ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd, 1990)

1.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

1. ฟีนอลฟ์ทาลีน อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายฟีนอลฟ์ทาลีน (phenolphthalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (C_2H_5OH) จนได้ปริมาณครบ 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ (methyl rorange) 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลเรด (methyl red) 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่กำจัดอิออนแล้ว จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4 conc.) 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ๆ แล้งเปิดฝาทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) ซึ่งอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หรือที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้งทำให้เย็นในโถดูดความชื้นจำนวน 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ ปิดฝาแล้วทำให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก ต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น(นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร(มิลลิลิตร)ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า N_2= ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า V_2= ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการวิเคราะห์

1.นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ลิตร

2.หยดฟีนอลท์ทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้ผสมกัน

2.1 ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป

2.2 ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกันปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3.

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้ผสมกันจะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ

ความเป็นด่าง(มิลลิกรัม$CaCO_3$ ต่อลิตร) = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ X10

1.2 การวิเคราะห์ค่าแอมโมเนีย

สารเคมี

1.น้ำกลั่นที่ปราศจากแอมโมเนียใช้เตรียมสารละลายและใช้เป็นมาตรฐาน

2.สารละลายกรดไฮโปคลอรัส (Hypochlorous acid reagent) ใช้โซเดียมไฮโปคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นของคลอรอกซ์มากกว่า 1.5 นอร์มอล

3.สารละลายแมงกานัสซัลเฟต (Manganous Sulphate Solution) ละลาย $MnSO_4.2H_2O$ จำนวน 50 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.สารละลายฟีเนต (Phenate reagent) ละลาย NaOH จำนวน 2.5 มิลลิกรัมและฟีนอล (C_6H_5OH) ลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1.เก็บตัวอย่างน้ำมาผ่านกระดาษกรองธรรมดาเบอร์ 4 (whatman No. 4) แล้วนำน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์

2.นำน้ำตัวอย่างจำนวน 20 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดแก้วขนาด 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายแมงกานัสซัลเฟต จำนวน 2 หยด เขย่าให้เข้ากันดี เติมสารละลายไฮโปคลอรัส 1 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเติมสารละลายฟีเนตทันทีจำนวน 1.2 มิลลิลิตร โดยค่อยๆเติมลงไปทีละหยดพร้อมกับการเขย่าแรงๆ สีจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 10 นาที

3.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นที่เติมสารละลายตามข้อ 2 เป็นตัวเปรียบเทียบอ้างอิง (blank)

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน

1.เตรียมสารละลายแอมโมเนีย (Stock ammonia solution) ละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ที่อบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้ว จำนวน 381.9 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรในขวดวัปริมาตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลาย 122 ไมโครกรัมแอมโมเนียต่อ 1 มิลลิลิตร

2.การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย (Standard ammonium solution) เจือจางสารละลายจากข้อ 1 จำนวน 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร1 ลิตรในขวดวัปริมาตร จะได้ความเข้มข้นของสารละลาย 0.50 ไมโครกรัมแอมโมเนียต่อ 1 มิลลิลิตร

3.เตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ระดับต่าง โดยใช้สารละลายในข้อ.2 จำนวน 1, 2, 5, 10, 20 และ 40 มาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะทำให้ได้ความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ 5, 10, 25, 50,100 และ 200 ไมโครกรัมแอมโมเนียต่อลิตรตามลำดับ

4.วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่แอมโมเนียความเข้มข้นต่างๆด้วยวิธีการเดียวกันกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบอ้างอิง (blank)

5.เขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าแอมโมเนียของน้ำตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

1.3 การวิเคราะห์ค่าไนไตรท์

สารเคมี

1.สารละลายซัลฟานิลาไมด์ (Sulphanilamide solution) ละลายสารละลายซัลฟานิลาไมด์จำนวน 5 กรัมลงในกรดไฮโดรคลอริดเข้มข้นจำนวน 50 มิลลิลิตรแล้วค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปจยได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.สารละลายแนปทิลเอทธิลีนไดอะมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (Naphthyl-ethelenediamine dihydrochloride solution) ละลายสารนี้จำนวน 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3.สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ (Nitrite strandard solution) ซั่งโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จำนวน 0.345 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะได้ความเข้มข้น 70 ไมโครกรัมไนโตรเจนต่อ 1 มิลลิลิตร

4.เจือจางสารละลายในข้อ 3 จำนวน 10 มิลลิลิตรให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จะได้ความเข้มข้น 0.7มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 1ลิตร

วิธีวิเคราะห์

1.ตวงน้ำตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตรใส่ขวดลูกชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ในกรณีที่น้ำตัวอย่างขุ่นมากๆควรกรองน้ำด้วยกระดาษกรองก่อนนำมาใช้

2.เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ และ สารละลายแนปทิลเอทธิลีนไดอะมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ อย่างละ 1 มิลลิลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากันดี รอให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ประมาณ 20-30 นาที

3.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้นำกลั่น เติมสารละลายข้อ 2 เป็นตัวเปรียบเทียบอ้างอิง (blank)

วิธีการทำกราฟมาตรฐาน

1.เจือจางสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ที่เตรียมไว้ จำนวน 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 และ 20.0 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นตามลำดับดังนี้คือ 0.0014, 0.007, 0.014, 0.070, 0.14 และ 0.28 มิลลิตร

2.นำสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างมาวิเคราะห์ด้วยวิธีเดียวกันกับน้ำตัวอย่าง

3.นำค่าที่ได้จากข้อ 2มาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าไนไตรท์ของน้ำตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

2. การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนด้วยเทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์
(ตามวิธีการของ Vicker และคณะ, 1993)

2.1 สารเคมี

- เมทานอล
- สีฮีมาท็อกซิลิน และอีโอซิน (Humason, 1972)
- แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์
- ไซลีน
- น้ำยาเปอร์เม้าท์

2.2 วิธีการ

นำตับอ่อนลูกกุ้งมาเกลี่ย (smear) บนสไลด์จากนั้นนำไปอบที่อุณหภมิ 56 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรึงตัวอย่างบนสไลด์ด้วยเมทานอล 5 นาที นำสไลด์แช่ในน้ำประปา 2 นาที แล้วย้อมสีด้วยสีฮีมาท็อกซิลิน 8 นาที นำสไลด์ไปแช่น้ำประปา 4 นาที ย้อมด้วยสีอีโอซิน 4 นาที จากนั้นนำน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วยการแช่ลงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที นำไปแช่ไซลีน (xylene) 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที จากนั้นปิดสไลด์ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การเตรียมตัวอย่างและการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (ตามวิธีการของ Bancroft, 1967)

3.1 สารเคมี

3.1.1น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson 's Fixative)

ฟอร์มาลีน (formalin)	220	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น (acetic acid gracial)	115	มิลลิลิตร
เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	330	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	335	มิลลิลิตร

3.1.2 สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin) (Humason , 1972)

ฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin crystal)	4	กรัม
โซเดียมไอโอเดท (sodium hydrate)	0.8	กรัม
อลัม (potassium aluminium sulfate)	100	กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	4	กรัม
คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200	กรัม
น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

3.1.3 สีย้อมอีโอซิน (eosin)) (Humason , 1972)

อีโอซิน(eosin)	1	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

ใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรที่ภายในมีน้ำยาดองเดวิดสัน ฉีดเข้าสู่ตัวกุ้งบริเวณหัวใจ ตับและตับอ่อน ให้ทั่วทั้งส่วนหัวและอกของกุ้ง จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนเปลือกที่คลุมเหงือกเพื่อให้น้ำยาซึมเข้าสู่เหงือกและอวัยวะภายในได้ดี ดองในน้ำยาดังกล่าวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานาน

3.3 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ขั้นตอนการฝังตัวอย่างลงในพาราฟิน (embeding)

ตบแต่งตัวอย่างให้มีขนาดพอเหมาะ จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
3	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
5	แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์	2
6	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1
7	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1
8	ไซลีน	1
9	ไซลีน	1
10	พาราพลาสท์	1
11	พาราพลาสท์	1

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์แล้วไปทำการฝังตัวอย่างลงในพาราฟิน จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-4 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 35 – 40 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้สไลด์ช้อนตัวอย่างขึ้นมาแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน และนำสไลด์ดังกล่าวไปผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาทอกซิลิน	20
11	น้ำประปา	3
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์	1
18	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีแล้วมาปิดสไลด์ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์และแผ่นกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction : PCR) (ตามวิธีการของ Belcher และ Young,1998)

