

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 ตู้กระจกขนาด 11 x 23 x 12 นิ้ว
- 1.2 เครื่องให้ออกซิเจน
- 1.3 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- 1.4 เครื่องมือวัดออกซิเจนในน้ำ (DO Meter)
- 1.5 เครื่องมือวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter)

2. อุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่าง

- 2.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด มีด กรรไกร
- 2.2 ปากคีบ (Stainless Steel Forceps)
- 2.3 หลอดเก็บตัวอย่าง (Micro Centrifuge Tubes)
- 2.4 เข็มฉีดยา

3. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เมตาบอไลต์ในน้ำดี (Bile Metabolites)

- 3.1 เครื่อง Fluorescence Spectrophotometer
- 3.2 ไมโครปิเปต (Micro Pipettes)
- 3.3 หลอดเก็บตัวอย่าง (Micro Centrifuge Tubes)
- 3.4 Tips (Yellow and Blue)
- 3.5 อุปกรณ์เครื่องแก้วพื้นฐาน

4. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยา EROD

- 4.1 เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- 4.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
- 4.3 เครื่อง Fluorescence Spectrophotometer แบบ Plate Reader (48 –Well)
- 4.4 เครื่อง UV/ Visible Spectrophotometer
- 4.5 เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (Homogenizer)
- 4.6 ไมโครปิเปต (Micro Pipettes)
- 4.7 Centrifuge Bottles

4.8 หลอดเก็บตัวอย่าง (Micro Centrifuge Tubes)

4.9 Tips (Yellow and Blue)

4.10 อุปกรณ์เครื่องแก้วพื้นฐาน

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับการเตรียมตัวอย่าง

1.1 Naphthalene ($C_{10}H_8$), M.W. 154.25, Fluka 43819

1.2 Phenanthrene ($C_{14}H_{10}$), M.W. 178.23, Fluka 77470

1.3 Pyrene ($C_{16}H_{10}$), M.W. 202.25, Fluka 82650

1.4 น้ำมันเครื่อง API SG/ CD (Lubrication Oil)

1.5 น้ำมันเบนซิน 91 (Benzene Oil)

1.6 น้ำมันดีเซล (Diesel Oil)

1.7 Acetonitrile (CH_3CN), F.W. 41.05, APS Fincehem 1535

1.8 Distilled Water (น้ำกลั่น)

2. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เมตาบอไลต์ในน้ำดี (Bile Metabolites)

2.1 Ethanol Absolute (C_2H_6O), F.W. 46.07, J.T. Baker B39417

2.2 Distilled Water (น้ำกลั่น)

3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ระดับของ EROD activity

3.1 Homogenizing Buffer

3.1.1 Di-Potassium Hydrogen Orthophosphate (K_2HPO_4) (pH 7.5),

M.W. 174.18, Ajax Fincehem 2221

3.1.2 Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$),

M.W. 292.25, Ajax Fincehem A663

3.1.3 Dithiothreitol, M.W. 154.25, Fluka 43819

3.1.4 Potassium Chloride (KCl), M.W. 74.55, Ajax Fincehem A383

3.1.5 Distilled Water (น้ำกลั่น)

3.2 Reagent Volumes

3.3.1 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH),

M.W. 833.35, Fluka 93220

3.3.2 7-Ethoxyresorufin, M.W. 241.24, Fluka 46121

3.3.3 Dimethylsulphoxide (DMSO) ($\text{CH}_3)_2\text{SO}$), M.W. 78.13, Analar 193234L

3.3.4 Resorufin Sodium Salt, M.W. 235.20, Sigma R-3257

3.3.5 Sodium Chloride (NaCl), M.W. 58.44, Ajax Fincehem A465

3.3.6 Distilled Water (น้ำกลั่น)

4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โปรตีน (Bradford Protein Assay)

4.1 BCA Protein Assay Kit, Pierce 23225

4.2 Distilled Water (น้ำกลั่น)

วิธีการ

การตรวจวัดการเรืองแสงของเมตาบอไลต์ในน้ำดี และระดับปฏิกิริยา EROD ในตับของปลานิล เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดของสารประกอบฟิเอเอชที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ สามารถแสดงเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. การเตรียมอุปกรณ์ที่จะใช้ในการวิเคราะห์
2. การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง
3. การทดสอบระดับความเป็นพิษ
4. การวางแผนการทดลอง
5. การสกัดตัวอย่าง
6. การวิเคราะห์ตัวอย่าง
7. การคำนวณ
8. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเตรียมอุปกรณ์ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือต่าง ๆ เช่น เครื่องชั่งชนิดละเอียด, Centrifuge, pH Meter, Micro Pipettes

เป็นต้น ก่อนการใช้งานควรมีตรวจสอบเช็คสภาพ (Calibrate) ให้อยู่ในสภาวะที่ปกติ และสามารถใช้งานได้ เช็ดทำความสะอาด และมีผ้าคลุมหรือกล่องปิดให้มิดชิดป้องกันฝุ่นละออง หรือสารปนเปื้อนต่าง ๆ ทุกครั้งหลังใช้งานเสร็จ

เครื่องแก้ว ก่อน และหลังการใช้งานควรมีการล้างทำความสะอาด โดยใช้ผงซักฟอก (Micro Detergent) แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นห่อด้วยอลูมิเนียมฟลอยให้มิดชิด เก็บไว้ในที่ป้องกันฝุ่นละออง หรือสารปนเปื้อนต่าง ๆ ได้ รวมทั้งอุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ตูบลา ลูกทราย ถัง เป็นต้น

2. การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ตัวอย่างสัตว์ทดลองที่นำมาศึกษา คือ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งเป็นเพศผู้ทั้งหมด ในช่วงเดือนพฤษภาคม-เดือนมิถุนายน จากสถานีวิจัย และพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี อายุประมาณ 3-4 เดือน ความยาวประมาณ 3-4 นิ้ว น้ำหนักตัวประมาณ 50 ± 15 กรัม



ภาพที่ 20 ลักษณะของปลานิลที่ใช้ในการศึกษา

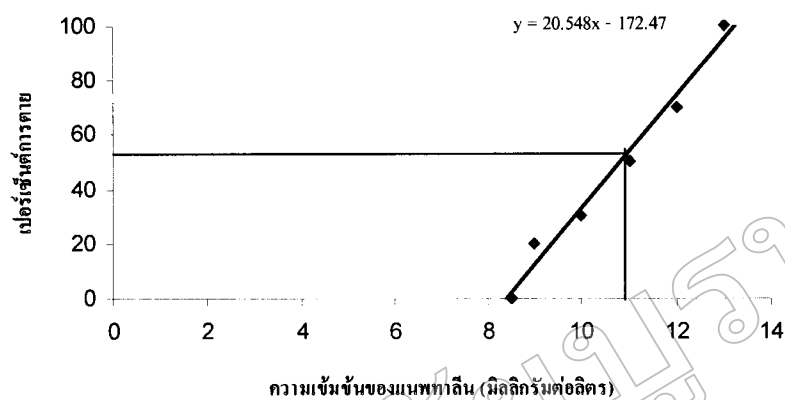
โดยก่อนทำการศึกษานำปลานิลทั้งหมดมาเลี้ยงในถังขนาดใหญ่ประมาณ 1 ตัน ในน้ำประปาที่มีการเติมอากาศทิ้งไว้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และทดสอบว่าไม่มีคลอรีนเรียบร้อยแล้ว ซึ่งจะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานาน 1-2 สัปดาห์ โดยมีการเติมออกซิเจน รักษาอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ที่ประมาณ 25.5-23.0 องศาเซลเซียส เปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 5% ทุก ๆ วัน ให้อาหารปรกติประมาณ 3% ของน้ำหนักตัว เพื่อเป็นการปรับสภาพระบบการทำงานต่าง ๆ ภายในตัวปลาให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อนของสารพิษ

3. การทดสอบระดับความเป็นพิษ (Toxicity Test)

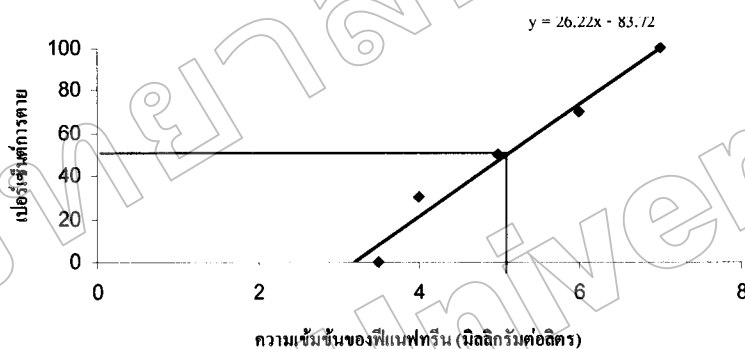
การศึกษาในครั้งนี้ต้องมีการทดสอบระดับความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน (Subacute หรือ Sublethal Toxicity) ของสารประกอบฟิเอเอชแต่ละตัวก่อน (การเตรียมสารดังภาคผนวก ก)

