บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมสัตว์ทดลอง
   - 1.1 กุ้งกุลาดำ ขนาด 10.9±0.5 ซม. จากฟาร์มในจังหวัดเพชรบุรี และสมุทรสงคราม
   - 1.2 อ่างแก้วขนาด 28x44x50 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 46x46x41 ลูกบาศก์เซนติเมตร
   - 1.3 น้ำทะเลความเค็ม 24 ppt pH 7.4-8.3
   - 1.4 อาหารกุ้งชนิดเม็ดสำเร็จรูป (บริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์)
   - 1.5 air pump และหัวทราย

2. เครื่องมือ
   - 2.1 UV - visible recording spectrophotometer (UV-160 A, Shimadsu)
   - 2.2 Standard pH meter (EA 920,Orion research)
   - 2.3 Tissue homogenizer (Heidolph type 58120)
   - 2.4 เครื่องชั่งละเอียด (A 200S, Sartorious)
   - 2.5 กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา (model 304274, Olympus Optical Co.,Ltd)
   - 2.6 Magnetic stirrer (Tokyo rikakikai Co.,Ltd)
   - 2.7 Tuberculin Syringe, disposable (Nipro medical industries Ltd)
   - 2.8 Tissue grinder (Wheaton Co.)
   - 2.9 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Arthur H. Thomas Co.)
   - 2.10 เครื่องอุ่นสไลด์ (Chicago surgical & Electrical Co.)

2.11 Automatic tissue processor (Lipshaw manufacturing Co.)

2.12 Parafin dispenser (Lipshaw manufacturing Co.)

3. สารเคมี

3.1 Acetylthiocholine chloride (Sigma Chemical Company)

3.2 5:5 dithiobis- (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) (Sigma Chemical Company)

3.3 Bovine erythrocyte cholinesterase 0.44 unit/mg (Sigma Chemical Company)

3.4 Sodium bicarbonate (E.merck)

3.5 Disodium hydrogen phosphate (May & Baker)

3.6 Monopotassium hydrogen phosphate (May & Baker)

3.7 Sodium citrate (E.merck)

3.8 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Fluka Chemical)

3.9 95% ethyl alcohol (E.merck)

3.10 100% formalin (E.merck)

3.11 glacial acetic acid (E.merck)

3.12 Methyl parathion (บริษัทเจียไต๋) (Technical gread 95%)

3.13 permout (Scientific Co.)

3.14 ไซลีน (Scientific Co.)

4. เครื่องแก้ว

4.1 ขวดปริมาตรขนาด 10, 50, 500, 1000 มล.(Pyrex)

4.2 กระบอกตวงขนาด 100 มล. (Pyrex)

4.3 หลอดทดลองพลาสติกขนาด 13 x 100 มม. (Elkay Products, Inc.)

4.4 Silica Cuvettes (path length 1 cm., Shimadsu)

4.5 Automatric pipets (adjustable volume) 1-1000 μl (Gilson) พร้อม tips

4.6 Automatric pipets (adjustable volume) 5-20 μl (Eppendorf) พร้อม tips

4.7 Microscope slide ขนาด 1x3 นิ้ว (Sail Brand)

4.8 Cover glass ขนาด 22x30 มม. (Menzel glaser)

การเตรียม Reagents

1. สารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0

เตรียมโดยการผสมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M (14.2 g/litre) จำนวน 475 มล. กับสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M (13.6 g/litre) 25 มล.ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 โดยใช้สารละสาย KH_2PO_4 0.1 M สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10-15 วัน

2. สารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 7

เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M (14.2 g/litre) จำนวน 5 มล. ผสมในสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M (13.6 g/litre) 4 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละสาย KH_2PO_4 สารละลายบัฟเฟอร์นี้ เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10-15 วัน

3. สารป้องกันการแข็งตัวของ hemolymph

เตรียมโดยนำ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จำนวน 2.92 กรัม และ sodium citrate 0.01 M (2.58 g/litre) จำนวน 0.258 มก. ไปละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 8 จำนวน 100 มล. สารละลายนี้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 10-15 วัน

4. Substrate Acetylthiocholine chloride (1.096×10^{-4} M)

ละลาย Acetylthiocholine chloride 21.67 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. สารละลายนี้สามารถคงตัวอยู่ได้เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 10-15 วัน

5. Dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.01 M

ละลาย DTNB 39.6 มก. และ sodium bicarbonate 15 มก. ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M, pH 7 จำนวน 10 มล.

6. Davidson's fixative solution

เตรียมโดยผสมส่วนผสมข้างล่างนี้เข้าด้วยกัน

95% ethyl alcohol	330 มล.
100% formalin	220 มล.
glacial acetic acid	115 มล.
tap water	335 มล.

7. Enzyme Bovine Cholinesterase (0.44 unit/mg)

ซึ่งเอ็นไซม์ Bovine cholinesterase 10 มก. มาละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มล. จะได้ปริมาณเอ็นไซม์ต่อ 1 มล.เท่ากับ 2.2 IU นำไป dilute ต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.1 IU, 0.55 IU, 0.275 IU และ 0.1375 IU

8. การเตรียม methyl parathion stock solution

นำ methyl parathion 0.05 มล. มาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มล. คนให้เข้ากัน นำมา 1 มล. ละลายในน้ำกลั่น 1 ล. จะได้ความเข้มข้นของ methyl parathion 1 ppm. เป็น stock solution

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาค่า Median Lethal Concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 hr) โดยการนำกุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพแข็งแรงขนาด 10.9±0.5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในน้ำเค็ม 24 ppt. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพของกุ้ง จากนั้นนำมาแยกเลี้ยงในอ่างแก้วขนาด 28x44x50 ลูกบาศก์เซนติเมตร กลุ่มละ 20 ตัว ใส่น้ำเค็ม 40 ล. และขนาด 46x46x41 ลูกบาศก์เซนติเมตร กลุ่มละ 30 ตัว ใส่น้ำเค็ม 60 ล. ภายในอ่างแก้วบรรจุน้ำทะเลความเค็ม 24 ppt., pH 7.4-8.3 ใส่หัวทราย เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำให้เพียงพอกับความต้องการของกุ้ง จากนั้นแบ่งกุ้งกุลาดำออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 50 ตัว โดยแต่ละกลุ่มให้เมทิลพาราไธออน ความเข้มข้นต่างกันดังในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมเมททิลพาราไธออนจาก stock solution (1 ppm.)

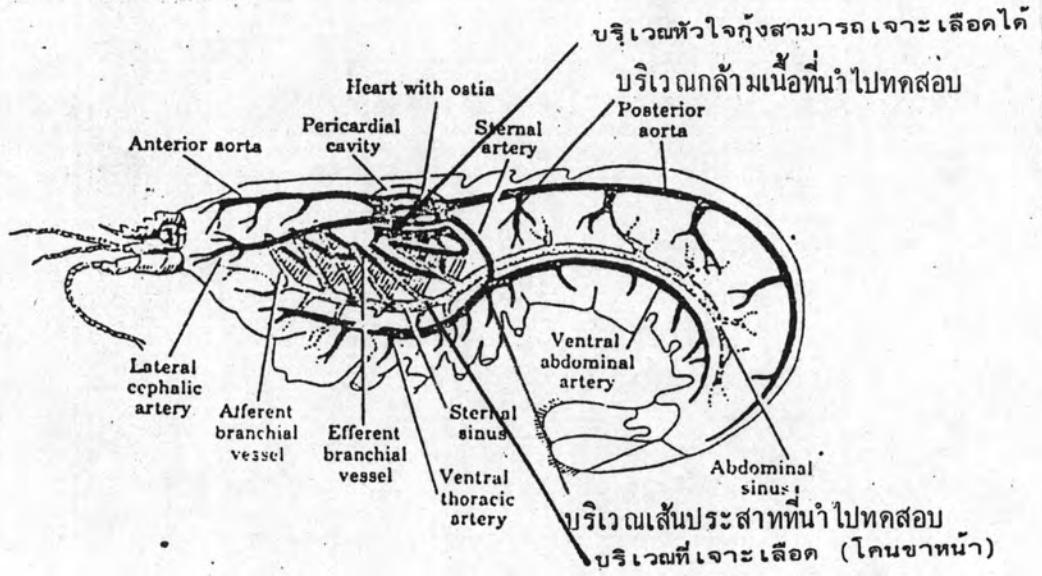
กลุ่มที่	ความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออน	ปริมาณเมททิลพาราไธออนจาก stock solution	ปริมาณน้ำทะเล
1	1 ppb.	100 มล.	น้ำ 99.9 ล.
2	20 ppb.	2 ล.	น้ำ 98 ล.
3	40 ppb.	4 ล.	น้ำ 96 ล.
4	50 ppb.	5 ล.	น้ำ 95 ล.
5	75 ppb.	7.5 ล.	น้ำ 92.5 ล.
6	90 ppb.	9 ล.	น้ำ 91 ล.

สังเกตุอาการของกุ้งกุลาดำในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จนครบ 96 ชั่วโมง ในระหว่างนั้นบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำ จำนวนกุ้งที่ตาย นำกุ้งที่ตายและกุ้งที่เสร็จจากการทดลองแล้ว นำมาศึกษาหาค่าเอ็นไซม์โพลีนเอสเทอเรส บันทึกจำนวนกุ้งตายในแต่ละกลุ่มเมื่อครบ 96 ชั่วโมง เพื่อนำมาหาค่า median lethal concentration และนำกุ้งมาดองใน Davidson's fixative ตามวิธีในข้อ 5 เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของตับ, ตับอ่อน และกล้ามเนื้อ

2. วิธีการวัดสมรรถนะของเอ็นไซม์โพลีนเอสเทอเรสในเลือดกุ้ง (Hemolymph) ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961)

2.1 การเตรียมเลือด

การเจาะเลือดเจาะจากบริเวณขาคู่หน้า และแล่งเลือดรอบหัวใจของกุ้งกุลาดำ (ดังรูปที่ 11) โดยใช้เข็ม No 21 การเจาะวาง syringe ทำมุมประมาณ 15-20 องศากับลำตัวกุ้งภายใน syringe บรรจุสารป้องกันความแข็งตัวของเลือดกุ้ง โดยอัตราส่วนของสารละลายป้องกันการแข็งตัวของเลือดกุ้งต่อเลือดกุ้ง 1:1.5



รูปที่ 11 แสดงวิธีการเจาะเลือดกุ้ง และตำแหน่งที่จะเลาะเอากล้ามเนื้อและเส้นประสาทมาทดลอง

2.2 วัดสมรรถนะของเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดกุ้ง

1) นำสารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 8 ใส่ลงใน cuvettes 2 อันๆ ละ 3 มล.โดยกำหนดให้อันหนึ่งเป็น Blank และอีกเซลเป็น Sample

2) เติมเลือด 50 μl และ DTNB 100 μl ลงในแต่ละ cuvettes

3) นำ cuvettes ทั้ง 2 อัน ไปวางในเครื่อง spectrophotometer ปรับความยาวคลื่นแสงไว้ที่ 412 nm

4) เติม substrate acetylthiocholine chloride จำนวน 20 μl ลงใน cuvette สำหรับ sample

5) คนให้เข้ากันทั้ง 2 cuvettes วัดการเปลี่ยนแปลงของค่า optical density (ΔA) ภายในเวลา 6 นาที

3. วิธีการวัดสมรรถนะของเอ็นไซม์โฟลีนเอสเทอเรสในเส้นประสาท และกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำ

1) การเตรียมเส้นประสาท และกล้ามเนื้อ เลาะเอา ventral nerve cord (ดังรูปที่ 11) มา 10 มก. เก็บใน phosphate buffer pH 8 จำนวน 4 มล. บดจนละเอียด นำมา 0.5 มล. ผสมใน phosphate buffer pH 8 2 มล. สำหรับกล้ามเนื้อตัดจากกล้ามเนื้อท้องบริเวณปล้องที่ 2 (ดังรูปที่ 11) มาจำนวน 20 มก. เก็บในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 จำนวน 1 มล. แยกบด เส้นประสาทและกล้ามเนื้อจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 0°C เพื่อรอวัดสมรรถนะของเอ็นไซม์ต่อไป

2) วัดสมรรถนะของเอ็นไซม์โฟลีนเอสเทอเรสในเส้นประสาท และกล้ามเนื้อ

- นำสารละลาย phosphat buffer 0.1 M, pH 8 ใส่ลงใน cuvettes 2 อัน ๆ ละ 2.6 มล. กำหนดให้เป็น sample และ blank
- เติมเส้นประสาท หรือกล้ามเนื้อ ที่ผ่านการบดจนละเอียดแล้ว จำนวน 0.4 มล. และ DTNB 100 μl ลงในแต่ละ cuvettes
- นำ cuvettes ทั้ง 2 ไปวางในเครื่อง spectrophotometer ปรับความยาวคลื่นแสงไว้ที่ 412 nm.
- เติม substrate acetylthiocholine chloride 20 μl ลงใน sample คนให้เข้ากัน
- เริ่มบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density (ΔA) ภายในเวลา 6 นาที

หมายเหตุ ทำการวัดอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อผลการทดลองที่แน่นอน แล้วหาค่าเฉลี่ยของ ΔA

4. วิธีการทำ Standard curve

1. นำสารละลาย phosphate buffer pH 8 ใส่ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน อันละ 3 มล.

2. เติม DTNB 100 μl และ substrate acetylthiocholine chloride 20 μl ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน นำไปวางใน spectrophotometer ปรับความยาวคลื่นแสงที่ 412 nm

i17159345

3. นำสารละลายมาตรฐานของ Bovine erythrocyte cholinesterase ที่มีปริมาณเอ็นไซม์ 0.1375-1.1 IU จำนวน 50 μl ใส่ในหลอดของ sample คนให้เข้ากัน

4. เริ่มบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density ในเวลา 6 นาที

5. เขียนกราฟระหว่างค่า optical density ที่เปลี่ยนแปลงต่อ 1 นาที (แกน y) กับจำนวนยูนิตของเอ็นไซม์ (แกน x)

6. คำนวณหาค่าคงที่ ($K = \frac{1}{\text{slope}}$)

5. ศึกษาพยาธิสภาพของตับและตับอ่อน (hepatopancrease) และกล้ามเนื้อที่เปลี่ยนแปลงไป

5.1 การดองตัวอย่าง (Fixation)

ตัวอย่างทั้งหมดจะดองในน้ำยา Davidson's fixation โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ

วิธีดอง

ฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อน และกล้ามเนื้อท้องบริเวณปล้องที่ 1 และปล้องที่ 5 หรือตัดแบ่งกุ้งออกเป็น 3 ส่วน คือ ตัดบริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับส่วนท้อง และส่วนท้องระหว่างปล้องที่ 3 กับ 4 ก่อนแช่ลงในน้ำยาดอง หลังจากนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำยาดองประมาณ 24-72 ชั่วโมง ย้ายไปเก็บใน เอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50% เก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง

5.2 วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

5.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อ ในกุ้งขนาดใหญ่ตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษา คือ ตับและตับอ่อน, กล้ามเนื้อ โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

5.2.2 นำชิ้นเนื้อมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนดึงน้ำออก clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน

5.2.3 นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40-45°C เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์โดยการช้อนขึ้น

จากน้ำด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40-50°C ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ถึงตลอดคืน

5.2.4 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำมาย้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ คือ ละลายพาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นผ่านขบวนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำแล้วย้อมสี หลังจากนั้นนำมาผ่านขบวนการดึงน้ำออกอีกครั้ง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากต่ำไปสูง แช่ในน้ำยาไซลีน แล้วทำการ mount สไลด์ด้วย permount

5.2.5 นำมาย้อมสี Hematoxylin และ Losin (H & E) ตามวิธี Humason (1979)

5. การอ่านผล

นำสไลด์ถาวรที่ได้ศึกษาดูลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง บันทึกผลการทดลอง

วิธีการคิดคำนวณสมรรถนะของเอ็นไซม์ (Enzyme Activity)

1. การคำนวณสมรรถนะของเอ็นไซม์ในเลือดกุ้ง (Hemolymph)

สมรรถนะของเอ็นไซม์ (Enzyme Activity) คำนวณเป็นหน่วยของหน่วยสากลโดยที่ 1 IU จะเท่ากับจำนวน substrate เป็นไมโครโมลที่ถูก hydrolyzed/1 นาที/มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ไมโครโมลของสับสเตรท

ไฮโดรไลซ์/นาที/มล. = $\Delta A \times k \times y$

ΔA = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง sample และ blank ต่อนาที

y = dilution factor = 3/5

k = 1/slope of the standard curve

2. การคำนวณสมรรถนะของเอ็นไซม์ในเส้นประสาทและกล้ามเนื้อ

$$R = \frac{\Delta A \times y}{1.36 \times 10^{2} \ (400/3120) \ Co} = 5.74 \times 10^{2} \times \frac{\Delta A}{Co} \times y$$

โดย R = rate, จำนวน substrate เป็นไมโครโมลที่ถูก hydrolyzed /นาที/กรัมของเนื้อเยื่อ

ΔA = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงต่อนาที (change in absorbance /min)

Co = ปริมาณของเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ (กล้ามเนื้อ, เส้นประสาท) มก./มล.

y = dilution factor ในกล้ามเนื้อ = 1

dilution factor ในเส้นประสาท = 40

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. หาค่า LC_{50} โดยใช้วิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949) โดยนำข้อมูลมาสร้างกราฟ ทำการทดสอบค่าที่ได้จากการทดลอง และค่าที่ควรจะเป็นโดยทำ chi square test

2. ใช้ ANOVA ชนิด oneway และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test