

การตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (VTcC3)
ใน *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi*

DETECTION OF VTcC3 GENE
IN *Vibrio parahaemolyticus* AND *Vibrio harveyi*



โครงการงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DETECTION OF THE VTcC3 GENE
IN *Vibrio parahaemolyticus* AND *Vibrio harveyi*



KATANYAPORN MANPHIM
THITIPA RUPPROM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (VTcC3) ใน <i>Vibrio parahaemolyticus</i> และ <i>Vibrio harveyi</i>
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกตัญญูภรณ์ แม่นพิมพ์ รหัสนักศึกษา 63050367 นางสาวฐิติภา รูปพรหม รหัสนักศึกษา 63050383
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายีนสร้างสารพิษ Tc (VTcC3) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD) และตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (VTcC3) ใน *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction โดยทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการทำงานของไพรเมอร์ด้วยเทคนิค Gradient PCR ที่อุณหภูมิ 55-63 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์เป็น 5 และ 10 $\mu\text{M}/\text{reaction}$ ใช้ตัวอย่างเชื้อ *V. parahaemolyticus* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค HLVD และ *V. harveyi* เมื่อตรวจวิเคราะห์ยีน VTcC3 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 $\mu\text{M}/\text{reaction}$ กำหนดสภาวะในการทำงาน ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 4 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 5 นาที และอ่านผลการทำ PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis ผลจากการวิจัยพบว่า ไม่ปรากฏแถบแบนขนาดที่ต้องการในตัวอย่างเชื้อทุกตัว จึงสรุปผลการตรวจหายีน VTcC3 ด้วยเทคนิค PCR เป็นผลลบ (Negative) จากนั้นทำการตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งจากการ Amplification curve พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ยีน VTcC3 ได้ตั้งแต่ 10 copies number และเมื่อตรวจสอบ Melt peak พบว่า ค่า Tm ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3 (Positive control) คือ 80.00 องศาเซลเซียส โดยตัวอย่าง *Vibrio* ssp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่ปรากฏ peak ที่ 80.00 องศาเซลเซียส จึงอ่านผลการตรวจหายีน VTcC3 เป็นผลลบ (Negative) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไม่พบยีนสร้างสารพิษ Tc (VTcC3) ใน *V. parahaemolyticus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และ *V. harveyi* ได้

คำสำคัญ : วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส, วิบริโอ ฮาเวีย, ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส, Real-time PCR

Title	Detection of <i>VTcC3</i> gene in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio harveyi</i>
Students	Miss Katanyaporn Manphim Student ID 63050367 Miss Thitipa Rupprom Student ID 63050383
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2023
Advisor	Asst. Prof. Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

The objective of this special project is the study the gene *VTcC3* that encodes the toxin Tc, which is causing highly lethal Vibrio disease (HLVD), and to detect the *VTcC3* gene in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* using the Polymerase Chain Reaction technique. The conditions were optimized for primer performance using the Gradient PCR technique at temperatures ranging from 55-63°C, and primer concentrations of 5 and 10 µM/reaction were used. Three strains of *V. parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus* strain non-causing AHPND, *V. parahaemolyticus* strain causing AHPND, and *V. parahaemolyticus* strain causing HLVD) and *V. harveyi* were used as samples. To detect the *VTcC3* gene using PCR technique with a primer concentration of 5 µM/reaction, the following conditions are set: Initial denaturation at 95 °C for 4 minutes, Denaturation at 95 °C for 30 seconds, Annealing at 63 °C for 30 seconds, Extension at 68 °C for 1 minute, repeat the reaction 30 times, and Final extension at 68 °C for 5 minutes. The PCR products were analyzed using Agarose Gel Electrophoresis. According to the results, not all samples included bands of the required size. It was determined that the *VTcC3* gene was not detected using the PCR technique. The results were confirmed using the Real-time PCR. The Amplification curve showed that the *VTcC3* gene could be analyzed at 10 copies. T_m value of the recombinant plasmid pUC57-*VTcC3* was 80 °C. The four *Vibrio* ssp. samples did not show a peak at 80 °C, demonstrating that the detection results for the *VTcC3* gene were negative. As a result, the three *V. parahaemolyticus* strains and *V. harveyi* do not contain the Tc toxin-producing gene (*VTcC3*).

Keyword : *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, Polymerase chain reaction, Real-time PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่อง การตรวจวิเคราะห์ยีนสร้างสารพิษ Tc (TcC3) ใน *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* เพื่อสำเร็จการศึกษาของนักศึกษาระดับปริญญาตรี จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และสนับสนุนเป็นอย่างดีจาก ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิجارณ์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำและการปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ จนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อยได้ด้วยดี ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์ที่ได้รับและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศิริขวัญ พลประทีป ผู้ให้ความรู้ และคำแนะนำ นอกเหนือจากอาจารย์ที่ปรึกษา ตลอดจนอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี และอำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ปฏิบัติงาน ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.อัญชลี ทัศนาศจร อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล นักวิจัย ทีมวิจัยอนุพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียมาใช้ในการศึกษา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ รศ.ดร.อนรรักษ์ โพธิ์เอี่ยม (ประธานกรรมการ) และ รศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์ (กรรมการ) ที่ให้คำปรึกษา และคำแนะนำจนโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ให้การสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจให้ในทุก ๆ เรื่อง จนโครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ที่คอยช่วยเหลือ ผลักดัน และเป็นกำลังใจให้ในการทำโครงการพิเศษนี้เสมอ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ไม่ว่าทางใดก็ตามหนึ่งต่อผู้ที่สนใจและสังคมนี้

กตัญญูภรณ์ แม้นพิมพ์
จิตติภา รูปพรหม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD)	3
2.2 Tc Toxin.....	3
2.3 เชื้อกลุ่มวิบริโอ (<i>Vibrio</i> spp.).....	5
2.3.1 เชื้อ <i>Vibrio harveyi</i>	5
2.3.2 เชื้อ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
2.4 การตรวจวินิจฉัยยีน	7
2.4.1 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction : PCR).....	7
2.4.2 เทคนิค Real-Time PCR (Quantitative Real Time PCR : qPCR)	7
2.4.3 Gel electrophoresis.....	10
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	13
3.1 การออกแบบไพรเมอร์	13
3.2 การเตรียมเชื้อ <i>Vibrio</i> spp.....	13
3.3 การสกัด Genomic DNA	14
3.4 การเตรียม Recombinant plasmid ที่มียีน VTcC3	14
3.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์	14
3.5.1 การทดสอบหาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม	14
3.5.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม.....	15
3.6 การตรวจหายีน VTcC3 ด้วยเทคนิค PCR.....	15
3.7 การตรวจหายีน VTcC3 ด้วยเทคนิค Real-time PCR	16
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	17
4.1 การออกแบบไพรเมอร์	17
4.2 การเตรียมเชื้อ <i>Vibrio</i> spp.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์	19
4.4 การตรวจหายีน <i>VTcC3</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	21
4.5 การตรวจหายีน <i>VTcC3</i> ด้วยเทคนิค Real-time PCR	22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	26
เอกสารอ้างอิง.....	27
ภาคผนวก	31
ภาคผนวก ก	32
ภาคผนวก ข	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4. 1 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน <i>VTcC3</i> ของ <i>V. paraheamolyticus</i>	17



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2. 1	อาการทางคลินิกของกุ้ง (ก) ลูกกุ้งที่ติดเชื้อ HLVD และ (ข) ลูกกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ HLVD.....	3
2. 2	โครงสร้างของ Tc toxins.....	4
2. 3	กลไกการทำงานของ Tc toxins	4
2. 4	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR)	7
2. 5	การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย SYBR Green I (A) และ Hydrolysis probe (B).....	8
2. 6	การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Hybridization Probe.....	9
2. 7	การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Molecular Beacons.....	10
4. 1	การเปรียบเทียบไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>V. parahaemolyticus</i> ในฐานข้อมูล. 17	17
4. 2	ลักษณะโคโลนีของ <i>Vibrio</i> spp. ที่เกิดขึ้นบนอาหาร TSA+1.5% NaCl.....	18
4. 3	ลักษณะโคโลนีของ <i>Vibrio</i> spp. ที่เกิดขึ้นบนอาหาร TCBS.....	19
4. 4	ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ด้วยวิธี Gradient PCR โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด VTcC3 เป็น DNA template กับไพรเมอร์ VTcC3 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร	20
4. 5	ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ด้วยวิธี Gradient PCR โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด VTcC3 เป็น DNA template กับไพรเมอร์ VTcC3 ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร	21
4. 6	ผลการเพิ่มปริมาณยีน VTcC3 ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ VTcC3 ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร (ข) ผลการเพิ่มปริมาณยีน VTcC3 ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16s ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร.....	22
4. 7	กราฟแสดง Amplification curve ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3	23
4. 8	กราฟมาตรฐานของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3.....	23
4. 9	กราฟแสดง Melt peak ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3.....	23
4. 10	กราฟแสดง Amplification curve ของ <i>Vibrio</i> spp.....	24
4. 11	กราฟแสดง Melt peak ของ <i>Vibrio</i> spp.	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Vibrio สายพันธุ์ก่อโรค เช่น *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* เป็นสาเหตุหลักในเกิดโรคระบาดแก่อุทสาหร่ายในระยะเวลา Post Laval ซึ่งถือเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจสำคัญในประเทศไทย โรคระบาดที่เกิดขึ้นจากเชื้อเหล่านี้ ได้แก่ โรคเรืองแสง (Luminescent vibriosis) ที่ก่อโรคโดย *V. harveyi* โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันหรือโรคตายด่วน (Acute hepatopancreatic necrosis disease : AHPND หรือ Early mortality syndrome : EMS) ที่ก่อโรคโดย *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ Vp_{AHPND} และ *V. harveyi* รวมไปถึงโรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD) ที่เป็นโรคอุบัติใหม่ในอุตสาหกรรมกุ้ง โดยมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์พิเศษของ *V. parahaemolyticus* (Vp_{HLVD}) แบคทีเรียมีการสร้างสารพิษ Tc (Toxin complex) ที่สามารถเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ท่อด้วยวิธีการฉีดสารพิษ (syringe-like mechanism) จากนั้นก็จะเกิดกระบวนการทำลายในเซลล์ทำให้กุ้งมีอาการตับซีด ลำไส้ว่างและตัวโปร่งใส เนื่องจากถูกทำลายท่อตับและเนื้อเยื่อทางเดินอาหารส่วนกลาง โดยถูกกินมากกว่า 90% ที่ติดเชื้อและแสดงอาการดังกล่าวข้างต้น จะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง (กรมประมง, 2567)

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อในกุ้งหลากหลายวิธี เพื่อเป็นการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาด ทำให้การตรวจวินิจฉัยโรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD) สามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น การตรวจพยาธิสภาพ (gross pathology) โดยการตรวจดูลักษณะอาการภายนอกและการตัดชิ้นเนื้อตับและตับอ่อนของกุ้งเพื่อดูการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของโรคนี้ การตรวจหาเชื้อสาเหตุทางจุลชีววิทยา โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อ การตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างสารพิษโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ (pcr product) ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เพื่อยืนยันผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากการทำ PCR เทคนิคนี้เป็นเทคนิคมาตรฐานที่นิยมใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค เนื่องจากมีความจำเพาะและไวสูง (Tran et al., 2013) การตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างสารพิษโดยเทคนิค Real-Time polymerase chain reaction หรือ quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) โดยมีการใช้สี Fluorescence ซึ่งเป็นตัวตรวจจับผลของ PCR product ที่เกิดขึ้นโดยไม่ต้องนำไปผ่านเทคนิค gel electrophoresis ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพจำเพาะและแม่นยำสูง (กรมประมง, 2562) การตรวจหาสารพิษ โดยวิธีชีวเคมี เช่น Western blotting, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) การตรวจการทดสอบประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อก่อโรค โดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ เป็นต้น เพื่อวินิจฉัยที่แม่นยำต้องอาศัยหลายวิธีหลายเทคนิคร่วมกัน โดยเฉพาะการตรวจหาชิ้นและสารพิษ เพื่อให้ได้ผลการวินิจฉัยที่น่าเชื่อถือและแม่นยำมากที่สุด (Tran et al., 2013)

ดังนั้นทางคณะผู้จัดทำจะทำการตรวจหาชิ้นสร้างสารพิษ Tc (VTcC3) ใน *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD) ในกุ้ง

1.2.2 เพื่อตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ใน *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาข้อมูลของยีนสร้างสารพิษ Tc เพื่อออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*)

1.3.2 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค Polymerase Chain Reaction เพื่อใช้ในการตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*)

1.3.3 เตรียมแบคทีเรีย *Vibrio* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. haveyi*, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นในการตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*)

1.3.4 เตรียม Recombinant plasmid plasmid *VTcC3* เพื่อใช้เป็น positive control ในการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค Polymerase Chain Reaction

1.3.5 ตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ใน *V. parahaemolyticus* และ *V.harveyi* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค Polymerase Chain Reaction ที่ใช้ในการตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) เพื่อการตรวจหายีนที่จำเพาะขึ้นได้

1.4.2 สามารถตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ใน *V. parahaemolyticus* และ *V.harveyi* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction ได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD)

โรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD) หรือ Translucent post-larvae disease (TPD) หรือ Glass post-larvae disease (GPD) เป็นโรคที่ก่อความรุนแรงต่อลูกกุ้งขาวในระยะ Post Laval (PL) ซึ่งสาเหตุของโรค HLVD คือ เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่สามารถผลิตสารพิษในกลุ่ม Toxin complexes (Tc toxin) อาการทางคลินิกของลูกกุ้งที่ติดเชื้อ คือ ตับและตับอ่อนสีซีดหรือไม่มีสี ทางเดินอาหารและลำไส้ว่าง ทำให้ลำตัวใสและโปร่งแสง โดยลูกกุ้งมากกว่า 90% ที่ติดเชื้อและแสดงอาการดังกล่าวข้างต้น จะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง (Zou et al, 2020; Yang et al., 2022; Yang et al., 2023; Liu et al., 2023)



รูปที่ 2. 1 อาการทางคลินิกของกุ้ง (ก) ลูกกุ้งที่ติดเชื้อ HLVD และ (ข) ลูกกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ HLVD
ที่มา: Jia (2024)

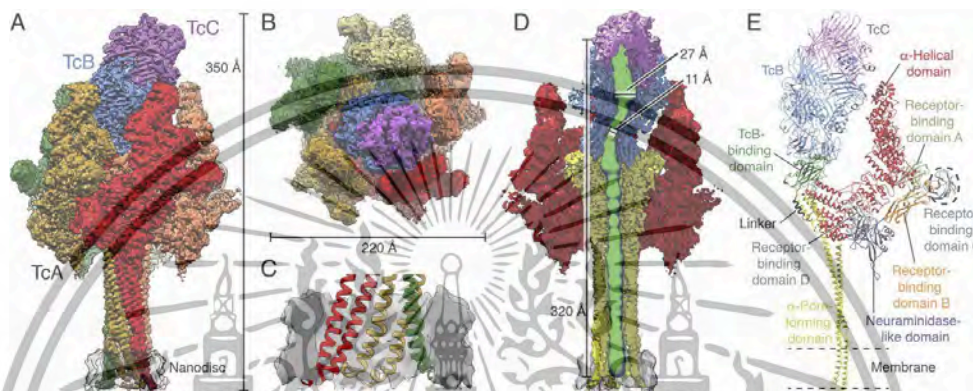
ช่วงปลายปี ค.ศ. 2019 มีรายงานการระบาดของโรค HLVD ครั้งแรก ในโรงเพาะและอนุบาลลูกกุ้งบริเวณตอนใต้ของประเทศไทย ในมณฑลกว่างตุง กวางสี และฟูเจี้ยน ต่อมาในปี ค.ศ. 2020 ช่วงเดือนมีนาคมถึงมิถุนายนมีการระบาดหนักขึ้น โดยขยายพื้นที่การระบาดไปยังบริเวณตอนเหนือของประเทศไทย ในมณฑลเฉิงชู่ ซานตง และเหอเป่ย์ (Chen, 2021; Harkell, 2020; He, 2020; Huang, 2020) ต่อมาในปี ค.ศ. 2023 มีการตรวจพบกุ้งที่ตายอย่างผิดปกติในโรงเพาะและอนุบาลลูกกุ้งประเทศเวียดนาม จากผลการตรวจสอบของห้องปฏิบัติการ ShrimpVet พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้ง เป็นเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD (ShrimpVet Research Laboratory, 2023) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการระบาดของโรค HLVD ในประเทศไทย

2.2 Tc Toxin

Tc toxins หรือ Insecticidal toxin complex family proteins เป็นสารพิษที่ถูกค้นพบครั้งแรกใน *Photobacterium luminescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในแมลง โดย Tc toxins มีบทบาทสำคัญในการควบคุมศัตรูพืชทางชีวภาพ (Bowen et al. 1998) ต่อมามีการค้นพบ Tc toxins ในแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Xenorhabdus spp.*, *Yersinia spp.*, *Pseudomonas spp.* และ *Serratia spp.* (Tennant et al., 2005; Dodd et al., 2006; Fuchs et al., 2006) Tc toxins เป็นโปรตีนสารพิษที่มีขนาดใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ TcA, TcB และ TcC (French-Constant & Waterfield, 2005)

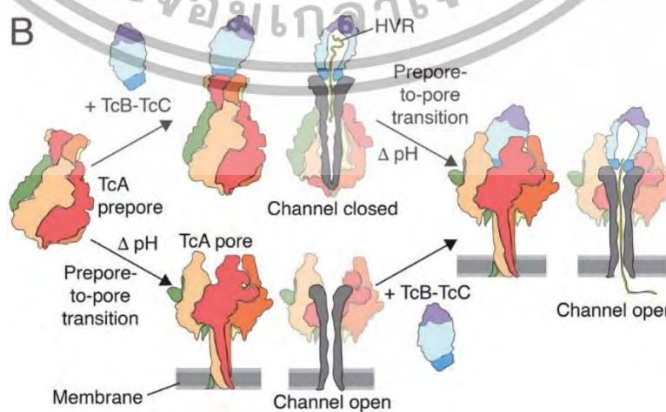
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TcA เป็นหน่วยย่อยขนาดใหญ่ โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน จำนวน 5 หน่วยย่อย ลักษณะคล้ายระฆัง มีช่องสำหรับเคลื่อนย้ายสาร หน้าที่ของ TcA คือ จับกับผนังเซลล์เจ้าบ้านและขนส่งเอนไซม์สร้างสารพิษผ่านช่องสำหรับเคลื่อนย้ายสารภายในโครงสร้าง, TcB และ TcC เป็นหน่วยย่อยขนาดเล็ก โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยที่แตกต่างกัน จำนวน 2 หน่วยย่อย ลักษณะคล้ายรังไหม อยู่ส่วนบนของช่องเคลื่อนย้ายสาร โดย TcB และ TcC จะทำงานร่วมกันเป็นช่องเก็บเอนไซม์สร้างสารพิษ หรือ ADP-ribosyltransferases (Gatsogianni et al., 2013; Meusch et al., 2014)



รูปที่ 2. 2 โครงสร้างของ Tc toxins
ที่มา: Roderer et al. (2019)

Tc toxins มีกลไกการทำงานคล้ายกับกระบอกฉีดยา ที่ฉีดเอนไซม์สร้างสารพิษเข้าไปยังเซลล์เจ้าบ้าน เมื่อเอนไซม์สร้างสารพิษที่อยู่ภายในมีสภาพเป็นกรด จะกระตุ้นให้ช่องสำหรับเคลื่อนย้ายสารโผล่ออกมาจากโครงสร้างของ TcA จากนั้นเส้นผ่าศูนย์กลางของ TcB บริเวณที่เชื่อมติดกับ TcA จะขยายออก เกิดเป็นช่องเปิดต่อเนื่องระหว่าง TcC, TcB และ TcA ทำให้เอนไซม์สร้างสารพิษที่อยู่ในโครงสร้างของ TcB และ TcC ถูกขนส่งผ่านช่องเคลื่อนย้ายสารไปยังเซลล์เจ้าบ้าน Tc toxins จะกลับสู่โครงสร้างเดิมเมื่อค่า pH เปลี่ยน (Gatsogianni et al., 2013)



รูปที่ 2. 3 กลไกการทำงานของ Tc toxins
ที่มา: Roderer et al. (2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio* spp.)

เชื้อในกลุ่มวิบริโอ เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้นหรือท่อนโค้ง สามารถพบได้ตามพื้นที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (halophile) ไม่สร้างสปอร์และสามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาหรือเส้นขน ปัจจุบันพบเชื้อในกลุ่มวิบริโอในหลายประเทศทั่วโลก โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ ที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส และยังมีมักพบในน้ำที่ไม่ค่อยสะอาด (กุสุมาวดี, 2560) (กุลวรา, 2561) เชื้อกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมได้โดยไม่ก่อโรค แต่เมื่อสภาพแวดล้อมโดยปกติของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไปเชื้อก็จะมีโอกาสก่อโรคได้ โดยเรียกเชื้อรูปแบบนี้ได้ว่า “ เชื้อฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) ” เชื้อวิบริโอบางชนิดสามารถก่อโรครุนแรงได้ด้วยเชื้อเพียงชนิดเดียวโดยการสร้างสารพิษ (toxin) และส่วนใหญ่เชื้อเพียงปริมาณน้อยก็สามารถทำให้กุ้งตายได้จำนวนมาก เช่น *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii* และ *Vibrio campbellii* ที่ก่อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันหรือโรคตายด่วน (Acute hepatopancreatic necrosis disease : AHPND หรือ Early mortality syndrome : EMS) เป็นต้น (จำเรณูศรี, 2566)

2.3.1 เชื้อ *Vibrio harveyi*

V. harveyi จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ติดสีแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น โค้งงอได้เล็กน้อย มีขนาดประมาณ 0.5-0.8 x 1.4-2.6 ไมครอน มีเส้นขนและใช้เส้นขนในการเคลื่อนที่ สามารถเจริญในที่ที่มีหรือไม่มีออกซิเจนได้ (facultative anaerobe) พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลและสิ่งแวดล้อมน้ำจืด (Zhang & Austin, 2005) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส (กุสุมาวดี, 2560) เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.5-6% เกลือ แต่จะเจริญได้ดีที่ 3% เกลือ (Zhang & Austin, 2005)

V. harveyi สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็ม เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลา กุ้ง กุ้ง ปูและหอยนางรม เป็นต้น โดยเฉพาะกุ้งสายพันธุ์ต่าง ๆ แบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในกุ้ง คือ โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน และโรคเรืองแสง (Luminescent vibriosis) ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่มีอัตราการตายสูงเมื่อกุ้งได้รับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยแบคทีเรียนี้มีความสามารถในการสร้างปัจจัยความรุนแรงต่าง ๆ เช่น เอนไซม์โปรตีเอส เฮโมลิซิน และฟอสโฟลิพาส ที่ไปทำลายเนื้อเยื่อของกุ้ง (Zhang et al., 2020) เมื่อกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ แบคทีเรียจะเข้าไปทำลายอวัยวะเป้าหมายที่บริเวณกระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน และลำไส้ ทำให้กุ้งมีอาการตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน ก่อให้เกิดโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (จำเรณูศรี, 2566) และโรคเรืองแสงมักเกิดจาก *V. harveyi* เป็นส่วนใหญ่ แบคทีเรียชนิดนี้จะแพร่กระจายเมื่อเข้าสู่ร่างกายของกุ้ง และสามารถทำให้กุ้งตายได้ทุกระยะการเติบโต แบคทีเรียจะสร้างสารพิษและเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อเยื่อ ทำให้กุ้งมีอาการอ่อนแอ ลำตัวมีแผลเปื่อย เปลี่ยนเป็นสีคล้ำ และเรืองแสงที่บริเวณหัว (Ruwandeeepika et al., 2012)

2.3.2 เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์รูปร่างเป็นแท่งขนาด กว้าง 0.5-0.8 ไมครอน ยาว 1.4-2.4 ไมครอน มีเส้นขน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และใช้เส้นขน ในการเคลื่อนที่ สามารถเจริญในที่ที่มีหรือไม่มีออกซิเจนได้ (facultative anaerobe) พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลและสิ่งแวดล้อมน้ำกร่อย สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เจริญได้ดีในช่วง อุณหภูมิ 15-42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจะอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส เชื้อ สามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ตั้งแต่ 1-8% เกลือ ถ้ามากกว่า 10% เกลือ เชื้อจะไม่สามารถอยู่ได้ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2557)

V. parahaemolyticus สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็ม มักพบได้ตามผิวดินและผิวของสัตว์ทะเล แบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่ส่งผลกระทบต่อสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลา กุ้ง กุ้ง ปูและหอยนางรม เป็นต้น โดยเฉพาะกุ้งสายพันธุ์ต่าง ๆ แบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในกุ้ง คือ โรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน และโรคซูเอีย (Zoea syndrome) เป็นต้น โรคเหล่านี้เป็นโรคที่สำคัญที่มีอัตราการตายสูงเมื่อกุ้งได้รับเชื้อแบคทีเรียไม่ว่าจะเป็นจากแหล่งน้ำหรือจากที่ปนเปื้อนมากับอาหารเลี้ยงกุ้ง โดย *V. parahaemolyticus* ที่ก่อโรคเหล่านี้จะเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคนั้น ๆ ซึ่ง *V. parahaemolyticus* มีสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคและไม่สร้างสารพิษ (จำเริญศรี, 2566)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่พบที่ก่อโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลันที่รุนแรงที่สุดในประเทศไทย (Vp_{AHPND}) นอกจากนั้นยังเป็นสาเหตุของโรคสำคัญที่เพิ่งพบได้ไม่นานที่ โดยมีสาเหตุมาจากการที่แบคทีเรีย (*V_{pHLVD}*) สร้างสารพิษชนิดใหม่ขึ้นมา ซึ่งก็คือ โรคตัวใส (Glass post larva disease : GPD) หรือโรค Highly-lethal Vibrio disease : HLVD) (*V_{pHLVD}*)

2.3.2.1 เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ก่อโรค AHPND (VpAHPND)

Vp_{AHPND} เป็นสายพันธุ์พิษที่มีพลาสมิดสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Photorhabdus insect-related (Pir) toxins) โดยมีกลไกการก่อโรค คือ เมื่อกุ้งได้รับเชื้อผ่านการกินอาหารปนเปื้อนหรือสัมผัสน้ำที่มีปนเปื้อนเชื้อ แบคทีเรียจะเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารและเจริญแบ่งตัวขยายจำนวนมากยังอวัยวะเป้าหมายที่บริเวณกระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน และลำไส้ สร้างสาร Pir toxin ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนสำคัญในตับ (hepatopancreas) และต่อมไขมันของกุ้ง ส่งผลให้ตับและต่อมไขมันเกิดการตายของเซลล์อย่างรวดเร็ว (acute necrosis) ทำให้กุ้งมีลักษณะอาการผิดปกติ (Tran et al., 2013) โดยอาการในระยะเริ่มแรกอาจไม่เด่นชัด คือ กุ้งจะว่ายน้ำช้าลง พฤติกรรมการกินอาหารผิดปกติอาจไม่กินหรืออาจกินอาหารมากผิดปกติ หากรุนแรงบริเวณหนวดและขาจะมีสีซีดจาง ตับซีด พบแผลตามลำตัว บริเวณแผลจะมีสีคล้ำและเนื้อเยื่อเน่าเปื่อย (Austin, 2010) เนื่องจากมีการสะสมสารคล้ายเจลาตินในลำไส้ ท้องอืดโตไม่ปกติ ซึ่งหากกุ้งติดเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อัตราการตายของกุ้งจะสูงมาก อาจสูงถึง 100 % ภายใน 10-40 วันหลังได้รับเชื้อ (Tran et al., 2013)

2.3.2.2 เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ก่อโรค HLVD (VpHLVD)

Vp_{HLVD} เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษกลุ่ม Tc (Tc complexes) ก่อโรค HLVD หรือโรคตัวใสในกุ้ง ซึ่งแตกต่างจาก Vp_{AHPND} ที่สร้างสารพิษกลุ่ม Pir สารพิษทั้งสองกลุ่มนี้ส่งผลต่อกุ้งคล้ายกัน แต่สายพันธุ์ Vp_{HLVD} จะมีความรุนแรงมากกว่าถึง 1000 เท่าและมีอัตราการตายที่สูงกว่า โดยกลไกการก่อโรค คือ เมื่อกุ้งได้รับสารพิษ สารพิษชนิดนี้จะทำลายตับโดยใช้กลไกการฉีดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษ (syringe-like mechanism) เข้าในไซโตพลาสซึมของเซลล์ท่อตับ และเกิดกระบวนการทำลายเซลล์ต่อไป ทำให้กึ่งมีลักษณะอาการตับซิด ลำไส้ว่างและตัวโปร่งใส เนื่องจากถูกทำลายท่อตับและเนื้อเยื่อทางเดินอาหารส่วนกลาง อัตราการตายของกึ่งสูงถึง 90 % ภายใน 24-28 ชั่วโมงหลังได้รับเชื้อ (กรมประมง, 2567)

2.4 การตรวจวินิจฉัยยีน

2.4.1 เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction : PCR)

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือ Polymerase Chain Reaction เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์พอลิเมอเรส สามารถสร้างสำเนาดีเอ็นเอที่ต้องการจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว โดยมีขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน ดังนี้ การทำลายพันธะไฮโดรเจนของดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Denaturation) ด้วยการให้ความร้อนสูงประมาณ 94-96 องศาเซลเซียส การจับคู่ของไพรเมอร์ (ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ) เข้ากับดีเอ็นเอสายเดี่ยวบริเวณตำแหน่งที่ต้องการขยาย (Annealing) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-65 องศาเซลเซียสและการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ตามแบบดีเอ็นเอสายตั้งต้นโดยอาศัยเอนไซม์พอลิเมอเรส (Extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

กระบวนการทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ถูกดำเนินการซ้ำหลายรอบ ทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากตามอัตราทวีคูณในแต่ละรอบ ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้น (สุดสวาท และคณะ, 2562)



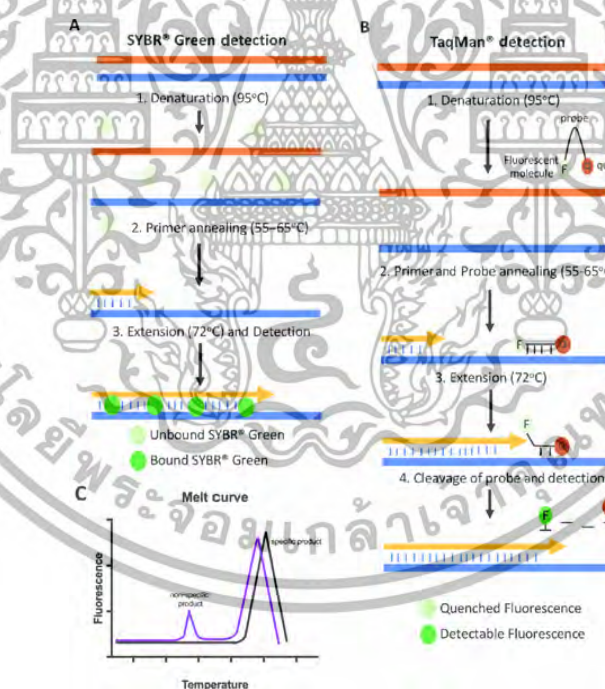
รูปที่ 2. 4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)
ที่มา: Smith (2022)

2.4.2 เทคนิค Real-Time PCR (Quantitative Real Time PCR : qPCR)

Real-Time polymerase chain reaction หรือ quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) คือ กระบวนการขยายเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจาก DNA เป้าหมาย โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (Primer) 1 คู่ ร่วมกับตัวตรวจจับ (probe) ที่ถูกออกแบบเป็นสายสั้น ๆ ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อเป้าหมายที่ต้องการตรวจ มีการติดสี Fluorescence ซึ่งเป็นตัวไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจจับผลของ PCR product ที่เกิดขึ้น โดยไม่ต้องนำไปผ่านเทคนิค gel electrophoresis (กรมประมง, 2562) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและแม่นยำสูง สามารถตรวจพบและวัดปริมาณของดีเอ็นเอหรือเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างรวดเร็วและในเวลาจริง (Wong et al., 2005) เทคนิค Real-Time PCR มีหลายวิธี คือ Hydrolysis probe, SYBR-Green I Dye, Hybridization probe และ Molecular Beacons

เทคนิค Real-Time PCR มีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้มากที่สุด คือ Hydrolysis probe (TaqMan probe) วิธีนี้เป็นวิธีการหนึ่งของ real-time PCR ซึ่งใช้โพรบ (Probe) ที่มีคุณสมบัติพิเศษในการตรวจจับและวัดปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายได้อย่างแม่นยำและเชื่อถือได้ โพรบจะเป็นสายนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ ประมาณ 20-30 เบส มีสารเรืองแสง (Reporter) ที่ปลายด้านหนึ่งและสารบ่งแสง (Quencher) ที่ปลายอีกด้านหนึ่ง โพรบจะจับกับสารพันธุกรรมเป้าหมายภายในบริเวณที่ไพรเมอร์จะจับสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ เมื่อเอนไซม์ Taq DNA Polymerase เริ่มทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใหม่ จะมีการแยกสายสาย โพรบด้วยคุณสมบัติ exonuclease ของเอนไซม์ทำให้สารเรืองแสงและสารบ่งแสง (Quencher) แยกจากกัน เมื่อแยกออกจากกัน สารเรืองแสงจะปล่อยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจจับได้ด้วยเครื่องมือ สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจจับได้ จะมีความเข้มแปรผันตรงกับปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายที่มีอยู่เริ่มต้น (Kubista et al., 2006)



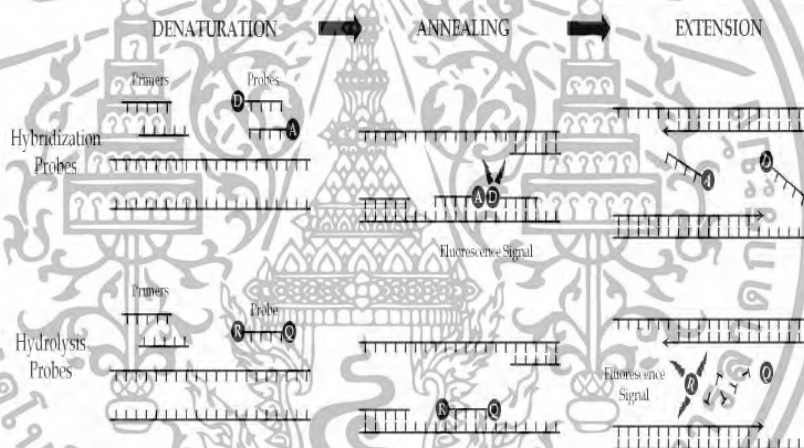
รูปที่ 2.5 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย SYBR Green I (A) และ Hydrolysis probe (B)
ที่มา: Adams (2020)

SYBR Green I เป็นสารเรืองแสงที่สามารถแทรกตัวและจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ PCR ได้อย่างจำเพาะ เมื่อสาร SYBR Green I จับกับดีเอ็นเอสายคู่แล้วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติทางสเปกโตรสโกปีของตัวสาร ส่งผลให้สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ในระหว่างการทำ Real-Time PCR ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และทวีจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้มีดีเอ็นเอสายคู่เพิ่มมากขึ้น สาร SYBR Green I ก็จับกับดีเอ็นเอสายคู่เหล่านี้และเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Giulietti et al., 2001)

Hybridization Probe เป็นเทคนิคหนึ่งของ Real-Time PCR ที่ใช้โพรบ ซึ่งเป็นสายนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ ที่มีสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ติดอยู่เพื่อตรวจจับดีเอ็นเอหรือเป้าหมายที่สนใจได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยปกติโพรบจะมีความยาวประมาณ 20-30 เบส และถูกทำให้มีสารเรืองแสง (Fluorescent Reporter) และสารบั้งแสง (Quencher) ติดอยู่ที่ปลายสองด้านของสายนิวคลีโอไทด์ ในระหว่างการทำ PCR โพรบจะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายในช่วงขั้นตอน Annealing เมื่อเอนไซม์ Polymerase เริ่มทำการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ในขั้นตอน Extension จะทำให้โครงสร้างของโพรบถูกทำลาย ส่งผลให้สารเรืองแสงและสารดับสัญญาณถูกแยกออกจากกัน เนื่องจากสารดับสัญญาณถูกแยกออกไป สารเรืองแสงจึงสามารถปล่อยคลื่นฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้อย่างเต็มที่ เครื่อง Real-Time PCR จะตรวจจับและบันทึกสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์นี้ไว้ ปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Wong et al., 2005)

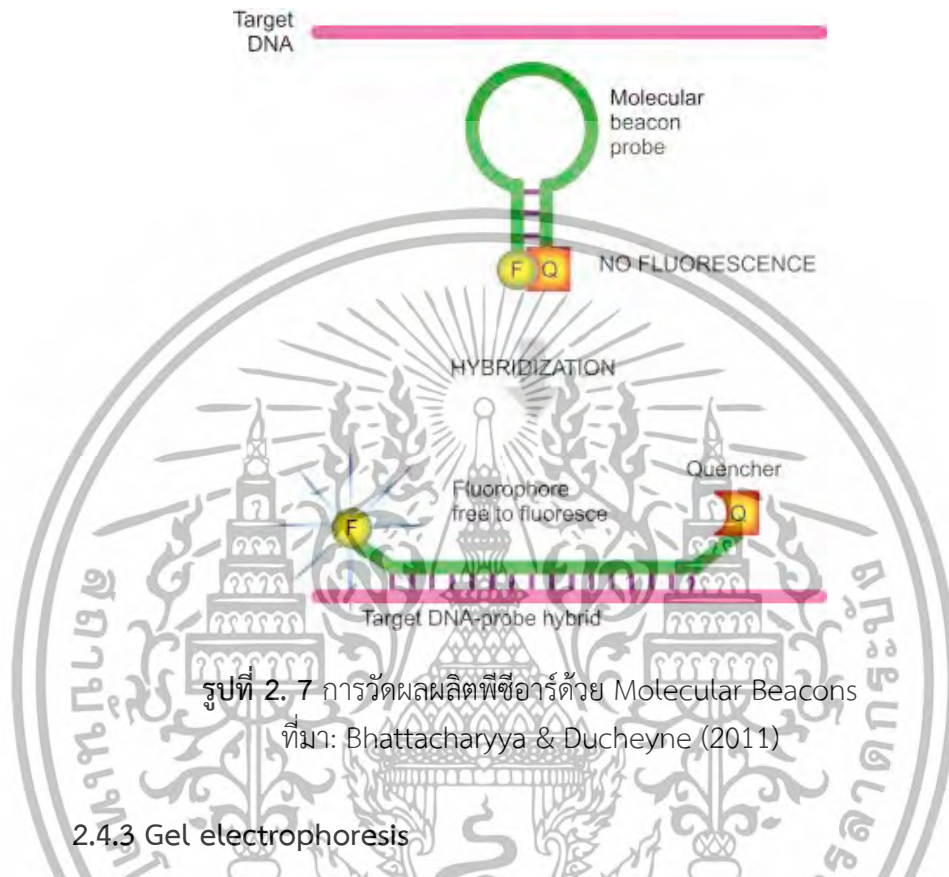


รูปที่ 2. 6 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Hybridization Probe
ที่มา: Yilmaz (2012)

Molecular Beacons เป็นเทคนิคหนึ่งของ Real-Time PCR ที่ใช้โพรบพิเศษที่เรียกว่า Molecular Beacons ในการตรวจจับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจง โดยโครงสร้างของ Molecular Beacons เป็นสายนิวคลีโอไทด์สั้นเดี่ยวที่มีลักษณะเป็นวงกลม โดยปลายทั้งสองด้านของสาย นิวคลีโอไทด์จะเชื่อมต่อกันด้วยการจับคู่เบสอย่างหลวม ๆ ส่วนตรงกลางของสายเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อเป้าหมายที่ต้องการตรวจจับ ที่ปลายด้านหนึ่งของ Molecular Beacon จะมีสารเรืองแสง (Fluorophore) ติดอยู่และที่ปลายอีกด้านจะมีสารบั้งแสง (Quencher) ติดอยู่ ระหว่างการทำ PCR เมื่อ Molecular Beacon อยู่ในรูปวงกลม สารเรืองแสงและสารดับสัญญาณจะอยู่ใกล้กันมาก ทำให้สารบั้งแสงสามารถบั้งสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ แต่เมื่อดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายถูกสังเคราะห์ขึ้นระหว่างการทำ PCR Molecular Beacon จะจับกับเป้าหมายด้วยลำดับเบสที่จำเพาะ ส่งผลให้โครงสร้างวงกลมของ Molecular Beacon เปิดออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกสารเรืองแสงและสารดับสัญญาณออกจากกัน เนื่องจากสารดับสัญญาณถูกแยกออกไป สารเรืองแสงจึงสามารถปล่อยคลื่นฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้อย่างเต็มที่ เครื่อง Real-Time PCR จะตรวจจับและบันทึกสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์นี้ไว้ ปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ตรวจวัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Tan et al., 2000)



รูปที่ 2. 7 การวัดผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Molecular Beacons
ที่มา: Bhattacharyya & Ducheyne (2011)

2.4.3 Gel electrophoresis

Gel Electrophoresis เป็นเทคนิคทางชีวเคมีที่ใช้สำหรับแยกและวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของแรงดันไฟฟ้ากระแสตรง (Direct Current หรือ DC) และคุณสมบัติของสารเหล่านั้นในการเคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่มีประจุภายในตัวกลางเนื้อแน่น ซึ่งทำให้สามารถแยกสารชีวโมเลกุลได้ตามขนาด ประจุ และรูปร่าง

กระบวนการ Gel Electrophoresis ดำเนินการดังนี้

1. เตรียมเจลที่ทำจากวัสดุพอลิเมอร์ เช่น อะกาโรส หรือพอลิอะคริลาไมด์ และผสมตัวทำละลายให้มีสภาพเป็นของแข็งกึ่งเหลว
2. นำสารตัวอย่างที่ต้องการศึกษา เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน มาหยดลงในหลุมของเจล
3. ใช้แรงดันไฟฟ้ากระแสตรง ทำให้สารชีวโมเลกุลที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่านเจลไปตามทิศทางของขั้วไฟฟ้าที่ตรงกันข้ามกับประจุ
4. สารจะเคลื่อนที่ตามขนาดและรูปร่าง โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการแยกชั้นตามขนาด
5. หลังจากนั้นสามารถย้อมหรือทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างเพื่อตรวจสอบได้

เทคนิค Gel Electrophoresis มีประโยชน์หลายประการ เช่น แยกองค์ประกอบในสารผสมต่าง ๆ วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่าง ศึกษาปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือตรวจสอบหาสารพันธุกรรม เป็นต้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Alberts, 2002) การใช้ gel electrophoresis ในการตรวจหาสารพันธุกรรมเป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายวิธี เช่น วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) สามารถนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาแยกด้วย gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอชิ้นส่วนที่สนใจ ซึ่งจะให้แถบสัญญาณที่ตำแหน่งที่สอดคล้องกับขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ โดยสามารถนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วย gel electrophoresis จะได้แถบสัญญาณที่ลักษณะเฉพาะตามการจัดเรียงตำแหน่งของบริเวณที่เอนไซม์สามารถจับและตัดได้ ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสและการจำแนกชนิดของดีเอ็นเอ ตรวจสอบความผิดปกติของยีน โดยการนำดีเอ็นเอของผู้ป่วยและคนปกติมาแยกด้วย gel electrophoresis ถ้ามีความผิดปกติของยีน เช่น การสูญหาย เพิ่มขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงขนาด จะสังเกตเห็นได้จากตำแหน่งและขนาดแถบสัญญาณที่แตกต่างกัน ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการนำอาร์เอ็นเอมาแยกด้วย gel electrophoresis เพื่อเปรียบเทียบปริมาณอาร์เอ็นเอของยีนนั้น ๆ ระหว่างเซลล์หรือสภาวะต่าง ๆ โดยพิจารณาจากความเข้มของแถบสัญญาณ (Loughran, 2021)

2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zou et al. (2020) ทำการเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะ Post-larvae ที่มีอาการป่วยจากฟาร์มในมณฑลเจียงซู และนำมาตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคที่สำคัญในกุ้ง ได้แก่ white spot syndrome virus (WSSV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), yellow-head virus (YHV), taura syndrome virus (TSV) และ infectious myonecrosis virus (IMNV) โดยอาศัยเทคนิค PCR จากการศึกษาพบว่าลูกกุ้งที่ทำมาตรวจสอบไม่ได้ติดเชื้อก่อโรคสำคัญดังกล่าวข้างต้น จึงทำการระบุชนิดของเชื้อก่อโรคด้วยการนำลำนิวคลีโอไทด์ไป blast เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในข้อมูล พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *V. parahaemolyticus* (99.93%) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA และ อาหาร TCBS พบว่าเกิดโคโลนีสีขาวขุ่นขึ้นบนผิว หน้าอาหาร TSA และเกิดโคโลนีสีเหลืองขึ้นบนอาหาร TCBS จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางชีวเคมีและทดสอบด้วยการแช่ จนสามารถสรุปได้ว่าเชื้อที่ก่อโรคในกุ้งดังกล่าวเป็น *V. parahaemolyticus* ที่มีความรุนแรงกว่า *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND เนื่องจากกุ้งที่ถูกนำมาทดสอบด้วยการแช่ โดยใช้เชื้อที่มีความเข้มข้น 1.83×10^6 CFU/ml มีอัตราการตาย 100% หลังจากแช่เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ซึ่งอาการทางคลินิกของกุ้งที่ติดเชื้อคล้ายคลึงกับอาการของโรค HLVD

Yang et al. (2022) ผลงานวิจัยนี้รายงานถึงโรคใหม่ที่มีอัตราการตายสูงมากในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (post-larvae) ของกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่เกิดขึ้นในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศจีน ตั้งแต่ปลายปี 2019 โรคนี้ทำให้ตัวอ่อนอายุ 6-12 วันเสียชีวิตมากกว่า 90% ภายใน 24-48 ชั่วโมง หลังจากพบสัตว์ที่มีอาการผิดปกติ คือ ลำไส้ว่างเปล่าและตัวอ่อนซีดหรือไม่มีสี ทำให้ตัวอ่อนดูโปร่งใส จากการทดลองพบว่าโรคนี้เกิดจากสารก่อโรค 3 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีความรุนแรงสูงมาก ได้แก่ Vp-HL-201910, Vp-HL-202005 และ Vp-HL-202006 ซึ่งแยกได้จากตัวอ่อนกุ้งที่ป่วยจากฟาร์มต่าง ๆ สายพันธุ์เหล่านี้มีความใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากมียีนรหัสสำหรับเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16S rRNA และ thermolabile hemolysin เหมือนกัน เมื่อทดสอบความรุนแรงของการติดเชื้อพบว่า Vp-HL-202005 มีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์ที่ก่อโรคตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันประมาณ 1,000 เท่า นอกจากนี้ สารละลายที่ได้จากการทำให้แบคทีเรียสลายด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงของ Vp-HL-202005 ก็ทำให้เกิดอาการของโรคในตัวอย่างกุ้ง แสดงให้เห็นว่าความรุนแรงของโรคนี้น่าจะเกิดจากสารพิษของแบคทีเรีย ผลการศึกษาทำให้ทราบว่า "โรคตัวใส" เกิดจาก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงมากชนิดหนึ่ง จึงได้เปลี่ยนชื่อโรคนี้นี้ใหม่เป็น "highly lethal Vibrio disease" หรือ HLVD โรคนี้นี้เป็นภัยคุกคามร้ายแรงต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง

Yang et al. (2023) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสาเหตุของโรคที่ทำให้เกิดอัตราการตายสูง (Highly Lethal Vibrio Disease : HLVD) ในกุ้ง *Penaeus vannamei* โดยได้ค้นพบว่าเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุ คือ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค HLVD (V_{pHLVD}) ซึ่งสามารถสร้างสารพิษชนิดหนึ่งเรียกว่า Tc toxins จึงทำการเปรียบเทียบโปรไฟล์โปรตีนของเชื้อ V_{pHLVD} และเชื้อ *Vibrio* ที่ไม่ก่อโรค HLVD และพบแถบโปรตีนพิเศษ 3 แถบที่มีขนาดประมาณ 300, 200 และ 100 กิโลดาลตัน เมื่อนำส่วนประกอบนี้ไปทดสอบกับตัวอย่างกุ้ง พบว่าทำให้กุ้งเกิดอาการของโรค HLVD เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ระบุว่าแถบโปรตีนทั้ง 3 แถบนั้นเป็นสายย่อยของสาร Tc toxins ซึ่งประกอบด้วยสาย TcA, TcB และ TcC ต่อมาได้พบยีนที่สร้างสาร Tc toxins ในจีโนมของเชื้อ V_{pHLVD} และพิสูจน์ว่าเมื่อนำยีนเหล่านี้ออกไป เชื้อจะสูญเสียความสามารถในการก่อโรค HLVD ข้อค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่าสาร Tc toxins เป็นปัจจัยกำหนดความรุนแรงหลักของโรค HLVD

Robert-Pillot et al. (2010) ได้ประเมินการใช้ PCR แบบเรียลไทม์ (Q-PCR) ในการนับจำนวนทั้งหมดและสายพันธุ์ก่อโรคของ *Vibrio parahaemolyticus* ในกุ้งโดยใช้โพรบไฮโดรลิซิส จากนั้นทดสอบความจำเพาะของวิธีนี้ด้วยการนำสายพันธุ์แบคทีเรียนอกเหนือเป้าหมาย 62 สายพันธุ์จาก 12 สปีชีส์มาทำร่วมด้วย พบว่ามีเพียง *V. parahaemolyticus* เท่านั้นที่สร้างสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ วิธีนี้สามารถตรวจพบ *V. parahaemolyticus* รวมถึงสายพันธุ์ก่อโรคที่มียีน *tdh* และ *trh* ได้ในตัวอย่างกุ้งที่ปนเปื้อนด้วยปริมาณเพียงไม่กี่เซลล์ต่อกรัม หลังจากเพิ่มปริมาณเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงผลที่ได้จากวิธี Q-PCR มีความสัมพันธ์อย่างดีกับผลจากวิธี MPN-PCR แบบดั้งเดิม ($R^2 > 0.9742$) ดังนั้นวิธี Q-PCR นี้จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและไวสำหรับการนับปริมาณ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งจริง สรุปได้ว่างานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธี Q-PCR โดยใช้โพรบไฮโดรลิซิสในการนับปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้งหมดและสายพันธุ์ก่อโรคในตัวอย่างกุ้งธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วจำเพาะ และมีความไวสูง สามารถตรวจพบปริมาณเชื้อในระดับต่ำมาก วิธีนี้อาจนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบไวบริโอปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์กุ้งและกุ้งทะเล

Liu et al. (2012) งานวิจัยนี้นำเสนอวิธีการตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเลด้วยเทคนิคพีซีอาร์แบบเรียลไทม์ โดยใช้ยีนเป้าหมายใหม่ที่มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อชนิดนี้ และมีการใช้ตัวควบคุมภายใน (IAC) แบบแข่งขันเพื่อระบุผลการทดสอบลบลวง วิธีการนี้มีความจำเพาะสูง และสามารถตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ในปริมาณน้อยมากถึง 4.8 พิโคแกรมของดีเอ็นเอหรือ 1 โคโลนี นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อเป้าหมายได้แม้ในสภาวะที่มีดีเอ็นเอหรือเชื้ออื่น ๆ รบกวนในปริมาณสูง การทดสอบกับตัวอย่างอาหารทะเล 96 ตัวอย่าง พบว่า 58 ตัวอย่าง (60.4%) ให้ผลบวก โดยมี 3 ตัวอย่างที่ให้ผลลบลวง ดังนั้นวิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลได้อย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการศึกษาข้อมูลของยีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ที่มีรายงานว่า ตรวจพบยีน *VTcC3* ใน พลาสมิด pHLC ของ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ vp-HL-202005 ที่ก่อโรค HLVD แต่ไม่พบใน *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *Vibrio* spp. ที่เป็นเชื้อฉวยโอกาส (Yang et al., 2023) ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Vibrio paraheamolyticus* สายพันธุ์ vp-HL-202005 (CP114198.1) จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะเจาะจงต่อยีน *VTcC3* ของเชื้อ *Vibrio paraheamolyticus* โดย Primer Forward (F) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ TcC3-F (Yang et al., 2023) ปรับเปลี่ยนความยาวของไพรเมอร์ให้มีความยาว 20-30 คู่เบส และ Primer Reverse (R) ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer 3 Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>) กำหนดให้ไพรเมอร์มีความยาว 20-30 คู่เบส, GC content 20-70%, ค่า Tm 50-100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไพรเมอร์แต่ละคู่ไปวิเคราะห์ปริมาณ GC content, ค่า Tm, การเกิด Hairpin formation และ Self-dimerization ด้วยโปรแกรม OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc2.0.html>) ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วย Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 1 คู่ และส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์

3.2 การเตรียมเชื้อ *Vibrio* spp.

เชื้อ *Vibrio* spp. ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. haveyi*, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND (*Vp_{nonAHPND}*), *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND (*Vp_{AHPND}*) และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค HLVD (*Vp_{HLVD}*) โดย *V. haveyi* และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND ได้รับการอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.อัญชลี ทักษนาขจร อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกุล นักวิจัย ทีมวิจัยอนุพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ก่อโรค HLVD ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการที่ไม่ประสงค์ออกนาม

นำเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA+1.5%NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด จึงแยกโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อตรวจยืนยันความบริสุทธิ์จากลักษณะของโคโลนีบนอาหาร TCBS จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ผ่านการตรวจยืนยันความบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร TSB+1.5%NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด จึงนำไปใช้ในการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การสกัด Genomic DNA

นำเชื้อ *Vibrio* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB+1.5%NaCl จากข้อ 3.2 มาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit, Favogen) ตามคู่มือของบริษัท นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้น และตรวจสอบคุณภาพด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบ

3.4 การเตรียม Recombinant plasmid ที่มียีน VTcC3

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการระบาดของโรค HLVD ในประเทศไทย จึงทำการสังเคราะห์ Recombinant plasmid ที่มียีน VTcC3 เพื่อใช้เป็น Positive control โดยส่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-HL-202005 (CP114198.1) ความยาว 215 คู่เบส ที่ครอบคลุมบริเวณของพรอมอเตอร์ในข้อ 3.1 ไปสังเคราะห์และโคลนเข้าพลาสมิด pUC57 ที่บริษัท Synbio Technologiise

3.5 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของพรอมอเตอร์

3.5.1 การทดสอบหาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม

ทำการทดสอบหาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมต่อการทำงานของพรอมอเตอร์จากข้อ 3.1 ในการเพิ่มปริมาณยีน VTcC3 ด้วยวิธี Gradient PCR ใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *V. haveyi* และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND จากข้อ 3.3 เป็น DNA template, ใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3 จากข้อ 3.4 เป็น Positive control และใช้ Deionized water เป็น Negative control โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

Deionized water	18.38	ไมโครลิตร
10X standard Taq Reaction Buffer	2.50	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.50	ไมโครลิตร
10 μ M Primer F	0.50	ไมโครลิตร
10 μ M Primer R	0.50	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.12	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.00	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาลงในหลอด PCR จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณยีน VTcC3 โดยกำหนดสถานะในการทำงาน ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 4 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 55-63 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยผสม PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้ากับ 6X Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และโหลดลงใน 1.5% Agarose gel ในการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำเจลไปส่องด้วย UV-transilluminator เพื่อดูขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับขนาดของ Ladder 100 bp + 3K, Positive control และ Negative control จากนั้นเลือกอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม มาใช้ในการหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

3.5.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ทำการปรับปริมาตรของไพรเมอร์แต่ละเส้นที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR จากข้อ 3.5.1 เป็น 0.25 ไมโครลิตร ดังนั้นความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา คือ 5 μM โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้

Deionized water	19.38	ไมโครลิตร
10x standard Taq Reaction Buffer	2.50	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.50	ไมโครลิตร
10 μM Primer F	0.25	ไมโครลิตร
10 μM Primer R	0.25	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.12	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.00	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาลงในหลอด PCR จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* โดยกำหนดสถานะในการทำงาน ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 4 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยผสม PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้ากับ 6x Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และโหลดลงใน 1.5% Agarose gel ในการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำเจลไปส่องด้วย UV-transilluminator เพื่อดูขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับขนาดของ Ladder 100 bp + 3K, Positive control และ Negative control

3.6 การตรวจหายีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค PCR

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จากข้อ 3.1, ใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากข้อ 3.3 เป็น DNA template, ใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-*VTcC3* จากข้อ 3.4 เป็น Positive control และ Deionized water เป็น Negative control โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Deionized water	19.38	ไมโครลิตร
10x standard Taq Reaction Buffer	2.50	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.50	ไมโครลิตร
10 μ M Primer F	0.25	ไมโครลิตร
10 μ M Primer R	0.25	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.12	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาลงในหลอด PCR จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* โดยกำหนดสภาวะในการทำงาน ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 4 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis โดยผสม PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้ากับ 6x Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และโหลดลงใน 1.5% Agarose gel ในการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำเจลไปส่องด้วย UV-transilluminator เพื่อดูขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับขนาดของ Ladder 100 bp + 3K, Positive control และ Negative control

3.7 การตรวจหายีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากข้อ 3.3 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-*VTcC3* จากข้อ 3.4 ที่เจือจางแบบ serial dilution ด้วย Deionized water ให้มีความเข้มข้น 0.5×10^7 ถึง 0.5×10^1 copies เป็น DNA template และ Deionized water เป็น Negative control ส่วนประกอบของปฏิกิริยามีดังนี้

Deionized water	2.50	ไมโครลิตร
2x SYBR green FastMix	5.00	ไมโครลิตร
10 μ M Primer F	0.25	ไมโครลิตร
10 μ M Primer R	0.25	ไมโครลิตร
DNA template	2.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	26.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาลงในหลอด PCR แบบ strip จากนั้นนำไปใส่เครื่อง Real-time PCR System โดยกำหนดสภาวะในการทำงาน ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นจึงทำการวิเคราะห์ melting curve เพื่อตรวจสอบคุณภาพ PCR product และวิเคราะห์ปริมาณของยีน *VTcC3* จากค่า C_q (Quantification cycle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การเชิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การออกแบบไพรเมอร์

จากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *VTcC3* ของ *V. parahaemolyticus* และนำไปตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ พบว่า ไพรเมอร์คู่ที่ถูกคัดเลือกไปสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ PCR product ขนาด 168 คู่เบส โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นมีคุณสมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4. 1 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *VTcC3* ของ *V. parahaemolyticus*

คุณสมบัติ	Primer Forward (F)	Primer Reverse (R)
ความยาว	30 คู่เบส	30 คู่เบส
GC content	37%	60%
Tm	57.5 องศาเซลเซียส	67.1 องศาเซลเซียส
Hairpin formation	ไม่เกิด	ไม่เกิด
Self-dimerization	ไม่เกิด	ไม่เกิด

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เส้น F และเส้น R ที่ถูกคัดเลือก ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *V. parahaemolyticus* ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อยีน *VTcC3* ของ *V. parahaemolyticus* โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือกเหมือนกับ *V. parahaemolyticus* ในฐานข้อมูล ซึ่งมีค่า Query cover เท่ากับ 100% และ Percent Identity เท่ากับ 100% ดังแสดงในรูปที่ 4.1

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-202212 plasmid pHLC-202212 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	94849	CP150950.1
Vibrio parahaemolyticus strain HZ-52 plasmid pHZ52-2 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	76778	CP047988.1
Vibrio parahaemolyticus strain 20140722001-1 plasmid pVPC22014-2 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	92429	CP034292.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-201910 plasmid pHLC_201910 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	84671	CP152366.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-202006 plasmid pHLC-202006 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	84689	CP150906.1
Vibrio parahaemolyticus strain LC plasmid unnamed2 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	70872	CP119304.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-202005 plasmid pHLC .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	84671	CP114198.1
Vibrio parahaemolyticus strain GL-601 plasmid pva1 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	103975	CP097871.1

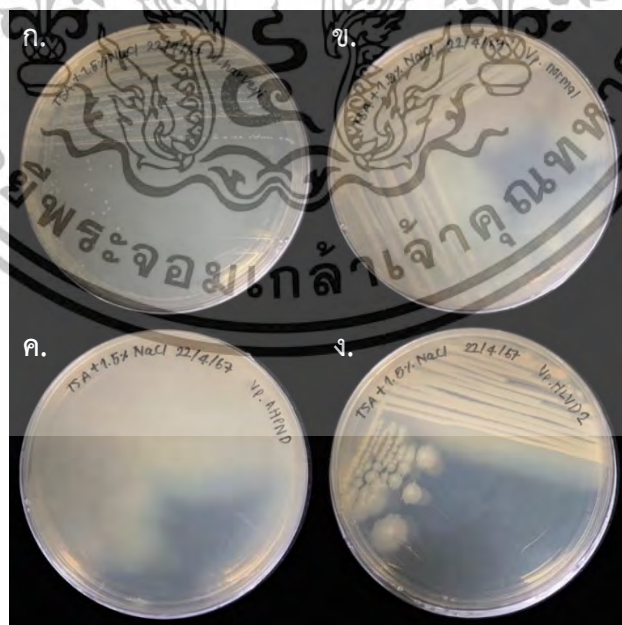
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Vibrio parahaemolyticus strain 20140722001-1 plasmid pVPC22014-2 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	92429	CP034292.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-201910 plasmid pHLC_201910 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	84671	CP152366.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-202006 plasmid pHLC-202006 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	84689	CP150906.1
Vibrio parahaemolyticus strain LC plasmid unnamed2 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	70872	CP119304.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-202005 plasmid pHLC .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	84671	CP114198.1
Vibrio parahaemolyticus strain GL-601 plasmid pva1 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	103975	CP097871.1
Vibrio parahaemolyticus strain vp-HL-202212 plasmid pHLC-202212 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	94849	CP150950.1
Vibrio parahaemolyticus strain HZ-52 plasmid pHZ52-2 .complete sequence	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	60.0	60.0	100%	1e-05	100.00%	76778	CP047988.1

รูปที่ 4. 1 ผลการเปรียบเทียบไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *V. parahaemolyticus* ในฐานข้อมูล. (ก) ไพรเมอร์เส้น F และ (ข) ไพรเมอร์เส้น R
ที่มา: NCBI (2024)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

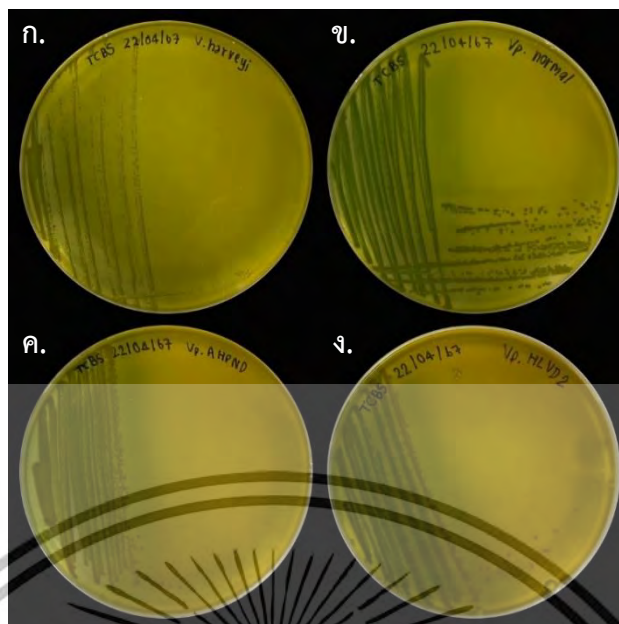
4.2 การเตรียมเชื้อ *Vibrio* spp.

