

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. การจำแนกเชื้อ

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 จานเลี้ยงเชื้อ

1.1.2 หลอดเลี้ยงเชื้อ

1.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.1.4 ออโตปิเปต

1.1.5 ทิปสำหรับออโตปิเปต

1.1.6 ขวดรูปชมพู่

1.1.7 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

1.1.8 แท่งคนสาร

1.1.9 ชุดทดสอบ API 20E

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 Tryptic Soy Agar, TSA

1.2.2 Tryptic Soy Broth, TSB

1.2.3 Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar, TCBS

1.2.4 Motility Medium

1.2.5 Oxidative-Fermentative Medium, OF

1.2.6 Decarboxylase Medium, Ornithine Modified

1.2.7 Indole Test Broth Agar

1.2.8 Triple Sugar Iron Agar, TSI

1.3 ยาต้านจุลชีพ

1.3.1 Ampicillin

1.3.2 Chloramphenicol

1.3.3 Novobiocin

1.3.4 Nitrofurantoin

- 1.3.5 Kanamycin
- 1.3.6 Oxolinic Acid
- 1.3.7 Oxytetracyclin
- 1.3.8 DD14 0/ 129
- 1.3.9 Sulfadiazine
- 1.3.10 Trimethoprim Sulfamethoxazole

2. การสกัดและการแยก Outer Membrane Protein ด้วยวิธี SDS-PAGE

2.1 วัสดุอุปกรณ์

- 2.1.1 เครื่อง Sonicator
- 2.1.2 อ่างน้ำแข็ง
- 2.2.3 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์
- 2.3.4 เครื่อง Ultracentrifuge Beckman Optima XL 100K

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 Phenyl Methyl Solfonyl Fluoride (PMSF)
- 2.2.2 10 mM Tris HCl buffer+ 1.5 percent NaCl (pH 8.0)
- 2.2.3 Sodium Lauryl Sacocinate
- 2.2.4 TEMED

2.3 บัฟเฟอร์

- 2.3.1 Sample Buffer
- 2.3.2 Electrode Buffer
- 2.3.3 1.5 M Tris, pH 8.8
- 2.3.4 1.0 M Tris, pH 6.8
- 2.3.5 Wet transfer buffer
- 2.3.6 Destaining Solution

3. การทดสอบทางภูมิคุ้มกัน

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 หนู Wistar Rat จำนวน 2 ตัว
- 3.1.2 ปีกเกอร์
- 3.1.3 กระบอกตวง
- 3.1.4 เครื่องชั่งสาร

3.1.5 กล้องจุลทรรศน์

3.1.6 แผ่นออลูมิเนียมฟอยล์

3.1.7 หลอดแก้ว

3.1.8 สไลด์นับเม็ดเลือด

3.1.9 เครื่อง Centrifuge MPW-350R

3.1.10 เครื่อง Illuminated Refrigerated Incubator Shaker

3.1.11 เครื่อง Soft Incubator SLI-1000 ND

3.1.12 เครื่อง Microplate Reader

3.1.13 เครื่อง Spectrophotometer

3.1.14 เครื่อง Mini Protean II Multi Screen

3.1.15 ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส

3.1.16 เข็มฉีดยาขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร

3.1.17 หม้อนึ่งความดัน

3.1.18 96 Well Plate

3.1.19 Nitrocellulose Membrane

3.2 สารเคมี (สูตรเตรียมดังภาคผนวก)

3.2.1 สี Natt Herrick's Stain

3.2.2 EDTA

3.2.3 Diaminobenzidine Tetrahydrochlorid (DEP)

3.2.4 Hydrogen Peroxide (H_2O_2)

3.2.5 0.01 M Phosphate Buffer Saline, pH 7.2

3.2.6 Tween tris Buffer Saline (TTBS)

3.2.7 Blocking Buffer

3.2.8 Coomassie Brilliant Blue R-250

3.2.9 Semi Dry Transfer Buffer

3.2.10 Molecular Weight Standard (Bio-Rad)

3.2.11 Mouse Monoclonal Anti-Seabass Immunoglobulin (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง)

3.2.12 Monoclonal Anti *V. vulnificus* Biotype 2 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ไพศาล ลิทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร)

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาวจากแหล่งต่าง ๆ

1.1 ปลากะพงขาว

1.1.1 ปลากะพงขาวป่วย ได้รับจากฟาร์มในจังหวัดชลบุรี ซึ่งปลามีอาการเกล็ดหลุด ตกเลือดบริเวณลำตัว และอวัยวะภายใน ถูกนำมาเขี่ยเชื้อจากบริเวณไต และบริเวณที่เกิดแผลเลี้ยงบนอาหารวุ้น TSA จนเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป

1.1.2 ปลากะพงขาวที่ไม่ป่วยที่ได้รับจาก จังหวัดฉะเชิงเทรา และจังหวัดจันทบุรี นำมาเขี่ยเชื้อจากบริเวณไตเลี้ยงบนอาหารวุ้น TSA จนเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป

2. การจำแนก Biotype ของเชื้อ *V. vulnificus* จากปลากะพงขาว

2.1 การทดสอบทางชีวเคมี

เชื้อที่แยกได้จากปลากะพงขาวทั้งหมดนำมาจำแนกชนิดของเชื้อ ทางจุลชีววิทยา โดยการศึกษาโคโลนี รูปร่างเซลล์ การทดสอบทางชีวเคมี และใช้ชุดทดสอบ API 20E (ตามการทดลองของ Fouz and Amaro (2003) (ภาคผนวก) ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เมื่อพบเป็นเชื้อ *V. vulnificus* จำแนก Biotype โดยใช้การทดสอบ Indole และ Ornithin Decarboxylase (ตามการทดลองของ Biosca et al., 1996)

2.2 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อที่ถูกทดสอบว่าเป็น *V. vulnificus* เลี้ยงในอาหาร TSB ที่มีเกล็ด 2 เปอร์เซนต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ครบเวลาถ่ายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Muller Hilton Agar ที่มีเกล็ด 2 เปอร์เซนต์ แล้วกระจายเชื้อให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม จากนั้นปล่อยอาหารให้แห้งแล้ววาง Antibiotic Disc บนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น ตรวจวัดผลจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวัดความกว้างของวงที่เกิดขึ้น

3. การเปรียบเทียบรูปแบบ Outer Membrane Protein (OMP) ระหว่างเชื้อ *V. vulnificus* โดยวิธี SDS- PAGE

3.1 ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากะพงขาว) จากจังหวัดฉะเชิงเทรา

3.1.2 *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากะพงขาว) จากจังหวัดฉะเชิงเทรา

3.1.3 *V. vulnificus* DMST 5852 (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

3.2 การสกัด Outer Membrane Protein (ปรับปรุงจากวิธีของ Biosca, Garay et al., 1993)

นำเซลล์แบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งจากนั้นล้างเซลล์ด้วย 10 mM Tris HCl Buffer+1.5% NaCl (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (Sonicate) 4 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที ในขณะที่แช่น้ำแข็ง และเติม Protease Inhibitor ที่มีส่วนผสมของ PMSF (10mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) โดยเติมสาร 5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ในหลอดที่บรรจุแบคทีเรีย นำไปปั่นเหวี่ยง 2,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนบนไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 100,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ Whole Cell Lysate (WCL)

ผสม Clear Gel-Link Pellet ปริมาตรครึ่งหนึ่งหรือทั้งหมดกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลือจะใส่ 1 mM ของ 10 mM Tris HCl Buffer+1.5% NaCl (pH 8.0) จากนั้นเติม 2% SLS (Sodium Lauryl Sarcosinate) ใน 10 mM Tris HCl Buffer+1.5% NaCl (pH 8.0) ในปริมาณที่เท่ากัน ทำการเขย่าให้ Pellet ละลายตัวทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 100,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อใหม่ และปรับระดับความเข้มข้นของโปรตีนควรรอยู่ในช่วง 5-3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัด OMP

นำ OMP ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 จากอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทำละลายที่อุณหภูมิห้อง และเจือจาง ที่อัตราส่วน 1: 10 และ 1: 50 และนำโปรตีนของ Bio-Rad มาทำการเจือจางแบบ Serial Dilution จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดที่เจือจางใส่ลงใน 96 Well Plate และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร และนำค่า OD (Optical Density) ที่เครื่องอ่านได้มาคำนวณ กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของโปรตีนมาตรฐานด้วยสมการเส้นตรง และคำนวณกลับเป็นกราฟเส้นตรงของตัวอย่าง OMP จะได้ปริมาณโปรตีนของเชื้อ

3.4 การเปรียบเทียบรูปแบบ OMP ของเชื้อ *V. vulnificus* ด้วยวิธี (SDS-PAGE)

ประกอบแผ่นกระจกของชุด อิเล็กโตรโฟรีซิส ตามคู่มือการใช้ เตรียม Separating Gel ที่ 12 เปอร์เซ็นต์ ใส่สารละลายผสมอะครีลาไมด์ (ดังภาคผนวก) ลงในช่องว่างระหว่างกระจกของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยความสูงของระดับอะครีลาไมด์ให้ต่ำกว่าขอบของกระจกประมาณ 1 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นด้านบนของอะครีลาไมด์เจล แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อครบเวลาเทส่วนของน้ำกลั่นออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เตรียม Stacking Gel ที่

4 เปอร์เซ็นต์ โดยเทสารผสมอะคลิละไมล์บน Separating Gel พร้อมใส่หัว เพื่อให้เกิดช่องว่าง จำนวน 10 ช่อง ทิ้งให้เจลแข็งตัว 30 นาที จากนั้นเตรียมตัวอย่าง โดยให้ความร้อนกับสารละลาย OMP ใน Sample Buffer ที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีเมื่อ Stacking Gel แข็งตัวให้นำหัวออก แล้วประกอบเข้าในชุด Mini Protein III (Bio-Rad) และเติมสารละลาย อิเล็กโตรโฟรีซิสบัฟเฟอร์ ในช่องด้านบนของอุปกรณ์ให้สารละลายท่วมตัวอย่าง เติมตัวอย่างในช่อง เติมตัวอย่าง ในแต่ละช่องของเจล ต่อชุดอุปกรณ์จ่ายไฟเข้ากับชุดทดลองตั้งกระแสไฟ 120 โวลต์ สังเกตแถบสีของ Bromphenol Blue จะลงมาถึงสุดปลายเจลจึงหยุดจ่ายไฟ แยกส่วนเจลออกจาก กระจกทำการย้อมเจลด้วย สี Coomassie Brilliant Blue R250 (ภาคผนวก) ข้ามคืนแล้วล้างสีด้วย Destaining (ภาคผนวก)

4. การจำแนกเชื้อ *V. vulnificus* โดยการใช้แอนติบอดี (Harlow & Lane, 1988)

4.1 การฉีดแอนติเจนเข้าหนูทดลอง

ฉีดแอนติเจน (OMP) ของแบคทีเรีย *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 เพื่อกระตุ้นให้ หนู Wistar Rat สร้างแอนติบอดี โดยนำแอนติเจนที่ต้องการทดสอบผสมกับ Complete Freund's Adjuvant ฉีดเข้าหนูทดลองบริเวณช่องท้อง ปริมาณ 100 มิลลิกรัม หลังจากนั้นฉีดอีก 2 ครั้ง ทุก 2 สัปดาห์ เพื่อกระตุ้นให้หนู Wistar Rat สร้างแอนติบอดีโดยใช้แอนติเจนปริมาณ 50 มิลลิกรัมผสม กับ Incomplete Freund's Adjuvant และ 1 สัปดาห์ หลังจากฉีดเข็มสุดท้าย จะทำการเก็บเลือดหนู เพื่อนำมาทดสอบอิมโมโนเจนของแบคทีเรียแต่ละ Biotype ต่อไป

4.2 การเก็บซีรัมของหนูทดลอง

สามารถทำได้หลังจากฉีดแอนติเจนเข้าหนูทดลองประมาณ 50 วัน หนูทดลองจะมีการสร้างแอนติบอดีตอบสนองในปริมาณที่สามารถตรวจสอบได้ และการเก็บเลือดของหนูทดลอง เพื่อตรวจสอบหาระดับแอนติบอดีหลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้าย 5 วัน และทำการทดสอบ ด้วยวิธี Western Blotting

4.3 วิธี Western Blotting

4.3.1 ชนิดของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

4.3.1.1 *V. vulnificus* Biotype 1 (จากปลากระพงขาวป่วยจากจังหวัดฉะเชิงเทรา)

4.3.1.2 *V. vulnificus* Biotype 2 (จากปลากระพงขาวป่วยจากจังหวัดฉะเชิงเทรา)

4.3.1.3 *V. vulnificus* DMST 5852 (จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

4.3.1.4 *V. vulnificus* MT 1506 (จากประเทศอังกฤษ)

4.3.1.5 *V. vulnificus* BT 89/04/7052 (จากประเทศอังกฤษ)

4.3.1.6 *V. vulnificus* MT 1506 (จากประเทศอังกฤษ)

4.3.2 โมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 และ *Vibrio* spp. มาผ่านขั้นตอนการแยกมวลโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่อง Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่น้ำนม (5% Dry Milk) พร้อมทั้งเขย่าช้า ๆ ครบเวลา ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นบ่มใน Monoclonal Anti *V. vulnificus* Biotype 2 (ได้ความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ไพศาล สัทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้าง 3 ครั้ง ใน PBS เขย่าแรง ๆ และนำไปบ่มใน Goat Anti Mouse Immunoglobulin ที่เชื่อม (Conjugate) ด้วยเอนไซม์ HRP (Horseradish Peroxidase) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และแช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสใน Substrate (DAB 7 มิลลิกรัม+ COCl_2 +PBS) เพื่อให้เกิดสี อ่านผลจากแถบสีที่เกิดเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

4.3.3 โพลีโคลนอลแอนติบอดี

นำแอนติซีรัมของหนูทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย OMP ของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 มาทดสอบความเป็นอิมโมโนเจน โดยนำแอนติซีรัมมาดูดซับแอนติบอดี โดยนำแอนติซีรัมหนูทดลองที่ได้รับการฉีด OMP ของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 มาดูดซับแอนติบอดีด้วย OMP ของ *V. vulnificus* Biotype 2 และ *V. vulnificus* Biotype 2 มาดูดซับแอนติบอดีด้วย OMP ของ *V. vulnificus* Biotype 1 จากนั้นนำไปพักที่ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน และปั่นแยกตะกอนทิ้ง จะได้ส่วนบนเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี จากนั้นนำ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 และ *Vibrio* spp. มาผ่านขั้นตอนการแยกมวลโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และถ่ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วยเครื่อง Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่น้ำนม (5% Dry Milk) พร้อมทั้งเขย่าช้า ๆ ครบเวลา 1 ชั่วโมงล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นบ่มใน Polyclonal Mouse Anti OMP *V. vulnificus* Biotype 1 หรือ 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้าง 3 ครั้งใน PBS เขย่าแรง ๆ และนำไปบ่มใน Goat Anti Mouse Immunoglobulin ที่เชื่อม (Conjugate) ด้วยเอนไซม์ HRP (Horseradish Peroxidase) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และแช่กระดาษไนโตรเซลลูโลสใน Substrate (DAB 7 มิลลิกรัม+ COCl_2 +PBS) เพื่อให้เกิดสี อ่านผลของแถบสีที่เกิดเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

5. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ในการก่อให้เกิดโรคในปลากระพงขาว

โดยการฉีดเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 เข้าบริเวณช่องท้องปลากระพงขาว ที่ความเข้มข้น 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก) แล้วสังเกตอาการของปลาที่ได้รับเชื้อจากอาการปลาที่ป่วย และอัตราการตาย จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลากระพงขาวที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* ทั้งสอง Biotype

6. การเตรียมวัคซีน

6.1 วัคซีนชนิด Bacterin

เลี้ยงเชื้อ *V. vulnificus* Biotype 1 และ 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เมื่อเชื้อเจริญ นำโคโลนีเดียวเลี้ยงใน TSB เขย่านาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที แล้วเติมฟอร์มาลินในสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นล้างเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง และเพาะเชื้อบนอาหาร TSA บ่มไว้ 48 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการเจริญของเชื้อ ถ้าเชื้อยังตายไม่หมด ให้ฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยฟอร์มาลิน ถ้าเชื้อตายหมดแล้วให้นำเชื้อมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^9 CFUต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก) เพื่อฉีดเข้าปลากระพงขาวต่อไป

6.2 วัคซีนชนิด OMP

ทำเช่นเดียวกับการสกัด OMP (ข้อ 2.1)

6.3 การให้วัคซีน

ทดลองใช้ปลากระพงขาวขนาด 150 ± 10 กรัม โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม ใช้ปลากระพงขาวกลุ่มละ 30 ตัวคือ

6.3.1 กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือ 0.85% เข้าที่ช่องท้อง 0.2 มิลลิลิตร ต่อปลา 1 ตัว

6.3.2 กลุ่มที่ 2 ฉีดวัคซีนชนิด Bacterin ด้านเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ปริมาณ 1:1 เข้าช่องท้องปลากระพงขาวที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/ มิลลิลิตร

6.3.3 กลุ่มที่ 3 ฉีดวัคซีนชนิด OMP ด้านเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ปริมาณ 1:1 ชนิด OMP เข้าที่ช่องท้องที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อปลา 100 มิลลิกรัม (ปรับปรุงจากวิธี Bader et al., 2004)

6.4 การทดสอบความคุ้มโรค

หลังจากให้ปลาได้รับวัคซีนแล้วในทุก 7 วันจนสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บเลือดปลา โดยวิธีการสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวมาวิเคราะห์

6.4.1 ตรวจวัดระดับแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA ในแต่ละกลุ่ม

6.4.2 ตรวจปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยเทคนิคการย้อมสี Natt- Herrick's Stain

หลังการให้วัคซีนปลากะพงขาว เมื่อพบว่าระดับแอนติบอดีของปลากะพงขาวเริ่มลดลง ให้ทำการทดสอบความคุ้มโรคของปลากะพงขาว โดยการฉีดเชื้อ *V. vulnificus* ทั้ง Biotype 1 และ 2 ปริมาณ 1: 1 ให้ปลาที่ได้รับวัคซีน และไม่ได้รับวัคซีน จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่ได้รับเชื้อ *V. vulnificus* ไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS (%))

$$RPS(\%) = 1 - \frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลากลุ่มที่ได้รับวัคซีน}}{\text{เปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลากลุ่มที่ไม่ได้รับวัคซีน}} \times 100$$

7. การศึกษาการสร้างและปริมาณแอนติบอดีในปลากะพงขาว (Immunoglobulin, Ig)

7.1 การเปรียบเทียบแอนติบอดีในปลากะพงขาวแต่ละกลุ่มโดยวิธี Indirect ELISA

(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

เทคนิค Indirect ELISA เป็นการทดสอบแอนติบอดีในเลือดปลาที่จำเพาะต่อเชื้อชนิดนั้น ๆ ปฏิกริยาระหว่างแอนติบอดี และแอนติเจนจะเกิดขึ้นบน 96 Well Plate โดยมีการใช้เอนไซม์ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการเปลี่ยนสี เพื่อยืนยันปฏิกิริยาขั้นตอนมีดังนี้

7.1.1 การเคลือบจานด้วยแอนติเจน

เติม 0.01% Poly-L-Lysine ที่ละลายใน 0.01M Phosphate Buffer Saline, pH 7.2 ลงใน 96 Well Plate ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ครบเวลาเท Poly-L-Lysine ออก แล้วเติมเชื้อ *V. vulnificus* ปริมาณ 1×10^7 เซลล์ ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติม 5 เปอร์เซ็นต์ Glutaraldehyde Solution (เตรียมใน Cold PBS) ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนในตู้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยให้ความชื้น เมื่อครบกำหนดล้าง Plate 3 ครั้งด้วย 0.01 M PBS แล้วผึ่งให้แห้ง

7.1.2 การทดสอบซีรัมปลากะพงขาว

เติมซีรัมปลากะพงขาว 100 ไมโครลิตร (เจือจาง 1: 100, 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1,600, 1: 3,200, 1: 14,000, 1: 28,000 ด้วย PBS) ในจานที่เคลือบด้วยแอนติเจน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เทของเหลวออก แล้วล้าง 3 ครั้งด้วย Wash Solution (0.01M PBS with 0.1% Tween 20) เติม Mouse Monoclonal Anti-Seabass Immunoglobulin (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทของเหลวออกแล้วล้าง 3 ครั้ง ใน Wash Solution เติม 100 ไมโครลิตร Goat Anti Mouse เจือจาง 1: 1,000 Immunoglobulin ที่เชื่อม (Conjugate) ด้วยเอนไซม์

HRP (Horseradish Peroxidase) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง และล้าง 3 ครั้งด้วย Wash Solution เติม 1 เปอร์เซ็นต์ Chromagen [0.001 กรัมของ O-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) ใน 100 ไมโครลิตร ของ Citrate Buffer, pH 4.5, 0.006% H_2O_2] 100 มิลลิลิตร ปฏิกริยาจะถูกสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีจากใสเป็นสีเหลือง หลังจากนั้น 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1N H_2SO_4 , 100 ไมโครลิตร นำ Plate ไปอ่านค่า OD (Optical Density) ด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ ความยาวคลื่น 490 nm

8. การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลากระพงขาวภายหลังได้รับวัคซีนชนิดต่าง ๆ

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลากระพงขาวจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวัคซีนกลุ่มละ 10 ตัว ในทุกสัปดาห์ แล้วเติมเลือด 20 ไมโครลิตร ในสไลด์ย้อมเม็ดเลือด (Natt-Herrick's Stain) ประมาณ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที หยดลงบน Hemacytometer แล้วนำไปนับจำนวนเม็ดเลือด โดยนับด้วยเลนส์ 10X ในช่องเม็ดเลือดขาว ทั้งสองข้าง

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาว} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือด}}{\text{พื้นที่นับ}} \times 2000 \text{ Cell} / \mu\text{l}$$

8

9. การทดสอบความจำเพาะระหว่างแอนติซีรัมปลากระพงขาวต่อวัคซีนที่ได้รับด้วย

เทคนิค Western Blot

แยกมวล์โมเลกุลของ OMP และ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* โดยวิธี SDS-PAGE ดังนี้ ตัดกระดาษในโตรเซลลูโลส ประกับกับแผ่นเจลและฟองน้ำทั้งด้านบนและล่าง วางชุดที่ประกับบนเครื่อง Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell จากนั้นเติม Transfer Buffer ครบเวลาถอดชุดอุปกรณ์ แล้วนำแผ่น ในโตรเซลลูโลส ออกมาแช่น้ำนม (5 % Dry Milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าช้า ๆ ครบเวลานำแผ่นในโตรเซลลูโลส วางบนเครื่อง Multi Screen Protein เติมแอนติซีรัมของปลากระพงขาวต่อ OMP และ Whole Cell ของเชื้อ *V. vulnificus* ซึ่งเจือจาง 1: 10 ในสารละลายนม 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง ล้างด้วย TTBS (ภาคผนวก) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เขย่าแรง ๆ จากนั้นนำแผ่นในโตรเซลลูโลส บ่มใน Mouse Monoclonal Anti Sea Bass Immunoglobulin (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ศุภลักษณ์ พุฒินาวรัตน์ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง) เขย่าช้า ๆ 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้าง กระดาษ Nitrocellulose Membrane อีก 3 ครั้ง ด้วย TTBS แล้วแช่แผ่นในโตรเซลลูโลสใน Goat Anti Mouse Immunoglobulin ที่เชื่อม (Conjugate) ด้วยเอนไซม์ HRP (Horseradish Peroxidase) เจือจาง 1: 1000 ครบเวลาล้าง 3 ครั้ง ด้วย TTBS จากนั้นนำแผ่นในโตรเซลลูโลส แช่ใน Substrate (DAB 7 มิลลิกรัม+ $CoCl_2$ +PBS) เพื่อให้เกิดสี อ่านผลของแถบสีน้ำเงินที่ปรากฏเปรียบเทียบกับมวล์โมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน