



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

- 3.1 ตัวหนอนไหม : หนอนไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากสถานีทดลองหม่อนไหม จังหวัดขอนแก่นและจากศูนย์ผลิตไข่ไหม อ.บ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น เลี้ยงในเรือนเลี้ยงไหมที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม ควบคุมอุณหภูมิ การเลี้ยงประมาณ 27 - 30°C ความชื้น 70-85 % ให้อาหาร 4 มื้อ/วัน
- กลุ่มตัวอย่าง : หนอนไหมวันที่ 1 ของทุกวัยตั้งแต่วัย 1 ถึงวัย 5 ไม่เลือกเพศคัดขนาด เท่า ๆ กัน

3.2 ขั้นตอนการศึกษาหา paraffin technique ที่เหมาะสมกับหนอนไหม

สารเคมี	-absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)	-xylene
	-ZnSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka AG, Switzerland)	-acetone (BDH, England)
	-lithium carbonate (May & Bakker, England)	-acetic acid
	-paraplast (Oxford, England)	-1% acid alcohol
	-sodium phosphate (Fluka AG, Switzerland)	-1% acid alcohol
	-chloroform (Carlo Erba, Spain)	-glacial alcohol
	-paraphast (Oxford, England)	-distilled water
	-methyl alcohol (BDH, England)	-95% ethyl alcohol
	-hematoxylin (Merck, Germany)	-1% acid alcohol
	-2% 3-Aminopropyl Trichoxy-silane in acetone	-40% formalin
	-0.9% normal saline	

อุปกรณ์	-บีกเกอร์ขนาด 30 ml	-cassette
	-ขวดแก้วขนาดเล็กพร้อมฝาปิด	-glass slide

-บล็อกพลาสติก สำหรับขั้นตอน Embedding	
-ชุดย้อมสไลด์	-คูบ paraffin
-ชุด embedding	-microtome (Lecia)
-light microscope	-คูบ microwave (2450 Mhz, National)

วิธีการทดลอง

1. การเคลือบสไลด์

เพื่อให้เนื้อเยื่อที่ตัดสามารถยึดติดกับแผ่นสไลด์แก้วได้ดียิ่งขึ้นโดยใช้วิธี Silanigation

ประยุกต์จากวิธีของ Rantop และคณะ (1986)

1. นำแผ่นสไลด์แก้วตามจำนวนที่ต้องการใช้น้ำมาล้างทำความสะอาด
2. นำสไลด์แก้วอบให้แห้ง
3. นำสไลด์ที่อบแห้งแล้วแช่ลงใน acetone 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
4. นำมาแช่ใน 2% 3-Aminopropyl Triethoxy-silane in acetone เป็นเวลา 10 วินาที
5. นำมาแช่ใน acetone อีก 5 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C ค้างคืน

2. การทดสอบความเหมาะสมของน้ำยาดอง (fixative)

1. เก็บตัวหนอนไหมวัย 1 จำนวน 35 ตัว
2. แบ่งตัวหนอนไหมออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว
3. ทำให้ตัวหนอนไหมมีลำตัวตรงก่อนนำลงน้ำยาดอง (fixative) เพื่อง่ายแก่การตัดโดย
 - นำตัวหนอนไหมแต่ละกลุ่มแช่ลงใน 0.9% normal saline ขนาด 10ml. นำเข้าตู้ microwave ปรับระดับความร้อนให้อยู่ปานกลาง (medium) ใช้เวลา 20 วินาทีจะได้อุณหภูมิประมาณ 58-60°C

- นำตัวหนอนไหมแต่ละกลุ่มแช่ลงในน้ำยาดองแต่ละชนิดที่จะใช้ทดสอบขนาด 10 ml. นำเข้าเครื่อง microwave ปรับระดับความร้อนให้อยู่ปานกลาง ใช้เวลา 7-10 วินาทีแล้วแต่ละชนิดของน้ำยาดอง ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 58-60°C

4. นำตัวหนอนไหมแต่ละกลุ่มแช่ลงในน้ำยาดองแต่ละชนิดรวม 7 ชนิดดังนี้

- กลุ่มที่ 1 Carnoy's solution
- กลุ่มที่ 2 Methacarn's solution
- กลุ่มที่ 3 Bouin's solution
- กลุ่มที่ 4 Zinc formalin

