บทที่ 3

อุปกรณ์ ขั้นตอนและวิธีวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้

1.1 อุปกรณ์สำหรับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อดูด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา

1. ตู้อบพาราฟฟิน
2. เครื่องมือตัดตัวอย่างพาราฟฟิน
3. วอร์มเพลต
4. ถ้วยสำหรับย้อมสี
5. เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด
6. แผ่นไสลด์
7. พู่กัน
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. กล้องจุลทัศน์แบบธรรมดา

1.2 อุปกรณ์สำหรับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อดูด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

1. กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน
2. แอล เค บี อุลตราไมโครโตม (LKB ultramicrotome)
3. เครื่องทำมีดแก้ว (knife maker)
4. เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด

018968

5. หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 20 ซีซี

6. กริชขนาด 200 เมช

7. แคปซูลพลาสติกสำหรับฝังตัวอย่าง

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อดูด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา

1. น้ำยาบูแองค์สำหรับดองตัวอย่าง (Bouin' s fluid)

2. พาราพลาส

3. เอธานอล

4. บิวธานอล

5. กรดไฮโดรคลอริก

6. กรดอะซีติก

7. ไซลีน

8. สีอิโอซิน

9. สีฮีมาทอกไซลิน

10. สารละลายไข่ขาว

11. น้ำยาเมาท์สไลด์

2.2 สารเคมีสำหรับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อดูด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

1. พาราฟอร์มัลดีไฮด์

2. กลูตาฮัลดีไฮด์

3. น้ำกลั่น

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 N NaOH)

5. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

6. ออสเมี่ยมเตรตตรอกไซด์

7. ยูรานิลอะซีเตต

8. เลดซิเตรต

9. กรดฟอสโฟทังสติก

10. เอธานอล

11. อีปอน 812

12. ดี เอ็ม พี 30 (2,4,6 tridimethylaminomethyl phenol)

13. ดี ดี เอส เอ (Dodecenyl succinic anhydride)

14. เอ็ม เอ็น เอ (Methyl nadic anhydride)

15. โพรพิลีนออกไซด์

3. สัตว์ทดลอง

3.1 ผึ้งมิ้ม (Apis florea) อายุ 22- 25 วัน

ผึ้งนางพญา 10 ตัว

ผึ้งตัวผู้ 10 ตัว

ผึ้งงาน 10 ตัว

3.2 ผึ้งหลวง (Apis dorsata) อายุ 22-25 วัน

ผึ้งงาน 10 ตัว

ผึ้งมิ้ม ที่นำมาศึกษาได้นำมาจากรังตามธรรมชาติ จากสถานีวิจัยพืชสวนพลิ้ว อำเภอพลิ้ว จังหวัดจันทบุรี และบางส่วนนำมาจาก ตำบลบางขันแตก อำเภอแม่กลอง จังหวัดสมุทรสงคราม และผึ้งหลวงได้นำมาจาก สถานีวิจัยพืชสวนพลิ้ว อำเภอพลิ้ว จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนมีนาคม 2535 ถึง เดือนสิงหาคม 2535

ขั้นตอนและวิธีวิจัย

1.ศึกษาโครงสร้างของตาประกอบโดยวิธีการตัดตัวอย่างแบบพาราฟินเพื่อดูด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 ผึ้งมิ้ม (Apis florea) อายุ 22-25 วัน

ผึ้งนางพญา 5 ตัว

ผึ้งตัวผู้ 5 ตัว

ผึ้งงาน 5 ตัว

1.1.2 ผึ้งหลวง (Apis dorsata) อายุ 22-25 วัน

ผึ้งงาน 5 ตัว

1.2 วิธีทดลองวิจัย

1. นำสัตว์ทดลองในข้อ 1.1 มาตัดหัวแบ่งเป็นสองข้างซ้ายขวา
2. ดองตัวอย่างด้วยน้ำยาดองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ดึงน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydrate) ด้วย 70 % แอลกอฮอล์ ทิ้งไว้จนสีของเนื้อเยื่อจางแล้วเปลี่ยนเป็น 90 % แอลกอฮอล์เวลา 6 ชั่วโมง จากนั้น 95 % แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ภายใน 12 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็น บิวธานอล เวลา 1 ชั่วโมง
4. ย้ายตัวอย่างลงใน ไซลีน เพื่อทำให้ตัวอยางใส (clearing) 1 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างใส่ลงในส่วนผสมระหว่าง ไซลีนกับพาราพลาส ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที โดยทำในตู้อบพาราฟฟิน ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส
6. นำตัวอย่างใส่ในพาราพลาสหลอม 2 ครั้งๆละ 30 นาที
7. ฝังตัวอย่างลงในพาราพลาสหลอมที่บริสุทธิ์ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
8. นำตัวอย่างไปตัดด้วยโรตารี ไมโครโตม (rotary microtome)โดยตัดขนาด 6 u
9. นำริบบอน (ribbon) ที่ได้ไปติดลงบนแผ่นไสลด์ (โดยก่อนที่จะติดต้องทา egg albumin ก่อน) วางริบบอนลงไปบนแผ่นไสลด์ที่วางอยู่บนวอร์มเพลตที่อุณหภูมิ

43 องศาเซลเซียส

10. นำแผ่นไสลด์ที่ได้ไปดึงพาราพลาส ออก (dewax) เพื่อทำการย้อมสีโดยแช่ในไซลีน (ไซลีน 2 ขั้นๆละ 5 นาที)

11. นำไสลด์ไปผ่านลงใน บิวธานอล, 95% แอลกอฮอล์, 90% แอลกอฮอล์,70 % แอลกอฮอล์ , น้ำกลั่น ขั้นละ 5 นาที

12. ย้อมด้วยสี ฮีมาทอกไซลิน (Haematoxyline) 8 นาที

13. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดาเพื่อดูการติดสีของนิวเคลียสถ้าติดมากเกินไปต้องทำการดิพเฟอเรนทิเอต (differentiate) โดยใช้ สารผสม กรดไฮโดรคลอริกกับแอลกอฮอล์ (กรดไฮโดรคลอริก 0.5 มล. ละลายใน 70 % แอลกอฮอล์ 100 มล.)

14. ล้างด้วยน้ำประปา (tap water)

15. นำไสลด์ไปดึงน้ำออกโดยผ่าน 70%, 90%, 95% แอลกอฮอล์ ขั้นละ 5 นาที

16. ย้อมด้วยสีอิโอซิน (Eosin) 2-3 นาที แล้วจุ่มใน 95%แอลกอฮอล์ 2-3 วินาที

17. ผ่านลงใน บิวธานอล 10 นาที

18. ทำให้ตัวอย่างใสด้วยไซลีน (ไซลีน 2 ขั้นๆละ 5 นาที)

19. นำไสลด์ไป เมาท์ (mount)โดยใช้ น้ำยาเมาท์สไลด์ (permount)แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดา

20. เมื่อได้ข้อแตกต่างจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ธรรมดาแล้วจึงไปทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้รายละเอียดมากขึ้นด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

1.3 <u>ศึกษาจำนวนออมาติเดียมในฝั้งแต่ละกลุ่ม</u>

1. นำฝั้งมากลุ่มละ 3 ตัว ตัดตาประกอบของฝั้งแต่ละข้างออกจากกัน
2. ตัดแผ่ให้เป็นแผ่นบางๆ
3. นับจำนวนออมาติเดียมของฝั้งแต่ละชนิด โดยใช้กล้องจุลทัศน์แบบสเตอร์ริโอ
4. นำผลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยมาตรฐานและค่าความคาดเคลื่อน

2. ศึกษาโครงสร้างตาประกอบโดยใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

2.1 สัตว์ทดลอง นำมาทดลองในช่วงเดือนสิงหาคม 2535

ผึ้งมิ้ม (Apis florea) อายุช่วง 22-25 วัน

ผึ้งงาน 5 ตัว

ผึ้งนางพญา 5 ตัว

ผึ้งตัวผู้ 5 ตัว

ผึ้งหลวง (Apis dorsata) อายุช่วง 22-25 วัน

ผึ้งงาน 5 ตัว

2.2 วิธีทดลองวิจัย

1. นำสัตว์ทดลองในข้อหนึ่งมาตัดหัวแยกเอาเฉพาะส่วนตาประกอบแล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1 มิลลิเมตร
2. จุ่มตัวอย่างลงในน้ำยาดองที่เตรียมตามวิธีของ Karnovsky ทันทีเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ล้างตัวอย่างด้วย ฟิกชิงบัฟเฟอร์ pH 7.4 ครั้งละ 10 นาที 2 ครั้ง
4. ดองตัวอย่างครั้งที่ 2 ด้วย 2 % ออสเมียมเตตตรอกไซด์ ใน 0.1 M คาร์โคไดเลตบัฟเฟอร์ pH 7.4 1 ชั่วโมง
5. ล้างด้วย วอชบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.4 ครั้งละ 10 นาที 3 ครั้ง
6. ดึงน้ำออกโดยผ่านลงใน 30% แอลกอฮอล์ 10 นาที 50% แอลกอฮอล์ 10 นาที 70 % แอลกอฮอล์ซึ่งเติม ยูรานิลอะซีเตต 0.5% และกรดพอสโฟทังสติก 1% 12 ชั่วโมง
7. 95% แอลกอฮอล์ 10 นาที
8. 100% แอลกอฮอล์ 3 ครั้งๆละ 10 นาที
9. แช่ใน โพพิลีน ออกไซด์ 2 ครั้งๆละ 20 นาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. ผ่านลงในส่วนผสมระหว่าง โพพิลีน : พลาสติกผสม อัตราส่วน 2:1 1 ชั่วโมง

โพพิลีน :พลาสติกผสม อัตราส่วน 1:2 ทิ้งไว้ข้ามคืน

11. ผ่านลงในพลาสติกผสม 1 ชั่วโมงแล้วนำไปดูดอากาศออกที่ความดัน 15 บรรยากาศ เป็นเวลา 30 นาที

12. เติมพลาสติกผสมที่ได้ลงใน แคปซูลแล้วฝังตัวอย่างลงใน แคปซูล

13. เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

65 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง

14. ตัดตัวอย่างด้วย แอล เค บี อุลตราไมโครโตม (LKB Ultra microtome) ขนาด 90 นาโนเมตร

15. ช้อนตัวอย่างจากกระทงน้ำกลั่นด้วย กริด ขนาด 200 เมช โดยใช้ฟู่กันที่ทำด้วยขนตาช่วยแล้วย้อมด้วยโลหะหนักเลดซิเตรตหรือยูรานิลอะซิเตต ทิ้งไว้ให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง

16. นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; Jeol 100SX, Jeol 200CX) และทำการถ่ายภาพเพื่อประกอบการศึกษา