บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

1. การทดลอง

1. เก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด Chamberlainia hainesiana และ Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana จากแม่น้ำแควน้อย อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี โดยคัดเลือกหอยทั้งสองชนิดที่มีขนาดความยาวเปลือกจากด้านหน้า(anterior)ถึงด้านท้าย(posterior)ตั้งแต่ 8 ซม. อายุประมาณ 3 ปีขึ้นไป
2. นำหอยมุกที่ได้มาผ่านกระบวนการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อแมนเทิล(mantle transplantion)ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยชนิดเดียวกัน(allograft) และเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยต่างชนิดกัน (xenograft) นำมาตัดเป็นชิ้นขนาด 4 มม. x 4 มม. จากนั้นเปิดฝาหอยโดยใช้คีมถ่างฝาหอยใช้ลิ่มไม้สอดเปิดฝาหอยไว้แล้วจึงทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อโดยวิธีการตามวิธีการต่อไปนี้
   2.1 ไม่ใส่นิวเคลียส (non-nucleated method)โดยสอดใส่แมนเทิลขนาด 4 มม. x 4 มม.เข้าไประหว่างชั้นแมนเทิลบริเวณด้านท้าย (posterior) ของหอย
   2.2 ใส่นิวเคลียส (nucleated method) โดยสอดใส่แมนเทิลขนาด 4 มม. x 4 มม. เข้าไปพร้อมกับกับเม็ดนิวเคลียส P_t ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มม. ที่ตำแหน่งเดียวกันกับข้อ 2.1
   2.3 กลุ่มควบคุม (sham operated group) นำหอยทั้ง 2 ชนิดมาผ่านกระบวนการเช่นเดียวกันกับ 2 วิธีแรกแต่ไม่ใส่ชิ้นแมนเทิลและนิวเคลียส
3. ชิ้นแมนเทิลที่ใส่เข้าไปตามวิธีที่ 2.1 และ 2.2 นั้นมีอยู่ 2 แบบคือแมนเทิลทั้งชิ้น และเฉพาะชิ้นแมนเทิลบุผิวชั้นนอก(outer mantle epithelium) จำนวนหอยที่ใช้ในแต่ละวิธีจะใช้วิธีละ 100 ตัว ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของหอยในแต่ละวิธีการวิจัย

วิธี / ชนิดหอย	CM	CO	CMN	CON	CMX	COX	CMNX	CONX	HM	HO	HMN	HON	HMX	HOX	HMNX	HONX	กลุ่มควบคุม
C	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	200
H	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	200

C = Chamberlainia hainesiana
H = Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana
O = Outer layer of mantle epithelium
M = Mantle
N = Nucleus
X = Xenograft technique

รวมหอยที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 2,000 ตัว

4. นำหอยที่ผ่านการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อแมนเทิลใส่ลงในกระชัง กระชังละ 5-8 ตัว แล้วจึงนำไปผูกที่บริเวณแพเลี้ยงหอยของงานวิจัยการเลี้ยงไข่มุกน้ำจืด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แม่น้ำแควน้อย อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี
5. สุ่มตัวอย่างหอยมาตรวจสอบการเกิดถุงไข่มุก(pearl sac)และไข่มุก ในระยะเวลา 4 เดือนแรกจะเก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้งทุก 2 สัปดาห์ เพื่อวัดขนาดของถุงไข่มุก โดยการวัดถุงไข่มุกตามความกว้างและความยาว ตามเปลือกของหอย และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยใช้วิธี paraffin section ทำการสุ่มตัวอย่างหอยครั้งละ 10 ตัวต่อ 1 การทดลอง จากนั้นเก็บตัวอย่างเดือนละครั้ง ๆ ละ 10 ตัว เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไข่มุกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

2. การตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

หลังจากที่สุ่มตัวอย่างหอยจากแพมาทำการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายเข้าไปดังนี้

1. การตรวจสอบด้วยตาเปล่าโดยดูการเปลี่ยนของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายว่ามีการสร้างถุงไข่มุกและไข่มุกหรือไม่ วัดขนาดและบันทึกภาพ

2. การตรวจสอบด้วย Paraffin section โดยการย้อมด้วยสี Haematoxylin-Eosin และ Alizalin Red S เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของถุงไข่มุกโดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1. Fixation

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

2.2. Dehydration

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

2.3. Clearing

ล้างเนื้อเยื่อใน xylene 1 ชั่วโมง

2.4. Impregnation

ถ่ายเนื้อเยื่อที่ล้างด้วย xylene แล้วถ่ายลงใน xylene + molten wax อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายลง wax_1 ที่ 58 °C เวลา 30 นาที จากนั้นถ่ายลง wax_2 ที่ 58 °C เวลา 1 ชั่วโมง

2.5. Embedding

embed เนื้อเยื่อลงใน paraffin ทิ้งไว้ให้เย็น

2.6. Section

ตัดเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอน embedding แล้วมาตัดด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 7 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปติดบนแผ่นสไลด์

2.7. Hydration

นำเนื้อเยื่อที่ติดบนสไลด์แล้วมาล้าง paraffin ด้วย xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นถ่ายลงใน n-butyl alcohol , 95 % , 90 % , 70 % ethyl alcohol , น้ำประปา ขั้นตอนละ 3 นาที

2.8. Staining

การย้อมด้วย Haematoxylin - Eosin นำสไลด์จากขั้นตอน 2.7 มาย้อมด้วยสีย้อม Haematoxylin 10-20 นาที differentiate(70 % alcohol

100 ml. + 2-3 หยด HCl(conc)) 5-10 วินาที จากนั้นล้างในน้ำประปา 5 นาที ถ่ายลงใน 70 % , 90 % ethyl alcohol ขั้นตอนละ 3 นาทีจากนั้นย้อมด้วยสี eosin(ใน 95 % alcohol) 3-5 นาที ล้างสีด้วย 95 % ethyl alcohol 15-30 วินาที จากนั้นถ่ายลง n-butyl alcohol, xylene 1, xylene 2 ขั้นตอนละ 5 นาที แล้ว mount ด้วย Cannada balsam

การย้อมด้วย Alizalin red S นำสไลด์จากขั้นตอน 2.7 มาย้อมด้วยสีย้อม alizalin red S (2 % aqueous) 3 นาที ล้างสีด้วย acetone 30 วินาที acetone + xylene อัตราส่วน 1:1 15 วินาที ถ่ายลง xylene 1 และ xylene 2 ขั้นตอนละ 5 นาที แล้ว mount ด้วย Cannada balsam

นำสไลด์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย กล้องจุลทัศน์แบบใช้แสง

3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM)

3.1.ตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่เป็นถุงไข่มุกแช่ลงใน 3 % paraformaldehyde ผสมกับ 2 % glutaraldehyde ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium phosphate 4 ชั่วโมง

3.2.ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium phosphate 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3.3.แช่ตัวอย่างลงใน 2 % OsO_4 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium phosphate 1 ชั่วโมง

3.4.ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium phosphate 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

3.5.แช่ตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ที่ความเข้มข้น 35%,50%,70%, 95% ตามลำดับขั้นตอนละ 10 นาที จากนั้นแช่ลงใน butanol 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที

3.6.ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต โดยใช้เครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต(critical point dryer)และใช้ butanol หรือ acetone เป็นสารละลายตัวกลาง(intermediate fluid)ระหว่างสารละลายลดน้ำ(dehydrant) กับ สารละลายตัวเปลี่ยน(transitional fluid) คือ คาร์บอนไดออกไซด์เหลวซึ่งเปลี่ยนจากสถานะของเหลวไปเป็นก๊าซ

3.7.นำตัวอย่างที่แห้งวางบนแท่นทองเหลืองนำไฟฟ้า(stub)ติดด้วยกาวนำไฟฟ้า(electroconductive paint) เช่น กาว silver หรือ corbon colloidal

3.8. อาบผิวตัวอย่างด้วยทองโดยใช้เครื่องทำโลหะให้เป็นไอออน (ion sputter) เมื่อตัวอย่างสามารถเป็นสื่อไฟฟ้าแล้วจึงนำเข้าศึกษาในกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังไฟฟ้า 10-20 KV

3.9. บันทึกภาพ

หมายเหตุ สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (ไข่มุก) จะเริ่มจากขั้นตอนที่ 3.6

3. วิเคราะห์ผลการทดลอง

1. นับจำนวนถุงไข่มุกที่เกิดขึ้น คิดเป็นเปอร์เซนต์ต่อจำนวนหอยที่นำมาทดลองทั้งหมดทุกวิธี

2. วัดขนาดของถุงไข่มุกที่เกิดขึ้นในแต่ละเดือน แต่ละวิธี เขียนกราฟขนาดของถุงไข่มุกที่เกิดขึ้นจนได้ไข่มุก

3. เปรียบเทียบระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในถุงไข่มุก ด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์

4. เปรียบเทียบระยะเวลาที่เกิดผลิกสารมุกในแต่ละวิธีด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

5. เปรียบเทียบไข่มุกที่เกิดขึ้นในแต่ละวิธีการทดลอง

รูปที่ 1 แสดงวิธีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle transplantation) ในหอยมุก

แผนที่ที่ 1 แผนที่แม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี แสดงบริเวณแพเลี้ยงหอยของงานวิจัยการเลี้ยงไข่มุกน้ำจืด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดัดแปลงจาก อำพร อึ้งปกรณ์แก้ว, "อัลตราสตรัคเจอร์ของเปลือกโกลคิเดียมหอยกาบน้ำจืดบางชนิด," (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535), หน้า 15.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย