# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

## วัสดุ

### สัตว์ทดลอง

1. ปลาดุกพันธุ์ผสม น้ำหนักประมาณตัวละ 80-100 กรัม จากฟาร์มเลี้ยง อ.สิงหนคร จ. สงขลา
2. กระต่าย
3. ปรสิต *Trypanosoma sp.* จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

### อาหารสัตว์ทดลอง

1. ใช้อาหารเม็ดปลาดุกสำเร็จรูป ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 30
2. ใช้อาหารเม็ดกระต่ายสำเร็จรูป

### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

| ชื่อสารเคมี | Molecular weight | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| Acrylamide | 71.1 | Merck |
| Agarose gel | - | Gibco BRL |
| Albumin | 67,000 | Merck |
| Ammonium chloride ($NH_4Cl$) | 53.492 | Merck |
| Ammonium nitrate ($NH_4NO_3$) | 80.04 | BDH |
| Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$ | 228.20 | Sigma |
| Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$ | 132.14 | Riedel de Haën |

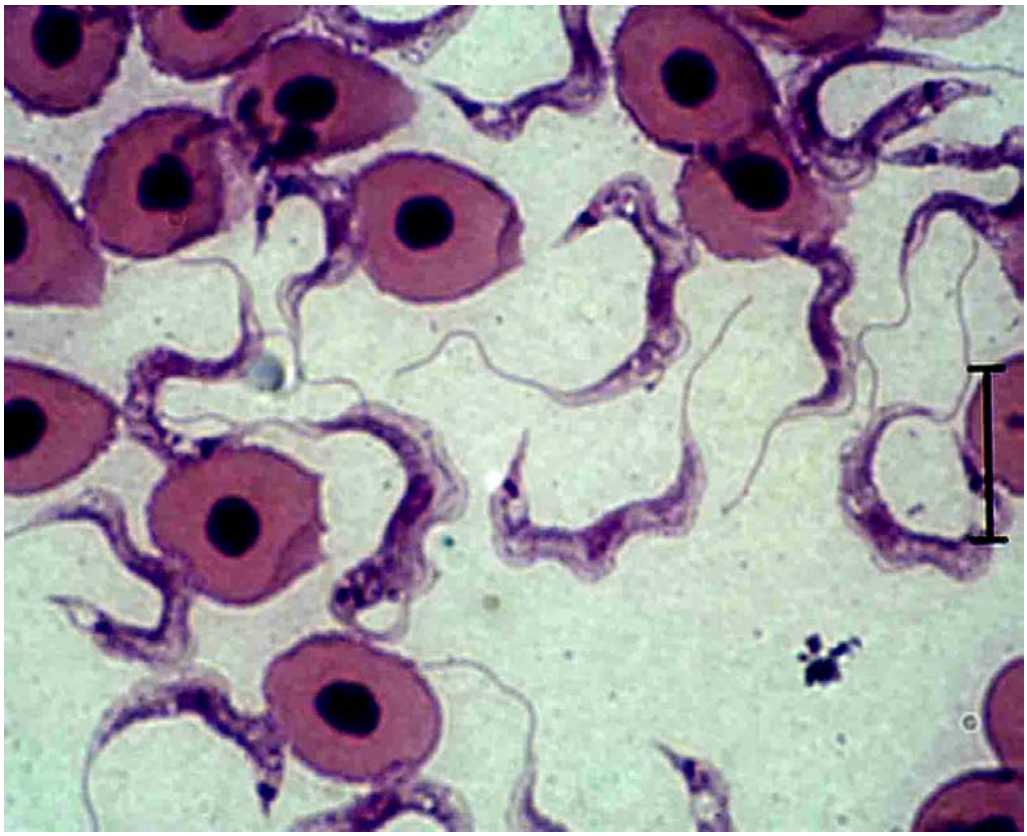
| ชื่อสารเคมี | Molecular weight | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| Anhydrous sodium sulfate ($Na_2SO_4$) | 142.04 | Carlo erba |
| Arabinose ($C_5H_{10}O_5$) | 150.1 | Sigma |
| Bis-acrylamide | - | Merck |
| Bovine serum albumin (BSA) | 67,000 | Fluka |
| Bromophenol blue | 669.99 | Fluka |
| 4-chloro-1-Naphthol | - | Sigma |
| Chymotrypsinogen A | 25,000 | Merck |
| Complete Freund's & Incomplete Freund's adjuvant | - | Difco |
| Coomassie brilliant blue R250 | - | Merck |
| Dextrose | - | Difco |
| Dipotassium hydrogen orthophosphate ($K_2HPO_4$) | 174.18 | Merck |
| Ethanol ($C_2H_2OH$) | 46.07 | BDH |
| Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) | 372.24 | Fluka |
| Formalin | | |
| Glacial acetic acid | 60.05 | Merck |
| Glucose ($C_6H_{12}O_6$) | 180.2 | Sigma |
| Glycerol ($C_3H_8O_3$) | 92.09 | BDH |
| Glycine ($C_2H_5NO_2$) | 75.07 | Fluka |
| Hydrochloric acid (HCl) | 36.46 | Merck |
| Hydrogenperoxid ($H_2O_2$) | - | วิทยาศรม |
| Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) | 245.48 | BDH |
| Methanol | 32.04 | BDH |
| Methyl violet | - | BDH |
| N, N',N',N, tetramethylenediamine (TEMED) | 116.2 | Promega |
| Ovalbumin | 43,000 | Merck |

