

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการที่ 1: เก็บตัวอย่างผัสดำเนินการเพื่อตรวจสอบโรคโนซิมาในพื้นที่ 3 จังหวัดภาคเหนือตอนบน ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่

ทำการสำรวจหาความชุกของโรคโนซิมา โดยสุ่มพื้นที่ตัวอย่างตามตาราง (ภาพที่ 11) ในแต่ละจังหวัด จังหวัดละ 10 ฟาร์ม และสุ่มรังผึ้งจำนวน 3 รังต่อฟาร์ม ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 เพื่อเก็บตัวอย่างผึ้งงานตัวเต็มวัย สำหรับตัวอย่างที่เก็บได้จากจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ได้จำนวน 377 และ 374 ตัวอย่างตามลำดับ ขณะที่การเก็บตัวอย่างผึ้งในพื้นที่จังหวัดแพร่ได้หยุดการเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคม ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557 และสามารถเก็บตัวอย่างได้เพียง 259 ตัวอย่าง เนื่องจากผึ้งที่เก็บตัวอย่างถูกเคลื่อนย้ายไปตามแหล่งอาหาร หรือแหล่งพื้นที่ที่มีการบานของไม้ดอก (ฤดูเก็บน้ำหวาน) เพื่อผลิตน้ำหวานให้เกษตรกร ดังนั้นจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้ได้ตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 1,010 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 11 แสดงตัวอย่างที่ดินตั้งรังผึ้ง (ทิศทางการตั้งรังผึ้งขึ้นอยู่กับลักษณะทางภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่) ในการเก็บตัวอย่างผึ้งจำนวน 3 รัง ของแต่ละฟาร์ม

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างสิ่งที่ได้จากการสำรวจแล้งฝั้งพื้นที่จากจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ตำแหน่งที่เก็บ ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนซ้ำ	รวมตัวอย่าง ทั้งหมด	ช่วงเวลาที่เก็บ ตัวอย่าง
เชียงใหม่	ฝั้งบินหน้าร้าง	120	3	377	ก.ค. 2556-มิ.ย. 2557
	ฝั้งตายหน้าร้าง	17			ก.ค. 2556-มิ.ย. 2557
ลำพูน	ฝั้งบินหน้าร้าง	120	3	374	ก.ค. 2556-มิ.ย. 2557
	ฝั้งตายหน้าร้าง	14			ก.ค. 2556-มิ.ย. 2557
แพร่	ฝั้งบินหน้าร้าง	80	3	259	ก.ค. 2556-ก.พ. 2557
	ฝั้งตายหน้าร้าง	19			ก.ค. 2556-ก.พ. 2557
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด		1,010		1,010	

สุ่มตัวอย่างฝั้งจากโรงที่กำหนดไว้จำนวน 60 ตัว/โรง โดยเก็บฝั้งงานที่บินเข้าออกหน้าร้าง ใช้สวิงโฉบไปมาให้ได้จำนวนฝั้งที่ต้องการ (ภาพที่ 12-ก) จากนั้นนำตัวอย่างฝั้งแช่ด้วยแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่น กรณีที่พบฝั้งตายอยู่หน้าร้าง (ภาพที่ 12-ข) ให้แช่แอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บตัวอย่างใส่ภาชนะบรรจุให้มิดชิด เขียนหมายเลขตัวอย่าง ชื่อเจ้าของฟาร์มฝั้งอย่างชัดเจน วันที่เก็บตัวอย่างนำมาแช่ในภาชนะเก็บความเย็น เพื่อนำมาตรวจสอบภายใต้ห้องปฏิบัติการต่อไป จากนั้นวัดอุณหภูมิอากาศ และความชื้นสัมพัทธ์ในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์วัดอุณหภูมิอากาศหน่วยเป็นองศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 เครื่อง



ภาพที่ 12 แสดงการเก็บตัวอย่างฝั้งพันธุ์บริเวณหน้าร้างฝั้ง

ก. การใช้สวิงเก็บตัวอย่างฝั้งที่บินอยู่หน้าร้าง

ข. ฝั้งตายหน้าร้าง ที่สันนิษฐานว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อโนซิมา

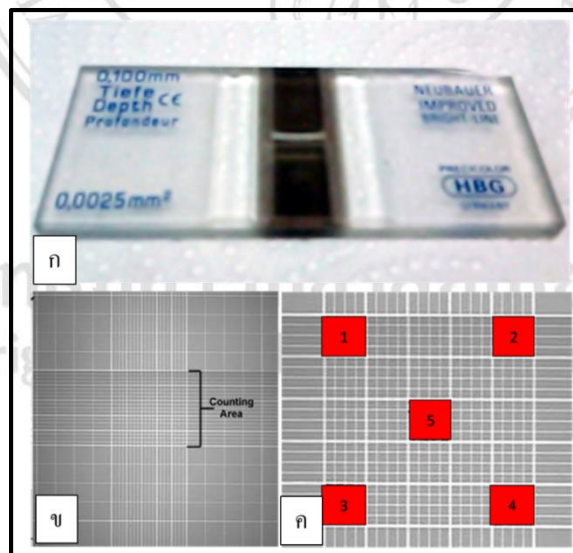
วิธีการที่ 2: ตรวจสอบสปอร์โนซิมา และการนับจำนวนสปอร์โนซิมาในผิ้วพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สู่มตัวอย่างสิ่งทีเก็บได้ จำนวน 5 ตัวต่อ 1 ตัวอย่างที่เก็บมาทำการผ่าตัดส่วนท้องเพื่อเอาลำไส้มาบดละเอียด ผสมด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง จากนั้นใช้ไมโครไปเปิดดูดูขึ้นแล้วหยดตัวอย่างลงสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ตรวจสอบสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์ เมื่อตรวจพบว่าตัวอย่างสิ่งมีชีวิตสปอร์ของโนซิมา ทำการนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Hemacytometer (ภาพที่ 13) โดยคำนวณจำนวนสปอร์ต่อสิ่ง 1 ตัว ดังนี้

$$\frac{\Sigma n}{5} \times 250,000 \text{ cell/ml}$$

หรือ $\frac{\Sigma n}{5} \times 2.5 \times 10^5 \text{ cell/ml}$

หมายเหตุ; Σn = ผลรวมของจำนวนสปอร์โนซิมาในตำแหน่งที่ใช้ับจำนวนสปอร์ทั้งหมด



ภาพที่ 13 Hemacytometer เครื่องมือเพื่อใช้นับจำนวนสปอร์โนซิมา

ก. Hemacytometer

ข. บริเวณที่ใช้นับจำนวนสปอร์โนซิมา

ค. ตำแหน่งที่ใช้นับจำนวนสปอร์โนซิมา

การวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผล

เมื่อได้ค่าต่าง ๆ ดังที่ได้จากการบันทึกข้อมูล นำข้อมูลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างอุณหภูมิ ความชื้นของสภาพแวดล้อมกับปริมาณสปอร์ที่ตรวจพบได้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อทราบถึงปริมาณสปอร์เฉลี่ยของโรคโนซิมาที่ถูกตรวจพบ กับค่าของอุณหภูมิเฉลี่ย และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยที่วัดได้ในวันที่เก็บตัวอย่าง และนำข้อมูลสภาพภูมิอากาศจากศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคเหนือ ย้อนหลัง 8 วัน เพื่อหาช่วงอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝนในการติดเชื้อของโรคโนซิมา จากนั้นเปรียบเทียบข้อมูลปริมาณสปอร์ในแต่ละพื้นที่โดยวิธีการทางสถิติ ด้วยโปรแกรม Statistix 8.0 ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3: ตรวจสอบดีเอ็นเอของ *Nosema* spp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

สำหรับตัวอย่างสิ่งที่ถูกตรวจพบสปอร์ที่คาดว่าจะเป็สปอร์ของเชื้อโนซิมาทั้งตัวอย่างสิ่งที่ใช้สวิงโอบ และตัวอย่างสิ่งที่ยาหยักรังที่พบสปอร์จะทำการสุ่ม ได้ดำเนินการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ขั้นตอนดังต่อไปนี้

การสกัด DNA

บดเนื้อเยื่อสิ่งให้ละเอียดโดยบดกับโกร่ง ใน 1 ตัวอย่างของเนื้อเยื่อผสมกับ TE Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที สารละลายแยกเป็นสองส่วน จากนั้นเทสารละลายส่วนของด้านบนออก ได้สารละลายใส เติม Cetyltrimethyl ammonium bromide buffer (CTAB buffer) ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงไป 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน และเติม Chloroform: Isopropanol (24:1) ในปริมาตร 800 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เกิดสารละลายแยกเป็นสองส่วน จากนั้นนำสารละลายที่ลอยอยู่ด้านบนย้ายลงหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม Chloroform: Isopropanol (24:1) 800 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ได้สารละลายแยกเป็นสองส่วน นำส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติม ethanol 100 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ลงไป 600 ไมโครลิตร แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายแยกเป็นสองส่วน นำสารละลายที่ลอยอยู่ด้านบนย้ายลง

หลอดใหม่ แล้วเติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ลงไป 600 ไมโครลิตร แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เกิดตะกอนดีเอ็นเออยู่ก้นหลอด จากนั้นเทสารละลายใสออกจากหลอด และเติม TE Buffer 50 ไมโครลิตร (ภาพที่ 14) ทำการเก็บดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป



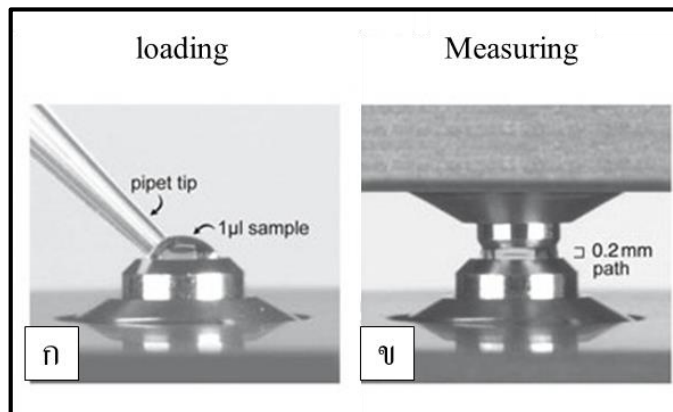
ภาพที่ 14 ผลผลิตดีเอ็นเอที่สกัดได้ เป็นตะกอนดีเอ็นเอพร้อมใส่ TE Buffer

การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดเพื่อเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 50 – 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง Nanodrop spectrophotometer micro volume sample retention system โดยดูดดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ลงเครื่อง (ภาพที่ 15) ในแต่ละ 1 ตัวอย่าง จากนั้นทำการทำความสะอาดด้วยกระดาษ Kim wipe จากนั้นเตรียมสารละลายดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

หมายเหตุ: M_1 = ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ก่อนเจือจาง
 V_1 = ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่าง ก่อนเจือจาง
 M_2 = ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการ
 V_2 = ปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการ



ภาพที่ 15 เครื่องวัดค่าปริมาณ ดีเอ็นเอ (Nanodrop spectrophotometer micro volume sample retention system)

- ก. แสดงการใช้ไมโครไปเปต หยดดีเอ็นเอตัวอย่างลงบน optical surface ในปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- ข. แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอถูกตรวจสอบโดย optical surface

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Multiplex PCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction)

ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงของโนซีมาทั้งสองชนิด โดย *N. ceranae* ถูกตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ 218 MITOC ซึ่งมีขนาด PCR product เท่ากับ 218-219 bp ส่วนไพรเมอร์ 321 APIS ใช้กับ *N. apis* มีขนาด PCR product เท่ากับ 321 bp (ตารางที่ 3) และนำไปเป็นสารผสมในปฏิกิริยาของ Multiplex PCR (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ 218 MITOC มีความจำเพาะเจาะจงกับ *N. ceranae* และไพรเมอร์ 321 APIS มีความจำเพาะเจาะจงกับ *N. apis* ถูกออกแบบมาจาก GenBank

Primer	Sequence	PCR product size (bp)	specificity
218 MITOC FOR	5'- <u>CGGCGACGATGTATTATGAAA</u> -ATATTTAA-3'	218-219	<i>N. ceranae</i>
218 MITOC REV	5'- <u>CCCGGTCATTCTCAAAA</u> -AACCG-3'		
321 APIS FOR	5'- <u>GGGGGCATATCTTTGACGTACTATGTA</u> -3'	321	<i>N. apis</i>
321 APIS REV	5'- <u>GGGGGGCGTTTAAATGTAAACAAACA</u> ACTAT-3'		

ตารางที่ 4 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Multiplex PCR ต่อ 1 ตัวอย่าง ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารประกอบ	ปริมาตร (μl)
10X Buffer NH_4SO_4	2
Primer MIT up	0.4
Primer MIT dw	0.4
Primer Api up	0.4
Primer Api dw	0.4
dNTP	0.5
MgCl_2	1.2
dH ₂ O	12.6
Tag (DNA polymerase)	0.1
DNA product	2
ปริมาตรรวม	20

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างแล้ว นำหลอด Multiplex PCR ที่เตรียมพร้อมเข้าเครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ Thermo cycler (ภาพที่ 16) กำหนดจำนวนรอบ อุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

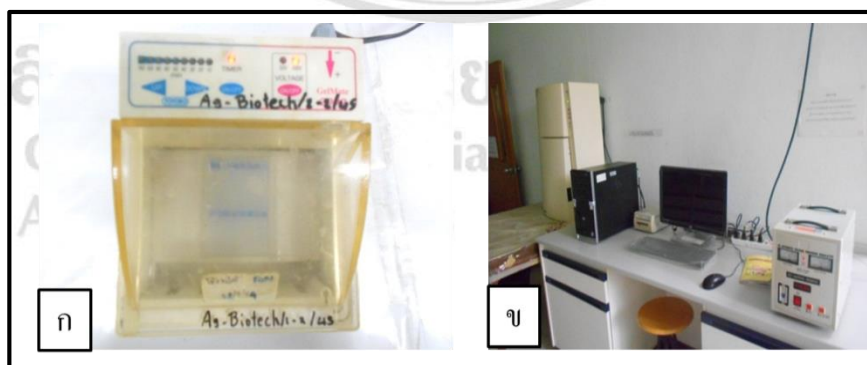
- | | | |
|--------------------------|---|----------|
| 1. Initial denaturation | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที | } 35 รอบ |
| 2. Template denaturation | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที | |
| Primer annealing | อุณหภูมิ 61.8 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที | |
| Extension | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที | |
| 3. Primer extension | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที | |



ภาพที่ 16 เครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ Thermo cycler

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยการหยดสี loading dye ลงบนแผ่น parafilm ใช้ไมโครปิเปตดูด PCR product กับ loading dye ในอัตราส่วน 6:2 ไมโครลิตร บรรจุลงในแผ่นเจล (agarose gel 1%) ที่เตรียมไว้ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นทำการเชื่อมต่อเครื่อง และตั้งค่าเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ที่กระแสไฟ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที โดยมีหลักการทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง จากขั้วบวกไปยังขั้วลบ จากนั้นบันทึกภาพขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง scanning gel electrophoresis images of DNA (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 แสดงการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และถ่ายภาพการปรากฏแถบดีเอ็นเอด้วย Gel documentation

ก. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส

ข. Scanning gel electrophoresis images of DNA