โดยการหาปริมาณความเข้มข้นของสารที่ทำให้ปลาตาย 50% (Lethal Concentration Fifty: LC_{50}) ในเวลา 96 ชั่วโมง (LD_{50} -96 hr) เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารประกอบฟิเอเอชแต่ละชนิด รวมทั้งยังสามารถทราบค่า NOEL หรือความเข้มข้นของสารพิษสูงที่สุดเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ (Expose) แล้วไม่ทำให้ตาย หรือไม่เกิดแสดงอาการเป็นพิษ (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว และคณะ, 2539) เพื่อกำหนดเป็นความเข้มข้นที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ จากการศึกษาได้ผลดังภาพที่ 23

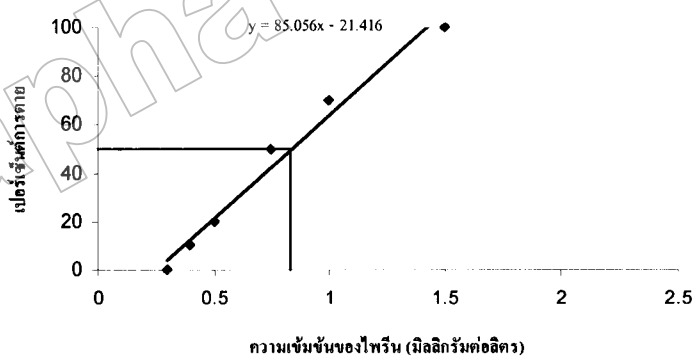
A



B



C



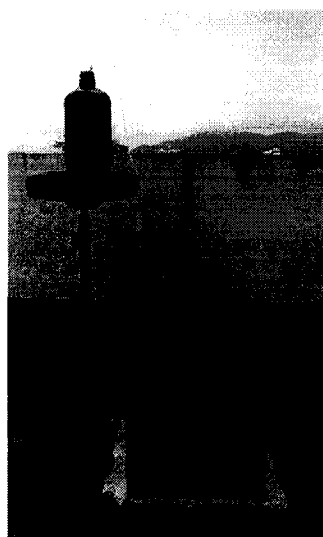
ภาพที่ 21 LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง และค่า NOEL ของเนฟทาไลน์ (A), ฟีแนฟทรีน (B) และไฟรีน (C) ในปลาไนล์

จากการศึกษาค่า LC_{50} -96 ชั่วโมง สารประกอบฟิเอเอชทั้ง 3 ชนิด พบว่า ไพรีน มีความเป็นพิษสูงที่สุดเนื่องจากมีค่า LC_{50} -96 ชั่วโมง คือ 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่า ฟิแนทรีน และแนพทาลิน ที่มีค่า LC_{50} -96 ชั่วโมง คือ 5 และ 11 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเป็นพิษลดลงตามลำดับ

แต่เนื่องจากค่า NOEL ยังเป็นระดับความเข้มข้นที่เสี่ยงต่อการตายของปลานิล และการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาที่ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน อาจมีปัจจัยทางธรรมชาติอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องได้ เพราะฉะนั้นระดับความเข้มข้นที่เลือกใช้จะเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่า NOEL เพียงเล็กน้อยหรือที่เรียกว่า Sublethal Condition ก็คือ ความเข้มข้นของสารพิษเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับแล้วไม่ทำให้ตาย หรือไม่แสดงอาการเป็นพิษ สามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ (ชัยวัฒน์ ต่อสกุล แก้ว และคณะ, 2539) เพื่อให้ปลานิลมีชีวิตอยู่ได้นานพอกับระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาเพราะฉะนั้น ความเข้มข้นของสารประกอบฟิเอเอชที่ใช้ คือ แนพทาลิน ที่ความเข้มข้น 0.125-8.000 มิลลิกรัมต่อลิตร, ฟิแนทรีน ที่ความเข้มข้น 0.047-3.000 มิลลิกรัมต่อลิตร และไพรีนที่ความเข้มข้น 0.004-0.250 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. การวางแผนการทดลอง (Experiment Design)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาการสัมผัสกับสารประกอบฟิเอเอชแบบต่อเนื่อง (Continuous Flow System) คือ มีการถ่ายน้ำที่ผสมกับสารประกอบฟิเอเอชแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ประมาณ 4% ทุกวัน ทำการวัดค่า pH, DO และอุณหภูมิทุก ๆ วัน สามารถแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ

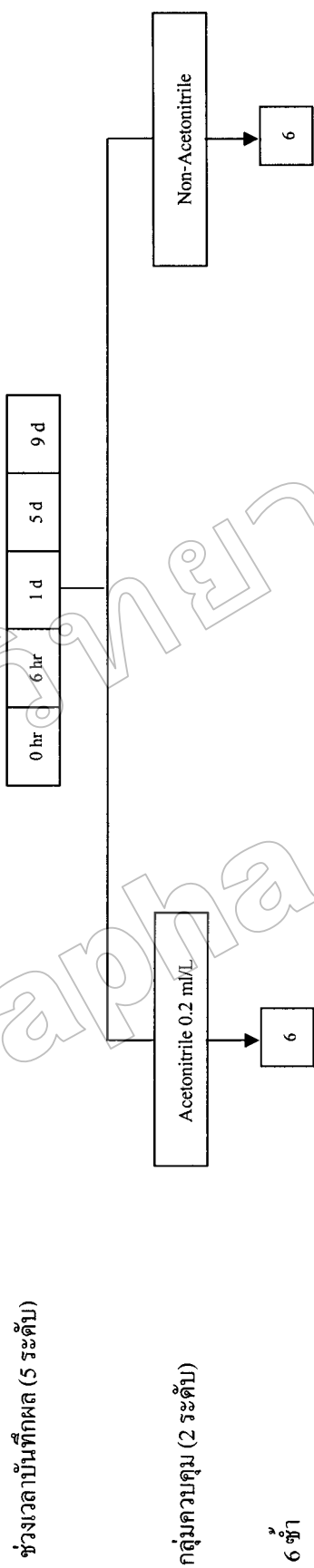


ภาพที่ 22 ระบบ Continuous Flow System

ชุดการทดลองที่ 1 การศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาความยาวคลื่นคู่ที่เหมาะสมในการตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี และตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี, ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ และสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตัวต่อน้ำหนักตัวของปลา ในกลุ่มควบคุมที่เติมด้วยอะซิโตนในไตรท์ 0.2 มิลลิลิตรต่อลิตร และกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมอะซิโตนในไตรท์ (น้ำเปล่า) ดังแสดงในภาพที่ 25

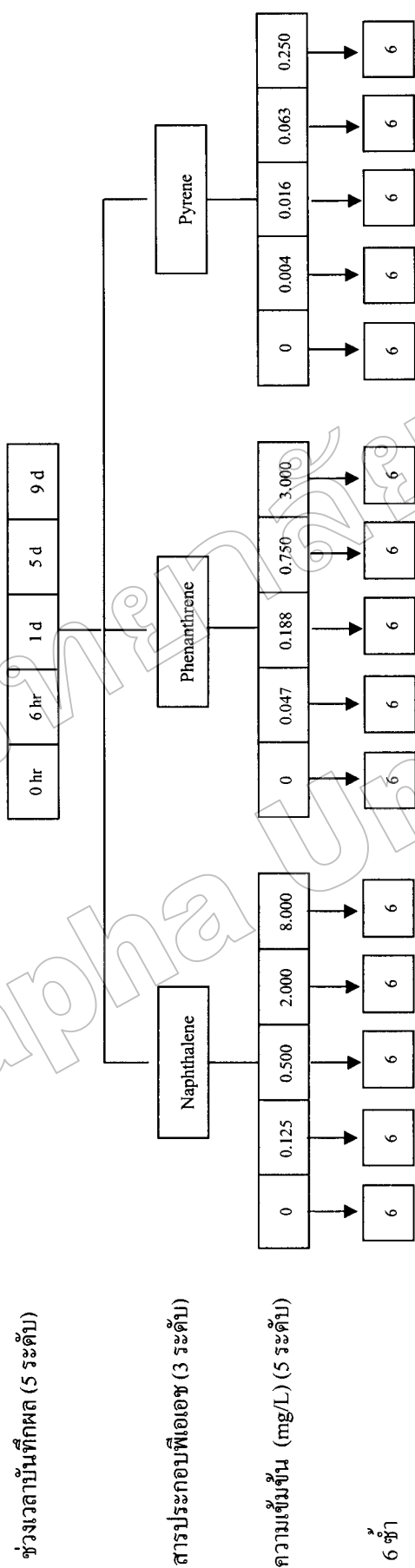
ชุดการทดลองที่ 2 การตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี, ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ และสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตัวต่อน้ำหนักตัวของปลา ที่สัมผัสกับสารประกอบพีเอเอช คือ แนพทาลิน, ฟิแนนทรีน และไพรีน ที่ระดับความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบระดับความเป็นพิษ โดยใช้อะซิโตนในไตรท์ 0.2 มิลลิลิตรต่อลิตร เป็นตัวทำละลาย และใช้กลุ่มควบคุมเป็นอะซิโตนในไตรท์ 0.2 มิลลิลิตรต่อลิตร และบันทึกผลที่ 0 และ 6 ชั่วโมง 1, 5 และ 9 วัน ดังแสดงในภาพที่ 26

ชุดการทดลองที่ 3 การตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี, ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ และสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตัวต่อน้ำหนักตัวของปลา ที่สัมผัสกับน้ำมันทางการค้า คือ น้ำมันเครื่อง API SG/ CD, น้ำมันเบนซิน 91 และน้ำมันดีเซล ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน คือ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยใช้กลุ่มควบคุมเป็นน้ำเปล่า และบันทึกผลที่ 0 และ 6 ชั่วโมง 1, 5 และ 9 วัน ดังแสดงในภาพที่ 27



6 ชั่วโมง

ภาพที่ 23 แผนการทดลอง (Experiment Design) ชุดการทดลองที่ 1 (แบบปัจจัยคงที่ 2 ปัจจัย)



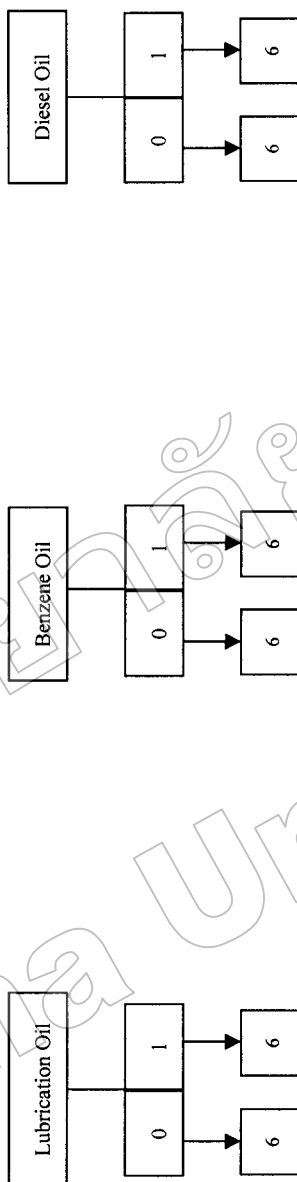
ภาพที่ 24 แผนการทดลอง (Experiment Design) ชุดการทดลองที่ 2 (แบบปัจจัยคงที่ 3 ปัจจัย)

หมายเหตุ : ความเข้มข้นที่ 0 (กลุ่มควบคุม) จะใช้ Acetonitrile ที่ 0.2 มิลลิตรต่อลิตร

ช่วงเวลาที่บันทึกผล (5 ระดับ)



สารประกอบพีเอเอช (3 ระดับ)



ความเข้มข้น (ml/L) (2 ระดับ)

6 ขั้ว

ภาพที่ 25 แผนการทดลอง (Experiment Design) ชุดการทดลองที่ 3 (แบบปัจจัยคงที่ 3 ปัจจัย)

หมายเหตุ : ความเข้มข้นที่ 0 (กลุ่มควบคุม) จะใช้น้ำเปล่า

ตัวอย่างปลานิลที่ได้รับสารประกอบพีเอเอชแล้วดังแสดงในแผนการทดลอง ต้องนำตัวอย่างปลานิลขึ้นมาน็อคด้วยน้ำแข็งก่อนทันที (ทำให้ปลาสลบ) จากนั้นจึงทำการชั่งน้ำหนักตัว และน้ำหนักตับของปลาทุกครั้ง เพื่อหาสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัว (%LSI) แล้วจึงนำมาทำการสกัดตัวอย่างเพื่อตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี และระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ ต่อไป

5. การสกัดตัวอย่าง

การสกัดตัวอย่างน้ำดี และตับ เพื่อทำการตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี และระดับปฏิกิริยา EROD ในตับของปลา ที่ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทางชีวภาพ โดยแบ่งวิธีการสกัดตัวอย่าง ออกเป็น 2 วิธี คือ

5.1 สำหรับการวิเคราะห์เมตาบอไลต์ในน้ำดี (Bile Metabolites)

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Aas et al. (1998) และ Britvic, Lucic, & Kurelec (1993)

5.1.1 ทำการผ่าเอาน้ำดีของปลานิล (สีเขียวคล้ำ) ออกมา จดบันทึกปริมาณที่แน่นอนไว้ ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษาตัวอย่างอาจทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen) และแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 26 ตัวอย่างน้ำดีของปลานิล

5.1.2 เติม 48 % เอทานอล ลงในตัวอย่างน้ำดีด้วยอัตราส่วน 1:2,500 เพื่อเป็นการเจือจางความเข้มข้นของน้ำดี แต่ต้องพยายามรักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส

ตลอดเวลาเพื่อเป็นการรักษาสภาพ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ (กรณีที่น้ำดีถูกแช่แข็งเอาไว้ต้องละลาย และพยายามรักษาคอนทามิให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส เช่นกัน)

5.1.3 นำส่วนนี้ไปใช้ในการตรวจวัดระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดีของปลา โดยใช้ความยาวคลื่นคู่ (Ex/ Em) ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการศึกษาเบื้องต้น

5.2 สำหรับการวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยา EROD และการวิเคราะห์โปรตีนในตับ

ดัดแปลงมาจากวิธีของ ICES. (1998) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Burke & Mayer (1974)

5.2.1 โดยทำการผ่าเอาตับของปลานิลออกมา ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน และจบบันทึกลงไว้ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษาตัวอย่างอาจทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen) และแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 27 ตัวอย่างตับของปลานิล

5.2.2 เติม Homogenizing Buffer ลงในตัวอย่างตับ ด้วยอัตราส่วน 1/ 5 -1/ 10 กรัม ต่อมิลลิลิตร (w/ v) แต่ต้องพยายามรักษาคอนทามิให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาเพื่อเป็นการรักษาสภาพ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ (กรณีที่ตับถูกแช่แข็งเอาไว้ต้องละลาย และพยายามรักษาคอนทามิให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส เช่นกัน)

5.2.3 นำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ประมาณ 700 รอบต่อนาที (rpm) หรือจนละเอียด

5.2.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5.2.5 คัดเอาส่วนใสที่อยู่บริเวณตรงกลางของหลอด (ข้างบนจะเป็นพวกไขมัน เป็นส่วนที่ไม่ต้องการ) จะได้เป็นสารละลายที่เรียกว่า Supernatant หรือ S9 เป็นส่วนที่นำไปใช้ในการตรวจวัดระดับปฏิกิริยา EROD และการวิเคราะห์โปรตีนในลำดับต่อไป



ภาพที่ 28 Supernatant หรือ S9

6. การวิเคราะห์

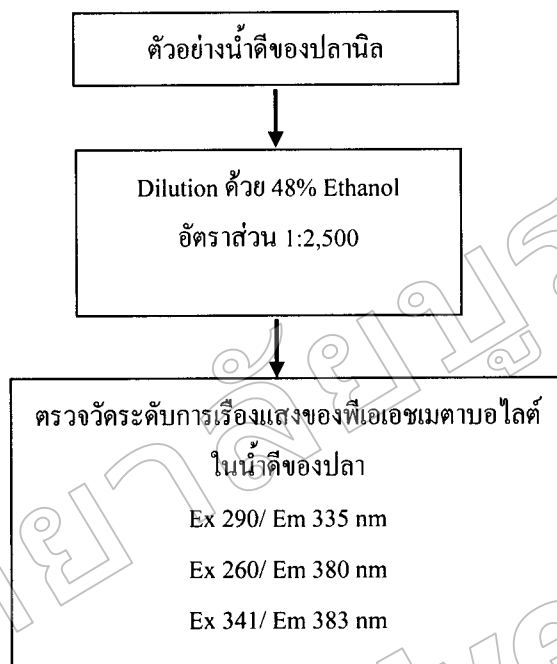
เมื่อสกัดตัวอย่างน้ำดี และตับ (Supernatant หรือ S9) ของปลานิลเรียบร้อยแล้ว จึงนำมาทำการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

6.1 การวิเคราะห์เมตาบอไลต์ในน้ำดี (Bile Metabolites)

นำตัวอย่างน้ำดีที่ผ่านการเจือจางด้วย 48% Ethanol แล้วมาทำการตรวจวัดระดับการเรืองแสงของฟิเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี โดยใช้ความยาวคลื่นคู่ที่ Em 290/ Ex 335 นาโนเมตร, Ex 260/ Em 380 นาโนเมตร และ Ex 341/ Em 383 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นคู่ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดระดับการเรืองแสงของเนพทาไลน์เมตาบอไลต์, ฟิแนนทรินเมตาบอไลต์ และฟิรินเมตาบอไลต์ในน้ำดี ตรวจวัดด้วยเครื่องฟลูออโรสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ความยาวคลื่นคู่ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งเป็นความยาวคลื่นคู่ที่สามารถตรวจวัดระดับการเรืองแสงของฟิเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี ได้มากที่สุด คัดแปลงมาจากวิธีของ Jonsson, Sundt, Aas, & Beyer (2004) ทดสอบด้วยวิธีฟลูออเรสเซนซ์

สกรีนนิ่ง ผลการศึกษาแสดงในบทที่ 4



ภาพที่ 29 สรุปขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง และการวิเคราะห์เมตาบอไลต์ในน้ำดี

6.2 การวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ

การวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ ดัดแปลงมาจากวิธีของ ICES. (1998)

และ Kennedy & Jones (1994)

6.2.1 เติม Reagent Volumes และ Supernatant (S9) ลงในแต่ละช่อง (Well) ดังนี้

1	2	3	4	5	6	7	8
Std-Blk	Std-Blk	Std-1	Std-1	Std-2	Std-2	Std-3	Std-3
Std-4	Std-4	Std-5	Std-5	Std-6	Std-6	Std-7	Std-7
Std-8	Std-8	Std-9	Std-9	Std-10	Std-10	Sam-Blk	Sam-Blk
C-Tilapia	C-Tilapia	T-Tilapia	T-Tilapia				

Std: Standard

Sam: Sample

C: Control Group

T: Treated Group

Std-Blk: 200 μ l TN Buffer

Std-1 to Std-10 2 μ l Standard + 198 μ l TN Buffer

Sam-Blk 1 7-ER + 198 μ l TN Buffer + 1 μ l NADPH

C, T: 1 7-ER + 2 μ l Supernatant + 196 μ l TN Buffer + 1 μ l NADPH

6.2.2 เติมน้ำแล้วนำไปใส่เครื่องวัดทันที ตั้งค่าให้เครื่องเริ่มอ่านค่าที่นาฬิกาที่ 2 และอ่านค่าไปเลย ๆ ทุก ๆ 2 นาที จนถึงนาฬิกาที่ 10 ช่วงเวลาการเกิดปฏิกิริยา (Reaction Time) ที่ใช้คือ 8 นาที ด้วยเครื่องฟลูออโรสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แบบ Plate Reader (48 –Well) ความยาวคลื่นคู่ที่ใช้ในการตรวจวัด คือ Ex 530/ Em 590 นาโนเมตร

6.2.3 ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ ที่ตรวจวัดได้จากการเรืองแสง จะต้องมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Resorufin จากนั้นนำไปคำนวณ ดังที่จะกล่าวต่อไป

6.3 การวิเคราะห์โปรตีนในตับ

การหาปริมาณโปรตีนในตับ คัดแปลงมาจากวิธีของ Bradford Protein Assay (1998)

โดยใช้ BCA Protein Assay Reagent Kit

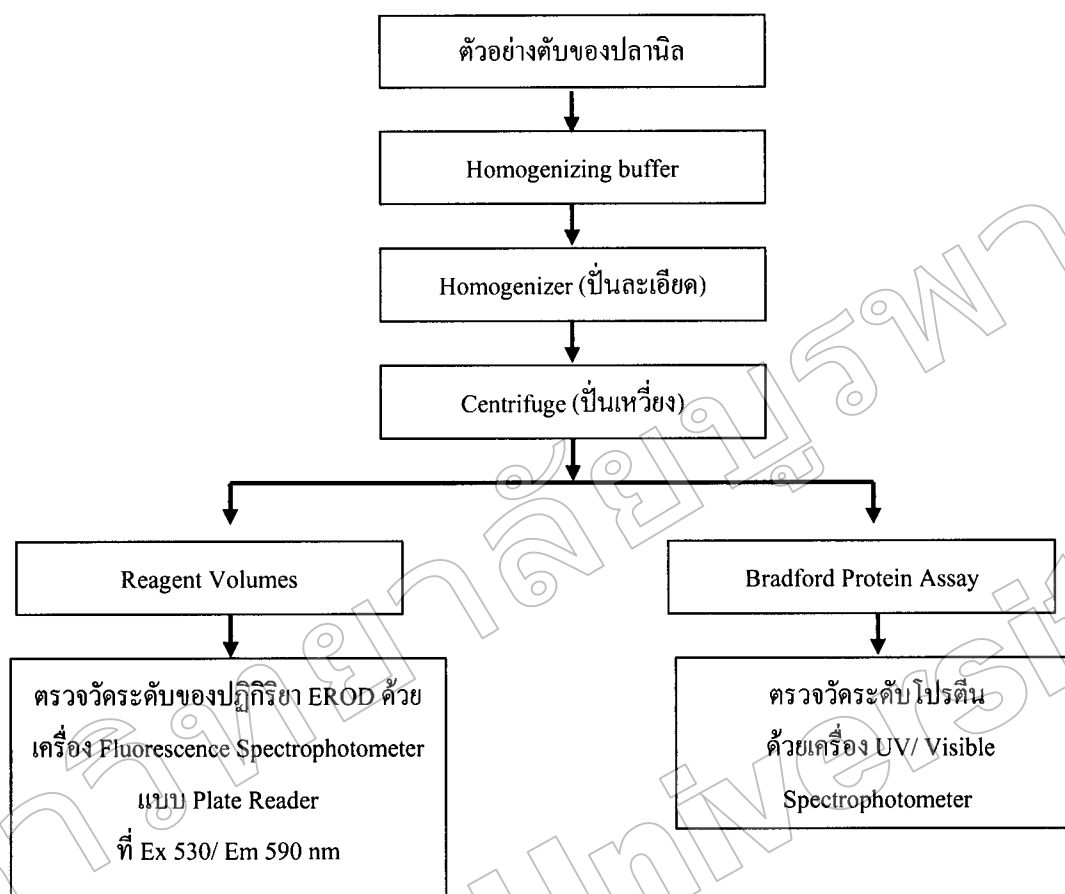
6.3.1 เตรียม Working Reagent โดยผสม Reagent A และ Reagent B อัตราส่วน 50:1

6.3.2 นำ Supernatant (S9) 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ Working Reagent 2.0 มิลลิลิตร

6.3.3 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/ Visible

Spectrophotometer แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนของ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0-800 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 30 สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และการวิเคราะห์ระดับปฏิกิริยา EROD และโปรตีนในตับของปลา

7. การคำนวณ

7.1 การหาสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัว (Liver Somatic Index: %LSI)

ก่อนทำการเก็บตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักตัว และน้ำหนักตับของปลานิล ที่แน่นอน และจดบันทึกไว้เพื่อหาสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัว จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Liver Somatic Index (\%LSI)} = \frac{\text{Liver Weight}}{\text{Body Weight}} \times 100$$

7.2 การอ่านค่าการเรืองแสงของเมตาบอไลต์ ในน้ำดี (Bile Metabolites)

Fluorescence Intensity หรือ Arbitrary Fluorescence Units (AFU) หรือ Arbitrary Fluorescence Units per mg⁻¹ Biliary Protein (A.F.U. mg⁻¹ Biliary Protein)

7.3 การหาระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ

$$\text{Resorufin (EROD activity)} = \frac{[\text{Resorufin}] \text{ nM} \times [200 \times 10^{-6} \text{ L}] \times 1000 \text{ pmole/ nmol}}{8 \text{ min} \times \text{Total Protein (mg)}}$$

(pmol/ min/ mg Protein)

$$200 \times 10^{-6} = \text{Total Volume (L)}$$

$$8 \text{ min} = \text{Reaction Time}$$

7.4 การหาปริมาณโปรตีนในตับ

$$\text{Total Protein (mg)} = Y \text{ (mg/ml)} \times \text{Total Volume (ml)}$$

$$Y = \text{ปริมาณโปรตีนที่อยู่ในตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนของ Bovine Serum Albumin (BSA) (mg/ml)}$$

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical Analysis)

การวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับการเรืองแสงของพีเอเอช เมตาบอไลต์ในน้ำดี, ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ และสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัวของปลานิล ที่สัมผัสกับสารประกอบพีเอเอช และน้ำมันทางการค้า ด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) ทดสอบความเป็นปกติของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk Test และ Log-Transformed และการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการเรืองแสงของพีเอเอชเมตาบอไลต์ในน้ำดี, ระดับปฏิกิริยา EROD ในตับ และสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตับต่อน้ำหนักตัวของปลานิล โดยการหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient; r) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 ($p = 0.01$) และ 95 ($p = 0.05$) และการพิจารณาว่าตัวแปรใด ๆ 2 ตัวแปร มีความสัมพันธ์กัน หรือไม่อย่างไร สามารถพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ดังนี้

8.1 ระดับความสัมพันธ์

8.1.1 ถ้า r เข้าใกล้ 1.00 (0.70-0.90) แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์อยู่ในระดับสูง

8.1.2 ถ้า r เข้าใกล้ 0.50 (0.30-0.70) แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์อยู่ในระดับปานกลาง

8.1.3 ถ้า r เข้าใกล้ 0.00 (0.30 และต่ำกว่า) แสดงว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์อยู่ในระดับต่ำ หรือไม่มีความสัมพันธ์กัน

8.2 ทิศทางความสัมพันธ์

8.2.1 ถ้า r มีค่าเป็นบวก แสดงให้เห็นว่าเมื่อค่าในตัวแปรหนึ่งเปลี่ยนไปค่าในอีกตัวแปรหนึ่งก็จะเปลี่ยนตามในทิศทางเดียวกัน

8.2.2 ถ้า r มีค่าเป็นลบ แสดงให้เห็นว่าเมื่อค่าในตัวแปรหนึ่งเปลี่ยนไปค่าในอีกตัวแปรหนึ่งก็เปลี่ยน แต่เปลี่ยนในทิศทางตรงกันข้าม