บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 บริษัท Beckman, Germany
2. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
3. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G650E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA
4. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany
6. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น PT 1200 ของบริษัท Sartorius, Germany
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA
8. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 2100 บริษัท Innova, USA
9. สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Eiken chemical, Japan
3. ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ ของบริษัท Sera, Germany
4. อาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ของบริษัทโภคภัณฑ์สตาร์ฟีด จำกัด

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** P1+ (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% ในเอทิลแอลกอฮออล์ 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. โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Phianphak, 2005) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1 *Bacillus subtilis* P11 (BSP 11)

จุลินทรีย์โพรไบโอติก แยกและคัดเลือกสายพันธ์จากลำไส้ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี ซึ่งจับได้จากชายฝั่งทะเล จังหวัดชลบุรี โดย ศิริเพ็ญ สังข์ชัย (2546) ใช้สำหรับเตรียมเซลล์เพื่อผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

3.4.2 *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 จากหน่วยวิจัยกุ้ง CENTEX ประเทศไทย

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ *B. subtilis* P11 (BSP11)

3.5.1.1 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. subtilis* P11

นำ *B. subtilis* P11 จาก stock เชื้อมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชม. ให้เชื้อขึ้น จากนั้นนำลูปที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ นำมาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชม. เชื้อที่ได้ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อไป โดยปิเปตเชื้อ 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่มีเกลือ NaCl อยู่ 1%, 2%, 3% และ 4% ตามลำดับ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 660 กับเวลา และเปรียบเทียบค่า specific growth rate ที่ได้ในแต่ละเปอร์เซ็นต์เกลือโซเดียมคลอไรด์ (% NaCl)

3.5.1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. subtilis* P11

นำ *B. subtilis* P11 จาก stock เชื้อมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชม. ให้เชื้อขึ้น จากนั้นนำลูปที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ นำมาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชม. เชื้อที่ได้ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อไป โดยปิเปตเชื้อ 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เพื่อทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 660 กับเวลา และเปรียบเทียบค่า specific growth rate ที่ได้ในแต่ละอุณหภูมิ

3.5.1.3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. subtilis* P11

นำ *B. subtilis* P11 จาก stock เชื้อมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชม. ให้เชื้อขึ้น จากนั้นนำลูปที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ นำมาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่ 37°c เป็นเวลา 24 ชม. เชื้อที่ได้ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อไป โดยปิเปตเชื้อ 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ในค่าพีเอช 6, 6.5, 7, 8 ตามลำดับ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 660 กับเวลา และเปรียบเทียบค่า specific growth rate ที่ได้ในแต่ละค่าพีเอช

3.5.2 เตรียม *B. subtilis* P11 (BSP11) แบคทีเรียที่มีคุณลมบัติเป็นโพรไบโอติกในกุ้งกุลาดำ เพื่อผสมในอาหาร กุ้งกุลาดำ

3.5.2.1 เลี้ยง *B. subtilis* P11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30°C ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบ / นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บเซลล์สดที่ได้ที่อุณหภูมิ 0°C ก่อนนำมาใช้ทดลอง

3.5.2.2 นำเซลล์สด *B. subtilis* P11 ผสมกับอาหารกุ้งกุลาดำในอัตราส่วน 1:4 น้ำหนักต่อน้ำหนัก โดยใช้เซลล์สด 1 ส่วน อาหารกุ้ง 4 ส่วน ได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^{10} CFU/กรัม (ศิริเพ็ญ สังข์ชัย, 2546) คลุกให้อาหารกับเชื้อเข้ากันดีเข้าโดยกระจายไม่ให้อาหารติดกันเป็นก้อน นำไปอบในตู้บ่ม 37°C เป็นเวลาประมาณ 1 วัน ให้อาหารแห้ง เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในห้องเย็น

3.5.2.3 ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารกุ้งกุลาดำ ปริมาณ *B. subtilis* P11 ที่ผสมในอาหารกุ้งกุลาดำทันที โดยวิธี total plate count ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย

3.5.3 เตรียมบ่อเลี้ยงกุ้งเพื่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

3.5.3.1 เตรียมบ่อดินเพื่อใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ขนาดประมาณ 1000 ตร.ม.ความลึกประมาณ 1.5 เมตร ณ ตำบลบึงบอน อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ลักษณะดินมีสมบัติเป็นดินเปรี้ยวและเค็ม ทำการตากบ่อไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงปล่อยน้ำเข้าไปให้มีความลึกประมาณ 1.3 เมตร และปรับแต่งน้ำให้มีความเค็มประมาณ 10 ส่วนในพันส่วน(ppt) ติดตั้งเครื่องตีน้ำเพื่อเพิ่มปริมาณ O_2 ในน้ำ

3.5.3.2 การเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1

นำกุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 15 (PL-15) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการปรับสภาพความเค็มโดยเลี้ยงในน้ำเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) บรรจุในบ่อซีเม็นต์ขนาด 0.8 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นค่อยๆลดความเค็มลงจนได้ความเค็มประมาณ 10 ppt ซึ่งใกล้เคียงกับความเค็มในบ่อดิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดโดยเลี้ยงในกระชังขนาด 2.25 ตารางเมตร ในบ่อดินที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.3.1 ปล่อยกุ้ง 150 ตัวต่อกระชัง พ่นให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา และให้อาหารเดียวกัน 3 มื้อต่อวัน การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1 กลุ่มควบคุม (control)คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *B. subtilis* P11 จำนวน 10 ซ้ำ

2 กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์ลด *B. subtilis* P11 จำนวน 10 ซ้ำ

ทำการศึกษาทุกๆ 15 วัน โดยแต่ละครั้งทำการตรวจนับปัจจัยดังนี้ คือ

1 น้ำหนักตัว (กรัม)

2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยวิธี plate count

3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง plate count

4 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำ โดย plate count

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *Vibrio* spp.ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส

5 ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนี้

- แอมโมเนียม (NH_4^+) (mg/l) หาค่าด้วย Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
- ไนไตรท์ (NO_2) (mg/l) (mg/l(หาค่าด้วย Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
- ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) (mg/l) หาค่าด้วย Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
- อัลคาลินิตี (Alkalinity) หาค่าด้วย Alkalinity test kit บริษัท Merck, Germany
- อุณหภูมิ (^oC) วัดด้วย thermometer
- ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) (mg/l) วัดด้วย DO meter
- พีเอช วัดด้วย pH meter
- ความเค็ม (ppt) วัดโดย Refractometer

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบตามกำหนด จะนับจำนวนกุ้งที่เหลือเพื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต (%) ระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก

3.5.3.3 การเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2

นำกุ้งกุลาดำระยะ postlarvae 15 (PL-15) จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการปรับสภาพความเค็มโดยเลี้ยงในน้ำเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) บรรจุในบ่อซีเม็นต์ขนาด 0.8 ลูกบาศก์เมตร จากนั้นค่อยๆลดความเค็มลงจนได้ความเค็มประมาณ 10 ppt ซึ่งใกล้เคียงกับ

ความเค็มในบ่อดิน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการทดลองเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบปิดโดยเลี้ยงในกระชัง ขนาด 1.5 ตารางเมตร ในบ่อดินที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ปล่อยกุ้ง 100 ตัวต่อกระชัง พ่นให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา และให้อาหารเดียวกัน 3 มื้อต่อวัน การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (control)คือกลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปโดยไม่ผสมเซลล์ *B. subtilis* P11 จำนวน 5 ซ้ำ
2. กลุ่มที่ให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปผสมเซลล์สด *B. subtilis* P11 จำนวน 5 ซ้ำ

ทำการศึกษาทุกๆ 20 วัน โดยแต่ละครั้งทำการตรวจนับปัจจัยดังนี้ คือ

1. น้ำหนักตัว (กรัม)
2. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยวิธี plate count
3. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง plate count
4. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และ *Vibrio* spp. ในลำไส้กุ้งกุลาดำ โดย plate count

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *Vibrio* spp.ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไธโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส

5. ตรวจสอบคุณภาพน้ำบางประการระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ดังนี้
   - แอมโมเนียม (NH_4^+) (mg/l) หาค่าด้วย Ammonium test kit บริษัท Merck, Germany
   - ไนไตรท์ (NO_2) (mg/l) หาค่าด้วย Nitrite test kit บริษัท Merck, Germany
   - ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) (mg/l) หาค่าด้วย Phosphate test kit บริษัท Merck, Germany
   - อัลคาลินิตี (Alkalinity) หาค่าด้วย Alkalinity test kit บริษัท Merck, Germany
   - อุณหภูมิ (^oC) วัดด้วย thermometer
   - ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) (mg/l) วัดด้วย DO meter
   - พีเอช วัดด้วย pH meter
   - ความเค็ม (ppt) วัดโดย Refractometer

เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบตามกำหนด จะนับจำนวนกุ้งที่เหลือเพื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต (%) ระหว่างกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มโพรไบโอติก

3.5.3.4 คำนวณผลผลิตและอัตราแลกเนื้อกุ้งต่ออาหารเลี้ยงกุ้งหลังการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้ง 2 ครั้ง

I 25192168

3.5.4 ติดตามปัจจัยแสดงภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ ในกุ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก

3.54.1 การนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (total hemocyte count)

เจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Alsever's solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยดเลือด 100 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือดนับเม็ดเลือดทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.5.4.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity) ในพลาสมากุ้ง

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยเพาะเลี้ยง *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทริปติกซอย ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในช่วงลอกเฟส (log phase) ปรับค่าโอดีที่ความถี่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml โดยเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างโอดี 660 นาโนเมตรกับจำนวน *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 (พิศมัย โพธิ์เวชกุล, 2547) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C 15 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่าเดิม เพื่อปรับให้ได้ 10^4 CFU/ml

หาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในพลาสม่ากุ้ง โดยเจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Van Harrevald's salt 1.4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บส่วนพลาสม่าไปกรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอน บ่มส่วนพลาสม่าที่ปราศจากเชื้อ กับ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนแรกในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปต 50 ไมโครลิตร กระจายเชื้อ (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเทรตบายซอลท์ซูโครส นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ที่ได้

3.5.5 ทดสอบความสามารถของกุ้งกุลาดำในการต้านทานต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสงจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639

เตรียม *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ความเข้มข้นประมาณ 10^7 CFU/ml ในน้ำเลี้ยงกุ้ง ในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 1 ใช้กุ้งแต่ละกลุ่มทดลองหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 วัน กลุ่มละ 10 ตัวต่อบ่อ ส่วนในการเพาะเลี้ยงกุ้งครั้งที่ 2 ใช้กุ้งแต่ละกลุ่มทดลองหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 80 วัน กลุ่มละ 20 ตัวต่อบ่อ ทดสอบความต้านทานต่อการชักนำให้เกิดโรค โดยติดตามผลดังนี้

3.5.5.1 อัตราการตายสะสม (cumulative mortality) นับติดตามผลทุกวัน

3.5.5.2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในน้ำเลี้ยงด้วยวิธี plate count โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย ส่วน *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส ติดตามผลทุก 2 วัน

3.5.5.3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ในลำไส้กุ้งด้วยวิธี Total plate count โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอยเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ส่วน *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลล์ซูโครส

3.5.5.4 ตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำจากข้อ 3.5.4 ในกุ้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเรืองแสง

3.5.6 ตรวจสอบพยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจาก *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 ด้วยวิธี Immunohisto chemistry (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sithigorngul et al., 2000)

3.5.6.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

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

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ 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 รอจนแข็งตัว จึงแกะพิมพ์ออก

ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ฝังในพาราฟลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน เรียงต่อกัน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น ให้พอดีกับขนาดเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตึงเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.6.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี Indirect peroxidase immunohistochemistry

ขั้นตอนการเอาพาราฟลาสต์ออก (deparaffination) นำสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นวางบนตะกร้า (slide basket) แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ,5 และ 5 นาที ตามลำดับ

ขั้นตอนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydration) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในไซลีนที่ผสมนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 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 สารละสายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 1 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยให้ปั๊มสูญญากาศ หยดสารละลาย P_1^- คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ โดยวางสไลด์ในกล่องที่ปิดฝาภายในบุด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้นเพื่อรักษาความชื้นตลอดเวลา ดูดสารละลาย P_1^- ในแต่ละเนื้อเยื่อออก ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ 2 ให้เป็นเนื้อเยื่อควบคุม หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ในเนื้อเยื่อที่ 1 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 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 ที่ 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 ถึงขั้นนี้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์บริเวณที่ให้ผลบวกจะสามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีนโดยนำเนื้อเยื่อ 3 แผ่นแรก หรือ 1 ชุด มาย้อมสีฮีมาทอกไซลีน แต่ในอีก 1 ชุดย้อมสีอิโอซินเพียงอย่างเดียวทำได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนนี้นำเนื้อเยื่อย้อมสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 10 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินออกอย่างรวดเร็ว แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้เนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีน้ำเงินจาง แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ 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) ในเนื้อเยื่อด้วยสีอิโอซิน 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

3.5.6.3 ขั้นตอนการทำเป็นสไลด์ถาวร

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

3.5.7 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Independent T-test และวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำระหว่างชุดทดลองด้วยวิธี Analysis of Covariance