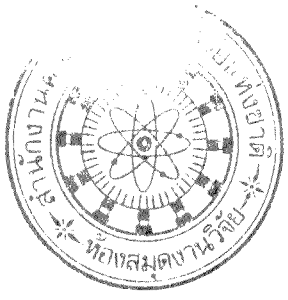

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

สัตว์ทดลองและวิธีดำเนินการทดลอง

ไก่พื้นเมืองไทยเพศผู้และเพศเมียพันธุ์ประดู่หางดำอายุ 16-18 สัปดาห์ซึ่งจะทำการซื้อจากฟาร์มไก่พื้นเมืองเอกชน โดยไก่ทั้งหมดจะถูกนำมาเลี้ยงไว้ภายในโรงเรือนที่มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง (12 hours of light and 12 hours of darkness, 12L: 12D) เพื่อให้ไก่ได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ จัดอาหารและน้ำให้ไก่ได้กินอย่างเสรี (*ad libitum*) เมื่อไก่มีอายุ 22 สัปดาห์จะถูกนำไปใช้ในการทดลอง โดยการแยกเข้าไปเลี้ยงในโรงเรือนปิด (evaporative cooling system) ที่ควบคุมอุณหภูมิตามกลุ่มการทดลอง ตามวิธีของ Gahali และคณะ (2001) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เลี้ยงในโรงเรือนปิดที่ควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนให้อยู่ที่ 35 ± 2°C

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงในโรงเรือนปิดที่ควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนให้อยู่ที่ 31 ± 2°C

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงในโรงเรือนปิดที่ควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนให้อยู่ที่ 27 ± 2°C

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุม เลี้ยงในโรงเรือนเปิดภายใต้อุณหภูมิสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

ไก่ทุกตัวจะมีเบอร์ติดปีกไก่ (wing band) เพื่อบอกหมายเลขของไก่ ไก่จะถูกเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันเป็นเวลา 28 สัปดาห์ (ระหว่างเดือนพฤศจิกายน-พฤษภาคม) ตลอดช่วงการทดลองทำการสังเกตและบันทึกพฤติกรรมของไก่พื้นเมือง น้ำหนักตัวไก่ และปริมาณผลผลิตไข่ไก่ เก็บเลือดไก่แต่ละตัวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เพื่อนำไปปั่นแยกพลาสมา ก่อนนำไปวิเคราะห์ฮอร์โมน และเมื่อสิ้นสุด ทำการเก็บสมองเพื่อนำไปวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้อง

สถานที่ดำเนินการทดลอง

ส่วนงานสัตว์ปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นสถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง อาคารเครื่องมือ 1 (F1) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นสถานที่เก็บตัวอย่าง และ Department of Animal Science, The Hebrew University of Jerusalem ประเทศอิสราเอล เป็นสถานที่วิเคราะห์ฮอร์โมน โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แทนวิธี radioimmunoassay ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถนำตัวอย่างพลาสมาไปวิเคราะห์ที่ Department of Animal Science, University of Minnesota ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ เนื่องจากสถานการณ์ไข้หวัดนก และไม่สามารถวัดฮอร์โมนเหล่านี้ได้ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ เนื่องจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีไม่มีใบอนุญาตการใช้สารกัมมันตภาพรังสีชนิด [125]I

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดไก่ถูกเก็บจากเส้นเลือดดำที่ปีก (wing vein) ปริมาณตัวละ 3 ลบ.ซม. สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยเก็บใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด คือ heparin

การเก็บตัวอย่างพลาสมา

โดยการนำเลือดไก่มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกเอาพลาสมาออกจากเม็ดเลือดพลาสมาที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์ฮอร์โมน

การเตรียมสมองส่วน Hypothalamus และ Pituitary

ทำการเก็บสมองส่วน hypothalamus และ pituitary ตามวิธีที่ได้รายงานไว้โดย Chaiseha และคณะ (1998b) โดยแม่ไก่จะถูกฆ่าโดยการฉีดยา pentobarbital sodium จากนั้นทำการเก็บสมองที่อยู่ในกะโหลกศีรษะทันที และทำการแยกเก็บสมองส่วน pituitary ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อป้องกันการสูญเสียเนื้อเยื่อส่วน median eminence จากนั้นตัดส่วน optic chiasma ที่ติดอยู่ใต้สมองส่วน hypothalamus ออกจากผิวด้านล่างของสมอง ชิ้นเนื้อเยื่อจะถูกตัดให้เหลือบริเวณของ median eminance, hypothalamus และ preoptic hypothalamus รวมอยู่ด้วย จากนั้นทำการแช่แข็งสมองส่วน hypothalamus และ pituitary ใน liquid nitrogen ทันที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ สมองส่วน hypothalamus จะถูกนำมา homogenize เพื่อใช้ในการหา VIP และ GnRH gene expression สมองส่วน pituitary จะถูกนำมา homogenize เพื่อใช้ในการหา PRL, FSH และ LH gene expression ด้วยเทคนิค Northern Blot Analysis

การชั่งน้ำหนักไก่

ไก่จะถูกจับมาชั่งน้ำหนักสัปดาห์ละ 1 ครั้งก่อนการเก็บตัวอย่างเลือด

การบันทึกข้อมูลผลผลิตไข่

ทำการเช็คพฤติกรรมไก่ 4 ครั้งต่อวัน เริ่มตั้งแต่ 07.00 น., 10.00 น., 13.00 น. และ 16.00 น. บันทึกข้อมูลผลผลิตไข่ที่ได้ในแต่ละวัน

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ฮอร์โมน

ฮอร์โมน PRL, LH และ FSH ในพลาสมาถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA ตามวิธีการของ Kosonsiriluk และคณะ (2008)

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน PRL, LHβ, FHSβ, VIP และ GnRH

การทำ Northern Blot Analysis เพื่อหา PRL, LHβ และ FSHβ

ทำการสกัด RNA จากสมองส่วน pituitary ที่ถูกแช่แข็งไว้โดยวิธีที่ได้รายงานไว้โดย Chaiseha และคณะ (1998a) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ การทำ Northern Blot Analysis จะทำตามวิธีที่ได้รายงานไว้โดย Sambrook และคณะ (1989) โดย RNA ทั้งหมด (10 และ 20 ไมโครกรัม/แถว) จะถูก denature ใน gel running buffer ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการแยกชั้นใน 1% agarose denaturing gel และทำ northern transfer ลงบน nylon membrane และ prehybridize เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมงด้วย digoxigenin-labeled PRL, LH, หรือ FSH cDNA probe ซึ่ง label ด้วยการทำ

nick translation ที่อุณหภูมิ 52°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง หลังจากการทำ hybridization และล้างแผ่น membrane แล้วทำการ develop ให้เกิดการตกตะกอนสีม่วงเข้มของ digoxigenin labeled probe

การทำ Northern Blot Analysis เพื่อหา VIP และ GnRH

ทำการสกัด RNA จากสมองส่วน hypothalamus ที่ถูกแช่แข็งไว้โดยวิธีที่ได้รายงานไว้โดย Chaiseha และคณะ (1998a) จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ การทำ Northern Blot Analysis จะทำตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น โดย nylon membrane จะถูก prehybridize เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมงและ probe ด้วย digoxigenin-labeled VIP หรือ GnRH cRNA probe หลังจากการทำ hybridization และล้างแผ่น membrane แล้วทำการ develop ให้เกิดการตกตะกอนสีม่วงเข้มของ digoxigenin-labeled probe

การคำนวณผลผลิตไข่

1) **จำนวนผลผลิตไข่รวม (cumulative egg production)** = จำนวนผลผลิตไข่สะสมเริ่มตั้งแต่ไก่เริ่มให้ไข่
2) **เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่สะสม (cumulative hen-day egg production)** = (จำนวนไข่ที่ผลิตได้ทั้งหมด*100)/(จำนวนวัน*จำนวนไก่ในช่วงการทดลอง)
3) **ปริมาณผลผลิตไข่เฉลี่ยต่อตัวต่อสัปดาห์** = จำนวนไข่รวมในแต่ละสัปดาห์/จำนวนไก่ที่เหลืออยู่ในแต่ละสัปดาห์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทั้งหมดจะใช้ SPSS สำหรับ windows software (version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ความแปรปรวนของระดับฮอร์โมน PRL ในพลาสมา และน้ำหนักตัวของไก่แต่ละกลุ่มการทดลองวิเคราะห์โดยการใช้ one way analysis of variance (ANOVA) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองโดยการใช้ Tukey's Studentized Test โดยค่า P ที่น้อยกว่า 0.05 จะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