ฝ่ายวิจัย
รับ วันที่ 22 ธค 24
เวลา 15.30 เลขที่ 1460

# การเก็บรักษา Plasmodium berghei ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ไดเม็ทธิลซัลฟอกไซด์และกลีเซอรอล

นางสาวไสว แพนแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2524

008605

; 15544862

# Preservation of *Plasmodium berghei* in Liquid Nitrogen by Using Dimethylsulfoxide and Glycerol

Miss Sawai Pankaew

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1981

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การเก็บรักษา Plasmodium berghei ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ไดเม็ทธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอล |
| โดย | นางสาวไสว แพนแก้ว |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุดศรี ไทยทอง |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.พูนพิพงศ์ วรวุฒิ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุดศรี ไทยทอง)

.....กรรมการ
(แพทย์หญิง ธากา สืบหลินวงศ์ )

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารมณ์ รัตนิทัต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเก็บรักษา Plasmodium berghei ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์และกลีเซอรอล

ชื่อนิสิต นางสาว ไสว แพนแก้ว

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง
แพทย์หญิง ชาดา สืบหลินวงศ์

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2523

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การเก็บรักษา Plasmodium berghei ไว้ในไนโตรเจนเหลว เป็นวิธีที่ใช้ได้ดีและมีผู้นิยมใช้กันมาก ในการทดลองครั้งนี้ทำเพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีที่เก็บมาเลเรียโดยได้ทำการศึกษาทั้งหมด 4 วิธีคือ เก็บโดยใช้ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ ตามวิธีการของ Pavanand et al (1974) และ Phillip & Wilson (1978) เทียบกับการใช้กลีเซอรอลตามวิธีของ Phillip & Wilson (1978) และ Rowe Eyster & Kellner (1968) โดยเปรียบเทียบความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อมาเลเรียด้วยการหาค่าลาเทนท์พีเรียด ระดับปาราสิตในเลือดหนูไมซ์ที่ได้รับเชื้อและทดสอบสมรรถภาพของเอ็นไซม์แลคเททดีไฮโดรจีเนส พบว่าเชื้อมาเลเรียที่เก็บโดยการเติมกลีเซอรอล 19 % ตามวิธีของ Phillip & Wilson สามารถอยู่รอดได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อมาเลเรียที่เก็บโดยการเติม 10 % ไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์โดยวิธีของ Phillip & Wilson เช่นกัน ส่วนการเติมกลีเซอรอล 14 % ตามวิธีของ Rowe Eyster & Kellner และการเติมไดเม็ททิลซัลฟอกไซด์ตามวิธีของ Pavanand et al นั้นให้ผลดีรองลงมาตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสมรรถภาพของเอ็นไซม์แลคเททดีไฮโดรจีเนสไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลา 24 สัปดาห์ที่ทำการทดลอง

Thesis Title Preservation of Plasmodium berghei in Liquid Nitrogen by Using Dimethylsulfoxide and Glycerol

Name Miss Sawai Pankaew

Thesis Advisor Assistant Professor Sodsri Thaithong

Dr. Tada Sueblinvong

Department Biology

Academic Year 1980

ABSTRACT

The preservation of Plasmodium berghei in liquid nitrogen was a wellknown and widely practiced method. The present study was designed to compare four published methods which were as follows: using dimethylsulfoxide as the cryopreservative was studied according to Pavanand et al (1974) and Phillip & Wilson (1978); two others were using glycerol by the methods of Phillip & Wilson (1978) and Rowe, Eyster & Kellner (1968). The achievements of comparisons were assessed by looking at the viability and the activity of lactate dehydrogenase in the cryopreserved parasites. The results were that the addition of 19 % glycerol to the cryopreserved parasites according to the method of Phillip & Wilson afforded the best protection. The use of 10% dimethylsulfoxide by the method of Phillip & Wilson also gave better protection to malarial parasites than using 14% glycerol, according to Rowe, Eyster & Kellner and than that 12% dimethylsulfoxide of Pavanand et al respectively. Besides, the activity of the parasitic lactate dehydrogenase remained unchanged throughout the 24 weeks of this study.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สดศรี ไทยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาและควบคุมการวิจัย ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์แพทย์หญิงชาดา สืบหลินวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่อง ตั้งแต่แรกเริ่มจนประสบความสำเร็จ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.พุฒิพงศ์ วรวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารมณ์ รัตนิทัต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องจนวิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบคุณอาจารย์ปรีชา อัศวเดชานุกร ภาควิชาสถิติ และพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูล

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์บางอย่างในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้เชื้อมาเลเรีย Plasmodium berghei เพื่อใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณสมพร แสงสว่าง ที่ช่วยพิมพ์วิทยานิพนธ์จนสำเร็จลงด้วยความเรียบร้อย

ขอขอบคุณ คุณประสิทธิ์ ธราภิชาตบุตร ที่กรุณาช่วยตรวจแก้คำผิด

ขอขอบคุณ คุณฉวีวรรณ จั่นสกุล คุณสุภาภรณ์ รัตนานุรักษ์พงษ์

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ ทุนสมเด็จพระมหิตลาธิเบศรอดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนก ที่ให้ทุนการวิจัยครั้งนี้.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย . . . . . ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ . . . . . จ

กิตติกรรมประกาศ . . . . . ฉ

รายการตารางประกอบ . . . . . ซ

รายการรูปประกอบ . . . . . ญ

รายการแผนภาพประกอบ . . . . . ฏ

บทที่

1. บทนำ . . . . . 1

2. สอบสวนเอกสาร . . . . . 7

3. อุปกรณ์ในการทดลอง . . . . . 11

4. การดำเนินการทดลอง . . . . . 15

5. ผลการทดลอง . . . . . 29

6. วิจารณ์ผลการทดลอง . . . . . 54

7. สรุปผลการทดลอง . . . . . 58

เอกสารอ้างอิง . . . . . 60

ภาคผนวก . . . . . 64

ประวัติการศึกษา . . . . . 67



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการตารางประกอบ


| | | หน้า |
|---|---|---|
| ตารางที่ 1 | แสดงผลของระยะเวลาที่เชื้อมาเลเรียถูกเก็บในไนโตรเจนเหลวต่อลาเทนท์พีเรียดในหนูที่ได้รับเชื้อ . . . . . | 36 |
| ตารางที่ 2 | แสดงค่าเปรียบเทียบผลต่างของลาเทนท์พีเรียดในหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งผ่านการเก็บในไตโตรเจนเหลวต่อระยะเวลาที่ถูกเก็บทุก 2 สัปดาห์ . . . . . | 37 |
| ตารางที่ 3 | แสดงค่าเปรียบเทียบวิธีเก็บเชื้อมาเลเรียไว้ในไนโตรเจนเหลวทั้ง 4 วิธี ต่อลาเทนท์พีเรียดในหนูที่ได้รับเชื้อ . . . | 38 |
| ตารางที่ 4 | แสดงค่าเฉลี่ยของระดับปาราสิตจากหนู 4 ตัว ที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บในไนโตรเจนเหลว ด้วยวิธีที่ 1 เริ่มนับจำนวนปาราสิตหลังจากฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าหนูแล้ว 1 วัน เรื่อยไปจนกระทั่งหนูตายหมด . . . . . | 39 |
| ตารางที่ 5 | แสดงค่าเฉลี่ยของระดับปาราสิตจากหนู 4 ตัว ที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 2 เริ่มนับจำนวนปาราสิตหลังจากฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าหนูแล้ว 1 วัน เรื่อยไปจนกระทั่งหนูตายหมด . . . . . | 40 |
| ตารางที่ 6 | แสดงค่าเฉลี่ยของระดับปาราสิตจากหนู 4 ตัว ที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 3 เริ่มนับจำนวนปาราสิตหลังจากฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าหนูแล้ว 1 วัน เรื่อยไปจนกระทั่งหนูตายหมด . . . . . | 41 |

หน้า

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับปาราสิตจากหนู 4 ตัว ที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 4 เริ่มนับจำนวนปาราสิตหลังจากฉีดเชื้อมาเลเรียเข้าหนูแล้ว 1 วัน เรื่อยไปจนกระทั่งหนูตายหมด . . . . . 42

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการรูปประกอบ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อก (log)เปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 1 ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . | 43 |
| 2 | กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 2 ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . | 44 |
| 3 | กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 3 ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . | 35 |
| 4 | กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียซึ่งถูกเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วยวิธีที่ 4 ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . | 46 |
| 5 | กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียที่เก็บไว้สัปดาห์ที่ 0 ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . | 47 |
| 6 | กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวทั้ง 4 วิธี เป็นเวลา 8 สัปดาห์ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . | 46 |


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ หน้า

7 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวทั้ง 4 วิธี เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . 49

8 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยล็อกเปอร์เซ็นต์ปาราสิตในเลือดหนูที่ได้รับเชื้อมาเลเรียที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวทั้ง 4 วิธี เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ต่อจำนวนวันหลังจากหนูได้รับเชื้อมาเลเรีย . . . . . 50

9 ภาพถ่ายแสดงแถบของเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสของเชื้อมาเลเรียและโฮสต์กลุ่มควบคุม แถวบนเป็นแถบของเอ็นไซม์ของโฮสต์ แถวล่างเป็นของเชื้อมาเลเรียและแถบเอ็นไซม์ที่มีแถบเดียวขาวมือสุดเป็นของหนูปรกติ แถบของเอ็นไซม์แถวบนและล่างนับจากซ้ายมือคู่ที่ 1 2 3 และ 4 เป็นเอ็นไซม์ที่เตรียมเก็บโดยวิธีที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ . . . . . 51

10 ภาพถ่ายแสดงแถบของเอ็นไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสของเชื้อมาเลเรียและโฮสต์ที่เก็บเอาไว้เป็นเวลา 24 สัปดาห์ แถวบนเป็นแถบของเอ็นไซม์ของโฮสต์ แถวล่างเป็นของเชื้อมาเลเรีย และแถบเอ็นไซม์ที่มีแถบเดียวขวามือสุดเป็นของหนูปรกติ แถบของเอ็นไซม์แถวบนและล่างนับจากซ้ายมือคู่ที่ 1 2 3 และ 4 เป็นเอ็นไซม์ที่ผ่านการเก็บด้วยวิธีที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ . . . . . 52

# รายการแผนภาพประกอบ


| แผนภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แสดงการจัดตั้งเครื่องมือสำหรับอีเล็กโตรฟอรีซิส . . . . | 24 |
| 2 | แสดงวิธีการวิ่งของเอ็นไซม์ในสตาร์ชเจล . . . . . | 23 |
| 3 | แสดงการเกิดฟอร์มาซาน โดยปฏิกิริยารีดักชั่นของ MTT . . | 26 |
| 4 | แสดงการเกิดฟอร์มาซานบนแผ่นเจล . . . . . | 26 |
| 5 | แสดงแถบของเอ็นไซม์ที่ได้จากการทำสตาร์ชเจล-อีเล็กโตรฟอรีซิสของเชื้อมาเลเรียและโฮสต์ที่เป็นกลุ่มควบคุม . . . . . | 53 |


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย