บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร และวาดรูป
   - 1.1 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus System Compound microscope : Model BHA) พร้อมอุปกรณ์ถ่ายรูป อุปกรณ์วาดรูป (Drawing tube) รวมทั้ง ocular และ stage micrometer
   - 1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope : Olympus System, Model XTR)
   - 1.3 กระจกสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
   - 1.4 แผ่นความร้อนสำหรับวางสไลด์ (slide warmmer)
   - 1.5 อุปกรณ์เครื่องแก้ว : Petri-dish, beaker, dropper, Stender-dish, staining jar
   - 1.6 เครื่องมืออื่นๆ เช่น ถุงมือ เข็มเขี่ย หน้ากาก พู่กัน ถุงพลาสติก กระดาษเลเบล กระดาษชำระ ปากกา ฯลฯ
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยด้านอณูชีววิทยา
   - 2.1 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (BIO-RAD : My Cycler™ Thermal Cycler)
   - 2.2 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
   - 2.3 โกร่งบดตัวอย่าง
   - 2.4 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
   - 2.5 เครื่องทำความเย็น (ตู้เย็น 4 $^{\circ}$C และตู้แช่ -20 $^{\circ}$C)
   - 2.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath : Julabo Model Eco TemTW20)
   - 2.7 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixer) ยี่ห้อ Seoulin รุ่น MyLab Combispin SLFVL-2400
   - 2.8 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด 3 ตำแหน่ง (OHAUS : Adventurer™)
   - 2.9 เตาไมโครเวฟ
   - 2.10 ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซิส แบบแนวนอน (BIO-RAD)
   - 2.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) บริษัท BIO-RAD
   - 2.12 Adjustable automatic pipettes
   - 2.13 Eppendorf tube
   - 2.14 Tip ขนาดต่างๆ

2.15 PCR tube

2.16 เครื่องถ่ายรูปเจล (Kodak Digital Science ID Image Analysis System with a DC 100 camera)

2.17 เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ฯลฯ

3. วัสดุอื่น ๆ เช่น ถุงมือ คีมคีบ ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร พลาสติกใสอย่างบาง ถุงพลาสติก ถาดพลาสติก กระดาษ ฯลฯ

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร

1.1 Ethyl alcohol 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 85% และ 95%

1.2 Formalin 10%

1.3 Buthyl alcohol

1.4 Xylene

1.5 Permount

1.6 สีย้อมชนิดต่างๆ (Borax Carmine และ Haematoxyline)

1.7 NaCl

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านอณูชีววิทยา

2.1 Agarose (Vivantis, Malaysia)

2.2 Deionized H_2O

2.3 GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia)

2.4 Ethidium Bromide

2.5 Ethyl alcohol

2.6 Isopropanol

2.7 Liquid nitrogen

2.8 Loading dye

2.9 Magnesium chloride

2.10 Arbitary primers (Operon Technology, USA)

2.11 *Taq* polymerase (Vivantis, Malaysia)

2.12 TBE buffer

วัสดุอุปกรณ์ในการศึกษาทางด้านระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์ (GIS)

1. GPS, Garmin etex venture
2. คอมพิวเตอร์
3. ArcGis Desktop ver. 9.3 software

วิธีการศึกษา

1. ลงพื้นที่สำรวจจุดเก็บตัวอย่างเก็บข้อมูลเบื้องต้นติดต่อประสานงานกับโรงฆ่าสัตว์ในบางพื้นที่ของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน เพื่อขอความร่วมมือในการทำวิจัย เช่น สอบถามแหล่งที่มาของสัตว์ เพื่อประโยชน์ในการเก็บตัวอย่างโฮสต์กึ่งกลาง

2. ศึกษาระบาดวิทยาของพยาธิใบไม้ตับขนาดใหญ่ *F. gigantica* และพยาธิใบไม้กระเพาะผ้าขี้ริ้วในวัว และควาย โดยสำรวจทั้งด้านความหลากหลายของชนิด และค่าความชุก (prevalence) ของการติดพยาธิ สำหรับการจัดจำแนกพยาธิกระเพาะผ้าขี้ริ้วใช้หลักการจัดจำแนกตาม Eduardo (1982; 1983; 1984; 1985) และรวบรวมข้อมูลด้านระบาดวิทยาเพื่อนำมาวิเคราะห์ผลการทดอง ขณะเดียวกันนำข้อมูลที่ได้สร้างเป็นแผนที่การระบาดของพยาธิโดยใช้โปรแกรม ArcGiS ver. 9.3

3. การศึกษาทางอณูชีววิทยา

3.1 นำตัวอย่างพยาธิที่รวบรวมไว้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Tissue DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการทำ PCR ดีเอ็นเอที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °C เพื่อรักษาไม่ให้ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ

3.2 การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD (Anuntalabhochai *et al.*, 2000) โดยในการวิจัยครั้งนี้ใช้ arbitary primers ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology, USA จำนวน 19 primers ได้แก่ OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-06, OPA-07, OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPN-02, OPN-03, OPN-04, OPN-05, OPN-06, OPN-07, OPN-08, OPN-09, OPN-10 และ OPP-11 โดยมีองค์ประกอบ และเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

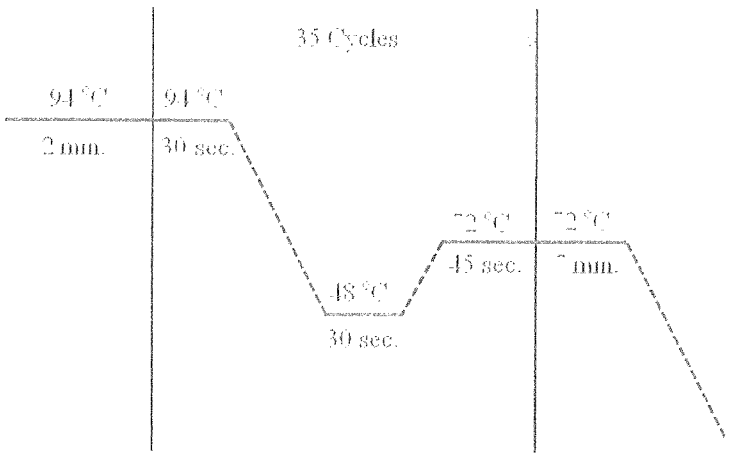
(1) ในปฏิกิริยา PCR แต่ละครั้งจะมีปริมาตรของสารละลายรวมทั้งหมด 20 µl โดยมีองค์ประกอบดังนี้

Buffer	2.0 µl
$MgCl_2$	0.6 µl
dNTP	0.4 µl

Primer	1.0 µl
DNA template	1.0 µl
Taq polymerase	0.3 µl
dH_2O	14.7 µl

(2) เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดสภาวะต่างๆ ดังนี้ (ภาพ 1)

Initial denaturation	94 °C 2 นาที
Denatulation	94 °C 30 วินาที
Primer annealing	48 °C 30 วินาที
Extention	72 °C 45 นาที
จำนวน 35 รอบ	
Final extention	72 °C 7 นาที



ภาพ 1 สภาวะต่าง ๆ ในปฏิกิริยา PCR

3.3 การทำ agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.4% agarose ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 35 นาที จากนั้นนำ gel ที่ได้ ย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นเวลา 10 นาที แล้ว destain ด้วยน้ำกลั่นอีก 10 นาที

3.4 ตรวจสอบ gel ด้วย UV- transilluminator พร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล Kodak Gel LOGIC 100

3.5 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ plasmid vector (Ligation) ในปฏิกิริยา ligation ใช้ pGEM®-T Easy vector (Promega, USA) ซึ่งมีส่วนผสมในปฏิกิริยาดังนี้

2X ligation buffer	5 µl

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

pGEM®-T Easy vector	1 µl
PCR product	1 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µl

ปรับปริมาตรด้วยน้ำ Nuclease-Free Water ให้ได้ปริมาตร 10 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.6 กระบวนการ transformation ด้วยวิธี Electroporator

(1) นำพลาสมิดลูกผสมจากกระบวนการ ligation มา desalt โดยใช้ Nitro-Cellulose membrane เป็นเวลา 30 นาที

(2) นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ desalt เรียบร้อยแล้วผสมกับ competent cell ทิ้งไว้ 15 นาที ในน้ำแข็ง

(3) นำพลาสมิดลูกผสมกับ competent cell จากข้อ 2 มาใส่เข้าไปใน cuvette ที่แช่ในอุณหภูมิ -20°C

(4) นำ cuvette ใส่ลงในเครื่อง Electrophorator จากนั้น transformation ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า 1.8 kV.

(5) นำสารละลายทั้งหมดใน cuvette ดูดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตร 1 ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

(6) นำมา spread plate ในอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของ ampicillin, X-gal และ IPTG

3.7 การเตรียม plasmid DNA จากเชื้อ *E.coli* โดยใช้ชุดสกัด PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA)

(1) เลือกโคโลนีสีขาวของ *E.coli* ที่เจริญบนอาหาร LB agar ที่มีส่วนผสมของ ampicillin 100 µg/ml, X-gal 80 µg/ml และ IPTG 0.5 mM มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 6 ml ที่มีส่วนผสมของ ampicilin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยใช้ไม้จิ้มฟันแตะบนโคโลนีสีขาวของ *E.coli* จากนั้นนำไม้จิ้มฟันใส่ลงในอาหาร LB broth ที่เตรียมไว้ นำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นระยะเวลา 1 คืน

(2) ถ่ายเชื้อลงใน centrifuge tube ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 1.5 ml ปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ทิ้ง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 20 เม.ย. 2555
เลขทะเบียน 245265
เลขเรียกหนังสือ

(3) เติมสารละลาย TE buffer ปริมาณ 600 µl ละลายเซลล์ที่ตกตะกอนให้อยู่ในลักษณะของเซลล์แขวนลอย

(4) เติมสารละลาย Lysis buffer ปริมาณ 300 µl ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการพลิกกลับไปกลับมา

(5) เติมสารละลาย Neutralization solution ที่แช่เย็น (4–8 °C) ปริมาณ 350 µl ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการพลิกกลับไปกลับมา แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที

(6) นำสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ปริมาณ 900 µl มาใส่ในPureYield™ Minicolumn ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาที

(7) เติม Endotoxin Removal Wash (ERB) ปริมาณ 200 µl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาที เทสารละลายทิ้ง

(8) เติม Column Wash Solution (CWC) ปริมาณ 400 µl ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง

(9) ละลายดีเอ็นเอที่ติดกับ membrane ของ column ด้วย Elution buffer หรือ DNase-free water ปริมาณ 30 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยการตัดด้วย restriction enzyme เช่น *Eco*RI ในขั้นตอนต่อไป

3.8 การตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

(1) เตรียมปฏิกิริยาในแต่ละหลอดจำนวน 20 µl ซึ่งประกอบด้วย

Plasmid	1 µl
*Eco*RI	2 µl
Buffer	5 µl
dH_2O	12 µl

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(3) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย agarose gel electrophoresis

3.9 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ส่งตัวอย่าง plasmid ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัทไบโอดีไซด์ จังหวัดปทุมธานี

3.10 การออกแบบ primer (primers designing) หลังจากได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพยาธิ *F. gigantica* แล้ว จากนั้นทำการออกแบบ

ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) ทั้ง forward และ reverse primers โดยใช้โปรแกรม Genetyx–MAC. Ver. 11

3.11 ทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงของ specific primers (specificity test) โดยการนำ specific primers มาทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของพยาธิที่สำรวจพบทั้งหมด โดยการทำ PCR

3.12 ทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจสอบของ specific primers (sensitivity test) โดยการทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของพยาธิ *F. gigantica* ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

3.13 นำ specific primer ที่ได้ มาตรวจสอบการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวอ่อนในหอย เพื่อหาชนิดของหอยที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อพยาธิแต่ละชนิด

3.14 วิเคราะห์ผลการวิจัย สรุปผล

3.15 เผยแพร่ผลงานวิจัยแก่ชุมชน ในพื้นที่ที่มีการระบาด