| ชื่อสารเคมี | Molecular weight | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---|---|
| Percoll | - | Sigma |
| Permount | - | Fisher |
| Phosphoric acid ($H_3PO_4$) | 98.00 | Sigma |
| Potassium chloride (KCl) | 74.56 | Merck |
| Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) | 294 | Sigma |
| Potassium dihydrogen orthophosphate ($KH_2PO_4$) | 136.09 | Merck |
| Pyronin B | - | - |
| Ribonuclease A | 13,700 | Merck |
| Sodium azide ($NaN_3$) | 65.01 | Riedel de Haën |
| Sodium chloride (NaCl) | 58.443 | Carlo Erba |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | 288.40 | Sigma |
| Sodium hydroxide (NaOH) | 40 | Merck |
| Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) | 84.01 | Riedel de Haën |
| Sulfuric acid ($H_2SO_4$) | 98.08 | LAB-SCAN |
| Tris (hydroxymethyl) aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) | 121.114 | Promega |
| Triton X-100 | - | Fluka |
| Tween-20 | - | Merck |

## อุปกรณ์

1. ตู้กระจกขนาด 30x120x38 เซนติเมตร (กว้างxยาวxสูง) ปิดด้านข้างและด้านหลังตู้กระจกทดลองด้วยแผ่นพลาสติกสีทึบทั้ง 3 ด้าน เพื่อลดการรบกวนปลาทดลองจากภายนอก
2. อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย
3. อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม (submesible pump)
4. อุปกรณ์ในการจับปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ถังน้ำ
5. กรงใส่กระต่าย

6. เข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA)
7. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer)
8. กล้องจุลทรรศน์ ของ Olympus, Japan
9. ที่เจาะวุ้น
10. microtiter plate U-shape
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แบบแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น RC 5C ของ Sorvall Instruments ( Dupont, Korea) และ Beckman รุ่น Avanti $^{TM}$ 30, USA.
12. เครื่องหมุนเหวี่ยง (eppendorf centrifuge), Brinkman Instruments Inc., USA.
13. ตู้เย็น ของ Sanyo, Japan และตู้แช่แข็ง ของ Sanyo, Japan
14. เครื่องสั่นความถี่สูง (sonicator) รุ่น 450 ของ Branson Sonifier
15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV-1200 series ของ SHIMADZU, Japan.
16. ไมโครปิเปต (micropipette) และ multichannel micropipette ของ Eppendorf, Germany
17. rotator ของ Stovall life science incorporate (Greensboro NC U.S.A)
18. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น Shel-lab Model 1235 ของ Sheldom Manufacturing, Inc.
19. เครื่อง hot plate & stirrer ของ Fisher Scientific, U.S.A
20. เครื่อง suction รุ่น A-3S ของ EYELA Aspirator
21. ชุดทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis unit) ของ Bio-Rad, U.S.A
22. เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงสำหรับอิเล็กโทรฟอรีซิส (power supply) รุ่น 1000/500 ของ Bio-Rad, U.S.A
23. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ของ Scientific Industries Inc., U.S.A
24. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-320 ของ Tomy, U.S.A
25. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่งรุ่น FA-200 ของ AND, Japan
26. เครื่องวัด pH (pH meter) รุ่น 713 ของ Metrohm, Switzerland
27. ตู้อบร้อน (hot air oven) ของ Heraeus GmbH, Germany
28. เครื่อง ultrasonic cleaner รุ่น 2200E3, Branson, Germany

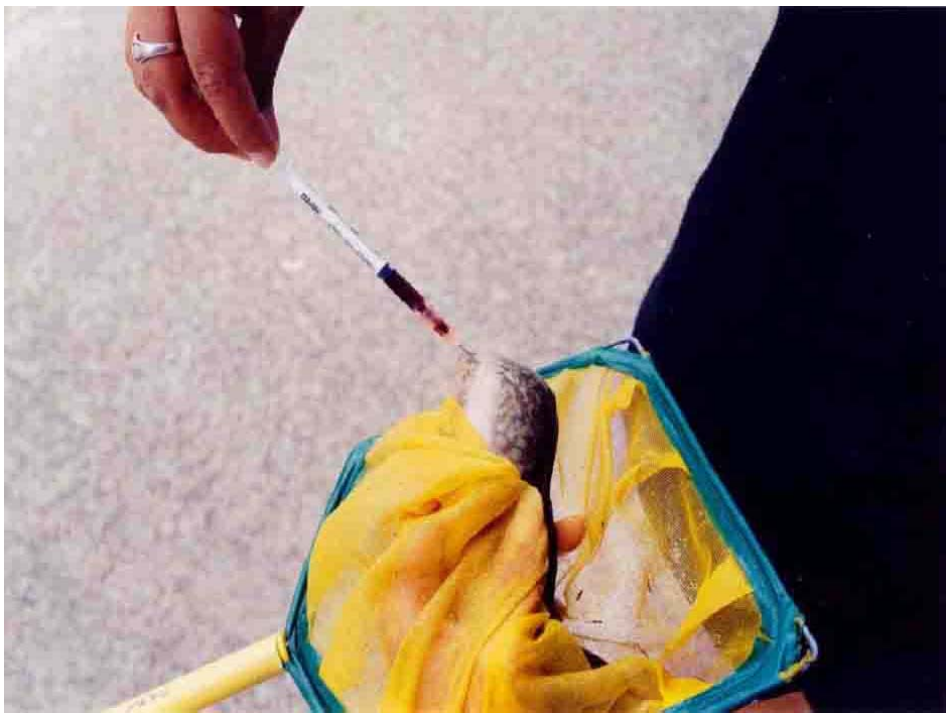


**รูปที่ 4** ปรสิต *Trypanosoma sp.* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

## วิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่าง *Trypanosoma sp.* เพื่อเป็นแอนติเจน และใช้ infection

คัดเลือกปลาดุกพันธุ์ผสมให้ได้ขนาดที่เหมาะสมคือ ปลาควรมีน้ำหนักประมาณ 80-100 กรัม อายุประมาณ 1 เดือนครึ่ง ฉีดเชื้อปรสิต trypanosome เข้าทางช่องท้องใกล้บริเวณครีบท้อง หลังจากฉีดเชื้อปรสิตประมาณ 2 วัน ให้ตรวจสอบว่าเกิดการติดเชื้อหรือไม่ โดยเจาะจากเส้นเลือดบริเวณกระดูกสันหลังตรงบริเวณใกล้หาง (รูปที่ 5) ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25 G ซึ่งในกระบอกฉีดยา (syringe) มี EDTA 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว แล้วนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าตรวจพบว่าปริมาณ trypanosome ในกระแสเลือดมีมาก ($10^7$-$10^8$ ตัว/มิลลิลิตร) ให้ต่อเชื้อโดยเจาะเลือดจากปลาที่ติดเชื้อแล้วนำไปฉีดให้ปลาปกติ และเก็บเลือดปลาเพื่อนำไปแยกเชื้อออกจากกระแสเลือดเพื่อเตรียมเป็นแอนติเจนต่อไป พร้อมทั้งนับจำนวนปรสิตด้วย ฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับให้มีจำนวน $1x10^7$ และ $1x10^5$ ตัว/มิลลิลิตร โดยใช้บัฟเฟอร์ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 เป็นตัวเจือจาง (diluent)



**รูปที่ 5** บริเวณที่เจาะเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสม

**2. การเตรียมตัวอย่างปลาสำหรับการทดลอง**

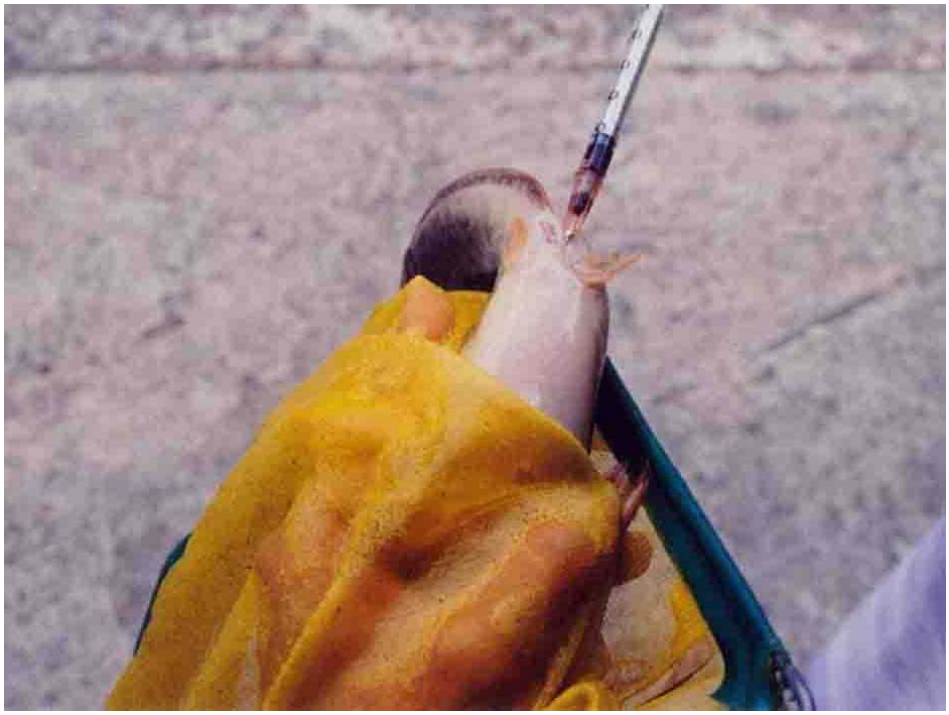
นำปลาดุกที่ซื้อมาจากฟาร์มเลี้ยงมาพักไว้ในบ่อพักประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพสัตว์ทดลอง ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง เมื่อครบกำหนดคัดเลือกปลาดุกขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 100 กรัมใส่ในตู้ทดลอง ตู้ละ 1 ตัว แต่ละตู้จะมีการให้ออกซิเจน ก่อนเริ่มทดลอง 1 วัน ตรวจสอบปลาทดลองทุกตัวว่าไม่มีปรสิต trypanosome อยู่ในกระแสเลือด โดยเจาะเลือดปลาทุกตัวมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างซีรัมไว้เป็นกลุ่มควบคุม (negative control)

แบ่งปลาออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 10 ตัวดังนี้

1. กลุ่มควบคุม ฉีดด้วย PBS (pH 7.2)
2. กลุ่มที่ได้รับแอนติเจน
3. กลุ่มที่ได้รับแอดจูแวนท์
4. กลุ่มที่ได้รับแอนติเจนผสมแอดจูแวนท์

**3. ศึกษาการเพิ่มจำนวนของปรสิตในปลาดุกพันธุ์ผสม และหาจำนวนปรสิตที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง**

นำปรสิต trypanosome ที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาฉีดให้แก่ปลาดุกพันธุ์ผสมบริเวณช่องท้องจำนวน 10 ตัว (รูปที่ 6) ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเจาะเลือดปลาทุก 1 ชั่วโมง จนพบ trypanosome ในกระแสเลือด บันทึกอัตราการตายทุกวัน และเลือกปริมาณปรสิตที่ทำให้ปลาตายน้อยกว่าร้อยละ 50 พร้อมทั้งนับจำนวนปรสิตทุกๆ 2 วัน เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของ trypanosome ในตัวปลา



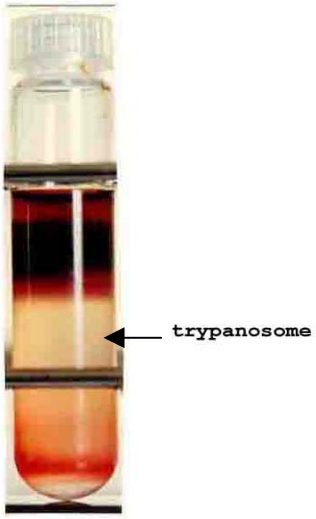
**รูปที่ 6** บริเวณที่ฉีดปรสิต trypanosome ให้แก่ปลาดุกพันธุ์ผสม

**4. การแยกปรสิต trypanosome เพื่อใช้ในการทดลอง**

การแยกปรสิต trypanosome ใช้วิธีการแยก 2 วิธีคือ

**4.1 โดยใช้ Percoll**

เตรียมสารละลาย Percoll ในน้ำเกลือ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นของ Percoll 60 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่น (centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 37,470 g (21,000 รอบต่อนาที (rpm)) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเลือดปลาที่มีปรสิตหยดในสารละลาย Percoll ซึ่งจะต้องทำอย่างระมัดระวังคือ หยอดเลือดปลาอย่างช้าๆ ทีละหยดเพื่อไม่ให้เลือดลงไปอยู่ชั้นล่าง หลังจากนั้นนำไปปั่นโดยใช้ swing out roter ที่แรงเหวี่ยง 966 g (3,000 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เม็ดเลือดปลาจะแยกชั้นออกจากปรสิต ดังแสดงในรูปที่ 7 แล้วใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดชั้นของปรสิตออกมาแล้วนำไปปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.2) จำนวน 3 ครั้ง เก็บปรสิตในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส




**รูปที่ 7** ปรสิต trypanosome ที่แยกได้จากการใช้สารละลาย Percoll

**4.2 โดยการปั่น**

เจาะเลือดปลาที่ได้รับเชื้อปรสิต ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว (clot) นำไปปั่นที่แรงเหวี่ยง 966 g (3,000 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เม็ดเลือดจะแยกชั้นออกจากปรสิต ใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดชั้นปรสิตที่อยู่บนชั้นเม็ดเลือดแดง นำไปปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.2) จำนวน 3 ครั้ง และเก็บปรสิตในสารละลาย PBS (pH 7.2) ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เตรียมเป็นแอนติเจนต่อไป

**5. การเตรียมแอนติเจน**

**5.1 ใช้ความร้อน** (heat-killed antigen)

นำเชื้อปรสิตที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย แล้วนำไปปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.2) 1 ครั้ง ปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{660}$) เท่ากับ 0.644 (Mc Farland No.3) ด้วยสารละลาย PBS นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

**5.2 Sonicated antigen**

นำเชื้อปรสิตที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.2) 1 ครั้ง เติมสารละลาย PBS ปริมาณเท่ากับปรสิต นั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียง (sonicator) โดย sonicate ที่ Duty cycle 20, Output control 60 เป็นเวลา 20 นาที

แล้วทำการปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{660}$) เท่ากับ 0.644 และ1.301 (2 เท่าของ Mc Farland No.3)

**5.3 supernatant antigen**

เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 5.2 แต่เมื่อ sonicate เสร็จแล้วให้นำไปปั่นที่แรงเหวี่ยง 37,470 g (21,000 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ส่วนใสข้างบนที่ได้คือ supernatant antigen

## 6. การเก็บซีรัม (serum)

ใช้เข็มขนาด 25 G ทำการเจาะเลือดปลาประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่แรงเหวี่ยง 966 g (3,000 รอบต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสข้างบนที่ได้คือ ซีรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

การเก็บซีรัมแบ่งได้เป็น ก่อนทดลอง หลังจากปลาได้รับแอนติเจน 1 สัปดาห์ และหลังจากปลาได้รับปรสิต trypanosome ทุกๆ 2 วัน (1, 3, 5, 7, 9, ……., ไม่พบปรสิตในกระแสเลือด) หลังจากไม่พบปรสิตในกระแสเลือด 1 สัปดาห์ และหลังจากการฉีดซ้ำ (rechallenge)

## 7. การทำ blood smear

นำเลือดปลาดุกพันธุ์ผสมก่อนทดลองและหลังจากได้รับสารทดสอบ 1 สัปดาห์ หยดลงบนสไลด์ที่สะอาดประมาณ 1 หยด แล้วใช้ปลายสไลด์ด้านที่มีขอบเรียบไถเลือดที่หยดไว้ไปตามรอยสไลด์ (ทำอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเลือดอาจแห้งติดสไลด์) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาย้อมด้วยสี Giemsa stain จากนั้นทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและนับจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาที่ทำการทดลองทั้ง 4 กลุ่ม

## 8. การสร้างภูมิคุ้มกัน

การทดลองที่ 1 นำ heat-killed antigen ผสมกับ β-glucan ซึ่งใช้เป็นแอดจูแวนท์ ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำไปฉีดให้แก่ตัวปลาบริเวณกล้ามเนื้อ ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับแอนติเจน และกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนผสมแอดจูแวนท์

การเตรียมแอนติเจนเพื่อใช้ในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยนำ sonicated antigen ที่เตรียมได้ส่วนหนึ่งมาผสมกับแอดจูแวนท์ โดยแอดจูแวนท์ที่ใช้ได้แก่ Complete Freund's adjuvant และ Incomplete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยส่วนผสมที่ได้จะต้องมีลักษณะ immersion-in-oil ทดสอบโดยเมื่อหยดลงไปในน้ำเย็นแล้วสารผสมนั้นไม่แตกกระจายทำให้น้ำขุ่น แต่หยดแรกที่หยดอาจแตกแต่หยดที่สองจะต้องไม่แตกกระจาย

เมื่อได้สารผสมตามที่ต้องการแล้ว นำไปให้ตัวปลาโดยวิธีการฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อ โดยฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร แบ่งฉีด 2 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยสัปดาห์ที่ 1 ใช้แอนติเจนผสมกับ Complete Freund's adjuvant และสัปดาห์ที่ 2 ใช้แอนติเจนผสมกับ Incomplete Freund's adjuvant

การทดลองที่ 3 เตรียมเหมือนครั้งที่ 2 แต่แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับแอนติเจน กลุ่มที่ได้รับแอดจูแวนท์ และกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนผสมแอดจูแวนท์

## 9. ทดสอบความสามารถในการกำจัดเชื้อปรสิต (*in vivo* test)

หลังจากปลาได้รับการฉีด PBS แอนติเจน (heat-killed หรือ sonicated) แอดจูแวนท์ และแอนติเจนผสมแอดจูแวนท์ ครบตามที่กำหนดไว้ จากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดปรสิต trypanosome เข้าบริเวณช่องท้อง ให้แก่ปลาทุกกลุ่มทดลอง ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (มีปรสิตจำนวน $1.0X10^5$ ตัว/มิลลิลิตร) และตรวจนับปริมาณปรสิตในตัวปลาทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งปรสิตหมด แล้วทำการฉีดเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง (reinfection)

**10. การทำ Phagocytosis (*in vitro* test)**

**10.1 การเลี้ยง *Candida albicans***

ถ่ายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextose agar (PDA) ซึ่งเป็น stock นำ stock ที่มีอยู่มา 1-2 loop ถ่ายลงใน potato dextrose broth (PDB) 50 มิลลิลิตร เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างใน PBS (pH7.2-7.4) 3 ครั้ง แล้วเติม DPBs ผสม 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคส (glucose) เทียบกับ Mc Farland No.3

**10.2 เตรียมเม็ดเลือดขาว**

นำเลือดปลาหลังจากได้รับสารทดสอบ 1 สัปดาห์ของทุกกลุ่มทดลองมาปั่นที่ 3,023 g (6,500 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาว (จะติดเม็ดเลือดแดงมาด้วย) ใส่ในหลอดที่มี DPB ผสม 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคส ปั่นล้างที่ 72 g (1,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดน้ำส่วนบนออก

นำตะกอนก้นหลอดมาเติมด้วย DPB ผสม 1 เปอร์เซ็นต์กลูโคส ทำเป็น suspension ให้ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ดูดใส่หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมซีรัมปลา 0.2 มิลลิลิตร และ *C.albicans* 0.5 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้ แบ่งมา 10 ไมโครลิตร นำมา smear ลงบนสไลด์ในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร (ตีตาราง สี่เหลี่ยมจัตรัส กว้าง 1 เซนติเมตร x ยาว 1 เซนติเมตร) แล้วย้อมด้วยสี wright's stain นับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการจับกินเกิดขึ้น แล้วคำนวณตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการจับกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด}} \times 100$$

**11. หาปริมาณแอนติบอดีของปลาต่อเชื้อปรสิตภายหลังการได้รับแอนติเจน**

**11.1 วิธี Passive heamagglutination** (ดัดแปลงจาก เบญจะ, 2528)

**การเตรียมเม็ดเลือดแดงแกะ**

นำเม็ดเลือดแดงแกะ (SRbc) ในสารละลาย Alsever's มาล้างในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง (966g หรือ 3,000 รอบต่อนาที 5 นาที) นำ packed Rbc ปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ packed Rbc 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ PBS (pH 7.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม glutaraldehyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติมทีละนิด พร้อมทั้งเขย่าไปด้วย แล้วนำไปเขย่า (rotate) บน rotator ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมา

ล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง เก็บใน PBS (pH 7.2) ที่มี $NaN_3$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ Fixed cell เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

**การเตรียมแอนติเจนสำหรับเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะ**

นำปรสิตที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย ปั่นล้างด้วย PBS (pH 7.2) 1 ครั้ง ตามด้วย PBS (pH 6.4) 3 ครั้ง เติมสารละลาย PBS (pH 6.4) ลงไปในปริมาตรที่เท่ากันกับปรสิต (1:1) ทำให้เซลล์ปรสิตแตกโดยใช้เครื่อง sonicator โดย sonicate ที่ Duty cycle 20, Output control 60 เป็นเวลา 20 นาที นำมาเจือจาง 1 เท่าด้วย PBS (pH 6.4)

นำ 10 เปอร์เซ็นต์ Fixed cell ที่เก็บรักษา (preserve) ด้วย glutaraldehyde ผสมกับกรดแทนนิค (tannic acid) 1:20,000 (ใน PBS (pH 7.2)) ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เขย่าตลอดเวลา เมื่อครบเวลานำไปล้างใน PBS (pH 6.4) 2 ครั้ง แล้วเตรียมเคลือบด้วย sonicated antigen ต่อไป

**การเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจน**

ทำเม็ดเลือดแดงแกะที่ผ่านกรดแทนนิคให้เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ใน PBS (pH 6.4) นำมาเติม sonicated antigen ที่ละลายใน PBS (pH 6.4) ในปริมาตร 1 ใน 4 ของปริมาตรเม็ดเลือดแดงแกะ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที เขย่าตลอดเวลา นำมาปั่นล้างใน PBS (pH 7.2) จำนวน 1 ครั้ง resuspend เม็ดเลือดแดงแกะที่เคลือบ ด้วย sonicated antigen ให้เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ใน PBS (pH 7.2) ที่มี BSA 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ sodium azide 0.1 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ control unsensitized แบบเดียวกัน แต่ไม่ใส่แอนติเจน

ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ โดยนำเลือดปลาตัวอย่างมาแยกซีรัม นำซีรัมที่ได้มาเจือจางในอัตราส่วน 1:2 1:4 1:16 1:32 1:64 1:128…..(two-fold dilution) แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงแกะที่เตรียมไว้ข้างต้นในอัตราส่วน 1:1 (50 ไมโครลิตร : 50 ไมโครลิตร) ตรวจปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่เกิดขึ้น บันทึกเป็นค่าไตเตอร์ที่ได้ของปลาแต่ละตัว

**11.2 โดยวิธี** Dot–blot ELISA

หยดแอนติเจน (sonicated และ supernatant) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) แล้วทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสใส่ใน microplate เติม Bovine Serum Albumin (BSA) 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปวางบน rotator เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย Tris buffer saline solution (TBS) 4 ครั้ง เติมแอนติบอดี (ซีรัมกระต่าย หรือ ซีรัมปลา) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปวางบน rotator 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS 6 ครั้ง Triton X–100 ใน TBS 3 ครั้ง (อย่าแช่นาน) หลังจากนั้นล้างด้วย Tween–20

ใน TBS 3 ครั้ง เติมคอนจูเกต (horse radish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG) 1:5000 ใน TBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร วางบน rotator นาน 30 นาที นำมาล้างด้วย TBS 4 ครั้ง Triton X–100 ใน TBS 3 ครั้ง และ Tween–20 ใน TBS 3 ครั้ง เติม 4-cloro-1-Naphthol (Substrate) 150 ไมโครลิตร แช่ทิ้งไว้จนเกิดสี (ปิด foil ไว้ไม่ให้โดนแสง) หลังจากที่เกิดสี (สีม่วงคราม) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง ห่อ foil เก็บไว้

## 12. **การผลิต** Polyclonal antibody

ได้ทำการทดลอง 2 ครั้ง คือ

ครั้งที่ 1 นำ sonicated antigen ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.644 ผสมกับ complete and incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 นำไปฉีดกระต่ายบริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous) สัปดาห์แรกให้ sonicated antigen ที่ผสม complete adjuvant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสัปดาห์ที่ 2 ฉีด sonicated antigen ที่ผสมกับ incomplete adjuvant ในปริมาตรเท่ากัน หลังจากกระตุ้น (immunized) กระต่ายครบ 3 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดกระต่ายทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 2 สัปดาห์

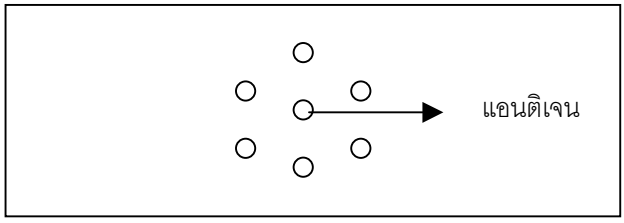
ครั้งที่ 2 นำ sonicated antigen ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.301 ผสมกับ complete and incomplete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดกระต่าย แต่ทำการฉีดกระตุ้น 3 ครั้ง คือ ครั้งแรกฉีดด้วย sonicated antigen ที่ผสม complete adjuvant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้น สัปดาห์ที่ 2 และ 3 ฉีด sonicated antigen ที่ผสมกับ incomplete adjuvant ในปริมาตรที่เท่ากัน หลังจากนี้ 1 สัปดาห์ เจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์

โดยนำเลือดกระต่ายที่เจาะได้มาวางไว้ให้เลือดแข็งตัว (clot) นำไปปั่นแยกซีรัมด้วยความเร็ว 966 g (3000 รอบต่อนาที) ดูดส่วนใส (ในที่นี้คือ ซีรัม) เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบโดยวิธี Ouchterlony และ Dot-blot ELISA ต่อไป

### 12.1 **โดยวิธี** Ouchterlony

ละลายวุ้น (agarose) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ต้มให้หลอมเหลวในน้ำเดือด แล้วอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส นำวุ้นปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร เทลงบนสไลด์ที่วางบนพื้นเรียบทิ้งให้แข็งตัว เจาะวุ้นเป็น 6 หลุม หลังจากนั้นใส่แอนติเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ไม่เจือจาง (undilute) 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 ในปริมาณ 10 ไมโครลิตร และแอนติบอดีที่ความเข้มข้นเดียวกับแอนติเจนในปริมาณ 10 ไมโครลิตรเท่ากัน ตามหลุมที่ต้องการ แล้วนำไปวางไว้ใน

moisture chamber ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ดูเส้นตะกอน (precipitation band) ที่เกิดขึ้น




**12.2 การตรวจหาแอนติเจนของปรสิต trypanosome โดยวิธี Dot–blot ELISA**

หยดซีรัมปลากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ฉีดแอนติเจน แต่ได้รับการฉีดด้วยปรสิตที่มีชีวิต ในระยะก่อนทดลอง เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม และระยะที่ตรวจไม่พบปรสิตในกระแสเลือด ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 ความเจือจางละ 3 ไมโครลิตร ลงในแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ซึ่งตัดเป็นวงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสใส่ใน microplate เติม Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางบน rotator เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย Tris buffer saline solution (TBS) 4 ครั้ง เติมซีรัมกระต่าย ที่มีค่าแอนติบอดี 1:80 หลุมละ 100 ไมโครลิตร วางบน rotator 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBS 6 ครั้ง Triton X–100 ใน TBS 3 ครั้ง (อย่าแช่นาน) และ Tween–20 ใน TBS 3 ครั้ง แล้วเติมคอนจูเกต (horse radish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG) 1:5000 ใน TBS ปริมาณ 150 ไมโครลิตร วางบน rotator นาน 30 นาที นำมาล้างด้วย TBS 4 ครั้ง Triton X–100 ใน TBS 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย Tween–20 ใน TBS 3 ครั้ง เติม 4-cloro-1-Naphthol (Substrate) 150 ไมโครลิตร แช่ทิ้งไว้จนเกิดสี (ปิด foid ไว้ไม่ให้โดนแสง) หลังจากที่เกิดสี (สีม่วงคราม) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้ง ห่อ foid เก็บไว้

**13..การทดสอบหาลักษณะของปรสิต trypanosome โดยวิธี SDS-PAGE**

**(Sodium dodecyl sulfate-polyacylamide gel electrophoresis, )**

**การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล** ทำตามวิธีการของ Laemmli (1970)

โพลีอะคริลาไมด์เจล ที่ใช้ในการศึกษาเป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 7x8 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูง

ประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใช้ปริมาณเจล 4 เปอร์เซ็นต์ และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร ใช้ปริมาณเจล 12 เปอร์เซ็นต์

**การเตรียมสารตัวอย่าง**

ในการเตรียมสารตัวอย่าง ผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วนกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) 1 ส่วน ปริมาณโปรตีนประมาณ 0.7-1.2 ไมโครกรัมต่อ 1 ช่องของเจล นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยอดสารตัวอย่าง low molecular standard และ high molecular standard ลงในช่องเจล เปิดกระแสไฟฟ้าที่ 250 โวลต์ (volt) โดยกำหนด 1 แผ่นเจล ใช้ 15 มิลลิแอมป์ (miliamp ; mA) เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่จนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟ ย้อมเจลด้วยสี coomassie blue 3 ชั่วโมง เทสีทิ้ง แช่เจลในน้ำยา destain I 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยา destain II จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน