

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

#### อุปกรณ์การทดลอง

##### 1. ตัวอย่างพยาธิ

เก็บพยาธิใบไม้ในกระเพาะปลาจิ้งรีวโค จากโรงฆ่าสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

##### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

###### 2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรและ sagittal section

2.1.1 กล้องจุลทรรศน์สองตาแบบเลนส์ประกอบ (binocular compound microscope)

พร้อมด้วยอุปกรณ์การถ่ายภาพและวาดภาพ

2.1.2 กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ (stereo microscope)

2.1.3 Hot plate

2.1.4 Rotary microtome

2.1.5 เครื่องมือผ่าตัด : มีด กรรไกร เข็มเย็บ ปากคีบ ถาดผ่าตัด

2.1.6 อุปกรณ์เครื่องแก้ว : จานแก้ว ปีกเกอร์ หลอดหยด กระจกสไลด์ กระจกปิดสไลด์ ขวดแก้วใส่แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ

2.1.7 อุปกรณ์ถ่ายรูป : กล้องถ่ายรูป ฟิล์มถ่ายรูปสี-ขาวดำ

2.1.8 อุปกรณ์อื่นๆ : ทิชชู ปากกา กระดาษเลเบล พู่กัน กระดาษฟอยด์ ไม้บรรทัด ถุงพลาสติก และ syringe

###### 2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านอนุชีววิทยา

2.2.1 เครื่อง PCR (Perkin Elmer : Gene Amp PCR system 2400)

2.2.2 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

2.2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

2.2.4 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

2.2.5 ตู้ดูดไอพิษ (toxicap)

2.2.6 โกร่งบดตัวอย่าง

- 2.2.7 ตู้บ่ม (incubator)
- 2.2.8 เครื่องทำความเย็น ได้แก่ ตู้เย็น ตู้แช่  $-20^{\circ}\text{C}$
- 2.2.9 water bath
- 2.2.10 Vortex
- 2.2.11 เครื่องชั่งแบบละเอียด
- 2.2.12 เตาไมโครเวฟ
- 2.2.13 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ โพรไฟรีซีสซันิคแนวนอน (บริษัท BIO-RAD)
- 2.2.14 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) (บริษัท BIO-RAD)
- 2.2.15 Adjustable automatic pipets และ tip ขนาดต่างๆ
- 2.2.16 Eppendorf tube
- 2.2.17 UV transilluminator
- 2.2.18 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม
- 2.2.19 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ปีเปต กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ ฯลฯ

### 3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรและ sagittal section

- 3.1.1 Formalin 4 %
- 3.1.2 น้ำเกลือ 0.85 %
- 3.1.3 Ethyl alcohol ความเข้มข้นต่างๆ
- 3.1.4 Absolute ethyl alcohol
- 3.1.5 Butyl alcohol
- 3.1.6 Xylene
- 3.1.7 Permount
- 3.1.8 paraffin
- 3.1.9 สีย้อม : Haematoxylin

#### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัยทางด้านอนุชีววิทยา

- 3.2.1 Agar
- 3.2.2 Agarose (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.3 Bromophenol blue
- 3.2.4 Chloroform
- 3.2.5 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (บริษัท Promega, USA)

- 3.2.6 Ethidium bromide
- 3.2.7 Ethyl alcohol
- 3.2.8 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.2.9 Isoamyl alcohol
- 3.2.10 Isopropanol
- 3.2.11 Liquid nitrogen
- 3.2.12 Magnesium chloride ( $MgCl_2$ ) (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.13 Phenol
- 3.2.14 Primer (บริษัท Operon Technology, USA)
- 3.2.15 Reaction buffer (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.16 Rnase ONE<sup>TM</sup> ribonuclease (บริษัท Promega, USA)
- 3.2.17 Sodium chloride (NaCl)
- 3.2.18 Sucrose
- 3.2.19 Tag DNA polymerase (บริษัท Promega, USA)

## วิธีการวิจัย

### 1. การสำรวจและการศึกษาทางด้านกายรูปวิทยา

#### 1. เก็บพยาธิใบไม้จากกระเพาะลำไส้เล็ก จากโรงฆ่าสัตว์ 2 แห่ง คือ

1. โรงฆ่าสัตว์เทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
2. โรงฆ่าสัตว์ของนายสิโรจ ดวงจิตร์ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน

โดยหลังจากเปิดช่องท้องของวัวนำกระเพาะอาหารมาผ่าเปิดแล้วนำไปล้างน้ำเพื่อกำจัดเศษอาหารที่ค้างอยู่ออก จากนั้นใช้ปากคีบพยาธิที่ติดอยู่กับผนังของกระเพาะอาหารใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่างที่มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% อยู่ แล้วจึงนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ

#### 2. หลังจากนำตัวอย่างพยาธิมาถึงห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% จนกว่าเศษอาหารที่ปนมากับตัวอย่างหมด จากนั้นนำพยาธิส่วนหนึ่งไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ $-20^{\circ}C$ เพื่อนำไปศึกษาทางด้านอนุชีววิทยาต่อไป

#### 3. นำพยาธิอีกส่วนหนึ่งไปจัดทำเป็นสไลด์ถาวร โดยนำพยาธิที่ล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% มา fix ด้วย 4 % formalin เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นย้อมด้วยสี Haematoxylin เป็นเวลา 1 คืน ทำการดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 10% 20% 30% 50% ตามลำดับ จนถึงความเข้มข้น 70% ทำการ destain จนได้ความเข้มสีที่เหมาะสม จากนั้นทำการ

ดึงน้ำออกด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น 85% และ 95% หลังจากนั้นนำไปแช่ 95% ethyl alcohol และ buthyl alcohol ในอัตราส่วน 2:1 1:1 และ 1:2 จนถึง buthyl alcohol แล้วจึงทำให้ตัวอย่างใสโดยแช่ใน buthyl alcohol และ xylene ในอัตราส่วน 2:1 1:1 และ 1:2 จนถึง xylene จากนั้นนำตัวอย่างไปวางบน slide ทำการ mount ด้วย Permount ปิดทับด้วย cover glass นำไปวางบน hot plate แล้วนำมาเก็บไว้ในกล่องเก็บ slide รอให้ตัวอย่างแห้ง แล้วนำไปศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำการวาดและถ่ายภาพเพื่อใช้ในการจัดจำแนกและเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยวิธี sagittal sections

4. นำพยาธิอีกส่วนหนึ่งผ่านกระบวนการทำ paraffin sagittal section ในขั้นแรกทำเหมือน ข้อ 3 ทุกประการ จนถึงแช่ตัวอย่างใน xylene จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ใน xylene และ paraffin ในอัตราส่วน 2:1 1:1 และ 1:2 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปแช่ต่อใน paraffin 1 paraffin 2 และ paraffin 3 จากนั้นทำการ embed ตัวอย่างลงในกระทง (boat) รอให้ตัวอย่างแข็ง แล้วจึงทำการเหลา (trim) แต่งตัวอย่างให้ได้สัดส่วนที่ต้องการ นำไปตัด sagittal section ด้วย Rotary microtome จากนั้นนำ sections ที่ได้มาทำเป็นสไลด์ถาวรเพื่อการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
5. นำข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง ไปคำนวณหาค่า Prevalence of infection (ค่าความชุกชุม) โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{Prevalence of infection} = \frac{\text{จำนวนโฮสต์ที่ตรวจพบพยาธิ}}{\text{จำนวนโฮสต์ทั้งหมดที่ได้รับการตรวจ}} \times 100$$

6. นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 5 มาวิเคราะห์ความแตกต่างของพยาธิแต่ละชนิดด้วยโดยใช้โปรแกรม SPSS

## 2. การศึกษาทางด้านอนุชีววิทยา

### 1. การเตรียมดีเอ็นเอ

#### 1.1 การเตรียมพยาธิ

นำพยาธิมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง

#### 1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ รศนา (2536) และ Yu *et al.*, (1997)

- 1.2.1 นำตัวอย่างพยาธิที่บดละเอียดประมาณ 0.1 กรัม ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml เติม lysis buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM EDTA, 0.5% SDS]

ปริมาตร 800  $\mu$ l เขย่าด้วย vortex mixer แล้วนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C ค้างคืน

- 1.2.2 เติม proteinase K ให้ได้ความเข้มข้น 100  $\mu$ g/ml และ Rnase ให้ได้ความเข้มข้น 20  $\mu$ g/ml ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 1.2.3 สกัดด้วย phenol / chloroform : isoamy alcohol เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น โดยเติม phenol อิ่มตัว 0.5 เท่า (v/v) และ chloroform : isoamy alcohol (24:1) 0.5 เท่า (v/v) ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย phenol / chloroform : isoamy alcohol จนไม่มีตะกอนขาว
- 1.2.4 สกัด phenol ออกด้วย chloroform โดยเติม chloroform 1 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำหลอดไปมา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่
- 1.2.5 ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 2 เท่า (v/v) 99% ethanol และ 1/20 เท่า 5 M NaCl ที่อุณหภูมิ -20° C ค้างคืน
- 1.2.6 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วนำมาคว่ำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- 1.2.7 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50  $\mu$ l เขย่าเบาให้ตะกอนละลายหมดแล้วเติม RNase จำนวน 5 units/หลอด แล้วนำไป incubate ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือค้างคืน
- 1.2.8 สกัดด้วย phenol / chloroform : isoamy alcohol
- 1.2.9 สกัดอีกครั้งด้วย chloroform
- 1.2.10 ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 2 เท่า (v/v) 99% ethanol และ 0.5 M NaCl ของความเข้มข้นสุดท้ายในการตกตะกอน ที่อุณหภูมิ -20° C ค้างคืน
- 1.2.11 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วนำมาคว่ำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 25  $\mu$ l นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20° C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ปริมาณ 10-25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

## 2. เทคนิค HAT-RAPD

### 2.1 การเลือกใช้ primers

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองเป็น arbitrary primers ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology, USA จำนวน 13 ไพรเมอร์

### 2.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

ใส่สารละลายปริมาตร 20  $\mu$ l ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งสารละลายประกอบด้วย 1x reaction buffer, 2 mM  $MgCl_2$ , dNTPs, primer 40 ng, ดีเอ็นเอต้นแบบ 10-25 ng, *Tag* polymerase 0.5 unit/reaction

### 2.3 เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR

เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ตามเงื่อนไขต่อไปนี้

|                          |   |    |   |     |     |    |   |    |
|--------------------------|---|----|---|-----|-----|----|---|----|
| อุณหภูมิ ( $^{\circ}C$ ) | : | 94 | : | 94  | 48  | 72 | : | 72 |
| เวลา (นาทีก)             | : | 5  | : | 3/4 | 3/4 | 1  | : | 7  |
| จำนวนรอบ (รอบ)           | : | 1  | : |     | 30  |    | : | 1  |

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ไปทำ agarose gel electrophoresis ต่อไป

## 3. Agarose gel electrophoresis

### 3.1 การเตรียม agarose gel

3.1.1 เตรียม agarose เข้มข้น 1.4 % โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1x TBE buffer ต้มจน agarose ละลาย เติม ethidium bromide

3.1.2 ทำความสะอาดถาดเจลขนาด 15x20 cm และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วใช้เทปพลาสติกใสปิดขอบถาดทั้งสองด้าน

3.1.3 วางหัวเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจลที่เตรียมไว้ เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) เมื่อ agarose แข็งตัว สำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงไป

3.1.4 เท agarose ที่หลอมละลายแล้วลงในถาดเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่นเจลหนาประมาณ 3-5 mm ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.1.5 เมื่อ agarose แข็งตัวแล้ว ดึงหัวเสียบออก พร้อมนำไปใช้ต่อไป

### 3.2 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis

- 3.2.1 นำแผ่นเจล agarose ที่เตรียมไว้มาแกะพลาสติกออก วางลงในอ่างอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ
- 3.2.2 เท 1x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่นเจล ให้สูงกว่าแผ่นเจลประมาณ 1-3 mm
- 3.2.3 ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากันใช้ ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของเจลที่เตรียมไว้
- 3.2.4 ปิดฝาอ่างและต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ให้ความต่างศักย์ 60 V กระแสไฟฟ้า 150 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้าประมาณ 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่นเจล จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- 3.2.5 นำแผ่นเจลไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพไว้ด้วยโฟลารอยด์

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

- 10.1 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ DNA marker
- 10.2 ตรวจสอบตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพยาธิแต่ละชนิด ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละ primer ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างพยาธิแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม SPSS (cluster analysis) และเสนอเป็น dendrogram แสดงความสัมพันธ์ พร้อมทั้งคิดค่า similarity index (S) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$S = 2 \times N_{ab} / (n_a + n_b)$$

เมื่อ  $n_a$  และ  $n_b$  แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในชนิด a และ b ตามลำดับ และ  $N_{ab}$  คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้งสองชนิด โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0-1 โดย 0 คือทั้งสองชนิดไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลย และ  $S = 1$  หมายถึงทั้งสองชนิดมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด (Nei and Li, 1979)