บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

(Materials and Methods)

1. สัตว์ทดลอง

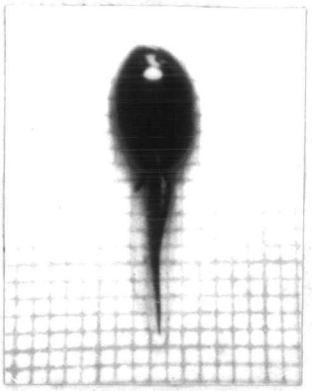
นำไข่คางคกชนิด Bufo melanostictus ที่ได้รับการผสมพันธุ์ใหม่ ๆ จากพ่อแม่คู่เดียวกันมาเลี้ยงในห้องทดลอง (แผนกวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ตามวิธีของศิริวรรณ โกมารทัต (2514) เมื่อไข่พักเป็นตัวแล้วแยกมาเลี้ยงในอ่างกระจกขนาดยาว 30 x กว้าง 20 x สูง 15 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร อ่างละ 100 ตัว แต่ละอ่างบรรจุน้ำประปาที่ได้ผ่านออกซิเจนไว้แล้ว 2 – 3 วัน จำนวน 3 ลิตร อุณหภูมิของน้ำในอ่างทดลอง 26 – 30 องศาเซ็นติเกรด pH ของน้ำในอ่างทดลอง 7 – 8 สัตว์ได้รับแสงสว่างจากหลอดไฟ (day light lamp) ซึ่งอยู่เหนืออ่างทดลองประมาณ 2 เมตร วันละ 12 ชั่วโมง แต่ละอ่างได้รับออกซิเจนตลอดเวลาจากเครื่องปั๊มอากาศ เมื่อสัตว์ทดลองมีอายุ 3 วัน ให้ใบผักกาดหอมต้มวันละ 2 ใบ (หนักประมาณ 10 กรัม) ต่อหนึ่งอ่างเป็นอาหาร ทำความสะอาดอ่างทดลองทุกวัน โดยใช้หลอดแก้วดูดเศษอาหารที่เหลือและของเสียที่สัตว์ถ่ายออกมาที่ตกอยู่ตามพื้นอ่างออกให้สะอาดมากที่สุด เติมน้ำประปาที่ได้ผ่านออกซิเจนไว้แล้วเท่ากับปริมาณน้ำที่ดูดออก ถ่ายน้ำสัปดาห์ละหนึ่งครั้ง เมื่อคางคกเจริญเติบโตจนถึงระยะตัวสำเร็จแล้วย้ายมาเลี้ยงในอ่างทดลองที่มีเนินดินและน้ำ ให้ยุงเป็นอาหาร

2. การแบ่งกลุ่มของสัตว์ที่นำมาทดลอง

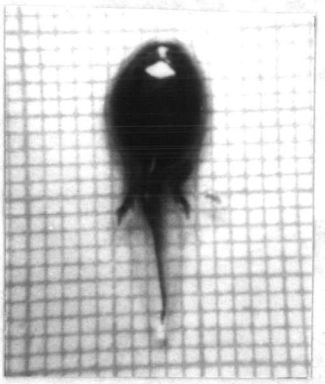
การแบ่งกลุ่มของสัตว์ที่นำมาทดลองนั้น ใช้การเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างภายนอกที่เกิดขึ้น เป็นหลักเกณฑ์ในการตัดสิน แทนที่จะแบ่งเป็นกลุ่มตามอายุของสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างระยะต่าง ๆ ของสัตว์ทดลองในแต่ละ

แผนภาพที่ 2 แสดงตัวอ่อนของ Bufo melanostictus ระยะต่าง ๆ ที่นำมาทำการทดลอง

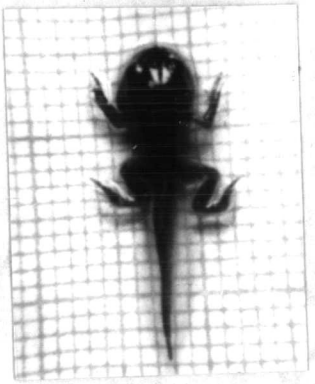
มาตราส่วน 1 ช่อง = 1 ตารางมิลลิเมตร



ระยะตุ่มขาหลัง

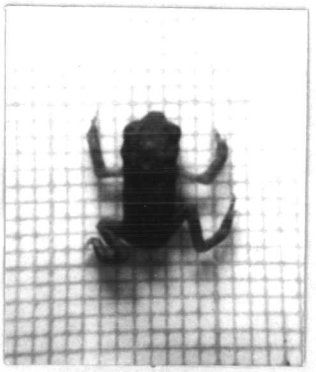


ระยะขาหลัง



ระยะขาหน้า

ระยะหางหดสั้น



ระยะตัวสำเร็จ

อ่างไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมกันทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงระดับ activity ของ urea cycle enzymes เท่าที่มีรายงานใน amphibian นั้น เกิดขึ้นโดยมีความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงของรูปร่างระยะต่าง ๆ ในขณะที่มี metamorphosis ดังนั้นจึงแบ่งสัตว์ที่นำมาทดลองออกเป็นกลุ่มตามระยะของการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างภายนอกดังนี้

กลุ่มที่ 1 ระยะตุ่มขาหลัง (limb bud stage)
กลุ่มที่ 2 ระยะขาหลัง (hind limb stage)
กลุ่มที่ 3 ระยะขาหน้า (fore limb stage)
กลุ่มที่ 4 ระยะหางหดสั้น (tail resorption stage)
กลุ่มที่ 5 ระยะตัวสำเร็จ (finish)
กลุ่มที่ 6 ระยะตัวเต็มวัย (adult)

D'Angelo (1941) ให้ชื่อระยะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ amphibian โดยเรียกระยะที่มีการเจริญของขาหลังว่า premetamorphosis ระยะที่เริ่มมีขาหน้าจนถึงระยะหางหดสั้นเรียกว่า metamorphosis climax และระยะตัวสำเร็จเรียกว่า post-metamorphosis

3. <u>การเตรียม homogenate</u>

นำตัวอ่อนของคางคกที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกันมาครั้งละ 10 ตัว ซับน้ำออกจากตัวให้แห้งแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักเปียก (wet weight) ด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด "Stanton" นำมาผ่าตัดเอาแต่ตับโดยใช้กล้องสองตา ("Stereozoom" ของ Bausch and Lomb) กำลังขยาย 30 เท่าช่วยขยายให้เห็นชัดเจน ตับที่ได้นำมารวมกันแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด "Stanton" homogenize ตับของสัตว์ทดลองในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนตับ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร โดยใช้ Virtis "45"

homogenizer ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที homogenate ที่ได้ใช้ในการหา activity ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase

สำหรับสัตว์ทดลองระยะตัวเต็มวัย การทดลองแต่ละครั้งใช้สัตว์ 1 ตัว นำมาชั่งน้ำหนักโดยใช้ Torsion balance "Torbal" แล้วมาผ่าตัดเอาแต่ตับ นำตับมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด homogenize ตับในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนเกี่ยวกับตับของตัวอ่อนคางคกใช้ความเร็ว 45,000 รอบต่อนาที

4. <u>incubation and color development</u>

activity ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase คำนวณจากปริมาณของผลที่ได้จากปฏิกริยาของเอ็นไซม์ทั้งสองซึ่งได้แก่ citrulline และ urea

006423

นำเอา homogenate ของตับและ incubating medium ใส่ใน conical centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรดเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วแต่ชนิดของเอ็นไซม์ แล้วเติม 0.5 molar perchloric acid 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเพื่อหยุดปฏิกริยาของเอ็นไซม์ นำมา centrifuge เพื่อแยกโปรตีนที่ตกตะกอน โดยใช้ IEC centrifuge model HN ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายในข้างบนมาหา citrulline และ urea โดยการวัดเทียบสี (colorimetric method) วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น (optical density) ด้วย spectrophotometer "Spectronic 20" ใน cuvett ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซ็นติเมตร

control tube ใช้ homogenate ที่เติม 0.5 molar perchloric acid 5.0 มิลลิลิตร เพื่อทำลายเอ็นไซม์ก่อนนำไป incubate กับ incubating medium

i 18255012

4.1 ornithine transcarbamylase (Brown and Cohen, 1959)

activity ของ ornithine transcarbamylase วัดได้โดยตรงจากอัตราการเกิด citrulline, specific activity ของ ornithine transcarbamylase ในการทดลองนี้วัดได้จากจำนวน micromoles ของ citrulline ที่เกิดในเวลา 1 นาทีต่อน้ำหนักตับเป็นมิลลิกรัม

incubating medium ประกอบด้วย glycylglycine buffer pH 8.3, 90 micromoles; L-ornithine pH 8.0, 20 micromoles; dilithium carbamyl phosphate, 20 micromoles (เตรียมทันทีก่อนใช้) และ homogenate ของตับ 0.2 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 2.0 มิลลิลิตร incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรด 15 นาที เมื่อครบ 15 นาทีแล้วเติม 0.5 molar perchloric acid 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเพื่อทำลายเอ็นไซม์ นำหลอดทดลองไป centrifuge นำสารละลายใสข้างบนมาหา citrulline ตามวิธีของ Grisolia (1955) โดยนำสารละลายใส 1 มิลลิลิตรมาเติมน้ำกลั่นจนเป็น 5 มิลลิลิตร เติม 3% aqueous solution diacetylmonoxime (2, 3 butanedione-2-oxime) 0.25 มิลลิลิตร และ 1 : 3 sulfuric acid:phosphoric acid 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมเข้ากันดีต้มใน water bath ที่มีน้ำเดือดในที่มืด (ใช้ aluminium foil หุ้มหลอดและปิดปากหลอดทดลอง) เป็นเวลา 15 นาที นำมาทำให้เย็นใน running water bath 10 นาที แล้วนำมาวัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่นแสง 490 millimicrons สารละลายมีสีส้ม

4.2 arginase (Brown and Cohen, 1959)

activity ของ arginase วัดได้จากอัตราการเกิด urea ที่ได้จากปฏิกริยาของเอ็นไซม์ specific activity ของ arginase

ในการทดลองนี้วัดได้จากจำนวน micromoles ของ urea ที่เกิดขึ้นต่อ 1 นาที ต่อน้ำหนักตับคิดเป็นมิลลิกรัม

incubating medium ประกอบด้วย L-arginine pH 9.5, 25 micromoles; manganous chloride, 0.5 micromoles; glycine buffer pH 9.5, 50 micromoles; homogenate ของตับที่นำมาทำให้เจือจาง 1 : 10 (คิดเป็นน้ำหนักตับ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 2.0 มิลลิลิตร incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซ็นติเกรดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบ 30 นาที แล้วใส่ 0.5 molar perchloric acid 5.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เพื่อทำลายเอ็นไซม์ นำหลอดทดลองไป centrifuge แล้วนำสารละลายใสข้างบนมาหา urea ตามวิธีของ Ceriotti and Spandrio (1963) โดยนำสารละลายใสมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนเป็น 5 มิลลิลิตร ใส่ 0.5 % diacetylmonoxime ใน 5 % acetic acid (v/v) 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.4 % phenazone (antipyrine) ใน 40 % sulfuric acid (v/v) 4 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกันดีต้มใน water bath ที่มีน้ำเดือดเป็นเวลา 50 นาที นำมาทำให้เย็นใน running water bath 10 นาที แล้วนำมาวัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่นแสง 460 millimicrons สารละลายมีสีเหลือง

5. วิธีหา urea ที่ขับถ่ายออกมาจากคางกก

นำคางคก Bufo melanostictus ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกัน มาชั่งน้ำหนักตัว แล้วนำมาใส่ใน beaker ที่มี 0.01 molar phosphate buffer pH 6.5 อยู่ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำ fluid ที่ได้จำนวน 1 มิลลิลิตรมาตรวจหา urea โดยการวัดเทียบสีตาม

วิธีของ Ceriotti and Spandrio (1963) คำนวณหาปริมาณของ urea ที่ขับถ่ายออกมาทั้งหมดใน medium ได้จากค่าความเข้มของสีที่วัดได้ เนื่องจากปริมาณ urea ที่ขับถ่ายออกมาทั้งหมดใน medium เป็นสัดส่วนกับปริมาณ urea ใน fluid ที่นำมาทำการวัดเทียบสี

อัตราการขับถ่าย urea ในการทดลองครั้งนี้วัดได้จากจำนวน micromoles ของ urea ที่ถูกขับถ่ายออกมาในเวลา 24 ชั่วโมงต่อน้ำหนักตัวคิดเป็นกรัม

6. <u>การทดสอบทางสถิติ</u>

นำค่า specific activity ของเอ็นไซม์ ornithine transcarbamylase และ arginase รวมทั้งอัตราการขับถ่าย urea ของคางคกระยะต่าง ๆ ที่นำมาทดลอง มาทดสอบทางสถิติ เพื่อตรวจสอบว่าผลการทดลองที่ได้นั้นอยู่ในระดับความเชื่อมั่นกี่เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี Complete Randomized Design (C.R.D. test)