สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

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 ^{o}C และตู้แช่ -20 ^{o}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 Arbitrary 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. สำรวจจุดเก็บตัวอย่าง

ลงพื้นที่สำรวจจุดเก็บตัวอย่างเก็บข้อมูลเบื้องต้น และกำหนดจุดเก็บตัวอย่าง ติดต่อประสานงานกับชาวบ้านในพื้นที่ในลุ่มแม่น้ำปิงตอนบน เพื่อขอความร่วมมือในการทำวิจัย เช่น สอบถามแหล่งจับปลา และหอย เพื่อประโยชน์ในการเก็บตัวอย่างโฮสต์กึ่งกลาง

2. การศึกษาทางด้านการระบาด และความหลากหลายของพยาธิในหอยและปลา

2.1 เก็บตัวอย่างหอยในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งวัดพิกัดจุดเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการระบาดของพยาธิโดยทุบตัวอย่างหอยให้แตก ใช้เข็มเขี่ยฉีกเนื้อหอยให้แยกออกจากกันเพื่อให้ตัวอ่อนพยาธิระยะเซอร์คาเรียหลุดออกมา นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo จากนั้นนับจำนวน และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความชุก (%prevalence) และค่าความหนาแน่น (intensity) ของพยาธิที่พบ

2.2 เก็บตัวอย่างปลาในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งวัดพิกัดจุดเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบการระบาดของตัวอ่อนระยะเมตาเซอร์คาเรีย โดยนำปลาที่ได้แต่ละตัวมาปั่นให้ละเอียด รวมกับสารละลาย pepsin 1% แล้วนำไป incubate ใน water bath shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองด้วย sieve mesh ขนาดต่างๆ เพื่อแยกเอากากและเศษของเนื้อปลาที่ย่อยไม่หมดออก ล้างด้วยสารละลาย NaCl 0.85 % จนใสแล้ว นำไปตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo จากนั้นนับจำนวนเมตาเซอร์คาเรีย และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าความชุก (%prevalence) และค่าความหนาแน่น (intensity) ของพยาธิที่พบ

3. การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาของพยาธิ

นำตัวอย่างพยาธิที่สำรวจพบในหอย และปลา มาทำ permanent slides เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา โดยคงสภาพด้วยฟอร์มาลิน 5% ย้อมสีด้วย Haematoxylene / Borax carmine ดึงน้ำออกโดยใช้ grading alcohols ทำให้ใสโดย xylene แล้ว mount ด้วย permount จากนั้นนำ permanent slide ที่ได้มาถ่ายรูป วาดภาพ และวัดขนาด เพื่อประกอบการการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน

4. การศึกษาทางอณูชีววิทยา

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

4.2 ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิที่สำรวจพบด้วยเทคนิค inter-simple sequence repeats, ISSR) โดยใช้ ISSR primers โดยการนำดีเอ็นเอของพยาธิพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ที่สำรวจพบมาเพิ่มปริมาณโดยกระบวนการ PCR ร่วมกับ ISSR primers จำนวน 10 primers โดยใช้ My Cycler^{R} Thermocycler (Bio-Rad) ซึ่งมีองค์ประกอบ 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

จากนั้น นำ PCR products ที่ได้มาทำ 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 และตรวจสอบ gel ด้วย UV- transilluminator พร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล Kodak

Gel LOGIC 100 และนำแถบ DNA ที่ได้จาก primer ทั้งหมดมานับจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้น แล้วนำไปแทนค่าข้อมูลให้เป็นระบบตัวเลขมาตรฐาน (0,1) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้โปรกแรม Clustal w

4.3 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS-2 และ COX1 gene ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae โดยการนำดีเอ็นเอของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ที่สำรวจพบมาเพิ่มปริมาณโดยกระบวนการ PCR ร่วมกับการใช้ ITS-2 และ COX1 primer 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	65 °C	30 วินาที
Extention	72 °C	45 นาที
จำนวน 35 รอบ		
Final extention	72 °C	7 นาที

จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ ITS-2 และ COX I gene แล้วแยกแถบดีเอ็นเอออกมา ทำให้บริสุทธิ์ (Eluted and Purified) และนำ PCR product ที่ได้ นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic relationships) โดยใช้โปรกแรม Clustal w

4.4 การตรวจสอบชนิดของพยาธิที่สำรวจพบด้วยไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primers) นำ specific primers ของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae ที่ได้ออกแบบจาก

กระบวนการ HAT-RAPD PCR มาตรวจสอบการติดพยาธิในปลา และหอยซึ่งเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิใบไม้วงศ์ Heterophyidae

5. การศึกษาการระบาดเชิงพื้นที่โดยใช้ระบบสารสนเทศทางภูมิศาสตร์

นำข้อมูลค่าความชุกของพยาธิทั้งในหอย และปลามาจัดทำแผนที่การระบาดโดยใช้โปรแกรม ArcGIS Desktop version 9.3 ของบริษัท ESRI, CO,Ltd และวิเคราะห์แนวโน้มการระบาดของพยาธิในพื้นที่สำรวจ

6. เผยแพร่ข้อมูลการวิจัยที่ได้สู่ชุมชน

รวบรวมข้อมูลการระบาดของพยาธิในพื้นที่ลุ่มน้ำปิงตอนบน เผยแพร่ข้อมูลสู่ชุมชนในเขตพื้นที่มีการการระบาดของพยาธิอย่างรุนแรง โดยการบรรยายให้ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพยาธิชนิดต่างๆ เช่น การก่อให้เกิดโรค การรักษา และการป้องกัน พร้อมทั้งแจกแบบสอบถาม เพื่อศึกษาบริบทชุมชน และพฤติกรรมต่างๆ ของชาวบ้าน

7. สรุปผลและวิเคราะห์ผลการวิจัย