บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์สำหรับศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ของหอยมะระดำ

1.1.1 เครื่องโรตารี่ไมโครโตม

1.1.2 เครื่องอุ่นสไลด์

1.1.3 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

1.1.4 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM)

1.1.5 ขวดเก็บตัวอย่าง

1.2 อุปกรณ์สำหรับศึกษาการเจริญเติบโตและสัดส่วนเพศ

1.2.1 เวอร์เนีย

1.2.2 เครื่องหมายติดตาม (Tagging)

1.2.3 เครื่องชั่งน้ำหนัก

1.2.4 ปากกาจับงาน

1.2.5 อุปกรณ์ผ่าตัด

2. สารเคมี

2.1 Absolute Alcohol

2.2 Acetic Acid

2.3 Distilled Water

2.4 Eosin, Y (C.I.45380)

2.5 Formaldehyde 40%

2.6 Glacial Acetic Acid

2.7 Hematoxylin Crystals

2.8 Mercuric Oxide

2.9 N-Buthyl Alcohol หรือ Butanol

2.10 Paraplast

2.11 Permount

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.12 Picric Acid Saturated Aqueous Solution

2.13 Xylene

ตัวอย่างสัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างหอยมะระดำจากป่าชายเลนบริเวณคลองบางโปรง จ.ชลบุรี ในช่วงน้ำลงต่ำสุด ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2546 ถึง เดือนมีนาคม 2547 โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยมะระดำจำนวน 10 ตัวต่อเดือน เพื่อนำมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์และศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และสังเกตพฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์และการวางฝักไข่

วิธีการศึกษา

การศึกษาภาคสนาม

1. ศึกษาการเจริญเติบโตแบ่งเป็น 3 ช่วง

ในเดือนมีนาคม 2546 ทำการเก็บตัวอย่างหอยมะระจำนวน 933 ตัว มาวัดความยาวเปลือกและติดเครื่องหมาย

ในเดือนกันยายน 2546 ทำการเก็บตัวอย่างหอยมะระมาทำการวัดความยาวเปลือก

ในเดือนมีนาคม 2547 ทำการเก็บตัวอย่างหอยมะระมาทำการวัดความยาวเปลือก

2. ศึกษาสัดส่วนเพศ

นำหอยที่เก็บได้ทั้งหมดตั้งแต่เดือนมีนาคม 2546 ถึงเดือนมีนาคม 2547 มาชั่ง น้ำหนักทั้งตัว แกะเปลือกออก แยกเพศ ชั่งน้ำหนักเนื้อ

3. สังเกตการวางฝักไข่

ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างหอยในแต่ละเดือนจะสังเกตการวางฝักไข่ และนับจำนวนฝักไข่ใหม่ พร้อมกับวัดขนาดและดูเพศของหอยที่วางฝักไข่

การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

1. การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหอยโดยใช้เทคนิคทางพาราฟิน

1.1 การเตรียมเนื้อเยื่อ

1.1.1 นำตัวอย่างหอยมะระดำที่เก็บได้จำนวน 10 ตัวต่อเดือน จากเดือนมีนาคม 2546 ถึง เดือนมีนาคม 2547 รวม 130 ตัว นำมาวัดขนาด ชั่งน้ำหนักเปลือก แกะเปลือกออก แยกเพศ ชั่งน้ำหนักเนื้อ ทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณ Gonad (ภาพที่ 3-1) แล้วแช่ลงใน Bouin's Fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อที่จะทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพเข้าสู่ขั้นตอนการทำพาราฟินเทคนิค

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.1.2 นำเนื้อเยื่อไปแช่ใน Alcohol ที่ความเข้มข้น 70%, 90% ขั้นละ 6 ชั่วโมง และ Alcohol 95% ทำ 2 ครั้ง ๆ ละ 6 ชั่วโมง

1.1.3 แช่ใน N-Butyl และ Xylene ขั้นละ 1 ชั่วโมงตามลำดับ

1.1.4 นำเนื้อเยื่อมาแช่ในสารผสมระหว่าง Xylene: Melt Paraplast ในอัตราส่วน 2: 1, 1: 1 และ 1: 2 ตามลำดับ แต่ละขั้นตอนใช้เวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส

1.1.5 ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟินเหลวที่อยู่ในแม่พิมพ์ แล้วทิ้งไว้ให้พาราฟินแข็ง

1.1.6 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้มาเหลา (Trimming) ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์

1.1.7 นำไปตัดด้วยเครื่องโรตารี่ไมโครโตมขนาด 6 ไมโครเมตร

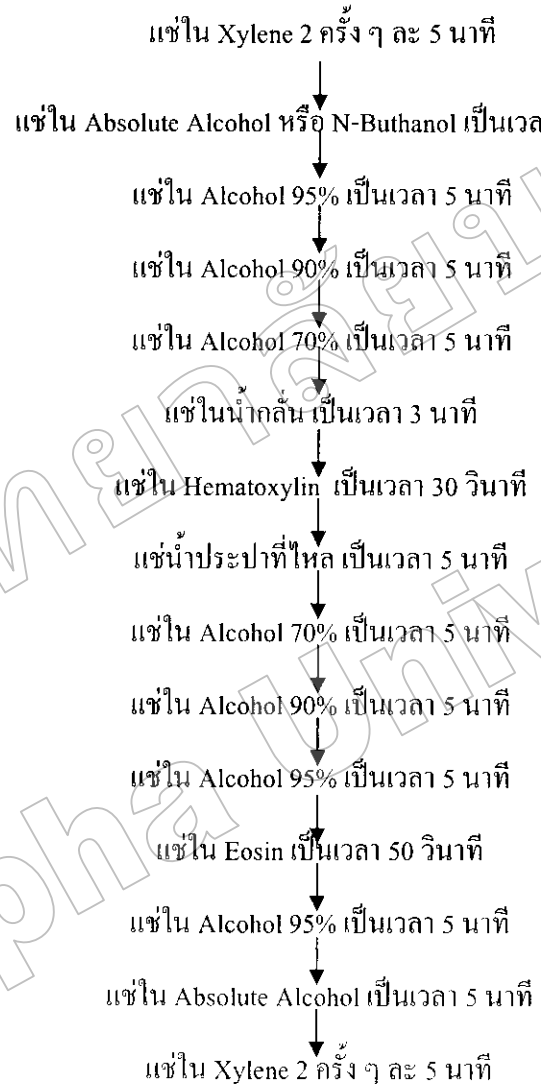
1.1.8 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการตัดติดลงบนสไลด์แล้วนำไปย้อมสี

ภาพที่ 3-1 อวัยวะภายในของหอยมะระดำ (*Chicoreus capucinus*)

1.2 การย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H & E)

นำสไลด์จากข้อ 1 มาทำการย้อมสี Hematoxylin & Eosin ตามขั้นตอนการย้อมสีของกันทิมา สุวรรณพงศ์ (2546) โดยขั้นตอนแรกเป็นการดึงเอาสารตัวกลาง คือ พาราพลาสออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้ไซลีน จากนั้นเป็นขั้นตอนการนำน้ำเข้าโดยใช้ Absolute Alcohol, Alcohol 95%, Alcohol 90%, Alcohol 70% และน้ำ ตามลำดับ แล้วนำไปย้อมสี Hematoxylin และนำไปล้างสีด้วยน้ำประปาจนกระทั่งได้สีน้ำเงินอ่อน จากนั้นนำไปแช่ใน Alcohol 70%, Alcohol 90% และ Alcohol 95% ตามลำดับ แล้วนำไปย้อมสี Eosin จากนั้นเป็นขั้นตอนการนำน้ำออกโดยใช้ Alcohol

95% และ Absolute Alcohol ตามลำดับ แล้วนำไปทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อใสโดยใช้ไซลีน (ภาพที่ 3-2) จากนั้นนำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีแล้วไปทำเป็นสไลด์ถาวรด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์และนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin (H & E) (กันทิมา สุวรณพงศ์, 2546)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ถ่ายรูประยะในการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ แล้วนำมาวิเคราะห์การพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ว่าอยู่ในระยะใด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University