

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างและตรวจตัวอย่าง

- 1.1.1 กล้องโพรบใต้น้ำแข็งสำหรับแช่ปลา
- 1.1.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 1.1.3 ชุดเครื่องมือผ่าตัดและถาดผ่าตัด
- 1.1.4 อุปกรณ์เครื่องแก้ว (petri dish, stander dish, beaker)
- 1.1.5 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์
- 1.1.6 ขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็ก (vial)
- 1.1.7 ดินสอ ปากกา สมุดบันทึก
- 1.1.8 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น เข็มเย็บ หลอดหยด พู่กัน กระดาษเลเบล ถุงมือ
- 1.1.9 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope)
Model: Olympus Model SZ-ST (Japan)
- 1.1.10 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)
Model: Olympus CX31 และ Olympus DP20 Microscope Camera (Japan)

1.2 อุปกรณ์ถ่ายรูปและวาดรูป

- 1.2.1 อุปกรณ์วาดรูป Drawing tube, Olympus (Japan)
- 1.2.2 กระดาษลอกลาย Tracing paper (DHA Siam lava, Thailand)
- 1.2.3 ocular micrometer และ stage micrometer
- 1.2.4 กล้องถ่ายภาพ Digital

1.3 อุปกรณ์ในการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 1.3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope)
Model: Olympus Model SZ-ST (Japan)
- 1.3.2 กล้องถ่ายภาพอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

- Model: JEOL-JSM-5910LV (JEOL, Tokyo, Japan)
- 1.3.3 เครื่องทำแห้งตัวอย่างแบบวิกฤต (Critical point Dryer)
Model: Polaron Model CPD7501 (Japan)
- 1.3.4 เครื่อง Sputter Fine Coater
Model: SPI-MODULE (Japan)
- 1.3.5 แท่นทองเหลืองสำหรับติดตัวอย่าง (Stub)
- 1.3.6 เทปกาารับอน (Electron Microscopy Science, USA)
- 1.4 อุปกรณ์ในการศึกษาทางอนุชีววิทยา
- 1.4.1 Microcentrifuge Tube ขนาด 0.5 และ 1.5 ml และ tip ขนาดต่างๆ
- 1.4.2 ไมโครปิเปต (Micropipettes) หรือ ออโต้ปิเปต (Autopipettes)
- 1.4.3 เครื่องเขย่า (Vortex)
- 1.4.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 1.4.5 เครื่องขังสาร
- 1.4.6 Hot Plate Stirrer
- 1.4.7 Heating Block Incubator
- 1.4.8 Thermal Cycler machine
- 1.4.9 Electrophoresis Set
- 1.4.10 Ultraviolet-visible Transilluminator
- 1.4.11 Gel Documentation
- 1.4.12 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- 1.4.13 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)
Model : Perkin Elmer Geneamp PCR 2400 System
- 1.4.14 ตู้เย็น (4°C) และตู้แช่ (-20°C)
- 1.4.15 pH meter
- 1.4.16 เตาไมโครเวฟ
- 1.4.17 กล้องถ่ายรูปต่อเข้ากับอุปกรณ์คอมพิวเตอร์สำหรับถ่ายรูปเจล
Model : Kodak Gel Logic-100

สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร

- 2.1.1 Haematoxyline (Reidel-de Haen, Germany)
- 2.1.2 Formalin (TOA Co. Ltd., Thailand)
- 2.1.3 Ethyl alcohol (Chemical Science, Thailand)
- 2.1.4 Buthanol (LABSCAN, Thailand)
- 2.1.5 Xylene (LABSCAN, Thailand)
- 2.1.6 Hydrochloric acid (LABSCAN, Thailand)
- 2.1.7 Permout (Fisher ChemAlert® Guide, USA.)

2.2 สารเคมีในการศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

- 2.2.1 2.5% Glutaraldehyde (Sigma, Germany)
- 2.2.2 1% Osmium tetroxide (Sigma, Germany)
- 2.2.3 0.1M Phosphate buffer (pH 7.3) (Sigma, Germany)
- 2.2.4 Acetone (Scharlau Chemis S.A., European Union)
- 2.2.5 0.2M Sodium phosphate monobasic buffer (Vivantis Inc., USA)
- 2.2.6 0.2M Sodium phosphate dibasic buffer (Vivantis Inc., USA)

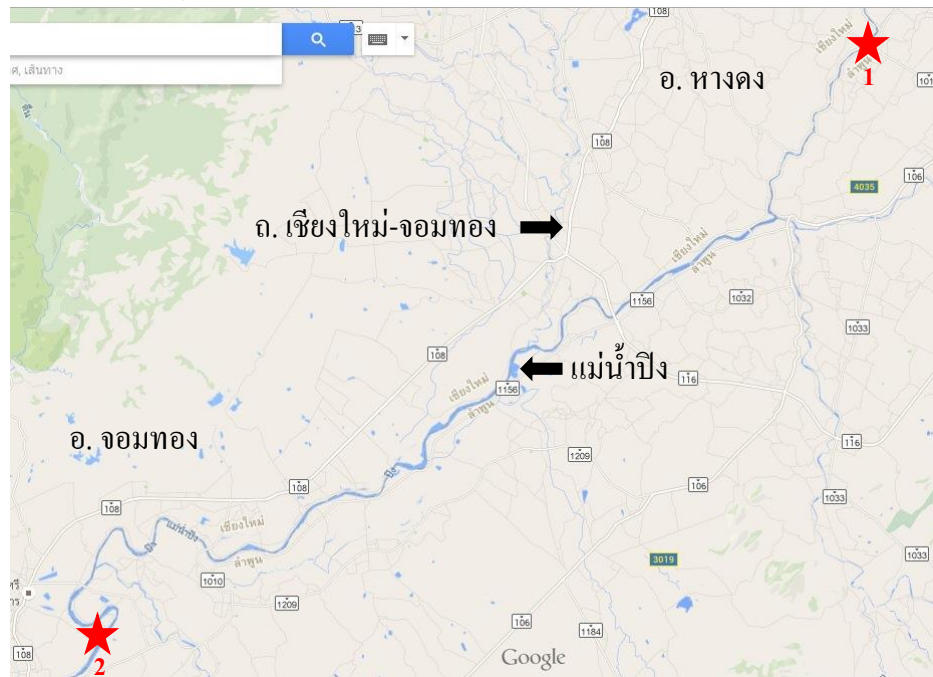
2.3 สารเคมีที่ใช้ในงานทางด้านอนุชีววิทยา

- 2.3.1 10X PCR buffer
- 2.3.2 TBE buffer
- 2.3.3 Agarose (Vivantis Inc., Malaysia)
- 2.3.4 Chelex®
- 2.3.5 Protenase K (Vivantis Inc., Malaysia)
- 2.3.6 *Tag* DNA polymerase
- 2.3.7 Ethidium bromide
- 2.3.8 Magnesium chloride (MgCl₂) (Vivantis Inc., USA)
- 2.3.9 Primer (Operon Technologies, USA)
- 2.3.10 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (Vivantis Inc., USA)

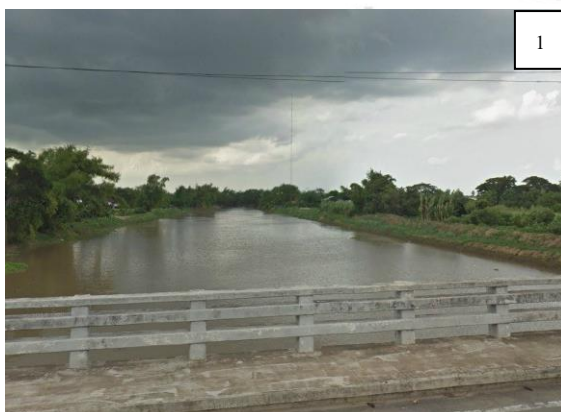
วิธีการวิจัย

1. จุดเก็บตัวอย่าง

- จุดที่ 1 หมู่บ้านท่ามาก ต.หนองตอง อ.หางดง จ.เชียงใหม่
(N18.599426, E98.965605)
- จุดที่ 2 หมู่บ้านท่าหลุก ต.สบเตี๊ยะ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่
(N18.404273, E98.702156)



