บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. การเตรียมบ่อและการเลี้ยง

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 บ่อปูนขนาด 2 ตัน จำนวน 8 บ่อ (เอื้อเฟื้อสถานที่โดยฟาร์มทะเลทอง ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี)

1.1.2 น้ำทะเล

1.1.3 น้ำจืด

1.1.4 หัวทราย

1.1.5 สายยางสำหรับต่อหัวทราย

1.1.6 สายยางสำหรับเติมน้ำเข้าบ่อ

1.1.7 สวิงขนย้ายปลา

1.1.8 ถังพลาสติก

1.1.9 Thermometer

1.1.10 Salinity refractometer

1.1.11 DO meter

1.2 สารเคมี

1.2.1 คลอรีนผง

1.2.2 Povidone-iodine

2. การเตรียมอาหารทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 อาหารสำเร็จรูปสำหรับปลากะพงขาว ชนิดเม็ดลอยน้ำ สูตรโปรตีน 42%

2.1.2 ช้อนตักอาหาร

2.1.3 กระบอกตวง

2.1.4 บีกเกอร์

2.1.5 แท่งแก้วคนสาร

2.1.6 กระบอกพ่นสาร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.7 ถาดอลูมิเนียม

2.1.8 เครื่องชั่งน้ำหนักอาหาร

2.1.9 เครื่องชั่งสารเคมี

2.2 สารเคมี

2.2.1 ไดโตซานชนิดผง

2.2.2 1% Acetic acid

2.2.3 น้ำมันปลา

3. การทดสอบทางภูมิคุ้มกัน

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ปลากะพงขาว

3.1.2 บีกเกอร์

3.1.3 กระบอกตวง

3.1.4 หลอดฉีดยา ขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร

3.1.5 เข็มฉีดยา เบอร์ 22

3.1.6 Eppendorf ขนาด 0.6 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.1.7 หลอดแก้ว

3.1.8 สไลด์แก้ว

3.1.9 สไลด์นับเม็ดเลือด (Neubauer hemocytometer)

3.1.10 กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

3.1.11 อ่างน้ำแข็ง

3.1.12 Petri dish

3.1.13 ตะแกรงลวดขูดเนื้อเยื่อ

3.1.14 กรรไกรผ่าตัด

3.1.15 ใบมีดผ่าตัด

3.1.16 ด้ามมีดผ่าตัด

3.1.17 ปากคีบ (Tissue forceps)

3.1.18 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.19 หลอดพลาสติกแบบก้นกรวย (Conical tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.1.20 ออโตปิเปต ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.21 ทิปสำหรับออโตปิเปตแต่ละขนาด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1.22 แผ่นอลูมิเนียมฟลอยด์

3.1.23 96-Well plate

3.1.24 กล่องบ่มสไลด์

3.1.25 กระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1

3.1.26 ช้อนตักสาร

3.1.27 pH meter (Index)

3.1.28 ไม้บรรทัด

3.1.29 เครื่องชั่งน้ำหนัก

3.1.30 เครื่องชั่งสารเคมี

3.1.31 เครื่องปั่น (Vortex)

3.1.32 เครื่องเขย่า (Shaker)

3.1.33 เครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge

3.1.34 เครื่อง Microplate reader

3.1.35 เครื่อง Autoclave

3.1.36 ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารละลาย EDTA อิ่มตัวในน้ำกลั่น

3.2.2 สีย้อมเม็ดเลือด Natt-Herrick's stain

3.2.3 Absolute methanol

3.2.4 สีย้อม Wright's stain

3.2.5 สีย้อม Trypan blue

3.2.6 Bovine Serum Albumin (BSA เข้มข้น 1.4 mg/ml)

3.2.7 สี Biorad (อัตราส่วนสีต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 4)

3.2.8 Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2

3.2.9 5% Non-fat dry milk in PBS

3.2.10 Low salt buffer

3.2.11 High salt buffer

3.2.12 Mouse monoclonal anti-seabass immunoglobulin (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ศุภลัคน์ พุฒิเนาวรัตน์ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง)

3.2.13 Goat anti mouse immunoglobulin (HRP conjugated)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2.14 1% Chromagen

3.2.15 1N H_2SO_4

3.2.16 Hank's Balanced Salt Solution, HBSS (Sigma) with 2 mM $CaCl_2$

3.2.17 สารละลาย Eugenol ใน 95% Ethanol เข้มข้น 100 mg/ml (ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.สพ.ญ.วรรณา ศิริมานะพงษ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.2.18 L-15 medium (Gibco™) with 2 mM $CaCl_2$

3.2.19 Heat-killed yeast in L-15 medium

3.2.20 0.85% Sodium chloride (NaCl)

3.2.21 Inactivated fetal bovine serum, FBS (Gibco™)

3.2.22 สารละลาย Nitro-Blue Tetrazolium, NBT (176 ug/ml)

3.2.23 สารละลาย Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA (Sigma) เข้มข้น 10^{-5} M

3.2.24 70% Methanol

3.2.25 2 M Potassium hydroxide (KOH)

3.2.26 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.27 น้ำกลั่น

4. การทดสอบการติดเชื้อ

4.1 วัสดุอุปกรณ์

4.1.1 จานเลี้ยงเชื้อ

4.1.2 ลูปเขี่ยเชื้อ

4.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4.1.4 ออโตปิเปต ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

4.1.5 ทิปสำหรับออโตปิเปตแต่ละขนาด

4.1.6 ขวดแก้วรูปชมพู่

4.1.7 บีกเกอร์

4.1.8 แท่งแก้วคนสาร

4.1.9 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

4.1.10 หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร

4.1.11 เข็มฉีดยา เบอร์ 26

4.1.12 กระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 Trypic Soy Agar, TSA with 2% NaCl

4.2.2 Trypic Soy Broth, TSB with 2% NaCl

4.2.3 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar, TCBS agar

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงปลาทดลอง และการตรวจวัดคุณภาพน้ำ

ซื้อพันธุ์ปลากะพงขาวจากเกษตรกรในจังหวัดเพชรบุรี นำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 2 ตัน จำนวน 8 บ่อ ภายในฟาร์มทะเลทอง ต.อ่างศิลา อ.เมือง จ.ชลบุรี ติดตั้งระบบให้อากาศโดยใช้หัวทราย บ่อละ 3 จุด เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ (โปรตีนร้อยละ 42) วันละ 2 ครั้ง ในแต่ละวันเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 50-80 ของน้ำในบ่อ โดยเตรียมน้ำในการเปลี่ยนถ่ายจากน้ำทะเลที่ปรับความเค็มเท่ากับ 20-25 ส่วนในพันส่วน (ppt) และฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนเข้มข้น 20 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แล้ว

เก็บข้อมูลคุณภาพน้ำในบ่อทดลอง โดยวัดอุณหภูมิ ความเค็ม pH และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ เก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียรวมและไนไตรท์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2. การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ทดลองเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำ สูตรโปรตีนร้อยละ 42 การเสริมไคโตซานลงในอาหารทำได้โดยการคลุกสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติกให้ทั่วเม็ดอาหาร ตากให้แห้งแล้วจึงคลุกน้ำมันปลาเป็นปริมาณร้อยละ 2 ของน้ำหนักอาหารซ้ำอีกครั้งเพื่อเคลือบเม็ดอาหาร ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำไปเลี้ยงปลา

สำหรับอาหารทดลองในกลุ่มควบคุมนั้นเตรียมโดยคลุกอาหารเม็ดด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 แทนสารละลายไคโตซานในปริมาตรที่เท่ากันกับข้างต้น ตากให้แห้ง เคลือบด้วยน้ำมันปลาเป็นปริมาณร้อยละ 2 ของน้ำหนักอาหารซ้ำอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำไปเลี้ยงปลา

3. การเตรียมสารละลายไคโตซาน

ละลายผงไคโตซาน 5, 10 และ 15 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 ในปริมาตร 200 มิลลิลิตร (ml) ต่ออาหารทดลอง 1 กิโลกรัม (kg) ของชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน และคลุกสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติกให้ทั่วเม็ดอาหาร แล้วจึงคลุกน้ำมันปลาในปริมาณ 20 ml ต่ออาหาร 1 kg ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำไปเลี้ยงปลา ในขณะที่การ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เตรียมอาหารสูตรควบคุม (ชุดการทดลองที่ 1) ใช้กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 ในปริมาตร 200 ml ต่ออาหารทดลอง 1 kg คลุกให้ทั่วเม็ดอาหาร แล้วจึงคลุกน้ำมันปลาในปริมาณ 20 ml ต่ออาหาร 1 kg ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำไปเลี้ยงปลา

4. การทดสอบทางภูมิคุ้มกัน

การศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

4.1 การทดลองเสริมอาหารด้วยไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1 และ 1.5 ของน้ำหนักอาหาร และติดตามผลการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลากะพงขาว

4.2 การทดลองเสริมอาหารด้วยไคโตซานในปริมาณที่ได้จากการทดลองที่ 1 และติดตามอัตราการเจริญเติบโต อัตราการตายของลูกปลากะพงขาว และค่า RPS หลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

4.1 การทดลองที่ 1 การเสริมอาหารด้วยไคโตซาน เข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1 และ 1.5 ของน้ำหนักอาหาร ต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลากะพงขาว

เลี้ยงปลากะพงขาว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 41.05 ± 7.55 กรัม บ่อละ 30 ตัว จำนวน 8 บ่อ แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 2 บ่อ โดยปลาแต่ละชุดการทดลองจะได้รับอาหารต่างกันดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1: อาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติ (ไม่ผสมไคโตซาน)

ชุดการทดลองที่ 2: อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมไคโตซาน ปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหาร

ชุดการทดลองที่ 3: อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมไคโตซาน ปริมาณร้อยละ 1 ของน้ำหนักอาหาร

ชุดการทดลองที่ 4: อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมไคโตซาน ปริมาณร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักอาหาร

เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 47 วัน โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง แต่ละวันให้อาหารไม่เกินร้อยละ 5 ของน้ำหนักปลา บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ อาหารที่เหลือ จำนวนปลาป่วย และจำนวนปลาตายในแต่ละบ่อทุกวัน ในขณะเดียวกันทุก ๆ 7 วัน สลบปลาเพื่อเจาะเลือดนำไปตรวจนับชนิดและจำนวนของเม็ดเลือดขาว ปริมาณโปรตีนรวม และปริมาณ Immunoglobulin รวมถึงการชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของปลา โดยสุ่มปลาจากแต่ละบ่อ ๆ ละ 20 ตัว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บรวบรวมข้อมูลดังนี้

- นับจำนวนปลาที่เหลือในแต่ละบ่อ
- ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวปลา โดยสุ่มปลาบ่อละ 20 ตัว เพื่อศึกษาการกระจายขนาดของปลา
- ศึกษาประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยสุ่มปลาบ่อละ 20 ตัว นำมาสลบและเจาะเก็บเลือดเพื่อตรวจนับชนิดและจำนวนของเม็ดเลือดขาว ปริมาณโปรตีนรวม และปริมาณ Immunoglobulin หลังจากนั้นผ่าตัดแยกไตส่วนหน้ามาตรวจสอบประสิทธิภาพของกระบวนการกลืนทำลายและความสามารถในการทำลายเชื้อโรคโดย Respiratory burst activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณน้ำหนักเพิ่ม อัตราการกินอาหาร อัตราแลกเนื้อ และอัตรารอดตายของปลา นำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโคโตซาน ทั้ง 4 ชุดการทดลอง

อัตรารอด (ร้อยละ)

$$= 100 \times \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม/ตัว)

$$= \frac{\text{ผลรวมของน้ำหนักของปลาทุกตัวในบ่อ}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมดในบ่อนั้น ๆ}}$$

น้ำหนักเพิ่มต่อวัน (กรัม/วัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง}}$$

Weight Gain Ratio (WGR; ร้อยละ)

$$= 100 \times \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$

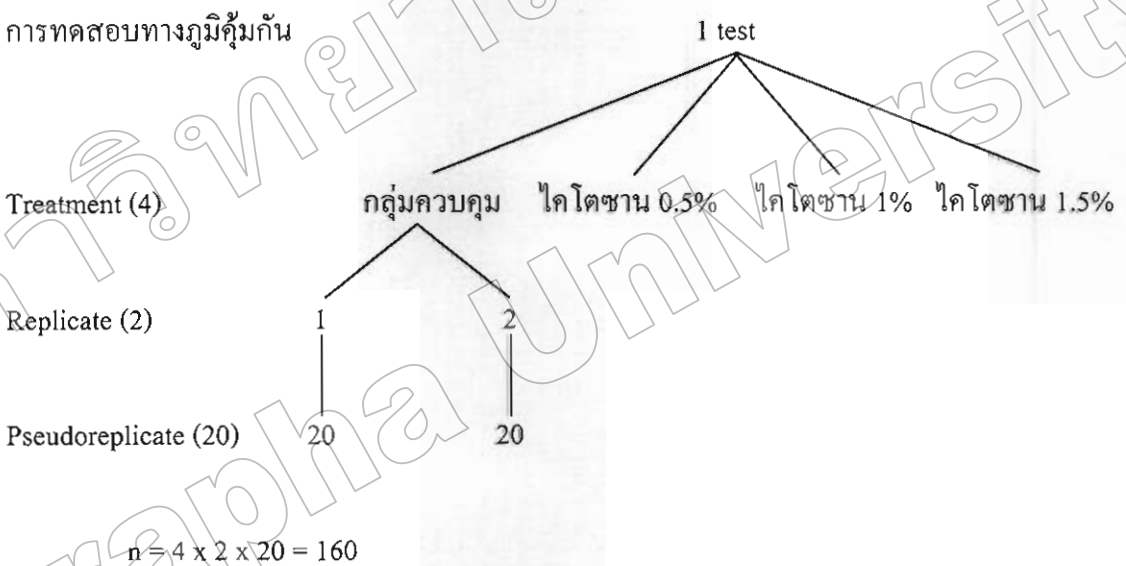
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อัตราเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR; ร้อยละต่อวัน)

$$= \frac{\ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาเลี้ยง}} \times 100$$

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed Conversion Ratio, FCR)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่ให้}}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}$$



ภาพที่ 6 แผนการทดลองที่ 1

4.1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดและพลาสมาของปลากะพงขาว

สลบปลากะพงขาวด้วยสารละลาย Eugenol (Sigma-Aldrich) ในเอธานอลเข้มข้น 20 ppm (Hanggono, 2003) และเก็บเลือดโดยดัดแปลงวิธีจาก Cha et al. (2008) ดังนี้ เจาะเก็บเลือดปลากะพงขาวจากเส้นเลือดดำท้ายลำตัว (caudal vein) ด้วยหลอดฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 1 ml และเข็มฉีดยาปลอดเชื้อเบอร์ 22 ที่ rinse ด้วยสารละลาย EDTA อิ่มตัวเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แบ่งเลือดส่วนหนึ่งมาทำฟิล์มเลือดบาง (Blood smear) บนสไลด์แก้วเพื่อใช้ตรวจจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาว และนำไปย้อมสีเพื่อตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวรวมในเลือด เก็บส่วนที่เหลือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นั้นลงในหลอด Eppendorf ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปปั่นแยกเก็บพลาสมาที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°C) นาน 10 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวมในเลือด (Total plasma protein) และปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig) ด้วยเทคนิค Enzyme Linked Immunoabsobent Assay (ELISA)

4.1.2 การตรวจหาปริมาณโปรตีนในเลือดปลากะพงขาว (Total plasma protein; TPP)

ใช้วิธีของ Lowry et al. (1951) ดังนี้ เตรียมโปรตีนมาตรฐานโดยการเจือจาง Bovine serum albumin (BSA เข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)) เป็น 1:2 ไปเรื่อย ๆ ในหลอด Eppendorf จำนวน 4 ครั้ง ความเข้มข้นของ BSA ที่ได้ คือ 0.7, 0.35, 0.175 และ 0.0875 mg/ml จากนั้นเจือจางพลาสมาปลากะพงขาวเป็น 1:10 และ 1:100 ที่ปริมาตร 50 และ 500 ไมโครลิตร (µl) ตามลำดับ นำตัวอย่างโปรตีนมาตรฐานและพลาสมาที่เจือจางแล้วใส่ลงใน 96-well microtitration plate หลุมละ 10 µl ตัวอย่างละสองซ้ำ เติมสี Biorad ที่กรองแล้ว (อัตราส่วนสีต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 4) ตามลงไป หลุมละ 200 µl ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; O.D.) ด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ 595 นาโนเมตร (nm) นำค่าที่อ่านได้สร้างเป็นกราฟมาตรฐานเส้นตรง (Linear regression) ของโปรตีนมาตรฐาน เมื่อได้สมการและค่า Correlation (R) แล้ว นำค่า O.D. ที่อ่านได้ของตัวอย่างเลือดปลากะพงขาวแทนค่า y จะสามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างนั้น ๆ ได้

4.1.3 การตรวจหาปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ในพลาสมาปลากะพงขาวด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ดัดแปลงจากวิธีของ Cuesta et al. (2004) ดังนี้ สุ่มเลือกซีรั่มปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาเจือจางด้วย PBS ตั้งแต่ 1:1 ไปจนถึง 1:1000 นำมาเติมลงใน 96 well plate หลุมละ 100 µl (ตัวอย่างละ 3 หลุม) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย Wash Buffer Low Salt นาน 3 นาที 3 ครั้ง จากนั้นเติม 5% Non-fat Dry Milk ใน PBS ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย Wash Buffer High Salt นาน 3 นาที 3 ครั้ง เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ Ig ของปลากะพงขาว หลุมละ 50 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย Wash Buffer High Salt อีก 3 ครั้ง แล้วจึงเติมแอนติบอดีจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Goat Anti Mouse Immunoglobulin) เจือจาง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1:1000 และ conjugate ด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) หลุมละ 100 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย Wash Buffer High Salt 3 ครั้ง เติมสารละลายซับสเตรท 1% Chromagen (1 mg/ml O-Phenylenediamine (OPD), 0.06% H_2O in 0.1 M Citrate Buffer pH 4.5) 100 µl สังเกตปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีเหลืองภายในเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1N H_2SO_4 หลุมละ 100 µl จึงนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader เฉลี่ยค่า O.D. ที่อ่านได้ในแต่ละ dilution และสร้างเป็นกราฟมาตรฐานเส้นตรง (Linear regression) ระหว่างค่า O.D. และ dilution ทั้งหมด พิจารณาเลือกค่า dilution ที่ให้ค่า O.D. อยู่ในช่วงกราฟดังกล่าว เพื่อใช้เจือจางซีรั่มปลากะพงขาวในแต่ละชุดการทดลองก่อนนำมาทดสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

4.1.4 การตรวจนับจำนวนของเม็ดเลือดขาว (Total white blood cells count)

นับจำนวนเม็ดเลือดขาวปลากะพงขาวตามวิธีของ Noga (2000) โดยนำเลือดมาย้อมสีในอัตราส่วน เลือด 1 ส่วน ต่อสีย้อมเม็ดเลือด (Natt-Herrick's stain) 200 ส่วน โดยเติมเลือด 20 µl ลงในสีย้อมเม็ดเลือดปริมาณ 4 ml ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หยอดเลือดที่ย้อมสีลงใน haematocytometer ให้เต็มทั้งสองข้าง แล้วนำมานับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า นับเม็ดเลือดในช่องเม็ดเลือดขาวทั้งสองด้านและนำมาคำนวณด้วยสูตรคำนวณข้างล่างนี้

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือด} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่นับได้ทั้งสองด้าน}}{8} \times 2000 \text{ เซลล์ / µl}$$

4.1.5 การตรวจจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว (Differential white blood cells count)

สเมียร์เลือดสดลงบนสไลด์แก้วที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาตรึงเซลล์ด้วย Absolute methanol ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้อมสไลด์ด้วยสี Giemsa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ในบัฟเฟอร์เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งไว้ให้แห้ง นำมานับจำแนกชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง โดยนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 100 เซลล์ต่อ 1 สไลด์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.1.6 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาว

สลบปลากะพงขาวด้วยสารละลาย Eugenol (Sigma-Aldrich) ในเอธานอลเข้มข้น 20 ppm (Hanggono, 2003) แล้วจึงนำปลามาแยกเม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าตามวิธีของ เยาวนิตย์ ดนยดล และคณะ (2543) และ Couso et al. (2003) โดยดัดแปลงดังนี้ ตัดไตส่วนหน้าด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำมาล้างเบา ๆ ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นนำมาเกลี่ยด้วยใบมีดผ่าตัดผ่านตะแกรงลวดปลอดเชื้อที่วางอยู่บนจานแก้วใน L-15 medium ผสม 2% FBS ปริมาตร 3 ml ขูดจนเนื้อเยื่อผ่านรูตะแกรงหมด ทิ้งให้เนื้อเยื่อตกตะกอนนาน 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนลงในหลอด Eppendorf นำไปปั่นที่ความเร็ว 400 g นาน 5 นาที ก่อนนำมา Resuspend ด้วย L-15 medium ผสม 2% FBS ปริมาตร 1 ml ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ด้วยวิธี Dye exclusion test โดยใช้สี Trypan blue ปรับความเข้มข้นเซลล์ด้วย Haemocytometer

4.1.7 การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Viability check)

ใช้วิธี Dye exclusion test ดังนี้ ผสมเซลล์ที่แยกได้จากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวเข้ากับสี Trypan blue เข้มข้น 0.25% ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 (Dilution factor เท่ากับ 10) ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปหยอดลงใน Haemocytometer ให้เต็มทั้งสองข้าง นับจำนวนเม็ดเลือดขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงกำลังขยาย 400 เท่า โดยเลือกนับเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่ติดสี (เซลล์ที่มีชีวิต) ในช่องนับเม็ดเลือดขาวทั้งสองด้าน และคำนวณด้วยสูตรข้างล่างนี้

$$\text{จำนวนเซลล์มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{Dilution factor} \times 10^4 \text{ เซลล์ / ml}$$

4.1.8 การทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

เตรียม Heat killed yeast ใน L-15 medium เข้มข้น 2.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Thiagarajan et al. (2006) จากนั้นนำมาทดสอบการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวโดยดัดแปลงจากวิธีของ เยาวนิตย์ ดนยดล และคณะ (2543) ดังนี้ ผสม Heat killed yeast กับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากไตของปลากะพงขาวในหลอด Eppendorf ด้วยอัตราส่วนของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีชีวิตต่อจำนวนเซลล์ยีสต์เท่ากับ 1 ต่อ 8 ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เซลล์ทั้งสองผสมกันอย่างทั่วถึง แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 50 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้เกิดกระบวนการ Phagocytosis เมื่อครบเวลาดูด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ส่วนผสมดังกล่าวมาหยดเป็นวงกลมบนสไลด์แก้วที่สะอาด (หยด 2 วง ต่อตัวอย่าง) บ่มที่อุณหภูมิห้องในกล่องที่มีความชื้นเพียงพอ รอให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะติดแผ่นสไลด์นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงเทของเหลวส่วนเกินทิ้งและล้างเซลล์ที่ไม่เกาะติดสไลด์ออกด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% 3 ครั้ง รอให้แห้งและตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล นาน 5 นาที เมื่อสไลด์แห้งแล้วจึงย้อมเซลล์ด้วยสี Giemsa เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่ลงในบัฟเฟอร์เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นและทิ้งไว้ให้แห้ง นำมานับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสง เพื่อคำนวณหาเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีการจับกินยีสต์ โดยนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด 200 เซลล์ต่อ 1 วง จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จับกินยีสต์ และจำนวนยีสต์ที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกินทั้งหมด จากนั้นคำนวณตามสูตรข้างล่างนี้

$$\text{Phagocytosis (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Phagocytosis Index (PI)} = \text{PP} \times \frac{\text{จำนวนยีสต์ที่ถูกกินทั้งหมด}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นับทั้งหมด}}$$

4.1.9 การทดสอบ Respiratory burst activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวด้วยเทคนิค Nitroblue tetrazolium assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Cook et al. (2003) และ Couso et al. (2003) ดังนี้ ภายหลังตรวจนับจำนวนเซลล์มีชีวิตใน cell suspension ที่ได้จากไตส่วนหน้าของปลากะพงขาวแล้ว เติม Cell suspension ลงใน Microplate 96 wells หลุมละ 100 µl (อย่างน้อย 6 x 10^5 เซลล์ต่อหลุม) ในคอลัมน์และแถวที่ต้องการ บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะลงบนพื้นผิวของ Micropalte เมื่อครบเวลาแล้วล้างเซลล์ด้วย HBSS เย็น (20 °C) เพื่อล้างเอาเซลล์ที่ไม่เกาะบนพื้นผิวออกไป แล้วจึงเติมสารละลาย NBT ใน HBSS (1 mg/ml) ปริมาณ 100 µl ลงในทุกหลุม ต่อมาเติมสารละลาย PMA ใน HBSS เข้มข้น 10^{-5} M เพื่อใช้เป็น stimulant agent ปริมาณ 30 µl ทุกหลุมในแถวที่ต้องการ และเติม HBSS เพื่อใช้เป็น Non stimulant agent ปริมาณ 30 µl ลงในทุกหลุมในแถวที่ต้องการ บ่ม ในกล่องมืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ล้างด้วย HBSS แล้วตรึงเซลล์ด้วย Absolute methanol และล้างด้วยเมธานอล 70% อีก 2 ครั้ง ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 2 M KOH ปริมาณ 120 µl เพื่อละลายตะกอนของ Formazan และ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตามด้วย DMSO ปริมาณ 140 µl ในทุกหลุม เขย่าเบา ๆ นาน 60 วินาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 655 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader

4.2 การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมอาหารด้วยไคโตซานในปริมาณที่ได้จากการทดลองที่ 1 ต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตรารอดของลูกปลากะพงขาว หลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Challenge test)

เลี้ยงปลากะพงขาว น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 6.80 ± 0.96 กรัม บ่อละ 30 ตัว จำนวน 8 บ่อ แบ่งเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 2 บ่อ โดยปลาแต่ละชุดการทดลองจะได้รับอาหารต่างกันดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 และ 2: อาหารเม็ดสำเร็จรูปปกติ (ไม่ผสมไคโตซาน)

ชุดการทดลองที่ 3 และ 4: อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผสมไคโตซาน ปริมาณร้อยละ 1 ของน้ำหนักอาหาร

เลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 49 วัน โดยให้อาหารวันละ 3-4 ครั้ง แต่ละวันให้อาหารไม่เกินร้อยละ 10 ของน้ำหนักปลา บันทึกปริมาณอาหารที่ให้ อาหารที่เหลือ จำนวนปลาป่วย และจำนวนปลาตายในแต่ละบ่อทุกวัน ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของปลาทุก 7 วัน โดยสุ่มปลาจากแต่ละบ่อ ๆ ละ 20 ตัว

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เก็บรวบรวมข้อมูลดังนี้

- นับจำนวนปลาที่เหลือในแต่ละบ่อ
- ชั่งน้ำหนักและวัดความยาว ความกว้างของปลา โดยสุ่มปลาบ่อละ 20 ตัว เพื่อศึกษาการกระจายขนาดของปลา
- ศึกษาประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันต่อการป้องกันโรคติดเชื้อ โดยสุ่มปลาบ่อละ 20 ตัว นำมาฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้มข้น 2 x 10^8 Colony forming unit (CFU) ต่อน้ำหนักลูกปลากะพงขาว 1 กรัม ปริมาตร 0.1 ml เข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ของลูกปลากะพงขาวชุดการทดลองที่ 1 และ 3 สำหรับชุดการทดลองที่ 2 และ 4 นั้นฉีด 0.85% NaCl ปลอดเชื้อปริมาตร 0.1 ml เข้าช่องท้องแทน สังเกตและบันทึกอาการป่วยและอัตราตาย จากนั้นคำนวณเปอร์เซนต์การตายเฉลี่ยของปลากะพงขาว และนำไปหาค่าประสิทธิภาพความคุ้มโรค (Relative Percent Survival, RPS) จากสูตร

$$RPS\ (\%) = \left\{ 1 - \frac{\text{เปอร์เซนต์การตายเฉลี่ยของกลุ่มที่กินอาหารเสริมไคโตซาน}}{\text{เปอร์เซนต์การตายเฉลี่ยของกลุ่มควบคุม}} \right\} \times 100$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำหรับอาการแสดงของลูกปลากะพงขาวเมื่อเกิดการป่วยจากการติดเชื้อ *V. harveyi* ได้แก่ ท้องบวมน้ำ ตกเลือดตามบริเวณลำตัว ตา ครีบ และหาง หากผ่าซากจะพบว่ามีน้ำขังในช่องท้อง มีจุดเลือดออกที่ตับและอวัยวะภายใน เมื่อเขี่ยเชื้อจากไตส่วนหลังไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot – blot พบว่าให้ผลบวกต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi*

4.2.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เพื่อเตรียมฉีดทดสอบ Challenge test

แตะเชื้อมาจาก Stock เชื้อ *V. harveyi* ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวมา 1 loop เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่ผสม NaCl ร้อยละ 2 ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เลือกโคโลนีสีขาวขุ่นมา 1 โคโลนี เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่ผสม NaCl ร้อยละ 2 ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เลือกโคโลนีสีเขียวมา 1 โคโลนี เขียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ผสม NaCl ร้อยละ 2 ปริมาตร 500 ml เขย่าทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แตะเชื้อมาย้อมสีแกรมเพื่อยืนยันเบื้องต้นและตรวจสอบซ้ำอีกครั้งด้วยเทคนิค Dot – blot จากนั้นจึงนำมาหาความเข้มข้นของเชื้อที่ได้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

4.2.1.1 ปั่นล้างเชื้อด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 2 รวม 3 ครั้ง เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 2 ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ml

4.2.1.2 เจือจางเชื้อที่ได้ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 2 ไล่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1:100, 1:1000 (10^3) 1:10000 (10^4) ไปจนถึง 10^9

4.2.1.3 แบ่งเชื้อที่เจือจางออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบบกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับโคโลนีของเชื้อโดยนับจำนวนอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนี และส่วนที่ 2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน

4.2.1.4 คำนวณความเข้มข้นของ Stock เชื้อแบคทีเรียที่ปั่นได้จากกราฟมาตรฐาน โดยมีหน่วยเป็น CFU/ ml

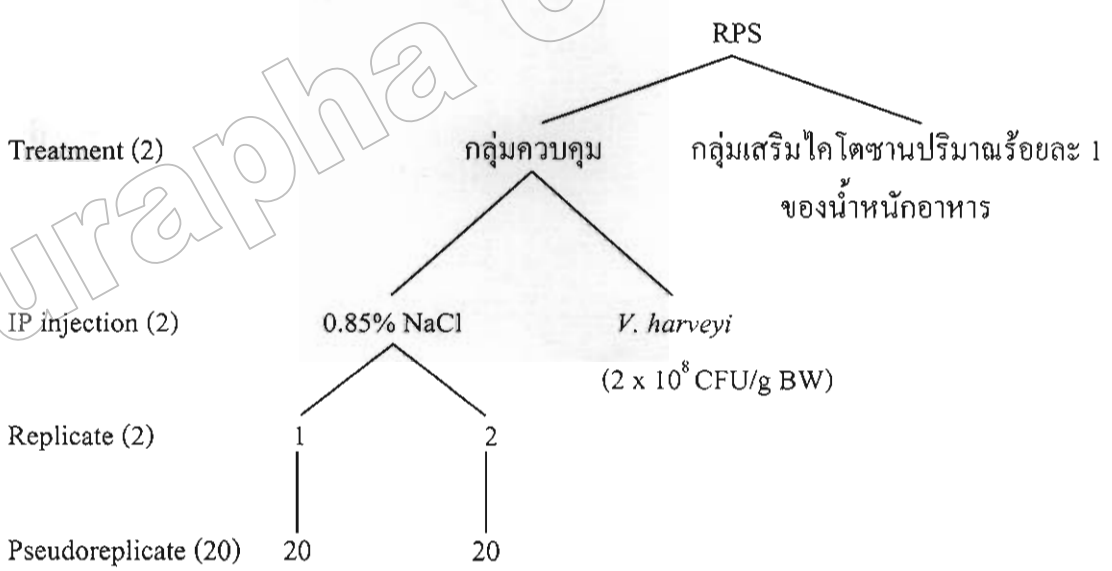
4.2.1 การทดสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค Dot – blot

ใช้ทดสอบยืนยันว่าโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงที่นำมาจาก Stock และที่แยกได้จากไตของลูกปลากะพงขาวหลังทำ Challenge test เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ขั้นตอนทดสอบทำได้โดยเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการตรวจละลายลงใน 2% NaCl ปริมาตร 50 µl หยดสารละลายเชื้อที่ได้ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (ใช้ตัวอย่างเชื้อที่

เก็บไว้ซึ่งทราบชนิดของเชื้อแน่นอนเป็น Positive และ Negative control หยดลงบนกระดาษทดสอบแผ่นเดียวกัน) ทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นบ่มใน 5% Non-fat Dry Milk ใน PBS ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย 0.01 M PBS ผสม 0.1% Tween 20 โดยล้าง 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 3 นาที แช่กระดาษในโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ใช้ลงในโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* บ่มและเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย 0.01 M PBS ผสม 0.1% Tween 20 อีก 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาบ่มในแอนติบอดีจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Goat Anti Mouse Immunoglobulin) เจือจาง 1:1000 และ conjugate ด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย 0.01 M PBS ผสม 0.1% Tween 20 อีก 4 ครั้ง สุดท้ายแช่ลงในสารละลายซับเสตรท (25 µl H_2O_2 + 7 mg DAB + 80 µl $CoCl_2$ + 20 ml 0.01 M PBS) สังเกตจุดสีน้ำตาลเข้มที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ Positive control และหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการแช่ลงในน้ำกลั่น

การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณน้ำหนักเพิ่ม ความยาวเพิ่ม อัตราการกินอาหาร อัตราแลกเนื้อ อัตรารอดตายของปลา และ RPS นำมาเปรียบเทียบทั้ง 4 ชุดการทดลอง



n = 2 x 2 x 2 x 20 = 160

ภาพที่ 7 แผนการทดลองที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างชุดการทดลองโดยวิธี ANOVA ปัจจัยต้นคือ ปริมาณไดโตซานที่เสริมในอาหารและระยะเวลาในการเลี้ยง และปัจจัยผันแปร คือการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในแต่ละการทดสอบและอัตราการเจริญเติบโต (การทดลองที่ 1) และประสิทธิภาพความคุ้มโรค อัตราการตาย และอัตราการเจริญเติบโต (การทดลองที่ 2) โดยใช้สถิติ Tukey test เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของตัวแปรในแต่ละชุดการทดลอง โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University