บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมสัตว์ทดลอง
   - 1.1 ปลากะพงขาว ขนาด 8.5 ± 0.5 ซม. จากฟาร์มในจังหวัดสมุทรปราการ
   - 1.2 อ่างไฟเบอร์กลาส์ขนาด 58x60x59 ลูกบาศก์เซนติเมตร
   - 1.3 น้ำกรองสะอาด pH 6.0-7.0
   - 1.4 อาหารปลา (artemia และ ปลาทูหั่นเป็นชิ้น)
   - 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 เครื่องชั่งละเอียด (A 200S, Sartorious)
   - 2.4 กล้องจุลทรรศน์ลำแสงธรรมดา (model CH2 ,Olympus Optical Co.,Ltd)
   - 2.5 Magnetic stirrer (RC-2, Tokyo rikakikai Co.,Ltd)
   - 2.6 Tissue grinder (Wheaton Co.)
   - 2.7 Syringe with needle
   - 2.8 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Arthur H. Thomas Co.)
   - 2.9 เครื่องอุ่นสไลด์ (Chicago surgical & Electrical Co.)
   - 2.10 Automatic tissue processor (Lipshaw manufacturing Co.)
   - 2.11 Paraffin dispenser (Lipshaw manufacturing Co.)

2.12 Gas chromatography (GC-16A, Shimadsu)

2.13 Shaker (SA-31, Yamato)

2.14 Rotary evaporator (RE-47, Yamato)

3. สารเคมี

3.1 Acetylthiocholine iodide (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 Toluene (J.T. Baker)

3.8 Methylene chloride (J.T Baker)

3.9 Methanol (J.T. Baker)

3.10 Acetone (J.T. Baker)

3.11 100% formalin (E.Merck)

3.12 Folidol (50% methyl parathion จากบริษัทไบเออร์ไทย จำกัด)

3.13 permout (Scientific Co.)

3.14 Xylene (Scientific Co.)

4. เครื่องแก้ว

4.1 ขวดรูปชมพู่ปริมาตรขนาด 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 Automatic pipets (adjustable volume) 1-1000 ul (Gilson) พร้อม tips

4.6 Automatic pipets (adjustable volume) 5-20 ul (Eppendorf) พร้อม tips

4.7 Microscope slide ขนาด 1x3 นิ้ว (Snail Brand)

4.8 Cover glass ขนาด 22x30 นิ้ว (Menzel glaser)

4.9 กรวยแยก (Separatory funnel, Pyrex) ขนาด 500 มล.

4.10 Glass stirrer

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 โดยใช้สารละลาย KH_2PO_4 0.1 M สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์

2. สารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0

เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M (14.2 g/litre) จำนวน 5 มล. ลงไปในสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M (13.6 g/litre) 4 มล.ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลาย KH_2PO_4 0.1 M สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์

3. Substrate Acetylthiocholine iodide

ละลาย Acetylthiocholine iodide 21.67 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. สารละลายนี้สามารถคงตัวอยู่ได้นาน 2 สัปดาห์เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

4. 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. เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C ได้นาน 2 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i17879246

5. การเตรียม 10% formalin

เตรียมโดยนำ 100% formalin มา 100 มล. ใส่ในน้ำกลั่น 900 มล.

6. Enzyme Bovine Cholinesterase (0.44 unit/mg)

ชั่งเอ็นไซม์ Bovine Cholinesterase 10 มก. มาละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มล. จะได้ปริมาณเอ็นไซม์ต่อ 1 มล. เท่ากับ 2.2 IU นำไปเจือจางต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.1 IU, 0.55 IU, 0.275 IU และ 0.1375 IU

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาหาค่า Median Lethal Concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96hr) โดยการนำปลากะพงขาวที่มีสุขภาพแข็งแรงขนาด 8.5 ± 0.5 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในน้ำกรองสะอาดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพของปลาจากนั้นแบ่งปลากะพงขาวออกเป็น 10 กลุ่ม ๆ ละ 50 ตัวมาแยกเลี้ยงในอ่างไฟเบอร์กลาส์ขนาด 58x60x59 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่มีน้ำกรองสะอาดจำนวน 100 ลิตร, pH 6.0-7.0 ใส่หัวทราย เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำให้เพียงพอกับความต้องการของปลา ปลากะพงขาวทั้ง 10 กลุ่ม ได้รับเมทิลพาราไธออนที่ขนาดความเข้มข้น 0.5-2.5 ppm โดยเตรียมจาก methyl parathion 50%

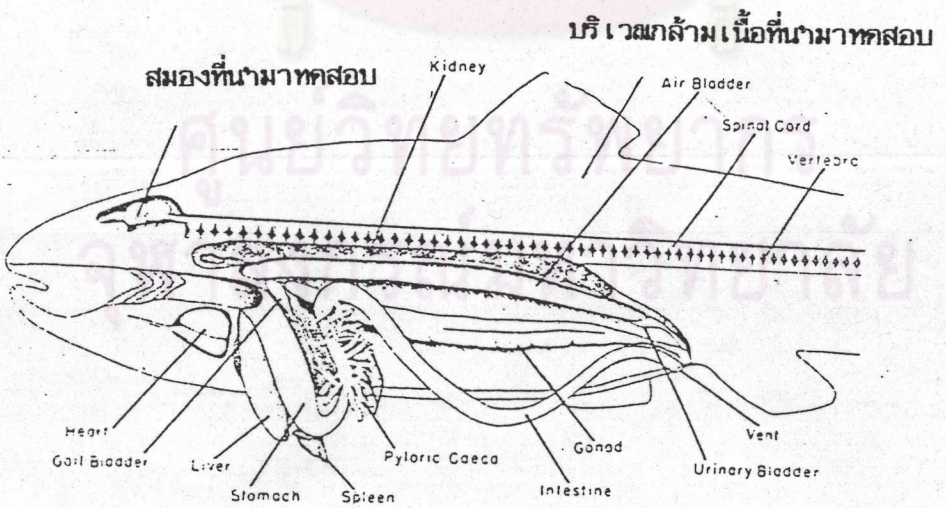
สังเกตุอาการของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไธออนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จนครบ 96 ชั่วโมง ในระหว่างนั้นบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำ บันทึกจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่มจนครบ 96 ชั่วโมง เพื่อนำมาหาค่า median lethal concentration เก็บปลาที่ตายโดยทันทีและปลาที่เสร็จจากการทดลองแล้ว มาแยกสมองและกล้ามเนื้อศึกษาหาค่าเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรส และปลาบางตัวในแต่ละกลุ่มมาดองใน 10% formalin ตามในวิธีในข้อ 5 เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของตับ เหงือก และกล้ามเนื้อ

2. ศึกษาความเป็นพิษของเมทิลพาราไธออนในความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ปลาตายในเวลา 7 วัน โดยใช้ปลาขนาด 8.5 ± 0.5 ซม. นำมาเลี้ยงในน้ำสะอาดก่อนการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพปลา จากนั้นแยกปลาเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 50 ตัว ในอ่างไฟเบอร์กลาส์ขนาด 58x60x59 ซม^3. ใส่น้ำกรอง 100 ลิตร pH 6.0-7.0 ปริมาณออกซิเจน

7-8 ppm ใช้หัวทรายเป็นตัวเพิ่มออกซิเจน ปลากะพงขาว 3 กลุ่ม จะได้รับเมททิลในขนาดความเข้มข้นในขนาด 0.05, 0.1, 0.2 ppm และอีกกลุ่มกำหนดให้เป็นกลุ่มควบคุม สังเกตอาการของปลาภายใน 7 วัน และเก็บปลาของแต่ละกลุ่มขึ้นครั้งละ 5 ตัว ที่เวลา 0, 2, 4, 8 ชั่วโมง และวันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 สังเกตุอาการของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่เวลาต่าง ๆ ในระหว่างนั้นบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำ ปลาที่เก็บขึ้นมานำมาศึกษาหาค่าเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรส และนำปลามาดองใน 10% formalin ตามในวิธีในข้อ 5 เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของตับ เหงือก และกล้ามเนื้อ

3. วิธีการวัดสมรรถนะของเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสมอง และกล้ามเนื้อของปลากะพงขาว ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961)

3.1 การเตรียมสมองและกล้ามเนื้อ ผ่าเปิดหัวปลาใช้เข็มเจาะเอาสมอง (ดังรูปที่ 9) มา 10 มก. เก็บใน phosphate buffer pH 8 จำนวน 2 มล. สำหรับกล้ามเนื้อตัดจากกล้ามเนื้อท้องบริเวณครีบหลัง (ดังรูปที่ 9) มาจำนวน 20 มก. เก็บในphosphate buffer pH 8 จำนวน 1 มล. แยกบดสมองและกล้ามเนื้อจนละเอียดด้วย tissue grinder จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0°C เพื่อรอวัดสมรรถนะของเอ็นไซม์ต่อไป



รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งที่จะเจาะเอากล้ามเนื้อ และสมองปลามาทดลอง
(วิมล เหมะจันทร์, 2523)

3.2 วัดสมรรถนะเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรสในสมองและกล้ามเนื้อ

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

<u>หมายเหตุ</u> ทำการวัดอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อผลการทดลองที่แน่นอน แล้วหาค่าเฉลี่ยของ Δ A

3.3 วิธีการทำ standard curve

3.3.1. นำสารละลาย phosphate buffer pH8 ใส่ใน cuvettes ทั้ง 2 อัน ๆ ละ 3 มล.

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

3.3.3. นำสารละลายมาตรฐานของ Bovine erythrocyte cholinesterase จำนวน 50 µl ใส่ในหลอดของ sample คนให้เข้ากัน

3.3.4. เริ่มบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า optical density ในเวลา 6 นาที

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

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

3.4 การวัดปริมาณเมทธิลพาราไธออนในน้ำโดยใช้ Gas chromatrography

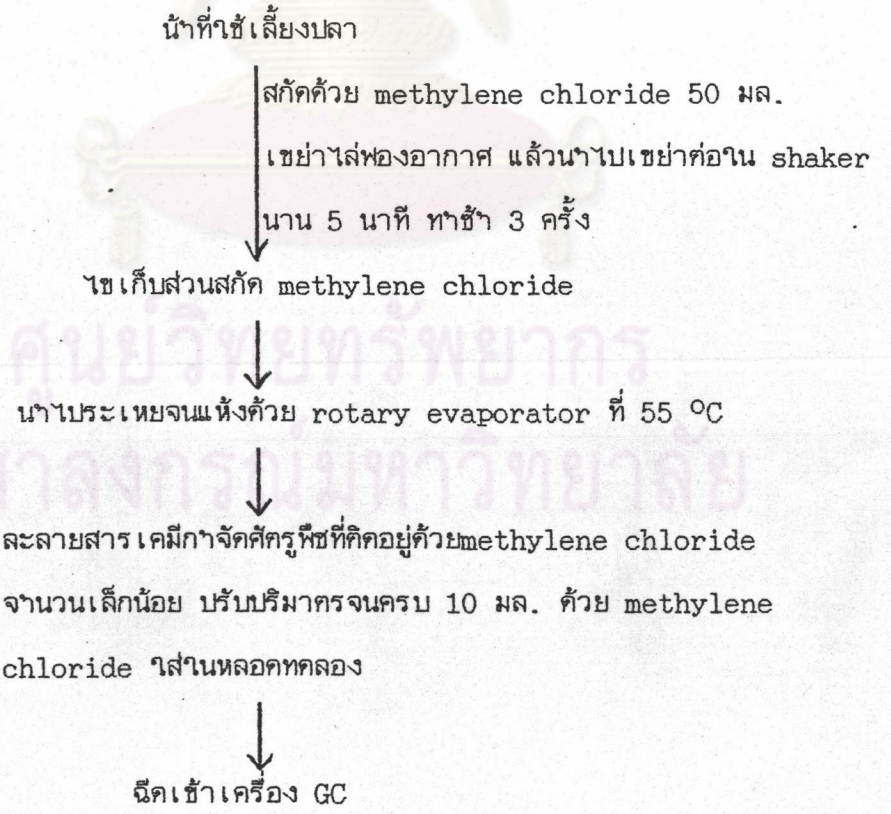
- ทำการสกัดน้ำที่มี methyl parathion อยู่ โดยประยุกต์วิธีการของ Lenardon AM และคณะ (1984) (ดังรูปที่ 10)

3.4.1. rinse ขวดปริมาตร 500 มล. และกรวยแยกขนาด 500 มล. ด้วย toluene, methanol, acetone และ methylene chloride ตามลำดับ

3.4.2. นำน้ำที่ใช้เลี้ยงปลามา 500 มล. เทใส่ในกรวยแยกขนาด 500 มล. จากนั้นใส่ methylene chloride 50 มล. เขย่าเพื่อไล่อากาศออก แล้วเขย่าต่ออีกเป็นเวลา 5 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ไขเอาส่วนล่างออกเก็บไว้ ทำเช่นนี้ซ้ำ 2 ครั้ง

3.4.3. นำส่วนที่เก็บไว้ทั้งหมดไประเหยจนแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และละลายสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ติดอยู่ด้วย methylene chloride จำนวนเล็กน้อย ปรับปริมาตรจนครบ 10 มล. ด้วย methylene chloride

3.4.4. นำส่วนในข้อ 3 ไปฉีดเข้าเครื่อง gas chromatography ที่ปรับสภาพไว้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ methyl parathion ที่เหลืออยู่ในน้ำ



รูปที่ 10 แผนภูมิแสดงการสกัดเมทธิลพาราไธออนในน้ำ

- Gas chromatography ที่มี Flame Photometric Detector (FPD) ใช้ glass column ขนาด 2.1 M x 3.0 mm. ภายในบรรจุด้วย Silicone OV-101 80/100 mesh Chromasorb WHb carrier gas เป็นไนโตรเจนที่ปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 40 มล./นาที fuel gas ใช้ H_2 กับ air ที่มีอัตราไหล 60 มล./นาที กำหนดอุณหภูมิของ column เป็น 210 ^{o}C อุณหภูมิขณะฉีด Injector 250 ^{o}C และ อุณหภูมิขณะวัด detector 300 ^{o}C ใช้สารละลายของ methyl parathion เป็น external standard

3.4.5. เขียนกราฟระหว่างค่าปริมาณ methyl parathion ที่มีอยู่ (แกน y) กับเวลาที่ผ่านไป (แกน x)

6. ศึกษาจุลพยาธิสภาพของเหงือก ตับ และกล้ามเนื้อที่เปลี่ยนแปลงไป

6.1 การดองตัวอย่าง (Fixation)

ตัวอย่างทั้งหมดจะดองในน้ำยา 10% formalin โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ

วิธีดอง

แยกตัดเหงือก ตับ และกล้ามเนื้อออก แช่ลงในน้ำยาดอง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในน้ำยาดองประมาณ 24-72 ชั่วโมง เก็บไว้ได้นานในอุณหภูมิห้อง

6.2 วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

6.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อ ในปลาที่มีขนาดใหญ่ตัดเฉพาะส่วนที่ต้องการศึกษาคือ เหงือก ตับ และกล้ามเนื้อ โดยตัดให้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มม.

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

6.2.3 นำแท่งตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน แล้วนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40-45^{o}C เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์โดยการช้อนชิ้นจากน้ำด้วยสไลด์ นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 40-50^{o}C ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน

6.2.4 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำไปย้อมสีตามขั้นตอนดังนี้ คือ ละลาย

พาราฟินด้วยไซลีน จากนั้นผ่านขบวนการดูดน้ำเข้า (hydration) ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำแล้วย้อมสี หลังจากนั้นนำมาผ่านขบวนการดึงน้ำออกอีกครั้ง (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปสูง แช่ในไซลีน แล้วทำการ mount สไลด์ด้วย permount

6.2.5 นำมาย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H & E) ตามวิธี Humason (1979)

6.2.6 การอ่านผล

นำสไลด์ถาวรที่ได้ศึกษาดูลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลำแสงธรรมดา บันทึกผลการทดลอง

วิธีการคิดคำนวณสมรรถนะของเอ็นไซม์ (Enzyme Activity)

การคำนวณสมรรถนะของเอ็นไซม์ในสมองและกล้ามเนื้อ

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

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

ΔA = การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อนาที (change in absorbance per min)

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

y = dilution factor ในกล้ามเนื้อ = 1

dilution factor ในสมอง = 4

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

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

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

3. เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ student's "t" test ที่ $p<0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย