

บทที่ 3

วิธีทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างหอยลาย (*Paphia undulata*) หอยนางรม (*Saccostrea* sp.) หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) หอยแครง (*Anadara granosa*) และหอยตลับขาว (*Meretrix casta*) จาก จังหวัดชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือนกันยายน พ.ศ.2554 ชนิดละ 40 ตัว

1.2 นำหอยตัวอย่างมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนักพร้อมเปลือกและน้ำหนักตัว เพื่อจดบันทึก

2. การตรวจหาปรสิต *Perkinsus* sp. โดยวิธี Quantitative method (Wilson-Ormond, Powell, Choi & Song, 1993)

2.1 แกะหอยลาย หอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยแครงทั้งตัวจำนวน 30 ตัว/ชนิด มา บ่ม

ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM) พร้อม Streptomycin 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Penicillin 500 ยูนิต/มิลลิลิตร บ่มในที่มืด ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

2.2 นำหอยทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านการบ่มในอาหาร RFTM แล้ว มาขยด้วย 2 M NaOH ที่ อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3 นำตัวอย่างหอยทั้ง 4 ชนิด ที่ขยแล้วมาปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 x g เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำส่วนบนทิ้ง เติมน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเท่าเดิม เพื่อล้าง NaOH ออกให้หมด ทำซ้ำจำนวน 3 รอบ

2.4 เติมน้ำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อทำการนับต่อไป

2.5 สุ่มตัวอย่างที่ได้ 100 ไมโครลิตร ย้อมด้วย Lugol's iodine 100 ไมโครลิตร เพื่อนับ จำนวน hypnospore ของ *Perkinsus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ครั้ง จดบันทึก แล้ว นำมาหาค่าเฉลี่ย (Wilson-Ormond et al., 1993; Almeida et al., 1999)

3. การเจาะเลือดหอย

3.1 ทำการเจาะเลือดหอยทั้ง 5 ชนิด ตัวที่ 1- 15 โดยเจาะผ่านกล้ามเนื้อยึดเปลือกไปที่ หัวใจเพื่อทำการดูเลือด (hemolymph) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ที่ อุณหภูมิ 4 °C

3.2 นับเม็ดเลือดหอย (hemocyte) ทั้ง 5 ชนิด ตัวที่ 1-5 ด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด (hematocytometer) ตัวละ 3 ครั้ง หลังจากดูดเลือดแล้วทันที จดบันทึก เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.3 นำเลือดที่เหลือ ตัวที่ 6-15 ไปทดสอบระบบภูมิคุ้มกันแบบอื่นๆ ได้แก่ เลคตินในน้ำเลือดและตรวจหาปริมาณไลโซไซม์

4. การวิเคราะห์ปริมาณเลคตินในน้ำเลือดหอยโดยทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม (Haemagglutination test)

4.1 การเตรียม 2% เม็ดเลือดแดง

นำเลือดใส่ลงในหลอดเหียงที่มีขีดบอกปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมน้ำสะอาดละลายไซโตคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหียงหนีศูนย์กลาง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทน้ำเลือดส่วนบนทิ้ง ล้างเม็ดเลือดโดยเติมน้ำสะอาดละลายไซโตคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 30 มิลลิลิตร ลงในตะกอน คน และหมุนเหียง ล้างเม็ดเลือดดังนี้ 3 ครั้ง และครั้งสุดท้ายอ่านปริมาตรของเม็ดเลือดที่ได้ เติมน้ำสะอาดละลายไซโตคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงเป็น 3 เปอร์เซ็นต์

อ่านปริมาตรเม็ดเลือดแดงหลังการล้างครั้งสุดท้ายได้ปริมาตรเป็น 3.0 มิลลิลิตร ต้องเติมน้ำสะอาดละลายไซโตคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์จนได้ปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร

4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม

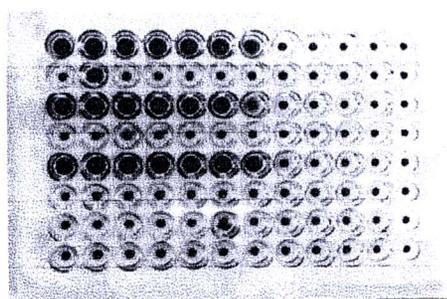
ทำการวิเคราะห์ในแผ่นไมโครไตเตอร์ (microtiter plate) ชนิด 8X12 หลุม ลักษณะ

กัน
 หลุมเป็นรูปตัวยู มีความจุหลุมละ 300 ไมโครลิตร โดยเติมน้ำเกลือ 0.85% NaCl ลงไปทุกหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปิเปิดน้ำเลือดหอยปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุมที่หนึ่ง ปิเปิดสารละลายจากหลุมที่หนึ่งมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สอง ปิเปิดสารละลายในหลุมที่สองขึ้นมา 50 ไมโครลิตร ผสมในหลุมที่สาม ทำดังนี้เป็นลำดับตั้งแต่หลุมบนซ้ายไปขวา (A1 ถึง B12) และจากบนลงล่าง สรุปรูปแบบนี้ทุกหลุมมีเลคตินที่เจือจางต่างกัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวน 24 หลุม จากนั้นเติม 3% เม็ดเลือดแดงลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดสอบดังนี้ 3 ชุด แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงสังเกตการณ์เกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง และบันทึกผล หลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็น สีแดงกองรวมเป็นจุดเล็ก ๆ อยู่กลางก้นหลุม และนับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน

4.3 การคำนวณปริมาณเลคติน

ทดสอบความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มหาปริมาณเลคติน อย่างคร่าวๆ ได้จากค่าการเจือจางมากที่สุดที่เลคตินยังสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มมีค่าเป็น 2^n เมื่อ n คือ จำนวนหลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม ตัวอย่างเช่น จากรูป 3.1 สารตัวอย่างสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มถึงหลุมที่ 7 จึงมีปริมาณเลคตินเท่ากับ 2^7 หรือเท่ากับ 128 ไตเตอร์ต่อปริมาตรสิ่งสกัด 50 ไมโครลิตร หรือ 2,560 ไตเตอร์/มิลลิลิตร และคำนวณหาค่า specific activity ของเลคตินได้จากสมการ

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{ปริมาณเลคติน (ไตเตอร์/มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}$$



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างการทดสอบความสามารถของสิ่งสกัดในการทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่ม การทดสอบทำ 3 ชุด ชุดละ 24 หลุม (1A-12B, 1C-12D และ 1E-12F) และชุดควบคุม ได้แก่ 1G-12H

โดยหลุมที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงแผ่กระจายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ที่ก้นหลุม ส่วนหลุมที่เม็ดเลือดแดงไม่เกาะกลุ่มจะเห็นสีแดงรวมกันเป็นจุดเล็กๆ อยู่ตรงกลางก้นหลุม และนับจำนวนหลุมทั้งหมดที่เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน

5. การตรวจหาปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอย

5.1 อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ lysozyme

Lysozyme from Hen egg white (EC.3.2.1.17), Sigma USA

Micrococcus luteus

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA)

5.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ lysozyme

- เตรียม 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Hen egg white lysozyme (HEWL) ซึ่ง Hen egg white lysozyme 0.001 กรัม ละลายใน 0.05 M PBS pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
 - เตรียม 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 990 ไมโครลิตร
 - เตรียม 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 980 ไมโครลิตร
 - เตรียม 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 970 ไมโครลิตร
 - เตรียม 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 960 ไมโครลิตร
 - เตรียม 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 950 ไมโครลิตร
 - เตรียม 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 920 ไมโครลิตร
 - เตรียม 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 900 ไมโครลิตร
 - เตรียม 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 850 ไมโครลิตร
 - เตรียม 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร HEWL ดูด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร HEW ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม 0.05 M PBS 800 ไมโครลิตร

5.3 การวัดปริมาณไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยลาย (Determination of lysozyme activity)

- เตรียมเชื้อ *M. luteus* วัดความเข้มข้นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตรได้ค่าการดูดกลืนแสง = 0.04 เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ
- นำเชื้อที่ได้ swop ลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ทิ้งไว้ 15 นาที
- เจาะหลุมขนาด 5 มิลลิเมตร plate ละ 4 หลุม

- ปิเปต lysozyme จาก hen white egg ที่เตรียมได้ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในข้อ 5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ ในแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ ป่มไว้ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (clear zone) เป็นมิลลิเมตรหรือเซนติเมตร นำข้อมูล inhibition zone เขียน กราฟระหว่างปริมาณของไลโซไซม์กับเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ใช้เป็นกราฟ มาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก

- การตรวจหาไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยใช้น้ำเลือดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารแข็ง TSA ป่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดขนาด inhibition zone เป็นเซนติเมตร หาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานได้เป็นปริมาณของไลโซไซม์ในน้ำเลือดหอยหลาย

6. การตรวจหาเชื้อ Perkinsus โดยวิธี immunohistochemistry

1. ขั้นตอนการเตรียม Perkinsus
2. ขั้นตอนการเตรียมแอนติบอดีต่อ เชื้อ Perkinsus
3. ทดสอบหาระดับแอนติบอดี (titer screening) ด้วยวิธี dot-ELISA

แล้วตรวจผลการทดสอบโดยบริเวณที่แอนติบอดีจับกับเชื้อ perkinsus บนกระดาษจะมี ลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล