บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ของบริษัท Beckmann, Germany

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA

- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G650E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA

-หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

- เครื่องเขย่า (Incubator shaker)

- ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซีส (agarose gel electrophoresis) ของบริษัท Biorad, USA

- เครื่องส่องเจลด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต ของบริษัท Biorad, USA

3.2 เคมีภัณฑ์

- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตแบซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

- อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

- ชุดจัดจำแนกเชื้อสำเร็จรูป API50CH ของบริษัท Biomerieux, France

- ชุดตรวจสอบสารปฏิชีวนะในอาหาร SAM-Test ของคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทาลัย

- Phenol Red Broth Base ของบริษัท Difco Laboratories, USA

- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany

3.3 **สารเคมีสำหรับ** Immunohistochemistry

1. เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 70%, 80%, 90%, 95% BDH
2. N-butyl alcohol Univar
3. ไซลีน (Xylene) Carlo Erba
4. Formaldehyde Carlo Erba
5. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
6. สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10)(วิธีเตรียมดูภาคผนวกข)
7. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ Sigma (Diaminobenzidine tetrahydrochloride ,DAB)
8. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide ,H_2O_2) 30 % Sigma
9. อิโอซิน (Eosin Y) 0.02% ใน เอทิลแอลกอฮออล์ 95 % Harleco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
10. ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข) Harleco
11. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) Sherwood
12. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) Difco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
13. Davidson ' s fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , NaOH) Riedel – de Haen
15. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl) Merck
16. Permount Ficther Scientific
17. แอนติบอดี *Vibrio harveyi* 639 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

3.4 สารเคมีสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

1. lysis buffer I (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
2. lysis buffer II (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
3. สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์
4. ไอโซโพพานอล
5. 70% เอธานอล
6. Proteinase K
7. Ribonuclease A
8. 1 kb ladder ของบริษัท Promega, USA
9. *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, USA
10. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท Promega, USA
11. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล Geneclean II Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
12. 6X gel loading buffer

3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

1. คัดเลือกแบคทีเรียจากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

นำแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่จับได้จากชายฝั่งทะเล จ.ชลบุรี และที่ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเพาะพันธุ์ลูกกุ้งกุลาดำ จ.ตรัง มาตัดทางเดินอาหารโดยวิธีปลอดเชื้อจากนั้นนำทางเดินอาหารที่ได้มาชั่งน้ำหนัก (กรัม) และทำเจือจางด้วย 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมคลอไรด์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. เพื่อหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* นำอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมไปกระตุ้นการงอกของสปอร์เพื่อหาแบคทีเรียที่สร้างสปอร์โดยใช้วิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37องศา

เซลเซียส นาน 24 ชม. ดูผลการทดลองโดยการนับจำนวนแบคทีเรียรวมและเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ลงบนอาหารแข็ง TSA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์

2. ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Vibrio harveyi* ที่ก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ

2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่แยกได้เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *V. harveyi*

เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำในอาหารเหลวทริปติกซอย (TSB) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 24 ชม. จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตัวเซลล์ออกที่ความเร็ว 7000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

2.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ *V. harveyi*

เลี้ยง *V. harveyi* ในอาหารเหลวทริปติกซอยที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2.0 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที นาน 24 ชม. จากนั้นนำมาเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง TSA ที่เติมวุ้น 1.0 เปอร์เซ็นต์และโซเดียมคลอไรด์ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเจาะหลุมโดยใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ซม. หยดส่วนใสที่ เตรียมได้จากข้อ 2.1 ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานเพาะเชื้อดังกล่าว ไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชม. แล้วนำออกมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. สังเกตและวัดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

3. การผสมแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำกับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

3.1 การเตรียมแบคทีเรียที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ

เลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหารเหลว TSB เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที นาน 24 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตัวเซลล์ที่ความเร็ว 7000 รอบ/นาที เก็บเซลล์สดที่ได้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

3.2 ผสมเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.1 กับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ผสมเซลล์สดที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 กับอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอัตราส่วน 1 :3, 1:4 และ 1:5

เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^{10} CFU/g โดยการผสมคลุกเคล้ากันในบีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อ แล้วนำไปทำให้อาหารแห้งในตู้ปลอดเชื้อเพื่อให้อาหาร กระจายตัวสม่ำเสมอ

3.3 ตรวจนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและสปอร์ของแบคทีเรียที่ผสมในอาหารกุ้ง

นำอาหารเลี้ยงกุ้ง 1.0 กรัมมาแขวนลอยในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 9.0 มล. เจือจางตามลำดับนำค่าการเจือจางที่เหมาะสมมากระจายเชื้อบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. เพื่อตรวจนับเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้นนำอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมไปกระตุ้นการงอกของสปอร์ เพื่อหาแบคทีเรียที่สร้างสปอร์โดยใช้วิธี heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. ดูผลการทดลองโดยการนับ จำนวนแบคทีเรียรวม

4. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับตู้กระจก

เลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ PL25 ในตู้กระจกที่บรรจุน้ำ 20 ลิตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ปล่อยกุ้งกุลาดำตู้ละ 20 ตัว จำนวน 2 ตู้ต่อกลุ่มการทดลอง การทดลองแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มควบคุมเลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรีย
- กลุ่มทดลอง 1 เลี้ยงโดยอาหารที่ผสมด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำที่ผ่านการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*
- กลุ่มทดลอง 2 เลี้ยงโดยอาหารที่ผสมด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* P1 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำที่ผ่านการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*
- กลุ่มทดลอง 3 เลี้ยงโดยอาหารที่ผสมด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* P2 ที่แยกได้จากทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำที่ผ่านการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi*
- กลุ่มทดลอง 4 เลี้ยงโดยอาหารที่ผสมด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* S11

บันทึกผลการทดลองทุก 15 วัน โดยติดตามปัจจัยดังต่อไปนี้คือ

- น้ำหนักกุ้งกุลาดำ
- ความยาวกุ้งกุลาดำ
- ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* P11, *Bacillus* P1, *Bacillus* P2, *Bacillus* S11 และ *Vibrio* spp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งและตะกอนอุจาระกุ้ง โดยวิธี Total plate counts (CFU/ml, CFU/g)

- เปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวของกุ้งกุลาดำทุกกลุ่มทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (0ne-way ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งทุก 15 วัน ดังนี้

- พีเอช (pH paper)
- อุณหภูมิ (Thermometer)
- ความเค็ม (Salinometer
- แอมโมเนียม (Ammonium test Kit)
- ไนไตรท์ (Nitrite test Kit)
- ไนเตรท (Nitrate test Kit)
- ฟอตเฟต (Phosphate test Kit)

5. การทดสอบความสามารถของกุ้งกุลาดำในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคจากเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 1526

5.1 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 เพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในอาหารเหลว TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 28 เองศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำมาทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคโดยวิธีการแช่ (Immersion Challenge) ปริมาณ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ที่ใช้ประมาณ 10^6 CFU/ml ลงในบ่อเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง กุ้งที่ใช้ทดสอบได้จากการรวบรวมกุ้งที่รอดชีวิตจากการ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน จากการทดลองข้อที่ 4 จำนวนกุ้งที่ใช้การทดลองกลุ่มละ 30 ตัว ทดสอบเป็นระยะเวลานาน 10 วัน ติดตามดูผลทุก 2 วันของปัจจัยดังต่อไปนี้

- อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำทั้ง 2 กลุ่มทดลอง
- ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* P11 และ *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 ในน้ำเลี้ยงกุ้งและในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Total plate counts (CFU/ml) และอาหารเฉพาะอย่าง TCBS สำหรับการเพาะเลี้ยง *V. harveyi* 1526

6. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นระยะเวลา 100 วันในระดับบ่อปูนด้วยอาหารผสมโพรไบโอติก *Bacillus* P11

เพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำวัย PL25 ที่ได้จากบ่อฟัก จ. ฉะเชิงเทรา ในบ่อปูนขนาดซีเมนต์ขนาด 80x74x87 ลูกบาศก์เซนติเมตร บรรจุน้ำได้ประมาณ 400 ลิตร โดยปล่อยกุ้งบ่อละ 70 ตัว ให้อากาศตลอดเวลา การทดลองแบ่งเป็น 2 ชุด ดังนี้

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก
- กลุ่มทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยให้อาหารที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus* P11

อาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำตลอดการทดลอง เป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป ให้อาหาร 10% ของน้ำหนักตัว โดยให้อาหารวันละ 3 มื้อ คือเวลา 09.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น. ระบบการเลี้ยงเป็นแบบระบบปิด (Closed recirculating water system) ที่ประกอบด้วยระบบกรองชีวภาพแยกกับระบบเลี้ยง (Menasaveta และคณะ, 1989) บันทึกผลการทดลองทุก 15 วัน โดยติดตามปัจจัยดังต่อไปนี้คือ

- น้ำหนักกุ้งกุลาดำ
- ความยาวกุ้งกุลาดำ
- ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* P11 และ *Vibrio* spp.

ในน้ำเลี้ยงกุ้งและตะกอนอุจาระกุ้ง โดยวิธี Total plate counts (CFU/ml, CFU/g) และอาหาร TCBS สำหรับการเพาะเลี้ยง *Vibrio* spp.

- เปรียบเทียบน้ำหนักและความยาวของกุ้งกุลาดำทั้ง 2 กลุ่มทดลองโดยใช้กา วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตรวจสอบคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งทุก 15 วัน ดังนี้

- พีเอช (pH paper)
- อุณหภูมิ (Thermometer)
- ความเค็ม (Salinometer)
- ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO Meter)
- แอมโมเนียม (Ammonium test Kit)
- ไนไตรท์ (Nitrite test Kit)
- ไนเตรท (Nitrate test Kit)
- ฟอตเฟต (Phosphate test Kit)

7. การทดสอบความสามารถของกุ้งกุลาดำในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

7.1 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 เพื่อใช้ในการทดสอบความต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (Challenge test)

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในอาหารเลว TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นำมาทดสอบความต้านทานต่อการติดโรคโดยวิธีการแช่ (Immersion Challenge) จำนวน *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ใช้ประมาณ 10^6 CFU/ml ลงในบ่อเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 กลุ่มการทดลองโดยใช้กุ้งที่รอดชีวิตจากการ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 วัน จำนวนการทดลองละ 30 ตัว ทดสอบเป็นระยะเวลานาน 10 วัน บันทึกผลทุก 2 วัน โดยการติดตามปัจจัยดังต่อไปนี้คือ

- อัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำทั้ง 2 กลุ่มทดลอง
- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* P11 และ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในน้ำเลี้ยงกุ้งและในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Total plate counts (CFU/ml) และอาหาร TCBS สำหรับการเพาะเลี้ยง *Vibrio* spp.

7.2 สังเกตลักษณะทางกายภาพของกุ้งที่ติดโรคโดย *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยสังเกตลักษณะภายนอกของลำตัวกุ้งที่ติดโรค ลักษณะของตับและตับอ่อน

7.3 ติดตาม *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในเนื้อเยื่อและทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำที่ติดโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

8. การตรวจ *V. harveyi* 639 ด้วย immunohistochemistry (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Paisarn Sithigorngul et al. (2000))

8.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

นำตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากการทดลองหลังจาก challenge ด้วย *V. harveyi* 639 นำมาตัดหัวและแยกลำไส้ออก แช่น้ำยา Davidson's fixative ให้คงรูป ล้างออกโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเปลี่ยนมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ข้ามคืน แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมกับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนนำสารใหม่เข้ามาแทนที่ (clearing) นำออกไปแช่ไซลีน จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ1 ชั่วโมง

ขั้นตอนการแช่ให้แข็งตัว (impregnation) ในพาราพลาสต์ แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวปริมาณ 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 45 นาที

ขั้นตอนการฝังพาราพลาสต์ (embedding) นำส่วนหัวของกุ้งและลำไส้แต่ละตัวจัดเรียงในก้นพิมพ์สี่เหลี่ยม จัดให้อวัยวะอยู่ตรงกลาง จากนั้นเทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงไปให้เต็มพิมพ์ ปิดด้วยกรอบพลาสติกด้านบนที่ต้องนำไปใช้ในการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม รอจนแข็งตัวจึงแกะพิมพ์ออก

ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ฝังในพาราพลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 0.8 ไมครอนเรียงต่อกัน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น ให้พอดีกับขนาดเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตึงเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.2 **กระบวนการย้อมโดยวิธี** Indirect peroxidase immunohistochemistry

ขั้นตอนการเอาพาราพลาสต์ออก (deparaffination) นำสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น วางบนตะกร้า (slide basket) แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ,5 และ 5 นาที ตามลำดับ

ขั้นตอนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (hydration) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในไซลีนที่ผสมนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็น

เวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, น้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที, สารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 1 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยให้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) หยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ โดยวางสไลด์ในกล่องที่ปิดฝาภายในบุด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้นเพื่อรักษาความชื้นตลอดเวลาดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเนื้อเยื่อออก ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ 2 ให้เป็นเนื้อเยื่อควบคุมหยดแอนติบอดีที่ 1 ให้คลุมแต่ละเนื้อเยื่อที่ 1 และ3 โดยแอนติบอดีที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3-3H และ โพลีโคลนอลแอนติบอดี pAb639 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสองชนิดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^-ปริมาณ 1:5 เก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 2 โดยการล้างแอนติบอดีที่ 1 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (vacuum pump) หยดแอนติบอดีที่ 2 ได้แก่ Goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเนื้อเยื่อเก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการใส่ซับสเตรต โดยการล้างแอนติบอดีที่ 2 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อแต่ละสไลด์มาทำปฏิกิริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ15 มิลลิกรัม และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ10 ไมโครลิตร ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ถึงขั้นนี้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ให้ผลบวกจะสามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin) โดยนำเนื้อเยื่อ 3 แผ่นแรก หรือ 1 ชุด มาย้อมสีฮีมาทอกไซลีน แต่ในอีก 1 ชุดย้อมสีอิโอซินเพียงอย่างเดียวทำได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนนี้นำ

เนื้อเยื่อย้อมสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 10 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินออกอย่างรวดเร็ว แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้เนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีน้ำเงินจาง แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีทับ (counterstain) ในเนื้อเยื่อปูด้วยสีอิโอซิน 0.02 เปอร์เซ็นต์ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที และไซลีน จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

8.3 ขั้นตอนการทำเป็นสไลด์ถาวร

ทำโดยการผนึกสไลด์ (mount) โดยหยดเปอร์เม้าท์ (permount) ประมาณ 3 หยด บนสไลด์ นำกระจกสไลด์มาปิดโดยแตะขอบด้านหนึ่งเอียงทำมุม 45 องศาเซลเซียสแล้วค่อยๆวางลง โดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อ *V. harveyi* 639 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในบริเวณต่างๆของเนื้อเยื่อกุ้ง

9. การตรวจหาสารปฏิชีวนะโดยวิธี Disk assay

การตรวจหาสารปฏิชีวนะโดยวิธี Simple Detection Method ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ
2. การเตรียมน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ที่ต้องการทดสอบ
3. การเตรียม test plate เพื่อตรวจสอบยาปฏิชีวนะโดยวิธี Disk assay
4. การอ่าน Inhibition zone

I 2148594X

9.1 การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบตามวิธีนี้มี 2 ชนิด คือ

1.*Micrococcus luteus* (*M. luteus*)

2.*Bacillus subtilis* 1163(*B. subtilis* 1163)

การเตรียม *Micrococcus luteus* (*M. luteus*)

เลี้ยงแบคทีเรีย *M. luteus* ลงบนอาหารแข็ง TSA หรืออาหารแข็งนิวเตรียนท์ (Nutrient agar slant)(NA) เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชม.ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 9.1.1 ลงใน sensitivity test broth ปริมาตร 20 มล.บ่มทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชม. ถ่ายแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 9.2.2 ลงใน sensitivity test broth ปริมาตร 20 มล.บ่มทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชม. ติดต่อกันนาน 2 วัน ได้เชื้อทดสอบ (Test organism)

การเตรียม *Bacillus subtilis* 1163 (*B. subtilis* 1163)

เนื่องจากแบคทีเรีย Bacillus เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ การเตรียมเชื้อในรูปสปอร์จะทำให้สะดวกในการปฏิบัติงานมากกว่าการใช้เซลล์ที่มีชีวิต ทั้งนี้สปอร์ที่เตรียมได้ในแต่ละรุ่นสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานประมาณ 6 เดือน โดยเก็บที่อุณหภูมิ 2 – 10 องศาเซลเซียสและข้อดีอีกประการหนึ่งของการใช้สปอร์คือ ในการเตรียม test plate แต่ละครั้งจะได้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกัน

ขั้นตอนการเตรียมสปอร์

เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* 1163 ลงบนอาหารแข็ง TSA หรือ อาหารแข็งนิวเตรียนท์ NA เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชม. ล้างแบคทีเรียบนผิวหน้า slant ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 3 มล.ถ่ายเชื้อจากข้อ 2 ลงในอาหาร Antibiotic medium no. 1 slant (Roux bottle) และเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้า slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน ล้างแบคทีเรียบนผิวหน้า slant ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 25 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000-5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างสปอร์ด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อและ

ปั่นเหวี่ยง ทำซ้ำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง เติมน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อลงในสปอร์ และนำไปต้มอีกครั้งในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บสปอร์ในน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ

9.2 การเตรียมส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* P11 (BP11)

เลี้ยงแบคทีเรีย BP11 ลงบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 50 มล. เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บส่วนในที่ได้มากรองผ่าน 0.45 ไมครอน filter membrane เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

9.3 การเตรียม Test plate

เตรียม test plate โดยใช้อาหาร Antibiotic medium no. 5 ปริมาตร 10 มล. สำหรับ *B. subtilis* และ *M. luteus* โดยวิธี pour plate เพื่อใช้ตรวจหาสารปฏิชีวนะ จุ่ม disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มม. ที่ปราศจากเชื้อลงในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย BP11 ด้วย capillary action และนำไปวางบน test plate ที่เตรียมไว้จากข้อ 1 พร้อมวาง antibiotic disk ลงบน plate เดียวกันเพื่อใช้เป็น positive control โดยใช้ Ampicillin 0.025 μg/ml สำหรับ *M. luteus* ยา Kanamycin 0.5 μg/ml สำหรับ *B. subtilis* 1163 เก็บ plate ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 2 ชม. และนำออกมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชม.

9.4 การอ่านผลบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) และการแปลผล

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยต้องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 12 มม. ขึ้นไป โดยในแต่ละครั้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งของ positive control ต้องมีขนาด 14 มม.

10. การตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เบื้องต้นในน้ำเลี้ยง *Bacillus* P11 โดยชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้าง CM-Test

ตัดจำนวนหลอดทดสอบเท่ากับจำนวนตัวอย่างที่จะทดสอบและตัดเพิ่มอีก 1 หลอดสำหรับใช้เป็นหลอดควบคุม (Negative control) นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* P11 ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการ

กรองผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอน ใช้ปากคีบปลอดเชื้อ (Forceps) คีบกระดาษกรองวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. ทีปลอดเชื้อจุ่มในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 7.2 และใส่ลงในหลอดชุดทดสอบ โดยให้กระดาษกรองสัมผัสกับผิวด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดทดสอบ ปิดฝาหลอดด้วยเทปกาว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่มชุดตรวจสอบนานประมาณ 2 ชั่วโมงครึ่ง โดยนำหลอดควบคุมมาดูก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด ให้อ่านผลการทดสอบทั้งหมดได้ การแปลผลดังนี้คือหลอดทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าไม่มีสารต้านจุลชีพหลอดทดสอบเป็นสีม่วง แสดงว่ามียาต้านจุลชีพ

11. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S ribosomal DNA)

11.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* P11

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1999) โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 20 ชม. ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แขวนลอยเซลล์ด้วย lysis buffer I (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย lysis buffer II (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมไอโซโพพานอล ปริมาตร 0.6 เท่า ของปริมาตรส่วนใสที่ได้ กลับหลอดไปมาจนเกิดตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนดีเอ็นเอแห้งสนิท ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

(A_{260} และ A_{280}) คำนวณค่า A_{260} ต่อ A_{280} โดยหากอัตราส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง แต่ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

11.3 คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากสมการ

ดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} X 50 X dilution factor

11.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ไปทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ส่วนผสมของสารในปฏิกริยา และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ออกแบบตามวิธีของ Blackall (1999) โดยที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกริยาของสารแต่ละชนิดเป็นดังนี้

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ 1X *Taq* DNA polymerase buffer *Taq* DNA polymerase ปริมาณ 1.5 หน่วย สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะกับปริเวณปลายทั้ง 2 ด้านของสายดีเอ็นเอแม่แบบ forward primer 10F 5' -AGTTTGATCCTGGCTC- 3' และ reverse primer 1540R 5' -AAGGAGGTGATCCAGCC- 3' ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ของแต่ละตัว) ดีเอ็นเอแม่แบบ ที่เตรียมได้ปริมาณ 1 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ รวมส่วนผสมทั้งหมดมีปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและควรเก็บส่วนผสมทั้งหมดในที่เย็น หลังจากนั้นดำเนินปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (Perkin Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Hot start	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที	
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	35 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 7 นาที	

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็คโทรโฟเรซิส ในขั้นต่อไป

11.5 การแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็คโทรโฟเรซีส

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซีส โดยเตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมในบัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข) เทลงในแม่พิมพ์ซึ่งมีหวีเสียบอยู่ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปล่อยให้อะกาโรสแข็งตัวประมาณ 20 นาที วางชิ้นอะกาโรสเจลลงในแชมเบอร์ เทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเหนือผิวหน้าของอะกาโรสเจล ประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม นำมาหยอดลงในช่องวิ่ง โดยช่องวิ่งแรกจะหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานที่ผสมกับสีติดตาม จากนั้นทำอีเลคโทรโฟเรซิส โดยใช้ชุดทำอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟเรซีสรุ่น Mini sub cell GT ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาเกือบถึงขอบเจลด้านล่าง ปิดเครื่อง นำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลานาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

11.6 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากะกาโรสเจลด้วยชุดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป(gel extraction kit)

ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่ลงในหลอด appendroff พร้อมชั่งน้ำหนัก เติมบัฟเฟอร์ QG ในปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จนเจลหลอมหมด ย้ายสารละลายทั้งหมดลงใน QIAquick spin column ที่ต่อกับหลอดเก็บตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้าง 2 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์ PE ที่มีเอธานอลเป็นส่วนผสม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย column ไปต่อกับหลอดสำหรับเก็บตัวอย่างใหม่ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ได้กลับมาเติมใน column เดิมอีกครั้งเพื่อชะดีเอ็นเอออกจาก column จนหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (16S rDNA)

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอดีเอ็นเอ (16S rDNA) ที่เตรียมได้จากข้อ 10.6 โดยใช้บริการจากหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ได้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพเมอร์ forward และ reverse ดังแสดงในตาราง เพื่ออ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัสดีเอ็นเอจนครบ 1,500 นิวคลีโอไทด์ รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit และนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast

ตารางที่ 3.1 แสดงนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Bacillus* P11

Primer	**ลำดับนวคลีโอไทด์ (5'-3')**
10F Forward	AGTTTGATCCTGGCTC
350F Forward	TACGGGAGGCAGCAG
1240R Reverse	CCATTGTAGCACGTGT
1540R Reverse	AAGGAGGTGATCCAGCC

12. การจัดจำแนกแบคทีเรีย *Bacillus* P11 โดยชุดสำเร็จรูป API50CH ของบริษัท Biomerieux, France

เลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* P11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตัวเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นแขวนลอยเซลล์ที่ได้ในสารละลายฟีนอลเรด ปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วหยดลงในชุดทดสอบของ API50CH จนครบ 50 ช่อง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลในเวลา 18-24 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาแปลผลด้วยโปรแกรมการจัดจำแนกแบคทีเรียของ API50CH

สรุปขั้นตอนการทดลองในงานวิจัยนี้

ระดับห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนที่ 1 **ทางเดินอาหารของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ**

- คัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติก
- ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของของ *V. harveyi*

BP1 BP2 BP11

แต่ละสายพันธุ์ผสมกับอาหารกุ้งในอัตราส่วนที่เหมาะสม
(น้ำหนักเซลล์เปียก : น้ำหนักอาหารกุ้ง)

ขั้นดอนที่ 2 **เลี้ยงกุ้งกุลาดำ PL25 ในตู้กระจกขนาด 20 ลิตร**

- สังเกตการเจริญเติบโต (น้ำหนักและความยาว)
- คุณภาพน้ำ
- ปริมาณแบคทีเรียรวมและปริมาณ *Bacillus*

ชักนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 1526

- สังเกตเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในแต่ละกลุ่มการทดลอง
- ได้ BP11 เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก และใช้เลี้ยงกุ้งในระดับ 400 ลิตร

ขั้นตอนที่ 3 **เลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อระดับ 400 ลิตร (2 ครั้ง)**

- สังเกตการเจริญเติบโต (น้ำหนักและความยาว)
- ตรวจคุณภาพน้ำ
- หาปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* sp. และ *Vibrio* spp. ในน้ำและในตะกอน

↓

ชักนำให้เกิดโรคเรืองแสงด้วย *V. harveyi* 639

- สังเกตเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในแต่ละกลุ่มการทดลอง
- หาปริมาณแบคทีเรียรวม, ปริมาณ *Bacillus* sp. และ *Vibrio* spp. ในน้ำ

↓

ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* P11 **และ** *Vibrio* spp. **ในทางเดินอาหารกุ้งที่ตาย**

↓

ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียรวม, *Bacillus* P11 **และ** *Vibrio* sp. **ในทางเดินอาหารกุ้งหลังเลี้ยงนาน 100 วัน**

↓

ตรวจหาปริมาณ *Vibrio* spp. **ในตับของกุ้งที่ตาย**

ขั้นตอนที่ 4 **ยืนยันการติดเชื้อ** *V. harveyi* 639 **ในอวัยวะของกุ้งที่ตายด้วยเทคนิค** Immunohistochemistry

ขั้นตอนที่ 5 **จัดจำแนก** *Bacillus* P11 **ด้วยชุดจัดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป** API50CHB **และ**16S rDNA

ขั้นตอนที่ 6 **ตรวจหาสารปฏิชีวนะในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง** BP11 **เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมงด้วยวิธี** Disk assay, CM-test **และ** HPLC

ขั้นตอนที่ 7 **ตรวจหาสารปฏิชีวนะในเนื้อก้งกลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม** BP11 **เป็นเวลา** 100 **วันด้วยวิธี** CM-test

ขั้นตอนที่ 8 **ตรวจหาปริมาณ** BP11 **และสปอร์ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 6 เดือน**