ตารางผนวก ก ที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction : PCR)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence)
MBV1.4F	5'-CGA TTC CAT ATC GGC CGA ATA-3'
MBV1.4R	5'-TTG GCA TGC ACT CCC TGA GAT-3'
MBV1.4NF	5'-TCC AAT CGC GTC TGC GAT ACT-3'
MBV1.4NR	5'-CGC TAA TGG GGC ACA AGT CTC-3'

ที่มา : Belcher และ Young (1998)

4.1 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบไพรมารี (primary polymerase chain reaction)

1.ดีเอ็นเอรวมของกุ้งที่ติดเชื้อ จะถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบไพรมารี ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้คือ 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH9.0), 0.1% Triton x-100, 0.2mM dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 0.25uM Primer MBV1.4Fและ MBV 1.4R, 2.5 unit Taq ส่วนผสมทั้งหมดนี้จะถูกทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร

2. นำไปทำการเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยเริ่มจากที่ 96 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ 40 รอบ ที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 94°C 30 วินาที, 65°C 30 วินาที และ 72°C 60 วินาที หลังจากเสร็จสิ้นในรอบสุดท้ายแล้วให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

3.นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซิส (gel electrophoresis) ซึ่งจะใช้เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปย้อมด้วยสีเอทธิเดียมโบรไมด์ ในกรณีที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 533 คู่เบสบนเจลดังกล่าว จะทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบเนสเต็ด (Nested PCR)

4.2 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบเนสเต็ด (Nested PCR)

1.ขั้นตอนนี้จะใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนการทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบไพรมารี มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีส่วนผสมดังนี้คือ 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH9.0),

0.1% Triton x-100, 0.2mM dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 0.25uM Primer MBV1.4Fและ MBV 1.4R, 2.5 unit Taq ส่วนผสมทั้งหมดนี้จะถูกทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 ไมโครลิตร

2.นำไปทำการเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิโดยเริ่มจากที่ 96 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ 40 รอบ ที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 94°C 30 วินาที, 65°C 30 วินาที และ 72°C 60 วินาที หลังจากเสร็จสิ้นในรอบสุดท้ายแล้วให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที

3.ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสแบบเนสเต็ด นำไปผ่านขั้นตอนการทำ เทคนิคเจลอิเลคโตรโฟริซิส แล้วนำไปย้อมด้วยสีเอทธิเดียมโบรไมด์ จากนั้ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบนเจล

5. สารเคมีและวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน
(ดัดแปลงจาก สากล, 2544)

สารเคมี

5.1 การเตียมสารละลายคงสภาพและสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer)

สารเคมีและวิธีการ

5.1.1. บัฟเฟอร์โซเดียมคาโคดีเลทความเข้มข้น 0.4 M pH 7.4

โซเดียมคาโคดีเลท (NaCAC)	42.806 กรัม
น้ำกลั่น	500 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคาโคดีเลทในน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องคนสารช่วย ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 7.4และควรเก็บทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้เป็นส่วนผสมของสารละลายคงสภาพและสารละลายรักษาสภาพเนื้อเยื่อในข้อ 4.1.2 และข้อ 4.1.3

5.1.2. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative)

กลูตาราลดีไอด์ ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์โซเดียมคาโคดีเลท (cacodelate buffer)	50	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่น บรรจุในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

5.1.3. สารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ

บัฟเฟอร์โซเดียมคาโคดีเลท ความเข้มข้น 0.4 M	50	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	94	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน บรรจุในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

5.1.4. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นที่สอง (secondary fixative)

5.1.4.1 ออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetraoxide) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ออสเมียมเตตราออกไซด์	4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เติมผลึกออสเมียมเตตราออกไซด์ลงในน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องคนสารช่วยในการผสมหรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องค้างคืนเพื่อให้ผลึกของสารละลายจนหมด ข้อควรระวังในการเตรียมสารชนิดนี้คือจะต้องเตรียมภายในตู้ดูดควันเพื่อป้องกันอันตรายจากไอระเหย

5.1.4.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 M pH 7.3

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (0.2 M) (sodium dihydrogen phosphate)	23	มิลลิลิตร
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (0.2 M) (sodium hydrogen phosphate)	77	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันดีและนำสารละลายนี้ผสมกับออสเมียมเตตราออกไซด์ในข้อ 5.1.4.1 ในอัตรา 1:1 ซึ่งจะได้น้ำยาคงสภาพออสเมียมเตตราออกไซด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บรรจุสารละลายในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

5.2 ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์และใช้สารแทรกในเนื้อเยื่อ (infiltration)

หลังจากที่ดองตัวอย่างในสารละลายออสเมียมเตตราออกไซด์ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างดังกล่าวผ่านขบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอน	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	อะซิโตน 70 เปอร์เซ็นต์	5
2	อะซิโตน 70 เปอร์เซ็นต์	5
3	อะซิโตน 70 เปอร์เซ็นต์	5
4	อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์	5
5	อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์	5
6	อะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์	5
7	อะซิโตน 90 เปอร์เซ็นต์	5
8	อะซิโตน 90 เปอร์เซ็นต์	5
9	อะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์	15
10	อะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์	15
11	อะซิโตน ผสมกับอีปอน-812 ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร	60
12	อะซิโตน ผสมกับอีปอน-812 ในอัตราส่วน 2:3 โดยปริมาตร	60
13	อะซิโตน ผสมกับอีปอน-812 ในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร	60
14	อีปอนบริสุทธิ	ข้ามคืน

เมื่อตัวอย่างผ่านเสร็จสิ้นทุกขั้นตอนจึงนำไปฝังในบล๊อคพลาสติกหรือแคปซูลพลาสติกขนาดเบอร์ตามต้องการ นำตัวอย่างอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการแกะตัวอย่างออกจากบล๊อคและตกแต่งเพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการตัดต่อไป

5.3 การเตรียมอีปอน-812 (epon-812)

สารเคมีและวิธีการ

1. ส่วนผสม A (stock mixture A)

อีปอน-812	62	มิลลิลิตร
โดดีซีนิลซัคซินิคแอนไฮไดรด์ (dodecenyl sucinic anhydride)	100	มิลลิลิตร

2. ส่วนผสม B (stock mixture B)

อีปอน-812	100	มิลลิลิตร
นาดิคเมทธิลแอนไฮไดร์ (nadic methyl anhydride)	89	มิลลิลิตร

ทำการผสมส่วนผสม A และ B แต่ละชนิดให้เข้ากันดีและเก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้ต้องนำมาปรับอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องเสียก่อน จากนั้นนำผสมส่วนผสม A และ B เข้าด้วยกันซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ผสมส่วนผสม A และ B ในอัตราส่วน 3:2 โดยปริมาตร คนให้เข้ากันพยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ

2. ค่อยๆ เติมดีเอ็มพี-30 (2,4,6, tridimethylamino methyl phenol) จำนวน 1 หยดลงในส่วนผสม A และ B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีอีกครั้งและนำไปใช้ได้ทันที กรณีที่ส่วนผสมดังกล่าวเหลือใช้สามารถเก็บในตู้เย็นไว้ใช้ในครั้งต่อไป

5.4 การย้อมสีทูลูดีนบลู (ทูลูดีนบลูความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์)

สารเคมี

ทูลูดีนบลู (toluidine blue)	1	กรัม
บอแรกซ์ (borax)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายทูลูดีนบลูและบอแร็กลงในน้ำกลั่นโดยใช้แท่งแก้วคนหรือใช้เครื่องคนสารช่วยจนกระทั่งละลายหมด ทำการกรองเก็บไว้ในขวดสีชาที่ระดับอุณหภูมิห้อง ข้อควรระวังคือบอแร็กเป็นสารที่ละลายยากดังนั้นควรบดให้ละเอียดก่อนซึ่งจะทำให้ละลายน้ำได้ง่ายขึ้น

วิธีการ

1.นำสไลด์ที่มีตัวอย่างเนื้อเยื่อซึ่งผ่านการตัดแบบหนาด้วยอัลตราไมโครโตมวางบนเตาความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาประมาณ 10 นาที เพื่อให้สไลด์แห้งสนิทแล้วทำการเคลื่อนย้ายลงจากเตา

2. หยดสีทูลูดีนบลูให้ท่วมตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือประมาณ 2-3 หยด โดยใช้เวลา 15-20 นาที

3. ล้างสไลด์ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหรือประปาจนสะอาด และนำวางบนเตาความร้อนอีกครั้งที่อุณหภูมิ 30-35 เซลเซียสและไม่ควรร้อนเกินกว่านี้เพราะจะทำให้แผ่นเนื้อเยื่อตัวอย่างเกิดการหดตัวเป็นรอยย่น เมื่อสไลด์แห้งสนิทจึงทำการเคลือบด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์และนำไปตรวจเช็คด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

5.5 การย้อมยูรานิลอะซิเตทและเลทซิเตรท (ตามวิธีการของ Robinson *et al*., 1987)

สารเคมี

5.5.1 ยูรานิลอะซิเตทความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ยูรานิลอะซิเตท (uranyl acetate)	2	กรัม
น้ำกลั่นต้มและผ่านการกรอง	40	มิลลิลิตร

ละลายยูรานิลอะซิเตทลงในน้ำกลั่นจนกระทั่งผสมเข้ากันดี ทำการกรองสารละลายและบรรจุในขวดสีชาเก็บในตู้เย็น

5.5.2 เลทซิเตรท

เลทซิเตรท(lead citrate)	0.2	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	2	กรัม
น้ำกลั่นต้มและผ่านการกรอง	50	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในน้ำกลั่น แล้วค่อยๆ เติมเลทซิเตรทลงไปผสมให้เข้ากันดี ทำการกรองและบรรจุในขวดแก้วที่สะอาด ปิดฝาให้มิดชิดเก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนนำไปใช้จะต้องกรองตะกอนออกทุกครั้ง

5.5.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.02 M

โซเดียมไฮดรอกไซด์	0.8	กรัม
น้ำกลั่นต้มและผ่านการกรอง	1000	มิลลิลิตร

วิธีการ

1. หยด 5 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิลอะซิเตทลงบนแผ่นพาราฟิลม์ (parafilm) หรือแผ่นขี้ผึ้งที่สะอาด ขนาดหยดควรจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิลิตร

2. นำกริดทีมีแผ่นตัวอย่างเนื้อเยื่อมาลอยบนผิวของหยดยูรานิลอซิเตทโดยให้ด้านที่มีตัวอย่างคว่ำลง

3. ใช้ภาชนะทึบแสงปิดบริเวณแผ่นพาราฟิลม์หรือแผ่นขี้ผึ้งทีมีสารละลายยูรานิลและกริดลอยอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

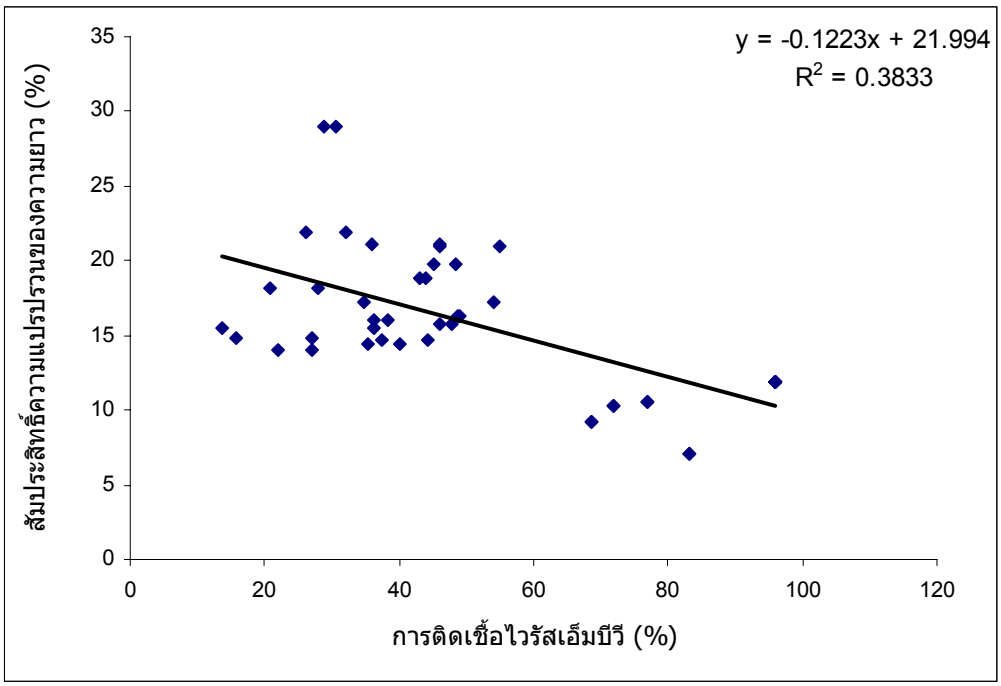
4. ใช้ปากคีบปลายแหลมจับกริดและจุ่มในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มและกรองแล้วเพื่อล้างสารละลายยูรานิลอซิเตทออกโดยใช้เวลา 30 นาที (ประมาณ 10-15 จุ่ม)

5. ทำการย้อมเลทซิเตรทโดยการนำกริดจุ่มในหยดของสารละลายที่มีเกล็ดของโซเดียมไฮดรอกไซด์วางอยู่ใกล้ๆ เพื่อช่วยดูดซับคาร์บอนไดออกไซด์ในบริเวณนั้น ปิดหยดสารละลายด้วยฝาของจานเพาะเชื้อ

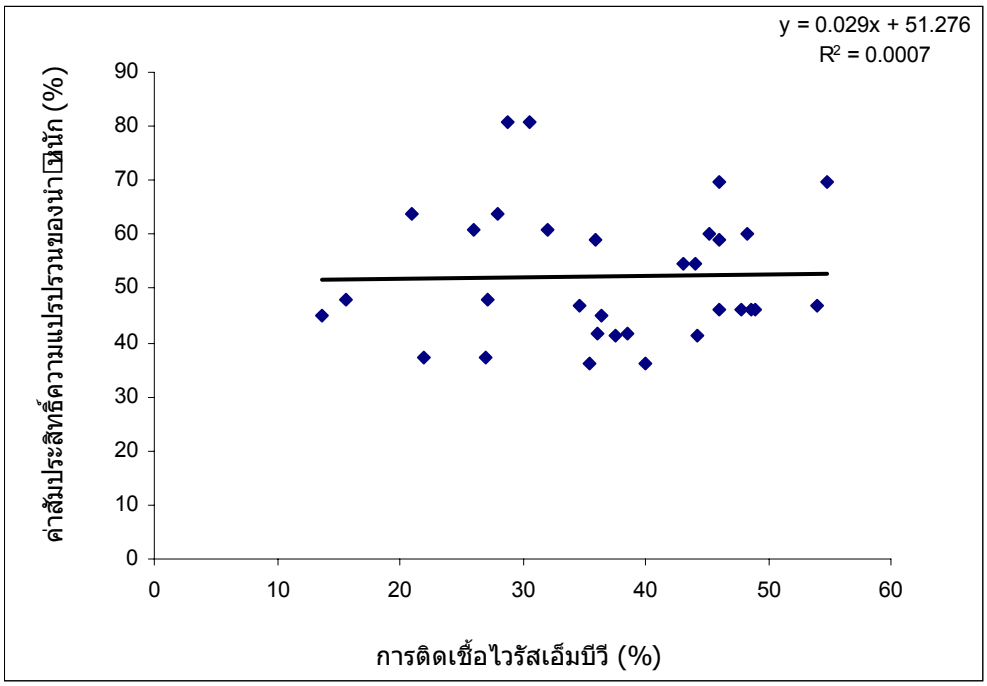
6. ล้างกริดด้วย 0.02 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ประมาณ 30 วินาที จากนั้นทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มและกรองแล้ว 2-3 ครั้งๆละ 10 จุ่ม ซับให้แห้งและนำไปศึกษารายละลายละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

ข้อควรระวัง คือ ห้ามผ่านลมหายใจเข้าสู่บริเวณหยดสารละลายที่ใช้ย้อมเนื้อเยื่อเพราะจะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไอดรอกไซด์เกิดเป็นตะกอนของโซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicabornate) ตกค้างบนตัวอย่างหรือกริด

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางสถิติ



ภาพผนวก ข ที่ 1 แสดงแผนภาพการกระจาย ค่าความถดถอยเชิงเส้นตรงและสหสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของความยาวตัวกุ้งกุลาดำและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อตลอดการศึกษา



ภาพผนวก ข ที่ 2 แสดงแผนภาพการกระจาย ค่าความถดถอยเชิงเส้นตรงและสหสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวตัวกุ้งกุลาดำและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อตลอดการศึกษา

ตารางภาคผนวก ค ที่ 8 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลองที่ 3

	สัปดาห์ 0-2			สัปดาห์ 2-4			สัปดาห์ 4-6		
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	21.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	20.5 ± 0.7	23.5 ± 0.7	21.0 ± 0.0	21.5 ± 0.7	20.5 ± 0.7	20.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.78 ± 0.15	7.82 ± 0.01	7.79 ± 0.01	7.70 ± 0.00	7.60 ± 0.06	7.70 ± 0.00	7.86 ± 0.04	7.61 ± 0.01	7.77 ± 0.06
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)	61.50 ± 2.12	66.00 ± 1.41	61.50 ± 2.12	73.50 ± 0.00	62.00 ± 0.71	63.00 ± 1.41	52.00 ± 2.83	43.75 ± 1.06	43.25 ± 1.06
แอมโมเนีย (มิลลิกรัม NH_3 ต่อลิตร)	0.06 ± 0.03	0.10 ± 0.08	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.00
ไนไตรท์ (มิลลิกรัม N ต่อลิตร)	0.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.01± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01

ตารางภาคผนวก ค ที่ 9 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลองที่ 3 (ต่อ)

	สัปดาห์ 6-8			สัปดาห์ 8-10		
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	21.0 $\pm$ 0.0	20.0 $\pm$ 0.0	20.5 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 0.0	20.0 $\pm$ 0.0	20.0 $\pm$ 0.0
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.81 $\pm$ 0.04	7.53 $\pm$ 0.05	7.74 $\pm$ 0.03	7.73 $\pm$ 0.05	7.52 $\pm$ 0.08	7.76 $\pm$ 0.01
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)	49.50 $\pm$ 0.71	40.25 $\pm$ 0.35	43.50 $\pm$ 0.71	56.25 $\pm$ 1.06	47.00 $\pm$ 1.41	52.25 $\pm$ 3.89
แอมโมเนีย (มิลลิกรัม NH_3 ต่อลิตร)	0.06 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.13	0.05 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01
ไนไตรท์ (มิลลิกรัม N ต่อลิตร)	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.38	0.00 $\pm$ 0.00

ตารางภาคผนวก ค ที่ 10 ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำระหว่างช่วงการทดลองที่ 3

	สัปดาห์ 0-2			สัปดาห์ 2-4			สัปดาห์ 4-6		
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
ความเค็ม (ส่วนในพันส่วน)	15.0 $\pm$ 0.0	15.0 $\pm$ 0.0	15.0 $\pm$ 0.0	15.0 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.0	15.5 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.0	15.5 $\pm$ 0.7
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	7.80 $\pm$ 0.05	7.77 $\pm$ 0.06	7.74 $\pm$ 0.03	8.07 $\pm$ 0.01	7.90 $\pm$ 0.01	7.93 $\pm$ 0.00	8.02 $\pm$ 0.04	7.90 $\pm$ 0.05	7.91 $\pm$ 0.00
ความเป็นด่าง (มิลลิกรัม $CaCO_3$ ต่อลิตร)	58.50 $\pm$ 0.71	57.25 $\pm$ 1.77	59.50 $\pm$ 1.41	67.75 $\pm$ 3.18	60.25 $\pm$ 1.77	60.50 $\pm$ 0.71	65.75 $\pm$ 3.18	53.00 $\pm$ 1.41	57.00 $\pm$ 1.41
แอมโมเนีย (มิลลิกรัม NH_3 ต่อลิตร)	0.18 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.12	0.26 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
ไนไตรท์ (มิลลิกรัม N ต่อลิตร)	0.19 $\pm$ 0.00	0.63 $\pm$ 0.32	0.54 $\pm$ 0.32	0.64 $\pm$ 0.08	1.36 $\pm$ 0.73	1.27 $\pm$ 0.35	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.10