ภาพ 6 แสดงแผนที่จุดเก็บตัวอย่าง



ภาพ 7 ตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่าง

1) สะพานศรีวิชัยอนุสรณ์ 2) ตลาดหมู่บ้านท่าหลุก

2. การสำรวจและการเก็บตัวอย่าง

2.1 เก็บตัวอย่างปลาจากตลาดขายปลาน้ำจืด โดยสุ่มซื้อปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) จำนวน 110 ตัว จากหมู่บ้านท่าหลุก ต.สบเตี๊ยะ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ และปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) จำนวน 92 ตัว จากหมู่บ้านท่ามาก ต.หนองตอง อ.หางดง จ.เชียงใหม่

2.2 นำปลามาจัดจำแนกชนิด และตรวจหาหนอนพยาธิจากเกล็ด ครีบอก ครีบท้อง ครีบทหาง เหงือก ตา ช่องปาก กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร และอวัยวะภายในต่างๆ โดยการแยกอวัยวะแต่ละส่วนใส่ลงใน Petri dish ที่มี NaCl 0.85% และทำการตรวจหาหนอนพยาธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ รวบรวมหนอนพยาธิที่พบแล้วนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3 นำข้อมูลของพยาธิที่พบมาคำนวณหาค่าความชุก (prevalence) และค่าความหนาแน่น (intensity) ตามวิธีการของ Margolis *et al.*, 1982

3. การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา โดยแบ่งการศึกษออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

3.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope: LM) สำหรับการทำสไลด์ถาวร (Permanent slide)

3.1.1 นำหนอนพยาธิที่ได้มาทำความสะอาด นำหนอนพยาธิไปรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วย 5% ฟอर्मาลีน

3.1.2 ย้อมสี Haematoxylin

3.1.3 Dehydrate ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, absolute buthanol)

3.1.4 ทำตัวอย่างหนอนพยาธิให้ใสด้วย Xylene และ Mount ด้วย Permount

3.1.5 วาดรูปตัวอย่างหนอนพยาธิและอธิบายส่วนต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและ Drawing tube



ภาพ 8 ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*)



ภาพ 9 ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*)

3.2 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

- 3.2.1 นำพยาธิที่ต้องการศึกษามาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จนกระทั่งเศษตะกอนต่างๆ หลุดออกไปหมด หลังจากนั้นทำการรักษาสภาพ (pre-fixed) ด้วย 2.5% Glutaraldehyde นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1M อีกครั้งเป็นเวลา 15 นาที
- 3.2.2 นำหอนพยาธิที่ทำการล้างเรียบร้อยแล้วมาทำรักษาสภาพ (post-fixed) อีกครั้งด้วยสารละลาย 1% Osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3.2.3 เมื่อครบกำหนด ล้างตะกอนให้หมดอีกครั้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1M ทั้งหมด 3 ครั้งเป็นเวลา 20 นาที
- 3.2.4 Dehydrate ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, absolute ethanol) ขึ้นตอนละ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วเก็บไว้ใน Acetone
- 3.2.5 นำพยาธิที่ได้จากกระบวนการข้างต้นไปผ่านกระบวนการทำให้แห้ง ด้วยวิธีการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤติ โดยใช้เครื่อง Critical Point Dryer (CPD) คือการนำ acetone ออกโดยการนำ CO₂ เข้าแทนที่
- 3.2.6 นำตัวอย่างหอนพยาธิที่ได้ไปติดบนแท่นทองเหลืองสำหรับติดตัวอย่าง (Stub) ด้วยคาร์บอนเทป
- 3.2.7 นำไปฉาบพื้นผิวตัวอย่างด้วยทองคำ (gold-coated) ด้วยเครื่อง Sputter Fine Coater
- 3.2.8 ศึกษารายละเอียดพื้นผิวและลักษณะโครงสร้างภายนอก เพื่อดูลักษณะสำคัญที่ให้รายละเอียดเพิ่มเติมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ที่กำลังขยายต่างๆ

4. การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

4.1 นำตัวอย่างหนองพยาธิที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Chelex®

โดยนำหนองพยาธิใส่ลงใน micro centrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติมแวนอลอย 5% Chelex 150 ไมโครลิตร และ Proteinase K 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 รอบ จากนั้นดูดสารละลายใสด้านบน (supernatant) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาไม่ให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเตรียมสำหรับขั้นตอนการทำ PCR

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction: PCR) ของตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) โดยใช้ไพรเมอร์มาตรฐานของตำแหน่งนี้ คือ forward 3S (5'-GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3') และ reverse BD2 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3')

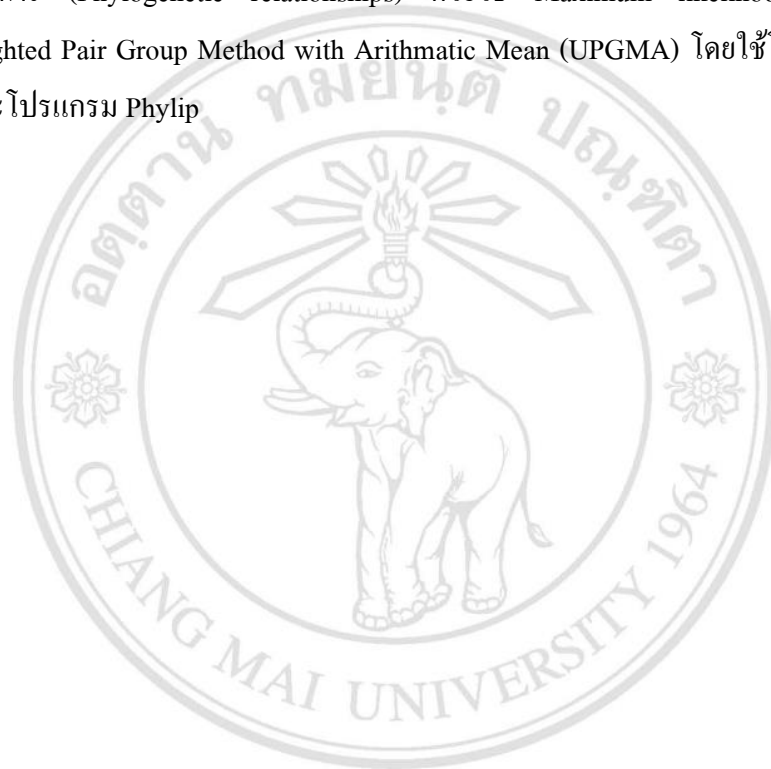
เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	2	1
Denaturation	94	1	39
Primer annealing	57	1	
Primer extension	72	1	
Final extension	72	10	1

4.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) โดย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.4% agarose ในสารละลาย 1X TBE โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการตรวจสอบผสมกับ loading dye ให้เข้ากัน จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆ หยดลงในแต่ละช่องของ 1.4% agarose ที่เตรียมไว้ แล้วให้กระแสไฟวิ่งด้วยศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/ml นาน 15 นาที จากนั้น destain ด้วยน้ำกลั่น 10 นาที

4.4 นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอของ PCR product บริเวณตำแหน่ง ITS2 ด้วย UV transilluminator

- 4.5 นำ PCR product ที่ได้ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท Integrated DNA Technologies ประเทศสิงคโปร์
- 4.6 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)
- 4.5 เมื่อรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด นำมาทำ Multiple Alignment เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit 5.0.6 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationships) ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) และ Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม Mega 6.0 และโปรแกรม Phylip



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved