึ่งไม่ละลายและสามารถจับเนื้อเยื่อได้ดี (Burstone, 1962) เมื่อทำปฏิกิริยากับฟาสท์ บลู บีบี จะได้ผลสีน้ำเงินแกมเขียว



วิธีการ

1. ผ่านชิ้นเนื้อเยื่อ ลงบิโตรเลียม อีเธอร์, อะซีโตน 100%, 95%, 80% และ 70% ขั้นตอนละ 3 นาที

2. นำลงในซับสเตรทซึ่งประกอบด้วยแนฟธอล เอเอส-ดี อะซีเตทละลายด้วย DMF และปรับสภาพน้ำยาด้วยทริสบัฟเฟอร์ (Tris buffer pH 7.1) ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 3 ชั่วโมง (ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ได้จากการทดลองในระยะเริ่มต้นของการวิจัยนี้ว่าให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีที่สุด) เปลี่ยนน้ำยาทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง เพราะสีเหลืองของฟาสท์ บลู บีบี จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถ้าทิ้งไว้นาน

3. ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลาประมาณ 10 นาที ปิดด้วยกลีเซอรีน เจลลี

สำหรับกลุ่มควบคุม ใช้วิธีการเหมือนกันทุกอย่าง โดยใส่ DMF แต่ไม่ใส่แนฟธอล เอเอส-ดี อะซิเตท ซึ่งเป็นซับสเตรท

การย้อมศึกษาเอนไซม์เอสเตอเรส ให้สีเขียวจาง ๆ ในต่อมไทรอยด์ที่มีการทำงานของเอสเตอเรสน้อย (แผ่นภาพที่ 8c) และให้สีน้ำเงินเขียวเข้มในต่อมที่มีการทำงานของเอสเตอเรสมาก (แผ่นภาพที่ 8d) การทำงานของเอสเตอเรส แสดงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเช่นเดียวกับแอสิด ฟอสฟาเตส

4.6 การศึกษาขนาดของช่องฟอลลิเคิล

ใช้ไมโครมิเตอร์วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของช่องฟอลลิเคิล ตั้งแต่ระยะเริ่มสร้างช่องฟอลลิเคิลในอายุฟัก 7 วัน จนกระทั่งเอ็มบริโอฟักออกมาเป็นตัว วัดทุกกลุ่มของการทดลอง (อายุฟัก 7 - 16 วัน) กลุ่มละ 6 ตัวจากชิ้นเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยฮีมาโตไซลินและอีโอซินซึ่งเป็นส่วนที่อยู่บริเวณกลาง ๆ ของต่อมไทรอยด์ โดยการวัดช่องฟอลลิเคิลของทุกฟอลลิเคิลที่อยู่ในแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเยื่อทั้งในแนวแกนตั้งและแกนนอน หาค่าเฉลี่ยและคิดเป็นไมครอน