จากการนำเชื้อ *Vibrio* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA+1.5%NaCl พบว่า โคโลนีของเชื้อ *V. harveyi* มีสีขาวขุ่น กลม นูน และผิวเรียบ (รูปที่ 3.3 ก), โคโลนีของเชื้อ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND มีสีขาวขุ่น และมีเมือกปกคลุม (รูปที่ 3.3 ข), โคโลนีของเชื้อ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND มีสีขาวขุ่น และมีเมือกหนาปกคลุม ทำให้เห็นโคโลนีไม่ชัดเจน (รูปที่ 3.3 ค) และโคโลนีของ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD มีสีขาวขุ่น มีเมือกแผ่ออกมาจากโคโลนี ขอบของโคโลนีหยัก (รูปที่ 3.3 ง) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร TCBS พบว่า โคโลนีของ *V. harveyi*, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD มีสีเหลือง (รูปที่ 3.4 ก, ค และ ง) *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND มีโคโลนีสีเขียว (รูปที่ 3.4 ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีเพาะเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ CAIM 1792 บนอาหาร TCBS พบว่า โคโลนีของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ CAIM 1792 มีสีเหลือง กลม และมีขอบหยัก โดยเชื่อดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ก่อโรคในกุ้งขาวแวนนาไม (Gauthier et al., 2011) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Zou et al., (2020) มีการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากลูกกุ้งที่มีการของโรค HLVD เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร TCBS พบว่า โคโลนีมีสีเหลืองเช่นเดียวกัน ซึ่งจากการตรวจสอบทราบว่าเป็น *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ JS20200428004-2 และจากรายงานของ Newman (2022) พบว่า เชื้อ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND จะมีโคโลนีสีเขียวเกิดขึ้นบนอาหาร TCBS แต่อาจมีโคโลนีสีเหลืองเกิดขึ้นได้



รูปที่ 4. 2 ลักษณะโคโลนีของ *Vibrio* spp. ที่เกิดขึ้นบนอาหาร TSA+1.5% NaCl. (ก) *V. harveyi*, (ข) *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND, (ค) *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ (ง) *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD

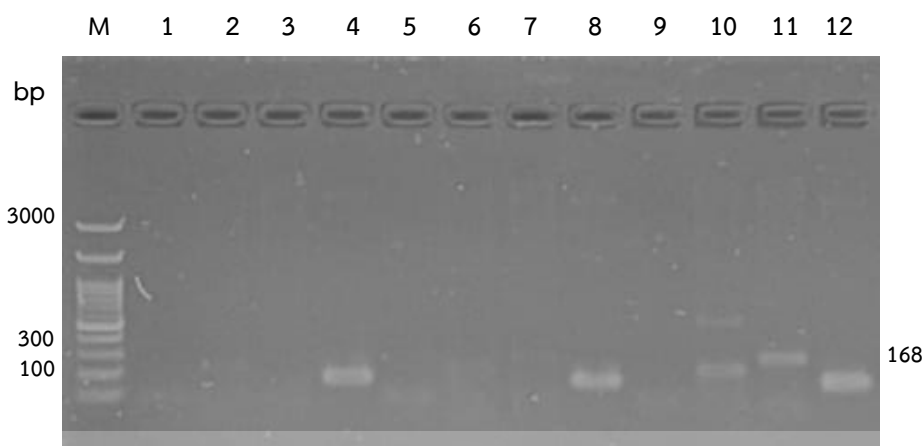
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. 3 ลักษณะโคโลนีของ *Vibrio* spp. ที่เกิดขึ้นบนอาหาร TCBS. (ก) *V. harveyi*, (ข) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND, (ค) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ (ง) *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD

4.3 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ด้วยวิธี Gradient PCR โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด *VTcC3* เป็น DNA template (positive control) และไพรเมอร์ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ([10 μ M/reaction]) เมื่อนำ PCR products ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4.4) พบว่าไพรเมอร์สามารถจับกับพลาสมิด *VTcC3* ได้ทุกอุณหภูมิที่ทำการศึกษา เนื่องจากปรากฏแถบแบนขนาด 168 คู่เบส ในเลนที่ 4, 8 และ 12 (positive control) ซึ่งตรงกับขนาดของ product size ตามที่ออกแบบไพรเมอร์ในข้อที่ 3.1 แต่ในทุก ๆ อุณหภูมิพบ nonspecific binding เกิดขึ้น โดยไพรเมอร์สามารถจับกับตำแหน่งบน genomic *V. harveyi* และเกิดแถบแบนขึ้นในเลนที่ 2, 6 และ 10 ในอุณหภูมิที่ 55, 61 และ 63 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และที่อุณหภูมิที่ 55 และ 61 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์สามารถจับกับตำแหน่งบน genomic *Vp_{AHPND}* และเกิดแถบแบนขึ้นในเลนที่ 7 และ 11 โดยแถบแบนที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่ตรงตามขนาดของ product size ที่ต้องการ

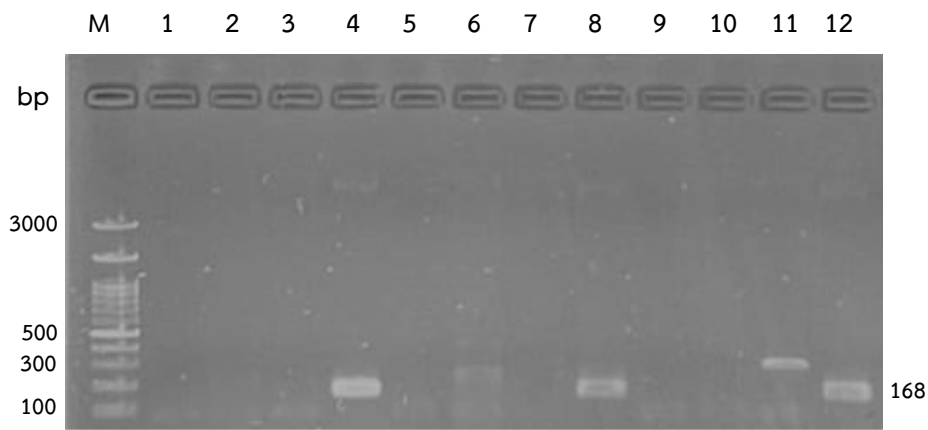


รูปที่ 4. 4 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ด้วยวิธี Gradient PCR โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด *VTcC3* เป็น DNA template กับไพรเมอร์ *VTcC3* ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

หมายเหตุ* เลน M คือ Ladder ขนาด 100 bp + 3K, เลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ Negative control, Genomic *V. harveyi*, Vp_{AHPND} และ Recombinant Plasmid *VTcC3* ที่ทำ PCR ที่อุณหภูมิที่ 63 องศาเซลเซียส ตามลำดับเลนที่ 5, 6, 7 และ 8 คือ Negative control, Genomic *V. harveyi*, Vp_{AHPND} และ Recombinant Plasmid *VTcC3* ที่ทำ PCR ที่อุณหภูมิที่ 61 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเลนที่ 9, 10, 11 และ 12 คือ Negative control, Genomic *V. harveyi*, Vp_{AHPND} และ Recombinant Plasmid *VTcC3* ที่ทำ PCR ที่อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.4 สรุปได้ว่าการทำ Gradient PCR อุณหภูมิที่ 55, 61 และ 63 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ปริมาตร 0.50 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ *VTcC3* ยังไม่สามารถจับกับยีน *VTcC3* ได้อย่างจำเพาะโดยไม่มี nonspecific binding เกิดขึ้นในทุกอุณหภูมิ เนื่องจากเกิดการจับกันของไพรเมอร์ *VTcC3* กับลำดับเบสใน genomic ของ *V. harveyi* และ Vp_{AHPND} และปรากฏแถบที่ไม่ตรงกับขนาดของ product size ที่ต้องการ ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Yang et al. (2023) ที่มีการรายงานว่าสามารถตรวจจับยีน *VTcC3* ได้ในอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส โดยไม่ปรากฏแถบแบนกับเชื้อไวรัสโอตัวอื่น ๆ ที่นำมาศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องด้วยการปรับเปลี่ยนขนาดของไพรเมอร์ที่แตกต่างจากรายงานข้างต้น รวมถึงอาจใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างกัน

ทางคณะผู้จัดทำได้ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด *VTcC3* เป็น DNA template (positive control) และปริมาตรไพรเมอร์ 0.25 ไมโครลิตร ($5 \mu\text{M}/\text{reaction}$) ผลปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเพียงอุณหภูมิเดียวที่ไพรเมอร์ *VTcC3* สามารถจับกับยีน *VTcC3* (positive control) ได้อย่างจำเพาะโดยไม่มี nonspecific binding เกิดขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 55 และ 61 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำให้การจับกันของไพรเมอร์ *VTcC3* และยีน *VTcC3* จับกันได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากมีการจับกันของไพรเมอร์ *VTcC3* กับลำดับเบสใน Genomic ของ *V. harveyi* และ Vp_{AHPND} และปรากฏแถบแบนขนาดที่ไม่ต้องการขึ้น



รูปที่ 4. 5 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ด้วยวิธี Gradient PCR โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด *VTcC3* เป็น DNA template กับไพรเมอร์ *VTcC3* ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร

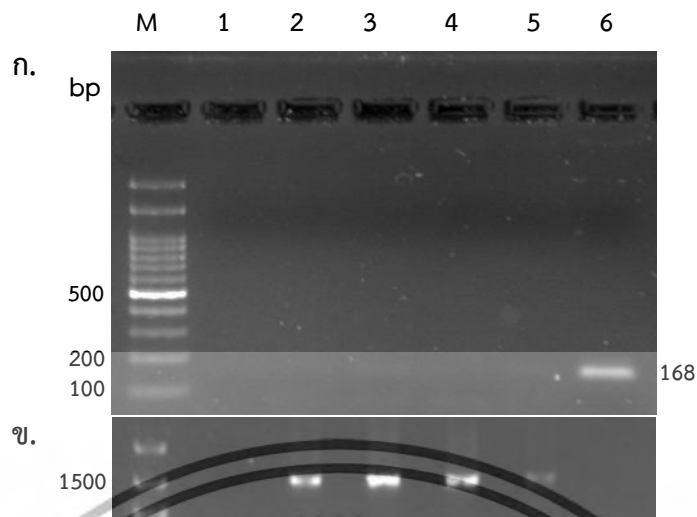
หมายเหตุ* เลน M คือ Ladder ขนาด 100 bp + 3K, เลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ Negative control, Genomic *V. harveyi*, *Vp_{AHPND}* และ Recombinant Plasmid *VTcC3* ที่ทำ PCR ที่อุณหภูมิที่ 63 องศาเซลเซียส ตามลำดับเลนที่ 5, 6, 7 และ 8 คือ Negative control, Genomic *V. harveyi*, *Vp_{AHPND}* และ Recombinant Plasmid *VTcC3* ที่ทำ PCR ที่อุณหภูมิที่ 61 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเลนที่ 9, 10, 11 และ 12 คือ Negative control, Genomic *V. harveyi*, *Vp_{AHPND}* และ Recombinant Plasmid *VTcC3* ที่ทำ PCR ที่อุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ดังนั้น จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ด้วยวิธี Gradient PCR ทั้งสองครั้ง สามารถสรุปผลได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ คือ อุณหภูมิที่ 63 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ([5 μ M/reaction])

4.4 การตรวจหายีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จากข้อ 3.1 ด้วยเทคนิค PCR ใช้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากข้อ 3.3 เป็น DNA template, Recombinant Plasmid pUC57-*VTcC3* จากข้อ 3.4 เป็น Positive control Deionized water เป็น Negative control และใช้สภาวะในการทำ PCR จากข้อ 4.3 พบว่า ไม่มีแถบแบนปรากฏขึ้นนอกเหนือแถบแบนบริเวณ Positive control (รูปที่ 4.5) กล่าวคือ ไพรเมอร์ *VTcC3* ไม่สามารถตรวจจับยีน *VTcC3* ใน *Vp_{HLVD}* ได้ ในสภาวะที่ทำการทดสอบมาแล้ว

ดังนั้นจึงต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของไพรเมอร์เพิ่ม โดยอาจเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นหรือปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับการทำงานของไพรเมอร์ในการทำเทคนิค PCR เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับตำแหน่งยีนที่ในเชื้อที่ต้องการ และได้ขนาด product size ที่ต้องการเท่านั้น และส่วน ของตัวอย่างเชื้อ *Vp_{HLVD}* และเชื้อที่ทำการศึกษาคือตัวอื่น เพื่อที่จะตรวจสอบหาปริมาณยีนสร้างสารพิษ *VTcC3* จึงได้นำไปตรวจสอบด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real time PCR เพื่อเทียบหาปริมาณของยีนต่อไป

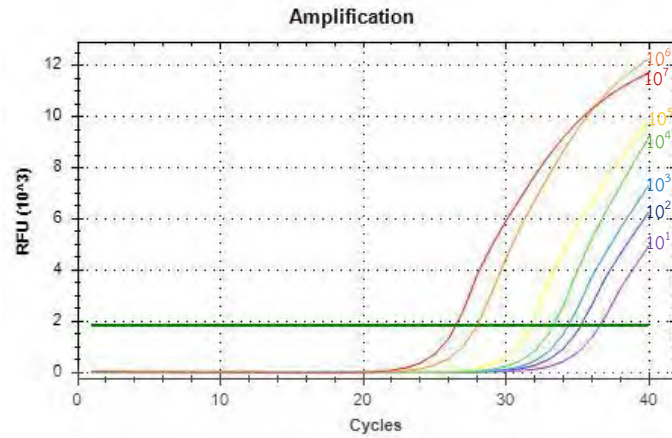


รูปที่ 4. 6 ผลการเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *VTcC3* ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร (ข) ผลการเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16s ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร

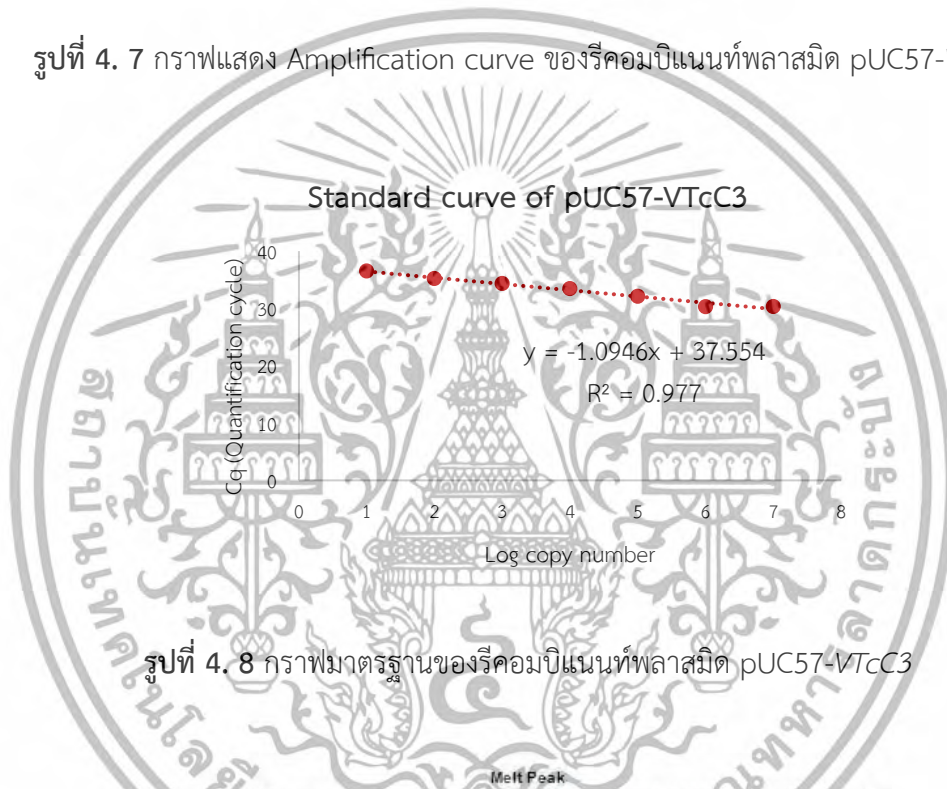
หมายเหตุ* ก: เลน M คือ Ladder ขนาด 100 bp + 3K, เลนที่ 1 คือ Negative control เลนที่ 2 คือ Genomic *V. harveyi* เลนที่ 3 คือ Genomic *Vp.non_{AHPND}* เลนที่ 4 คือ Genomic *Vp_{AHPND}* เลนที่ 5 คือ Genomic *Vp_{HLVD}* และเลนที่ 6 คือ Recombinant Plasmid *VTcC3*, ข: เลน M คือ Ladder ขนาด 100 bp + 3K, เลนที่ 1 คือ Negative control เลนที่ 2 คือ Genomic *V. harveyi* เลนที่ 3 คือ Genomic *Vp.non_{AHPND}* เลนที่ 4 คือ Genomic *Vp_{AHPND}* เลนที่ 5 คือ Genomic *Vp_{HLVD}* และเลนที่ 6 คือ Recombinant Plasmid *VTcC3*

4.5 การตรวจหาปริมาณ *VTcC3* ด้วยเทคนิค Real-time PCR

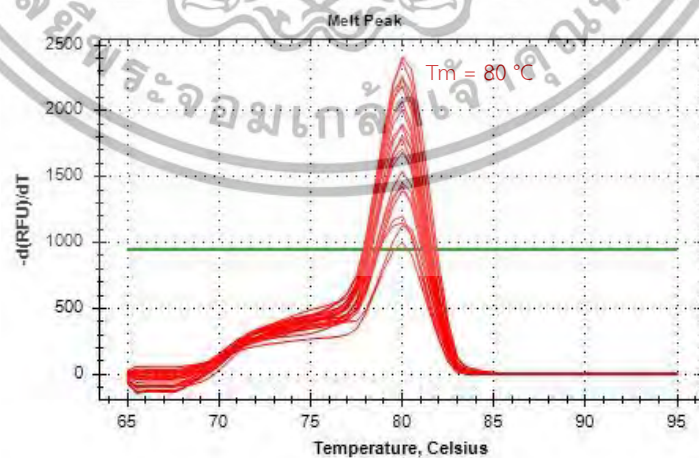
จากการเพิ่มปริมาณยีน *VTcC3* โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-*VTcC3* ความเข้มข้น 1×10^7 ถึง 1×10^1 copies เป็น DNA template ในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์จากข้อ 3.1 พบว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-*VTcC3* ที่ความเข้มข้น 10^7 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 28.48, 10^6 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 30.29, 10^5 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 32.1, 10^4 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 33.45, 10^3 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 34.33, 10^2 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 35.20 และ 10^1 copies number มีค่า Cq เท่ากับ 36.53 เมื่อนำค่า Cq ของแต่ละ copies number ไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน X เป็นค่า log ของ copies number ต่างๆ และแกน Y เป็นค่า Cq จะได้กราฟเส้นตรงที่มีสมการเส้นตรงคือ $y = -1.0946x + 37.554$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9770 (รูปที่ 4.7) เมื่อตรวจสอบจาก Melt peak พบว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-*VTcC3* ที่ความเข้มข้น 10^7 ถึง 10^1 copies number มีค่า Tm เท่ากับ 80.00 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4. 7 กราฟแสดง Amplification curve ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3



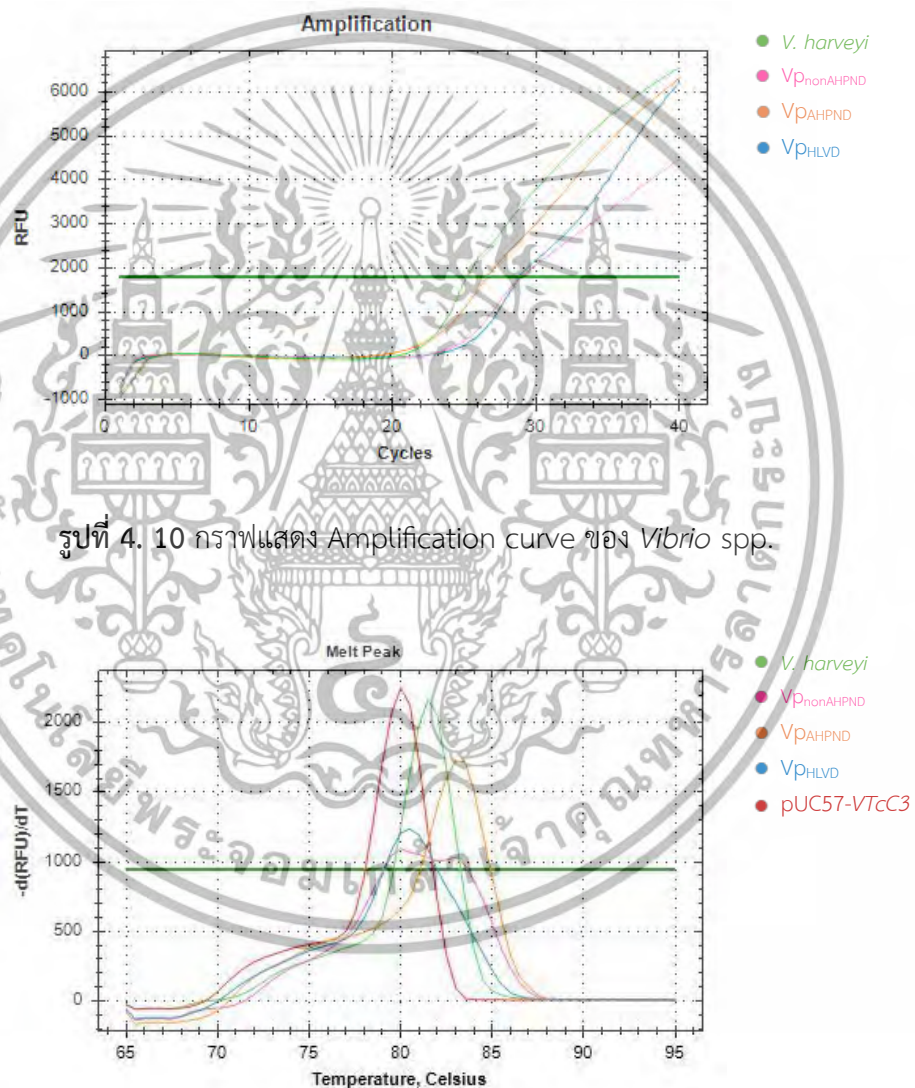
รูปที่ 4. 8 กราฟมาตรฐานของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3



รูปที่ 4. 9 กราฟแสดง Melt peak ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTcC3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์จีโนมิกส์ดีเอ็นเอของ *V. haveyi*, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD ความเข้มข้น 200 นาโนกรัม พบว่า มีค่า C_p เท่ากับ 24.77, 28.70, 26.49 และ 29.38 ตามลำดับ (รูปที่ 4.10) เมื่อตรวจสอบคุณภาพของ PCR product จาก Melt peak พบว่า มีค่า T_m ที่แตกต่างกัน โดย *V. haveyi* มีค่า T_m เท่ากับ 81.50 องศาเซลเซียส, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND มีค่า T_m เท่ากับ 80.00 และ 83.00 องศาเซลเซียส, *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND มีค่า T_m เท่ากับ 83.00 องศาเซลเซียส และ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD มีค่า T_m เท่ากับ 80.50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4. 10 กราฟแสดง Amplification curve ของ *Vibrio* spp.

รูปที่ 4. 11 กราฟแสดง Melt peak ของ *Vibrio* spp.

จากรูปที่ 4.7 จะเห็นว่า Melt peak ของ *V. paraheamolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND ปรากฏขึ้น melt peak ขึ้น จำนวน 2 peak หรือมี PCR product เกิดขึ้น 2 ขนาด โดยค่า T_m ที่ 80.00 องศาเซลเซียส ตรงกับ ค่า T_m ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-VTC3 (Positive เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

control) และค่า T_m ที่ 83.00 องศาเซลเซียส อาจเกิดจากการจับกันของไพรเมอร์กับ nonspecific binding ซึ่งค่า C_q ที่ 28.70 อาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตำแหน่ง nonspecific binding จึงไม่สามารถนำค่า C_q ไปคำนวณหาจำนวน copy number ของยีน *VTcC3* ได้

ดังนั้นจากการเปรียบเทียบค่า T_m ของตัวอย่าง *V. haveyi*, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUC57-*VTcC3* พบว่า ไม่เกิด peak ของ target PCR product ส่วน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND เกิด peak ที่มีลักษณะไม่แยกจากกันชัดเจน และความสูงของพีค ใกล้เคียงกับ Threshold line กล่าวคือ การตรวจสอบยีน *VTcC3* ใน *Vibrio* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR ให้ผลเป็นลบ (Negative)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษา ยีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Highly-lethal Vibrio disease (HLVD) เพื่อตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) ใน *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio harveyi* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction ที่ทำการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการทำงานของไพรเมอร์ด้วยเทคนิค Gradient PCR พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ คือ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส (annealing temperature) เมื่อใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์เป็น 5 $\mu\text{M}/\text{reaction}$ ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นดังกล่าวสามารถทำให้ไพรเมอร์จับกับตำแหน่งบนยีน *VTcC3* ได้อย่างจำเพาะโดยไม่เกิด nonspecific binding ขึ้นกับเชื้อที่ร่วมทำการทดสอบ (*Vp_{AHPND}* และ *V. harveyi*)

ผลการตรวจหายีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค PCR (T_a 63°C และความเข้มข้นไพรเมอร์เป็น 5 $\mu\text{M}/\text{reaction}$) ไม่พบแถบแบนเกิดขึ้นในทุกตัวอย่างเชื้อที่ร่วมทำการศึกษา รวมถึง *Vp_{HLVD}* มีเพียงแถบแบนของ positive control เท่านั้นที่เกิดขึ้น กล่าวคือ จากผลการตรวจวิเคราะห์ เชื้อที่นำมาทดสอบทุกตัวไม่มียีน *VTcC3* ซึ่งจากรายงานของ Yang et al. (2023) กล่าวว่ายีน *VTcC3* สามารถตรวจพบได้ใน *Vp_{HLVD}* โดยไม่พบใน *Vp_{AHPND}*, *V. parahaemolyticus* ที่ไม่ก่อโรค AHPND และ *V. harveyi* จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ยีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค Real time PCR เพื่อยืนยันความถูกต้อง และผลการตรวจวิเคราะห์ยีน *VTcC3* ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า ตัวอย่างเชื้อ *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค AHPND, *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD ไม่ปรากฏ melt peak ที่ตรงกับ 80.00 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การตรวจวิเคราะห์ยีน *VTcC3* ใน *Vibrio* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ให้ผลเป็นลบ (Negative)

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของไพรเมอร์ อาจจะต้องเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ให้สูงขึ้น, ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้เหมาะสม หรือปรับอัตราส่วนของคู่ไพรเมอร์ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR จีโนมิกส์ดีเอ็นเออาจไม่เหมาะสมกับการใช้เป็น DNA template ดังนั้นควรทดลองใช้พลาสมิดดีเอ็นเอเป็น DNA template ซึ่งอาจทำให้การตรวจจับจำเพาะยิ่งขึ้น เนื่องจากมีรายงานว่า ตำแหน่งของยีนสร้างสารพิษ Tc (*VTcC3*) อยู่บนพลาสมิด pHLC ของ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD (Yang et al., 2023)

โรค HLVD เป็นโรคที่อุบัติขึ้นใหม่ในอุตสาหกรรมกุ้ง มีความคล้ายคลึงกับโรค AHPND แต่มีอัตราการตายที่สูงกว่า ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย และไม่มีวิธีการตรวจสอบ (Validation method) ที่สามารถแยกโรค HLVD และโรค AHPND ได้ เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค HLVD ที่ได้รับการอนุเคราะห์สำหรับการศึกษานี้ ยังไม่ได้ผ่านการตรวจสอบ ดังนั้นควรส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำมาทดสอบทางทฤษฎี โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่มีกับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ vp-HL-202005 (CP114198.1) ในงานวิจัยของ Yang et al. (2023)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. (2567). *คู่มือไบโอซีเคียวริตี้โรงเพาะฟักและอนุบาลกุ้งทะเล*. <https://anyflip.com/gjeym/egur>
- กฤษมาวดี ฐานเจริญ. (2560). การใช้ประโยชน์จากโปรไบโอติกแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus* ในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกรามจังหวัดกาฬสินธุ์. ม.ป.พ. กุลวรา พูลผล. (2561). การดื้อยาของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากน้ำทะเลบริเวณหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์). คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. https://buuir.buu.ac.th/bitstream/1234567890/3957/1/2564_104.pdf
- กลุ่มแบคทีเรียวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2557, 25 ธันวาคม). *Vibrio parahaemolyticus*. https://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/fact_sheet/4_58.pdf
- จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ. (2566, 26 สิงหาคม). โรคที่เกิดจากเชื้อ “ไวรัสโอ (Vibrio)” ในบ่อดินของประเทศไทย. https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20230828141516_1_file.pdf
- ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำสงขลา กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง. (2562). *คู่มือการตรวจวินิจฉัยโรคสัตว์น้ำด้วย Real Time PCR (Quantitative Real Time PCR; qPCR)*. https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20191225105459_1_file.pdf
- สุดสวาท ชัยสิทธิ์, ศุภณัฐ แสนสุข, ปรรารถนา งานเลิศ, และสุदारัตน์ ชนะสิทธิ์. (2562). การตรวจหาเชื้ออีโคไลด้วยเทคนิคพีซีอาร์จากตัวอย่างปลา. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม*, 13(2): 1-10.
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 42.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.
- Austin, B. (2010). Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4): 310-317.
- Bhattacharyya, S., & Ducheyne, P. (2011). 3.327-Intracellular Probes. In P. Ducheyne (Ed.), *Comprehensive Biomaterials*, 447-470.
- Bowen, D., Rocheleau, T. A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., & French-Constant, R. H. (1998). Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens*. *Science*, 280(5372): 2129-2132. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.280.5372.2129>
- Chen, H., (2021). *Gao Ji! Guangdong, Hainan, Jiangsu Deng Di You Bao Fa Bo Li Miao! Jin Yi Miao Chang Pai Diao 3000 Duo Wan Wei Xia Miao, Miao Chang Ting Chan [Urgent! Recurrence of glass post-larvae disease in Guangdong, Hainan*
- เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- and Jiangsu! One hatchery lost over 30 million shrimp post-larvae]. Nong Cai Bao Dian Shui. Available online. <https://mp.weixin.qq>
- Dodd, S. J., Hurst, M. R., Glare, T. R., O'Callaghan, M., & Ronson, C. W. (2006). Occurrence of sep insecticidal toxin complex genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*. *Appl Environ Microbiol*, 72(10): 6584–6592. <https://doi.org/10.1128/AEM.00954-06>
- French-Constant, R. & Waterfield, N. (2005). An ABC guide to the bacterial toxin complexes. *Adv Appl Microbiol* 58: 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\).58005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05).58005-5)
- Fuchs, T. M., Bresolin, G., Marcinowski, L., Schachtner, J., & Scherer, S. (2008). Insecticidal genes of *Yersinia* spp.: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution. *BMC Microbiol*, 8: 214–224.
- Gatsogiannis, C., Lang, A. E., Meusch, D., Pfaumann, V., Hofnagel, O., Benz, R., Aktories, K., & Raunser, S. (2013). A syringe-like injection mechanism in *Photobacterium luminescens* toxins. *Nature*, 495: 520–523.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4): 386-401.
- Harkell, L., (2020). *Shrimp hatcheries in China hit by 'glass post-larvae'*. Undercurrentnews. Available online. <https://www.undercurrentnews.com/2020/04/22/shrimp-hatcheries-in-china-hit-by-glass-post-larvae/>
- He, H., (2020). *Da Kao Yan! "Bo Li Miao" Cheng Zai, Raoping 9 Cheng Miao Chang Shou Ying Xiang! Ye Zhe: Bing Fei Guai Bing, Ke Fang Ke Kong, Yang Hu Bu Bi Kong Huang [A Great challenge! The outbreak of "glass post-larvae disease". Over 90% of the hatcheries in Raoping are hit!]*. Shui Chan Qian Yan. Available online. https://mp.weixin.qq.com/s/eaqGJs1m22b_r3YzPmZcYg
- Huang, Y., (2020). *Nan Mei Bai Dui Xia "Bo Li Miao" Bu Rong Le Guan, Fang Fan Cuo Shi Xu Qiang Hua [The glass post-larvae disease is a serious problem for *Penaeus vannamei*. The strategies for disease prevention should be strengthened.]*. Shui Chan Qian Yan. Available online. <https://mp.weixin.qq.com/s/W3kdpV6qx7Whon0GuQHZ9A>
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95–125.
- Liu, B., He, X., Chen, W., Yu, S., Shi, C., Zhou, X., Chen, J., Wang, D., & Shi, X. (2012). Development of a real time PCR assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood. *Protein Cell*, 3(3): 204-12.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Liu, S., Wang, W., Jia, T., Xin, L., Xu, T., Wang, C., Xie, G., Luo, K., Li, J., Kong, J., & Zhang, Q. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* becomes lethal to post-larvae shrimp via acquiring novel virulence factors. *Microbiology Spectrum*, 11(6): 1-19. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00492-23>
- Loughran, S.T. (2021). *Introduction to Biomolecular Analysis*. CRC Press.
- Meusch, D., Gatsogiannis, C., Efremov, R. G., Lang, A. E., Hognagel, O., Vetter, I. R., Aktories, K., & Raunser, S. (2014). Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature*, 508: 61–65.
- Newman, S. G. (2022, April 11). An update on vibriosis, the major bacterial disease shrimp farmers face. Global Seafood Alliance. <https://www.globalseafood.org/advocate/an-update-on-vibriosis-the-major-bacterial-disease-shrimp-farmers-face/>
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P., & Quilici, M.L. (2010). Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3): 190-197.
- Roderera, D., Hofnagel, O., Benz, R., & Raunser, S. (2019). Structure of a Tc holotoxin pore provides insights into the translocation mechanism. *PNAS*, 116(46): 23083-23090. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.190982111>
- Ruwandeeepika, H. A. D., Jayaweera, T. S. P., Bhowmick, P. P., Karunasagar, I., Bossier, P. & Defoirdt, T. (2012). *Vibrio harveyi* outbreaks and disease management in shrimp aquaculture in the western coastal region of Sri Lanka. *NAQUA*, 62: 760-766.
- Smith, M. (2024). *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)*. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- Tan, W., Fang, X., Li, J., & Liu, X. (2000). Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies. *Chemistry - A European Journal*, 6(7): 1107-1111.
- Tennant, S. M., Skinner, N. A., Joe, A. & Robins-Browne, R. M. (2005). Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. *Infect Immun*, 73: 6860–6867.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1): 45-55.
- Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 75-85.

- Yang, F., Xu L. M., Huang, W. C., & Li, F. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae, *Aquaculture*, 548(1).
- Yang, F., You, Y. L., Lai, Q. L., Xu, L. M., & Li, F. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* becomes highly virulent by producing Tc toxins, *Aquaculture*, 576.
- Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E., & menevse, S. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis.
- Zhang, X. H., He, X. X. & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine life science & technology*, 2(3): 231-245.
- Zhang, X. H., & Austin, B. (2005). Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of applied microbiology*, 98(5): 1011-1019.
- Zou, Y., Xie, G., Jia, T., Xu, T., Wang, C., Wan, X., Li, Y., Luo, K., Bian, X., Wang, X., Kong, J., & Zhang, Q. (2020). Determination of the infectious agent of translucent post-larva disease (TPD) in *Penaeus vannamei*. *Pathogens*, 9(9): 741-757 <https://doi.org/10.3390/pathogens9090741>



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS) agar (1 ลิตร)

Proteose peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium thiosulphate	10	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Oxgall	8	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Ferric citrate	1	กรัม
Bromo thymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารแข็ง TCBS 89 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ย้ายลงขวดรูปชมพู่ (flask) ให้ความร้อนด้วย magnetic stirrer หรือ microwave จนอุ่น ละลายรอให้อาหารอุ่นแล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

2. Trypticase soy broth (TSB) + NaCl 1.5% (1 ลิตร)

Pancreatic digest of casein	17	กรัม
Pancreatic digest of soybean meal	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Dextrose (Glucose)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
หมายเหตุ เติม NaCl เพิ่ม 1.5%	15	กรัม

ชั่งอาหารเหลว TSB 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมเกลือ NaCl 15 กรัม คนให้ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ย้ายลงขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดดูแรน (duran) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Trypticase soy agar (TSA) + NaCl 1.5% (1 ลิตร)

Pancreatic digest of casein	17	กรัม
Pancreatic digest of soybean meal	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Dextrose (Glucose)	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
หมายเหตุ เติมน้ำ NaCl เพิ่ม 1.5%	15	กรัม

ชั่งอาหารเหลว TSB 45 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือ NaCl 15 กรัม คนให้ละลายและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ย้ายลงขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดดูแรน (duran) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารอุ่นแล้วเทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและสารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียม 70% Ethanol (1 ลิตร)

95% Ethanol	737.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ตวง 95% Ethanol ปริมาตร 737 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และผสมสารละลายให้เข้ากัน

2. การเตรียม 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic หรือ EDTA (1 ลิตร)

EDTA	186.10	กรัม
สารละลาย NaOH		
น้ำกลั่น		
pH 0.8		

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 0.8 ด้วยสารละลาย NaOH จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียม 5X TBE buffer (1 ลิตร)

Tris-base	54.00	กรัม
Boric acid	27.50	กรัม
0.5 M EDTA	20.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ละลาย Tris-base และ Boric acid ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA pH 0.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียม 0.5X TBE buffer (1 ลิตร)

5X TBE buffer	20.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

ตวงสารละลาย 5X TBE buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และผสมสารละลายให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียม 1.5% Agarose gel (40 มิลลิลิตร)

Agarose gel	0.60	กรัม
0.5X TBE buffer	40.00	มิลลิลิตร

ชั่ง Agarose gel 0.60 กรัม ละลายใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร หลอมให้เม็ดเจลละลายโดยใช้ไมโครเวฟ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม RedSafe DNA Stain ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทเจลลงในภาชนะที่เตรียมไว้ เมื่อเจลแข็งตัวจึงค่อยๆ ดึงหัวออก





งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 5 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาวกตัญญูภรณ์ แม้นพิมพ์ รหัสประจำตัว 63050367
นางสาวฐิติภา รูปพรหม รหัสประจำตัว 63050383

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ขอ
รับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การตรวจหายีนสร้างสารพิษ Tc (VTcC3) ใน *Vibrio parahaemolyticus*
และ *Vibrio harveyi*

ชื่อภาษาอังกฤษ Detection of VTcC3 gene in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio*
harveyi

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ 0.26 %

ลงชื่อ.....กตัญญูภรณ์ แม้นพิมพ์.....

ลงชื่อ.....ฐิติภา รูปพรหม.....

(นางสาวกตัญญูภรณ์ แม้นพิมพ์)

(นางสาวฐิติภา รูปพรหม)

นักศึกษา

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของ
นักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้
เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....ธิปชัย วัฒนวิจารณ์.....

(ผศ.ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้