กลุ่มที่ 5 Zinc alcohol

กลุ่มที่ 6 70% Alcohol

กลุ่มที่ 7 10% Neutral buffered formalin

กลุ่มที่ 1, 2, 3 แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C overnight

กลุ่มที่ 4, 5, 6, 7 แช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง overnight

5. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาเข้าขั้นตอนการ paraffin embedding โดยเริ่มจาก

5.1 dehydration ด้วย 70%, 85%, 95% และ absolute ethyl alcohol 3 ครั้ง ๆ ละ 20-30 นาที สำหรับ Zinc-formalin, 70% alcohol และ 10% NBF ส่วน Carnoy's solution, Methacarn's solution, Bouin's solution และ Zinc-alcohol ผ่านถึง absolute ethyl alcohol ได้เลย

5.2 clearing ด้วย xylene 3 ครั้ง ๆ ละ 20-30 นาที

5.3 infiltrate ด้วย paraffin 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

5.4 embedding ด้วย paraffin ตัวอย่างเนื้อเยื่อ 1 ตัวค้อนบล็อกพลาสติก 1 บล็อก วาง specimen ในแนวยาวของ plastic block

5.5 trimming ให้ได้ขนาดที่ต้องการ

5.6 sectioning แนว cross section ความหนา 4 ไมโครเมตร

5.7 staining ด้วย Hematoxyline-eosin

5.8 mounting ด้วย Permount

6. นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) เพื่อตัดสินใจว่า fixative ชนิดไหนเหมาะสมกับ specimens มากที่สุด

3.3 ขั้นตอนการศึกษาโดยขั้นตอนการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope)

สารเคมี	: -absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)	-paraplast (Oxford, England)
	-0.9% normal saline solution (NSS)	-xylene
	-Pyronin-y (Fluka, Switzerland)	-Carnoy's solution
	-Eosin (Merck, Germany)	-1% acid alcohol
	-lithium carbonate (May & Baker, England)	-acetone (BDH, England)
	-diethyl ether (May & Baker, England)	-distilled water

-Hematoxylin (Merck, Germany)

-95% ethyl alcohol

-Methyl green (Fluka, Switzerland)

อุปกรณ์

-ขวดแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับคงตัวหนอนไหม

-กรรไกรผ่าตัดขนาดเล็ก

-คีมคีบขนาดเล็ก

-เข็มหมุด

-บล็อกพลาสติกสำหรับขั้นตอนการ embedding

-ปักเกอร์

-cassette

-glass slide

-ตู้อบ paraffin

-ชุด embedding

-ชุดย้อม slide

-ตู้อบ microwave (2450 Mhz, National)

-microtome (Leica)

-light microscope

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวหนอนไหมวันที่ 1 ของทุกวัยตั้งแต่วัย 1 ถึงวัย 5 วัยละ 10 ตัว รวมทั้งสิ้น 50 ตัว
2. นำตัวหนอนไหมวัย 1 ถึงวัย 4 มาทำให้ตาย และมีลำตัวยืดตรงเพื่อสะดวกต่อการตัด section โดยใส่น้ำยา凍 คือ Carnoy's solution ในปริมาณ 50 ml เข้าตู้ microwave ปรับระดับความร้อนให้อยู่ปานกลาง ใช้เวลา 24 วินาที จะได้อุณหภูมิ 59°C สำหรับหนอนไหมวัย 5 ไม่ต้องผ่านขั้นตอนดังกล่าวนี้เนื่องจากสามารถแยกคอมพิวเตอร์สร้างเส้นไหมออกมาจากตัวหนอนไหมได้
3. นำหนอนไหมวัย 1, 2, 3 และคอมพิวเตอร์สร้างเส้นไหมแต่ละส่วนห่อกระดาษบางบรรจุลง cassette นำลงขวดที่มีน้ำยา凍 ส่วนหนอนไหมวัย 4 บรรจุลง cassette ได้ทันที
4. เก็บ specimen ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C overnight
5. นำมาผ่านขบวนการ paraffin embedding ดังนี้
 - 5.1 ถึง 5.5 ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการศึกษาหา paraffin technique ที่เหมาะสมกับหนอนไหมข้อ 5.1 ถึง 5.5

5.6 sectioning โดย

- ตัด section วางบนสไลด์แก้ว ให้สไลด์แก้ว 1 แผ่นมี 5 sections ความหนา section ละ 4 ไมโครเมตร

- ตัดติดกัน 10 sections แบ่งวางบนสไลด์แก้ว 2 แผ่น

- เว้นระยะตัดทุก ๆ 100 ไมโครเมตร ตัดจนหมดบล็อก

5.7 staining โดยย้อมด้วย methyl green - pyronin-y

5.8 mounting ด้วย Permount

6. นำไปศึกษาดูด้วยกล้อง light microscope

7. วัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางโดยกำหนดการวัดจากขอบนอกสุดของต่อมสร้างเส้นใหม่ ทั้ง 3 ส่วนด้วย ocular lens micrometer นำผลหาค่าเฉลี่ย

8. วัดขนาดเซลล์ของต่อมสร้างเส้นใหม่(gland cell) โดยกำหนดการวัดจากขอบนอกสุดถึงขอบในสุดที่ชิดกับท่อของค่อม(lumen) ในแต่ละข้าง นำค่าที่ได้ทั้งสองมาหาค่าเฉลี่ย วิธีการทั้งหมดนี้จะต้องทำการทดลองจนครบทุกขั้นตอน แล้วทำซ้ำหลังจากการประเมินผลของ section ที่ย้อมสีแล้วว่าไม่ดีพอ ขั้นตอนนี้จึงต้องทำซ้ำหลายครั้ง

3.4 ขั้นตอนการศึกษาโดยใช้ขบวนการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope)

สารเคมี	-absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)	-osmium tetroxide
	-propylene oxide (Merck, Germany)	-ethyl alcohol 95%
	-Epon 812 (Fluka AG, Switzerland)	-modified Karnovsky
	-DDSA (Fluka AG, Switzerland)	-distilled water
	-0.05 M. cacodylate buffer pH 7.4	-lead citrate
	-DMP -30 (Fluka AG, Switzerland)	-0.2 M. imidazole
	-diethyl ether (May&Baker England)	
	-MNA (Fluka AG, Switzerland)	
	-uranyl acetate (Merck, Germany)	

อุปกรณ์ : -ขวดแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับใส่ specimen

-บีกเกอร์

-กรรไกรผ่าตัดและคีมคีบขนาดเล็ก

-ใบมีด

-Copper grid

-ultramicrotome

-transmission electron microscope : HITACHI H-600 (100 KV)

วิธีการทดลอง

1. นำตัวหนอนไหมวัย 5 วันที่ 1 จำนวน 10 ตัว มาทำให้สลบด้วย diethyl ether
2. ซ้ำแหล่งต่อมสร้างเส้นไหม แยกต่อมสร้างเส้นไหมแต่ละส่วนออก
3. แช่ต่อมสร้างเส้นไหมทั้ง 3 ส่วนไว้ใน modified Karnovsky's fixative เป็นเวลา 2 ชม. แล้วนำมาตัดแต่งให้ได้ขนาดพอเหมาะประมาณ 0.5 มิลลิเมตร แล้วนำ specimen แช่ใน Karnovsky's fixative ที่อุณหภูมิ 4°C overnight
4. ล้างด้วย 0.05 M cacodylate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง
5. แช่ตัวอย่างใน 4% OsO₄ : 0.2 M imidazole ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. ล้างด้วย distilled water เป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง
7. แช่ specimen ไว้ใน uranyl acetate เป็นเวลา 20 นาที
8. ควบน้ำออกจาก specimen โดยใช้แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ได้แก่ 50%, 70%, 80%, 95% 2 ครั้ง และ absolute alcohol 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 5 นาที
9. แช่ specimen ใน propylene oxide เป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง
10. แช่ specimen ใน propylene oxide : plastic ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 30 นาที
11. แช่ specimen ในพลาสติกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C
12. polymerization พลาสติกที่ 60°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
13. ตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นบาง ๆ ประมาณ 500Å⁰ หรือ 60-100 นาโนมิเตอร์ โดย ultramicrotome
14. ซ้อนตัวอย่างด้วยกริดทองแดง แล้วย้อมด้วย 6% uranyl acetate เป็นเวลา 10 นาที และ Renold's lead citrate เป็นเวลา 5 นาที
15. ส่องดูและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope : HITACHI H-600)

16. นำฟิล์มที่ถ่ายไปทำการล้าง อัด และขยายภาพ โดยใช้น้ำยาตามภาคผนวกเพื่อทำการ
แปลผลต่อไป