สำนักหอสมุด มหาวิ... บูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN HORN SHELL (*Cerithium* sp.) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION

เบญจา สุทธาโร
BENJA SUTTARO

2551
1648

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางทะเล
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN HORN SHELL (*Cerithium* sp.) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION
โดย	นางสาวเบญจา สุทธาโร
คณะ	เทคโนโลยีทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ มลฤดี สนธิ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วิจิตรา โหรานรือง

คณะเทคโนโลยีทางทะเลได้พิจารณาปัญหาพิเศษฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางทะเลของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....ผู้รักษาการแทนคณบดีคณะเทคโนโลยีทางทะเล

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณี เทอดเทพพิทักษ์)

คณะกรรมการตรวจสอบปัญหาพิเศษ

.....ประธาน

(อาจารย์มลฤดี สนธิ)

.....กรรมการ

(อาจารย์วิจิตรา โหรานรือง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

ขอบพระคุณ อาจารย์ มลฤดี สนธิ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา พร้อมกับคำแนะนำที่ดี ข้อคิดในเรื่องต่าง ๆ และความใส่ใจห่วงใยที่ดีเสมอมา ตลอดจนสละเวลาในการตรวจทาน และแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ วิจิตรา โหราเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมซึ่งคอยให้ความรู้ คำแนะนำ ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติทุกท่านสำหรับการอบรมสั่งสอน การสนับสนุนด้านการเรียน และคอยเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ซึ่งมีส่วนทำให้การทำปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พิชัย สนแจ้ง อาจารย์วศิน ยุวนะเตมีย์ และคณาจารย์ทุกท่านในมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสารสนเทศจันทบุรีที่คอยอบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำ คำปรึกษาแก่ลูกศิษย์เสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณพัชรี คุณสุเมตน์ และพี่ ๆ ที่คุ้งกระเบนทุกท่านที่ให้ความรู้ และให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุดทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และให้ข้อเสนอแนะที่ดีในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอบคุณ เพื่อน ๆ คณะเทคโนโลยีรุ่น 4 ทุกคน รวมทั้งท่านอื่น ๆ ที่มิได้เอ่ยนามในที่นี้ที่มีส่วนช่วยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

เบญจา สุทธาโร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47330865: สาขาวิชา: เทคโนโลยีทางทะเล; วท.บ. (เทคโนโลยีทางทะเล)
คำสำคัญ: ไวรัสตัวแดงดวงขาว/ หอยเจดีย์/ เทคนิคพีซีอาร์

เบญจา สุทธาโร: การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus,WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) (DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN HORN SHELL (*Cerithium* sp.) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION): อาจารย์ที่ปรึกษา: มลฤดี สนธิ, วท.ม., อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: วิจิตรา โหราเรือง, วท.ม., 42 หน้า. พ.ศ. 2550.

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์จากบ่อเลี้ยงกุ้ง จำนวน 6 หมู่บ้าน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์หมู่บ้านละ 45 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างหอยเจดีย์ออกเป็น 9 ชุด ชุดละ 5 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างหอยเจดีย์ที่เก็บจากตำบลคลองขุดทั้งหมด 270 ตัวอย่าง นำหอยเจดีย์มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Lysis buffer แบบ salt extraction ให้ได้ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.5-2.0 และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ชุดทดสอบ Ezee Gene ของ Shrimp Biotechnology Business Unit

ผลการศึกษาพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งของตำบลคลองขุดทั้งหมด 31.48 % (85/270) หมู่บ้านที่พบการระบาดมากที่สุดคือ หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง 66.67 % (30/45) รองลงมาคือหมู่ 4 บ้านหมูดุด 55.56 % (25/45) หมู่ 1 บ้านสัตบุตร 33.33 % (15/45) และหมู่ 9 บ้านคลองขุดบน 33.33 % (15/45) ตามลำดับ ส่วนหมู่ 3 บ้านเนินประดู่ และหมู่ 8 บ้านอัมพวา ไม่พบการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุด ซึ่งกล่าวได้ว่าหอยเจดีย์สามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้ง ดังนั้นเกษตรกรควรมีการเฝ้าระวัง และคอยกำจัดหอยเจดีย์ที่เกิดขึ้นภายในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47330865: MAJOR: MARINE TECHNOLOGY; B.Sc. (MARINE TECHNOLOGY)

KEYWORDS: WHITE SPOT SYNDROME VIRUS, HORN SHELL, POLYMERASE CHAIN REACTION

BENJA SUTTARO: DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN HORN SHELL (*Cerithium* sp.) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION. SPECIAL PROBLEM ADVISOR: MOLRUEDEE SONTHI, M.Sc., SPECIAL PROBLEM CO-ADVISOR: WIJITRA HORARUANG, M.Sc. 42 PAGES. 2007.

Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in horn shell (*Cerithium* sp.) that found in shrimp farm at Chlongkud area, Thamai, Chanthaburi Province. Two hundred and seventy horn shells from six villages were detected to carry out in this study. Each of village was collected in 45 horn shells and grouped in subsamples of 5 organisms. Tissue from all horn shell of each subsample was pooled in a single tube for DNA extraction. PCR analysis was done per group using WSSV 232 IC single step PCR-ready to use kit belongs to Shrimp Biotechnology Business Unit (SBBU), Biotec.

Results showed that the presence of WSSV in all horn shells at Klongkud area had detected positive at 31.48% (85/270). Moo.10, Chlongkud Lang had the highest WSSV outbreak (66.67%) and Moo.4, Mo Dud (55.56%), Moo.1, Suthabut (33.33%), Moo.9, Klongkud Bon (33.33%), respectively. No WSSV presence in horn shells at Moo.3, Naonpradu and Moo.8, Ban Umpava. From the results, detection WSSV positive in horn shells at Klongkud area is revealed that they can be carrier WSSV and might be possible transmission this virus into cultured shrimps. Hence, the monitoring WSSV outbreak in this area is very importance.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย..... 3

แผนการดำเนินงาน..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

หอยเจดีย์..... 4

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว..... 7

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง..... 10

เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน..... 11

เจลอิเล็กโตรโฟรีสิสของดีเอ็นเอ..... 13

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว..... 16

ตำบลคลองขุด..... 16

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 17

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 19

วัสดุและอุปกรณ์..... 19

สารเคมี..... 20

วิธีการทดลอง..... 21

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	การวิเคราะห์ผลการวิจัย	25
	ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์	25
5	อภิปรายและสรุปผล	28
	อภิปรายผลการทดลอง	28
	สรุปผลการทดลอง	31
	ข้อเสนอแนะ	31
บรรณานุกรม		32
ภาคผนวก		35
	ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	36
	ภาคผนวก ข ภาพประกอบการศึกษา	39
ประวัติย่อของผู้วิจัย		42

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3-1 แสดงส่วนประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม..... 23

4-1 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์..... 25

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะของหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.)..... 4

2-2 ลักษณะดวงขาวใต้เปลือกของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว..... 8

2-3 อวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาว..... 9

3-1 ภาพแสดงรูปแบบการเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์..... 21

4-1 รูปแบบดีเอ็นเอเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของหอยเจดีย์..... 27

5-1 แผนที่แสดงพื้นที่ที่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุด..... 30

ข-1 หอยเจดีย์ที่อาศัยในพื้นบ่อที่มีกุ้งที่ตายด้วยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว..... 40

ข-2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermo cycler (รุ่น PX2 Thermal)..... 40

ข-3 เครื่อง UV transilluminator (Spectroline) (รุ่น Dolphin Series Gel Image V.1)..... 41

ข-4 เครื่อง gel electrophoresis..... 41

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จังหวัดจันทบุรีเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นอันดับต้น ๆ ในเขตภาคตะวันออก โดยเฉพาะบริเวณตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ มีเกษตรกรประกอบอาชีพเลี้ยงกุ้งมากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่ สนิท กิจชล (2550) กล่าวว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำบริเวณตำบลคลองขุดเริ่มครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2529 การเพาะเลี้ยงในช่วงแรกได้มีการบุกรุกพื้นที่ป่าชายเลนเพื่อเปิดบ่อใหม่จำนวนมาก เกษตรกรได้รับผลกำไรจากการประกอบอาชีพมาก ส่งผลให้รูปแบบการเลี้ยงกุ้งเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจากที่เคยเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ความหนาแน่นน้อย เปลี่ยนมาเป็นเลี้ยงในระบบที่มีความหนาแน่นมาก หรือแบบกึ่งพัฒนาเพื่อหวังผลกำไรมากขึ้น ซึ่งสาเหตุดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบต่อความสมดุลของสภาพแวดล้อม และการแพร่ระบาดของเชื้อโรคเพิ่มมากขึ้น เช่นโรคที่เกิดจากโปรโตซัว เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัส เป็นต้น แต่โรคที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเริ่มมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวครั้งแรกเมื่อประมาณเดือนตุลาคม พ.ศ. 2537 การระบาดเกิดขึ้นอย่างรุนแรง และรวดเร็วมาก ทั้งยังสามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในกุ้งระยะวัยอ่อน และกุ้งที่โตแล้ว (ปภาศิริ บาร์เนท และคณะ, 2549) เชื้อโรคตัวแดงดวงขาว เป็นเชื้อไวรัสชนิดดีเอ็นเอไวรัส (DNA virus) เมื่อกุ้งได้รับเชื้อโรคกุ้งจะกินอาหารลดลง มีจุดสีขาวใต้เปลือก มีอัตราการตายสูงถึง 80-100 % ในเวลา 1-3 วัน ในปี พ.ศ. 2540 - 2541 มีกลุ่มเกษตรกรหันมาเลี้ยงกุ้งสายพันธุ์ใหม่ที่นำเข้ามาจากประเทศไต้หวัน คือกุ้งขาวแวนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ช่วงแรกการเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไมประสบความสำเร็จ เนื่องจากกุ้งขาวแวนาไม เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และไม่เกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อเกษตรกรบริเวณตำบลคลองขุดเลี้ยงกุ้งขาวแวนาไมมากขึ้น มีการตรวจพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวแวนาไมแต่ไม่แสดงลักษณะอาการของโรคออกมา ปัจจุบันสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งขาวแวนาไม และมีการแสดงอาการของโรค ก่อให้เกิดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวขึ้นในกุ้งขาวแวนาไม นอกจากนี้ ชวาล ประมวลสุข (2550) กล่าวว่าสาเหตุหนึ่งของการเกิดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว มาจากพื้นที่ส่วนใหญ่ที่

ใช้เลี้ยงกุ้งขาวแวนาไมเป็นพื้นที่ที่มีประวัติการติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว จากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาก่อน สาเหตุการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถเกิดได้จากเชื้อที่อยู่ในธรรมชาติ สภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ การติดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ และการติดเชื้อจากพาหะ (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544) จากการสำรวจพื้นที่บ่อเลี้ยงกุ้งในตำบลคลองขุด พบสัตว์หลายชนิดที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อาศัยอยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น ปูแสม กุ้งฝอย และหอยเจดีย์ (จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์, 2542) โดยเฉพาะหอยเจดีย์(*Cerithium* sp.) พบจำนวนมากในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงใกล้กับป่าชายเลน และบริเวณใกล้แหล่งน้ำเค็ม จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสัตว์ที่เป็นพาหะที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งเหล่านี้ อาจก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งได้

หอยเจดีย์ก่อให้เกิดปัญหาต่อการเลี้ยงกุ้งอยู่แล้ว เป็นตัวทำให้ค่าพีเอช และค่าอัลคาไลน์ในน้ำต่ำลง แย่งอาหาร และที่อยู่อาศัยของกุ้ง จากรายงานของจรีพรและกิจการ (2542) สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ได้ แสดงว่าหอยเจดีย์เป็นพาหะนำโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งได้ แต่ตัวมันเองไม่ตาย จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ หรือหอยขี้นกที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งบริเวณเขตตำบลคลองขุด โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า (ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร, 2536) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและสนับสนุนความคิดเกี่ยวกับการพบเชื้อไวรัสตัวแดงวงขาวจากพาหะที่อาศัยอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์หรือหอยขี้นก (*Cerithium* sp.) ที่อยู่ในพื้นที่เพาะเลี้ยงกุ้งในบริเวณเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการปรากฏเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ ซึ่งอาจจะเป็นพาหะตัวหนึ่งในการนำโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่ตัวกุ้ง
3. นำข้อมูลที่ได้นี้ไปพัฒนา และป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยผ่านพาหะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขอบเขตของการวิจัย

สุ่มตัวอย่างหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) จากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งในหมู่บ้านที่เลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (*Cerithium* sp.) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล และห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ อาคารเรียนรวม มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสารสนเทศ จังหวัดจันทบุรี
ระยะเวลาที่ทำการวิจัย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2550 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2551

แผนการดำเนินงาน

ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือน/ปี พ.ศ. 2550						เดือน/ปี พ.ศ. 2551			
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
1. รวบรวมเอกสารที่เกี่ยวข้อง	←	→								
2. เก็บตัวอย่าง			←	→						
3. ตรวจหาเชื้อ WSSV ด้วยเทคนิค PCR					←	→				
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง							←	→		
5. เขียนรายงานผลและจัดทำรูปเล่ม									←	→

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยเจดีย์ (horn shell)

ภาพที่ 2-1 ลักษณะของหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.)

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Phylum Mollusca

Class Gastropoda

Order Mesogastropoda

Family Cerithiidae

Genus *Cerithium* sp.

Sciencetific name: *Cerithium* sp. (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

ลักษณะสำคัญของสัตว์ใน Class Gastropoda (บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์, 2546) Class Gastropoda จัดเป็นคลาสที่ใหญ่ที่สุดใน Phylum Mollusca สมาชิกของสัตว์ในคลาสนี้ ได้แก่ หอยฝาเดียวชนิดต่าง ๆ มีรูปร่างหลายแบบสามารถคืบคลานได้ด้วยแผ่นเท้าที่อยู่ทางด้านล่างของลำตัว ซึ่งมีลักษณะแบน หอยฝาเดียว และหอยดึกดำบรรพ์ส่วนใหญ่มีเปลือก และอวัยวะภายใน (visceral mass) ที่ขด และบิดเป็นเกลียวทางด้านขวามือซึ่งเป็นผลของการบิดตัว (torsion) ของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เปลือก และอวัยวะภายในบรรจุอยู่ด้านในของลำตัว อวัยวะภายในของหอยฝาเดียวส่วนใหญ่เป็นแบบไม่มีสมมาตร (asymmetry) ยกเว้นหอยฝาเดียวพวกดึกดำบรรพ์ที่มีอวัยวะภายในเป็นคู่ เช่น หัวใจ ไต อวัยวะสืบพันธุ์ และเหงือก เป็นต้น การบิดตัว คือการที่ส่วนของเปลือก แมนเทิล และอวัยวะภายในบิดตัวตามแนวราบ หรือแนวส่วนหัว และแผ่นเท้า (head-foot) ของตัวหอย ในทิศทางตามเข็มนาฬิกาเป็นมุม 180° ปกติการบิดตัวจะพบในตัวอ่อนของหอย (บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์, 2540) ตำแหน่งของช่องแมนเทิลของตัวอ่อนหอยอยู่ทางด้านท้ายที่ค่อนมาทางด้านล่างของลำตัว ภายหลังจากการบิดตัวช่องแมนเทิลจะเคลื่อนมาอยู่ทางด้านหน้าที่ค่อนไปทางด้านบนของลำตัว ส่วนเหงือก หัวใจ ไต อวัยวะภายใน จะสลับซ้ายขวา นอกจากนี้เส้นประสาทที่ไปยังอวัยวะภายในก็จะบิดตัวเป็นรูปเลข 8 ตามไปด้วย ผลของการบิดตัวทำให้หอยฝาเดียวมีรูปร่าง และลักษณะที่เหมาะสมในการดำรงชีวิตให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น หอยฝาเดียวจัดจำแนกออกเป็น 3 Subclass (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

ซับคลาสโพรโซแบรงเคีย (subclass prosobranchia)

หอยที่อยู่ในซับคลาสนี้ เป็นหอยฝาเดียวที่เกิดการบิดตัวในระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยสามารถพบได้ทั้งในน้ำจืด และน้ำเค็ม รวมทั้งบนบกด้วย มีช่องแมนเทิลอยู่ทางด้านหน้า พวกที่อาศัยอยู่ในน้ำจืดจะมีเหงือกจำนวน 1-2 อัน อยู่ภายในช่องแมนเทิล ส่วนใหญ่จะมีเปลือก และโอเพอร์คิวลัม (operculum) ปิดปากเปลือก และโดยทั่วไปจะมีเพศแยกกัน ซึ่งหอยเจดีย์ก็จัดอยู่ในซับคลาสนี้

ออร์เดอร์เมโซแกสโทรโพดา (mesograstropoda) เป็นออร์เดอร์ที่ใหญ่ที่สุด มีรูปร่างแตกต่างกันมากที่สุดของซับคลาสโพรโซแบรงเคีย หอยมีหัวใจประกอบด้วยออริเคิล (oricle) หนึ่งอัน มีกล้ามเนื้อหนึ่งอันยึดติดระหว่างเปลือกกับตัวหอย เหงือก และออสเฟรเดียม(osphradium) มีลักษณะจำนวนหนึ่งคล้ายหวี (unipectinate) ระบบประสาทซับซ้อน มีแรดูลาหลายชนิด แต่ที่พบทั่วไปเป็นแบบทีนิโอกลอซซา (taenioglossa) พบเฉพาะไตข้างซ้าย ส่วนไตข้างขวาเปลี่ยนไปเป็นท่อของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยทั่วไปมีเพศแยกกัน เปลือกมักไม่มีร่องไซฟอน (siphonal canal) อาศัยทั่วไปทั้งในน้ำเค็ม น้ำกร่อย น้ำจืด และบนบก

แฟมิลีเซอริทีดี (cerithidae) เปลือกมีลักษณะเป็นรูปกรวยมีหลายเวิร์ล (whorl) ผิวเปลือกไม่เรียบบางชนิดมีสีสันสวยงาม ปากเปลือกมีขนาดเล็กรูปร่างรี และเอียง ร่องไซฟอนมีขนาดสั้น โอเพอร์คิวลัมเป็นมันเงา พบในประเทศเขตร้อน และออสเตรเลีย อาศัยในน้ำเค็ม สะอาด

ซับคลาสโอพิสโทแบรงเคีย (subclass opisthobranchia)

หอยฝาเดียวที่มีเปลือก และช่องแมนเทิลขนาดเล็กมากหรืออาจไม่มี หอยพวกนี้เกิดจากการบิดตัวกลับ (detorsion) ของตัวอ่อนหอย พวกหอยดึกดำบรรพ์ มีโอเพอร์คิวลัม และเปลือกขนาดใหญ่ หอยสามารถหดส่วนหัว และแผ่นเท้ากลับเข้าเปลือกได้ นอกจากนี้ยังมีเหงือกออริเดิล และไตจำนวนหนึ่งอัน ส่วนหัวมีเทนเทเคิล (tentacle) สองคู่ มีสองเพศในตัวเดียวกัน และส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม

ซับคลาสพัลโมนาตา (subclass palmonata)

มีออริเคิล และไตหนึ่งอัน ไม่มีเหงือก ช่องแมนเทิลส่วนใหญ่อยู่ทางด้านขวา เปลี่ยนแปลงเป็นช่องที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ หรือปอด ระบบประสาทประกอบด้วยเส้นประสาทจำนวนมาก และเหมือนกันทั้งสองด้านของลำตัว ส่วนใหญ่จะมีเปลือกแต่ไม่มีโอเพอร์คิวลัม และมีสองเพศในตัวเดียวกัน

ลักษณะรูปร่างทั่วไปของหอยเจดีย์

หอยเจดีย์ หรือหอยขี้นก (*Cerithium* sp.) เป็นหอยเปลือกแข็งที่พบชุกชุมมากในพื้นที่เลี้ยงกุ้งบริเวณก้นอ่าวไทย และทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งในระบบกึ่งพัฒนาอย่างรุนแรง (ลิลา เรืองแป้น และรังสิไชย ทับแก้ว, 2539) หอยเจดีย์เป็นหอยฝาเดียว ลักษณะรูปร่างเป็นเกลียว ปลายด้านบนแหลมคล้ายเจดีย์ มีขนาดโตประมาณ 2 เซนติเมตร แพร่พันธุ์ได้รวดเร็ว เพราะแม่หอยมีปริมาณไข่มากเฉลี่ยถึงตัวละ 40,000 ฟอง อาศัยอยู่ตามโคลนแนวชายฝั่ง โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีความเค็มสูง หอยเจดีย์กินพวกสารอินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก แพลงค์ตอนพืช (phytoplankton) และแบคทีเรียที่อยู่ตามพื้นดินเป็นอาหาร เมื่อเข้ามาในบ่อกุ้งสามารถเพิ่มปริมาณ และเจริญเติบโตเร็วมาก เนื่องจากในบ่อกุ้งมีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ส่งผลต่อคุณภาพน้ำ และการเจริญเติบโตของกุ้งโดยตรง (สุนันท์ ทวยเจริญ และคณะ, 2527)

วงจรชีวิตของหอยเจดีย์

เริ่มตั้งแต่แม่หอยวางไข่มีลักษณะฝักเป็นเส้นสาย และจะเริ่มฟักตัว มีการแบ่งเซลล์อย่างต่อเนื่อง พัฒนาเป็นลำดับดังนี้ ระยะคลีเวจ (cleavage larvae) ใช้เวลาประมาณ 7 ชั่วโมงจะเข้าสู่ระยะแกสตรูลา (gastula larvae) ชั่วโมงที่ 40 เข้าสู่ระยะเวลิเจอร์ (veliger larvae) ซึ่งเป็นระยะตัวอ่อนของหอยใช้เวลาประมาณ 3 วัน ตั้งแต่วางไข่ หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะคืบคลานใช้ระยะเวลาประมาณ 15-20 วัน และจะเข้าสู่ระยะที่สร้างเปลือกสมบูรณ์ความยาวประมาณ 1.45 มิลลิเมตร ใช้เวลาประมาณ 1 เดือนหลังจากวางไข่ โตเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 2 เดือน มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลกระทบของหอยเจดีย์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง (กฤษณา รัตนอาภา, 2540)

1. ปัญหาสีน้ำใส เนื่องจากหอยเจดีย์กินพวกแพลงค์ตอนพืชเป็นอาหาร

2. ปัญหาเรื่องพีเอช และอัลคาไลน์ต่ำ หอยเจดีย์ต้องการแร่ธาตุในการสร้างเปลือกเหมือนกับกุ้ง เพราะเปลือกหอยเจดีย์ประกอบด้วยหินปูน (แคลเซียมคาร์บอเนต) ดังนั้นอัลคาไลน์ในน้ำจะถูกนำไปใช้ในการสร้างเปลือก และการเจริญเติบโตของหอย

3. ปัญหาเรื่องการขาดออกซิเจน สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการหายใจและการเผาผลาญเพื่อการเจริญเติบโต รวมทั้งหอยเจดีย์ด้วย ดังนั้นหากมีหอยเจดีย์จำนวนมากจะทำให้เกิดปัญหาการขาดออกซิเจนได้ โดยเฉพาะในช่วงหัวรุ่ง หรือเช้ามืด

4. ปัญหาของเสีย และก๊าซพิษ หอยเจดีย์มีการกินอาหาร และมีการขับถ่ายของเสียในรูปก๊าซพิษ หรือขับถ่ายของเสียในรูปกรด ซึ่งมีปริมาณไม่มากแต่ก็มีผลทำให้กุ้งเกิดความเครียด

5. เป็นพาหะนำโรคระบาด ทั้งแบคทีเรีย และไวรัส บ่อที่เคยมีประวัติการระบาดของเชื้อโรคอย่างรุนแรงจำเป็นต้องกำจัดหอยเจดีย์ให้หมดก่อนการเพาะเลี้ยงกุ้ง

6. มีผลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตกุ้ง การเจริญเติบโต หรืออัตราการรอดตายของกุ้งในบ่อที่มีหอยเจดีย์จะต่ำกว่าบ่อที่เลี้ยงปกติที่ไม่มีการระบาดของหอยเจดีย์ อาจจะเกี่ยวกับแร่ธาตุหรือการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติน้ำของหอยเจดีย์

7. แย่งอาหาร และพื้นที่อยู่อาศัยของกุ้ง พฤติกรรมของกุ้งกุลาดำ คือจะมีการหมกเลนและหากินบริเวณพื้นบ่อ หากมีหอยมาก กุ้งจะลงไปกินอาหารได้ลำบาก และอาหารบางส่วนยังต้องสูญเสียไปให้หอยเจดีย์ด้วย

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV)

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว เริ่มพบในปี พ.ศ. 2535-2536 ในประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ไทย อินโดนีเซีย และอินเดีย เป็นโรคที่เกิดได้ทุกภูมิภาคในโลก ในประเทศไทยพบการระบาดตอนปลาย พ.ศ. 2537 บริเวณที่เกิดการระบาดรุนแรง คือภาคตะวันออกแถบ จ.จันทบุรี จ.ตราด และภาคใต้ฝั่งตะวันออก จ.นครศรีธรรมราช จ.ปัตตานี ฝั่งตะวันตก จ.ตรัง การระบาดก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่อธุรกิจเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศ เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถพบในกุ้งหลายชนิด ดังนี้ *P. vannamei, P. stylirostris, P. monodon, P. japonicus, P. indicus, P. chinensis* (จิรศักดิ์ ตั้งตรง-ไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลักษณะของโรคตัวแดงดวงขาว

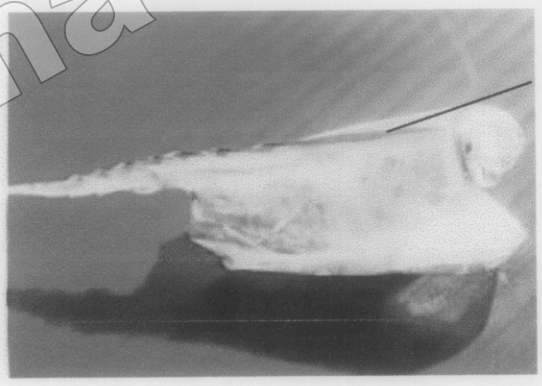
เกิดจากเชื้อไวรัส White Spot Syndrom Virus (WSSV) รูปร่างเชื้อเป็นแท่ง (bacilliform morphology) และมี nucleocapsid ความยาว 270-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 110-125 นาโนเมตร (Hameed et al., 2002) เชื้อไวรัสสามารถทำลาย เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมน้ำเหลืองทำให้นิวเคลียสของเซลล์บวม (ทิม วิลเลียม เฟลเกล, 2544) สภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิดโรคได้ คือมีความเค็ม 29-25 พีพีที อุณหภูมิ และค่าพีเอช เปลี่ยนแปลงมากในรอบวัน คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงไม่ดี และในช่วงรอยต่อฤดูกาล

ลักษณะอาการ

ผิวใต้เปลือกกุ้งตลอดทั้งตัวมีสีแดงเรื่อ ๆ ออกชมพูถึงเข้ม บางครั้งจะพบออกเป็นสีส้ม และพบจุดขาวขนาด 0.1-2 มิลลิเมตร ใต้เปลือกบริเวณส่วนหัว ตัวกุ้งที่เป็นโรคจะว่ายอยู่ผิวน้ำเกยขอบบ่อ อ่อนแอ กินอาหารลดลง ลอกคราบไม่ออก ตัวนิ่ม อัตราการตาย 80-100 % ภายใน 4-5 วัน หลังจากตรวจพบเชื้อ (ชลอ ลิ้มสุวรรณ, 2543)

การป้องกัน

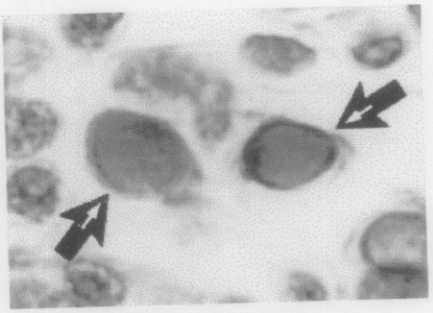
คัดลูกกุ้งที่ปลอดโรคโดยผ่านการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ กำจัดพาหะของโรค เช่น กุ้ง ปู หอย และน้ำที่ใช้ควรผ่านการฆ่าเชื้อ เนื่องจากโรคนี้ยังไม่สามารถรักษาให้หายได้ การป้องกันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด



ภาพที่ 2-2 ลักษณะดวงขาวใต้เปลือกของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว

ที่มา : http://www.kungthai.com/virus.html#sembv วันที่เข้าถึง 06/08/50

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-3 อวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อตัวแดงดวงขาว

ที่มา : http://www.kungthai.com/virus.html#sembv วันที่เข้าถึง 06/08/50

การศึกษาโรคตัวแดงดวงขาว

ลักษณะของเชื้อตัวแดงดวงขาวเป็นดีเอ็นเอไวรัส (DNA virus) เป็นเชื้อโรคที่สามารถอยู่ได้อิสระในระยะเวลาหนึ่ง แต่นานที่สุดไม่เกิน 5 วัน ในขณะที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นานเป็นปี เชื้อราอยู่ได้เป็นเวลานานนับเดือน ดังนั้นเชื้อไวรัสจึงต้องมีพาหะอาศัยเพื่อความอยู่รอด สาเหตุดังกล่าวทำให้ไวรัสที่อยู่อย่างอิสระไม่สามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมได้ เป็นการควบคุมทางธรรมชาติรูปแบบหนึ่ง แต่ข้อเสีย คือการที่ไวรัสเข้าไปอยู่ในเซลล์ลักษณะเช่นนี้ ยาที่ใช้ฆ่าไวรัสต้องเข้าไปทำลายเซลล์เช่นเดียวกัน การค้นพบยาเพื่อใช้ฆ่าไวรัสจึงมีปัญหามาก การรักษาเชื้อไวรัสที่ดีที่สุดคือ การป้องกันโรคโดยใช้วัคซีน

การศึกษาเชื้อไวรัสต้องใช้เนื้อเยื่อในการศึกษา เพาะเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง พอไวรัสเพิ่มปริมาณในระดับหนึ่ง จะทำให้เซลล์แตกและตาย จะเห็นลักษณะวิกาลขึ้นมาในเนื้อเยื่อ การศึกษาไวรัสในกุ้งทำได้ 4 ลักษณะ (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544)

ลักษณะภายนอก

ดูลักษณะทางกายวิภาคได้ แต่ในลักษณะที่กุ้งป่วยไม่แสดงอาการ ทำให้ไม่สามารถทราบได้ การตรวจด้วยวิธีนี้ยังไม่เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

ลักษณะวิกาลของเนื้อเยื่อ

การนำเอาส่วนที่ติดเชื้อโรคมาตัดชิ้นส่วนแล้ววางบนกระจก และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในกรณีนี้ไม่สามารถมองเห็นตัวไวรัส แต่จะเป็นการตรวจดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเมื่อถูกไวรัสเข้าทำลาย วิธีนี้เป็นวิธีที่ยอมรับในบางกรณีที่เนื้อเยื่อเห็นวิกาลได้ชัดเจน แต่ในเชื้อตัวแดงดวงขาวการตรวจด้วยวิธีนี้ไม่เป็นที่ยอมรับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตรวจดูด้วยกล้องอิเล็กตรอน

ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับสถาบันวิจัยเท่านั้น เนื่องจากอุปกรณ์มีราคาแพง และต้องใช้ความชำนาญของเจ้าหน้าที่ จึงไม่เหมาะสมในลักษณะของการตรวจเป็นประจำทุกวัน เพราะกรณีศึกษาตัวอย่างทำได้สูงสุดประมาณ 15 ตัวอย่างต่อวัน

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

เป็นวิธีที่มีความไวสูงในทางทฤษฎี แม้ว่าจะมีสารพันธุกรรมเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เป็นวิธีที่สามารถแจ้งผลได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง และสามารถตรวจหาได้ทีละหลาย ๆ ตัวอย่าง สามารถตรวจหาในสัตว์ได้ทุกขนาด แม่พันธุ์ ตัวเต็มวัย ตัวอ่อน ปัจจุบันเป็นวิธีการเดียวที่องค์การการค้าโลก (WTO) ระบุว่าเป็นวิธีการตรวจสอบการซื้อขายกุ้งระหว่างประเทศ (กุ้งเป็น)

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง

ปัจจัยหลักที่สำคัญที่มีอิทธิพลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และการแพร่ระบาดของโรคในชุมชนมีปัจจัยที่เกี่ยวกับเชื้อโรค สิ่งแวดล้อม และเจ้าบ้าน (ไพบูลย์ โล่สุนทร, 2538)

เชื้อโรค (pathogen)

สิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวได้ในกุ้ง ได้แก่ พวกพาหะต่างๆ เช่น กุ้งฝอย ปูแสม หอยเจดีย์ แมลง นก เป็นต้น หรืออาจเกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีอยู่ในธรรมชาติ

สิ่งแวดล้อม (environment)

เป็นสิ่งที่อยู่รอบ ๆ ตัวของกุ้งมีความสัมพันธ์ และส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของตัวกุ้งโดยตรง เช่น อัตราความหนาแน่นในการเลี้ยงมากเกินไป คุณภาพน้ำต่ำกว่าระดับมาตรฐาน อุณหภูมิต่ำเกินไป สภาพอากาศแปรปรวน ช่วงรอยต่อฤดูกาล เศษอาหารที่ตกค้างในพื้นบ่อ ก่อให้เกิดของเสีย เชื้อโรค และสัตว์ต่าง ๆ ที่เป็นพาหะนำโรคได้ เป็นต้น

กุ้ง (shrimp)

กุ้งในตระกูล Penaeus หลายชนิดสามารถยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544) การได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวขึ้นอยู่กับการยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของตัวกุ้งเอง ถูกพันธุ์อ่อนแอ ถือเป็นปัจจัยภายในของเจ้าบ้าน (Intrinsic factors) กุ้งสามารถแสดงอาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เมื่อเลี้ยงไปประมาณ 30-40 วัน หรือการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อแม่พันธุ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน (Polymerase chain reaction, PCR)

ประวัติเทคนิคพีซีอาร์

ในปี ค.ศ. 1985 ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ของแบคทีเรีย หรือการโคลน (cloning) เทคนิคดังกล่าวเรียกว่า เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน (Polymerase chain reaction, PCR) โดยเริ่มต้นต้องทราบลำดับเบสของยีน หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณเสียก่อน อาจจะทราบเฉพาะช่วงปลายของยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดก็ได้ จากนั้นสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (primer) 2 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดประกอบด้วยสายนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ (oligonucleotide) โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 18-30 เบส สายเริ่มต้นจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับปลาย 3′ ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองด้าน โดยที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการให้เพิ่มปริมาณไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์มากนัก และไม่ต้องมีปริมาณมาก ก็สามารถทำให้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ (ยุพา ผลโภคและคณะ, 2546)

หลักการพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) เอนไซม์ ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphate, dNTPs) ทั้งสี่ชนิด ไพรเมอร์ (primer) และบัฟเฟอร์ (buffer) ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นต่อเนื่องซ้ำกันหลายรอบเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

(1) ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

(2) ขั้นตอน Anncaling เป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อประสิทธิภาพ และความจำเพาะในการทำพีซีอาร์เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

(3) ขั้นตอน Extension ช่วงเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับความยาว และความเข้มข้นของสายต้นแบบรวมถึงปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำด้วย เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ อุณหภูมิในขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส ใน 1 รอบของปฏิกิริยาถ้าเริ่มต้นมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 1 โมเลกุลจะได้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ 2 โมเลกุล ดังนั้นจำนวนดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR Product) จะมีค่าเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โปรแกรมอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์

ปัจจุบันการทำพีซีอาร์ใช้เครื่องมือเฉพาะที่สามารถเพิ่ม และลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีระบบการทำงานอัตโนมัติ (Thermo cycler) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของเครื่องจะตั้งให้สอดคล้องกับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA replication) ในธรรมชาติ คือเริ่มต้นด้วยอุณหภูมิสูงเพื่อแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส เริ่มต้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ

เจลอิเล็กโตรโฟรีสิสของดีเอ็นเอ

การทำอิเล็กโตรโฟรีสิสโดยใช้เอกาโรส หรือพอลีเอคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gels) เป็นตัวกลาง เป็นวิธีมาตรฐานในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เทคนิคนี้ง่าย รวดเร็ว และมีอำนาจจำแนกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากกันได้ ทั้งยังสามารถใช้ในการตัดสินตำแหน่งดีเอ็นเอภายในเจลได้โดยการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่งเป็นการย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอ สามารถใช้ตรวจสอบแถบ หรือแบนด์ที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพียง 1-10 นาโนกรัม ได้ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถนำแถบ หรือแบนด์ดีเอ็นเอออกมาจากเจลนำไปใช้ประโยชน์ในการโคลนนิงต่าง ๆ ได้

เอกาโรส หรือพอลีเอคริลาไมด์เจล เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Polymerization reaction) โครงสร้างของเจลจะมีลักษณะเป็นรูพรุนของตาข่ายร่างแหเจล เมื่อนำมาใช้เป็นตัวกลางในสนามไฟฟ้าทำให้มีคุณสมบัติในการแยกดีเอ็นเอตามขนาด โดยไม่ขึ้นกับส่วนประกอบของเบสในดีเอ็นเอ ความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragment) ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเจล ยิ่งเจลมีความเข้มข้นสูงขนาดของรูพรุนก็จะยิ่งมีขนาดเล็ก โมเลกุลดีเอ็นเอ ที่เคลื่อนที่ผ่านเจลไปได้ก็จะต้องมีขนาดเล็ก ดังนั้นการใช้เจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะต่อการใช้แยกดีเอ็นเอ ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ในสนามไฟฟ้าของการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีสิสขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการมีประจุลบของดีเอ็นเอ ทำให้สามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจากตำแหน่งที่มีขั้วลบ ผ่านเจลที่เป็นตัวกลางไปยังขั้วบวก ความเร็วในการเคลื่อนที่บนเจลตัวกลางขึ้นกับขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางแตกต่างกันบนตัวกลาง ทำให้สามารถแยกดีเอ็นเอได้

เอกาโรสเจลมีอำนาจจำแนกต่ำกว่าพอลีเอคริลาไมด์เจล แต่มีช่วงในการจำแนกที่สูงกว่า ในกรณีที่ดีเอ็นเอมีขนาดความยาวจาก 200 คู่เบส ถึงประมาณ 50 คู่เบส สามารถแยกออกจากกันได้

จากเอกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เอกาโรสเจลรันในแนวนอนในสนามไฟฟ้าที่มีความเข้ม และทิศทางคงที่ (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

เอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส

เอกาโรสสกัดมาจากสาหร่ายทะเลเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้น เอกาโรสที่มีขายทางการค้าไม่มีความบริสุทธิ์ที่แท้จริง มีการปนเปื้อนด้วย พอลิแซ็กคาไลด์อื่น ๆ เกลือ และโปรตีน ปริมาณการปนเปื้อนส่งผลต่อดีเอ็นเอที่แยกออกมา ในปัจจุบันผู้ผลิตส่วนใหญ่มีการเตรียมเอกาโรสคุณภาพพิเศษซึ่งได้คัดมาเพื่อลดการมีอินฮิบิเตอร์ (inhibitors) และนิวคลีเอส (nuclease) เพื่อลดพื้นหลังหรือแบกกราวด์ (background) ของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลังจากการย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ เอกาโรสที่เจลมีอุณหภูมิต่ำ (low-gelling-temperature agarose) สามารถนำมาวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กมากประมาณ 10-500 คู่เบส เอกาโรสเจลเริ่มต้นโดยการหลอมเอกาโรสในบัฟเฟอร์ที่ต้องการจนกระทั่งได้สารละลายใส โปร่งแสง สารละลายที่หลอมเหลวนี้ ถูกเทลงในเบ้า และปล่อยให้เจลแข็งตัว เมื่อแข็งตัว เอกาโรสจะก่อรูปเป็นแมทริกซ์ (matrix) ความเข้มข้นของเอกาโรส เป็นตัวตัดสินความหนาแน่นของแมกทริกซ์ เมื่อทำให้เกิดสนามไฟฟ้าตลอดเจล ดีเอ็นเอที่มีประจุลบที่พีเอชเป็นกลาง เคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก หรือแอโนด (anode) มีพารามิเตอร์จำนวนหนึ่งเป็นตัวตัดสินอัตราการเคลื่อนที่ (อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเอกาโรสเจล

ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเอกาโรสเจลได้แก่ ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของเอกาโรสเจล โครงแบบของดีเอ็นเอ (conformation) ความต่างศักย์ที่ใช้ (applied voltage) องค์ประกอบของเบส และอุณหภูมิ สีย้อมที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอ องค์ประกอบของอิเล็กโตรโฟรีสิสบัฟเฟอร์

ขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอ ที่เป็นสายคู่เส้นตรง (linear double stranded DNA) เคลื่อนที่ผ่านเจลเมทริกซ์ (gel matrices) ด้วยอัตราที่เป็นส่วนผกผันกับ $\log_{10}$ ของจำนวนคู่เบส โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ไปได้ช้าเพราะมีแรงเสียดทานที่สูงกว่า และเคลื่อนที่ผ่านรูของเจลได้มีประสิทธิภาพน้อยกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า ความเข้มข้นของเอกาโรสส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเส้นตรง ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ อัตราการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเส้นตรงเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ที่ใช้ ในขณะที่ความเข้มของสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้น การเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นขณะที่ความต่างศักย์เพิ่มขึ้น ขอบเขตการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอในเอกาโรสเจลลดลง เพื่อให้อำนาจแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 กิโลเบส จะต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าในการทำ

เจลอิเล็กโตรโฟรีสิสไม่เกิน 5 โวลต์/ซม. องค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ และอุณหภูมิไม่ส่งผลกระทบต่อการทำอิเล็กโตรโฟรีสิสของดีเอ็นเอในเอกาโรสเจล โดยทั่วไปจะทำที่อุณหภูมิห้อง สีย้อมเอทิเดียมโบรไมด์เป็นสีฟลูออเรสเซนต์ที่แทรกเข้าไปในดีเอ็นเอจะไปลดการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงในอิเล็กโตรโฟรีสิสลง 15 % สีย้อมแทรกเข้าไประหว่างชั้นคู่เบส ทำให้โมเลกุลดีเอ็นเอเส้นตรง และโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นวงมีความยาวเพิ่มขึ้น เอทิเดียมโบรไมด์ เป็นสารก่อมะเร็ง ควรปฏิบัติงานด้วยความระมัดระวัง

องค์ประกอบ และความเข้มข้นของไอออนของอิเล็กโตรโฟรีสิสบัฟเฟอร์ ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอิเล็กโตรโฟรีสิส ในกรณีที่ไม่มีไอออนการนำไฟฟ้าต่ำสุด และดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้ามาก ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มไอออนสูง บัฟเฟอร์เหล่านี้ประกอบด้วย EDTA พีเอช 8 กับ ทริสแอซิเตต (Tris-acetate, TAE) ทริสบอเรต (Tris-borate, TBE) หรือทรีสฟอสเฟต (Tris-phosphate, TPE) จากประวัติศาสตร์ทริสแอซิเตตเป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนใหญ่ แต่ความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ค่อนข้างต่ำ มีแนวโน้มเหือดแห้งเมื่อเพิ่มเวลาในการรันเจล ต้องเติมบัฟเฟอร์เพิ่ม หรือทำให้บัฟเฟอร์หมุนเวียน ที่ขั้วบวก หรือแอโนด ขั้วลบ หรือแคโทด ตลอดระยะเวลาในการทำอิเล็กโตรโฟรีสิส ทริสบอเรตมีราคาแพงกว่า ทริสแอซิเตตเล็กน้อย แต่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์สูงกว่า รับกระแสไฟได้เร็วกว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเชิงเส้นสายคู่เคลื่อนที่ผ่านทริสแอซิเตตได้เร็วกว่าเคลื่อนที่ในทริสบอเรต และทรีสฟอสเฟต 10 % แต่อำนาจการจำแนกของระบบเหล่านี้เหมือนกัน (อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

เครื่องมือที่ใช้สำหรับเอกาโรสอิเล็กโตรโฟรีสิส

โครงแบบโดยทั่วไปเป็นแผ่นเจลที่อยู่ในแนวนอนซึ่งประดิษฐ์ขึ้นโดย วอล์เตอร์ แชฟเนอร์ (Walter Schaffner) ข้อดี คือสามารถใช้เอกาโรสความเข้มข้นต่ำได้เพราะมีตัวค้ำจุนอยู่ใต้เจล สามารถหล่อเจลให้มีขนาดต่าง ๆ ได้ และง่ายต่อการใส่ตัวอย่าง เทเจลแผ่นหนาบนแผ่นแก้วหรือถาดพลาสติกที่ตั้งอยู่บนแท่นในถังอิเล็กโตรโฟรีสิส (electrophoresis tank) อิเล็กโตรโฟรีสิสดำเนินไป โดยที่เจลแช่อยู่ได้บัฟเฟอร์ ความต้านทานของเจลต่อการไหลผ่านของกระแสไฟฟ้าเกือบเท่ากับความต้านทานของบัฟเฟอร์ ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการซื้อถังอิเล็กโตรโฟรีสิส คือจะต้องง่ายต่อการตรวจสอบเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ในระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟรีสิส ควรมีฝาปิดเพื่อป้องกันการเชื่อมต่อของกระแสไฟฟ้า ควรมีช่องเสียบสายไฟอยู่ทางด้านนอกเพื่อสามารถทำให้เทบัฟเฟอร์ออกได้ง่าย และหมด ควรออกแบบช่องเสียบสายไฟเพื่อยอมให้บัฟเฟอร์มีการหมุนเวียนในระหว่างช่องที่เป็นขั้วบวก และขั้วลบ (อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว

การตรวจวินิจฉัยมีหลายวิธี โดยแต่ละวิธีมีความไวแตกต่างกัน สำหรับเทคนิคพีซีอาร์เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในหลอดทดลอง โดยใช้หลักการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงอย่างรวดเร็วของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (thermo cycler) และการทำงานของสารประกอบตั้งต้นต่าง ๆ ในหลอดทดลอง อันได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบของไวรัส ดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ เบสทั้ง 4 ชนิด เอนไซม์ ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส แมกนีเซียมคลอไรด์ บัฟเฟอร์ และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผลิตผลของพีซีอาร์ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส (gel electrophoresis) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ ผลิตผลของพีซีอาร์ที่ได้กับขนาดดีเอ็นเอของไวรัสในตำแหน่งที่จำเพาะกับการเข้าจับของไพรเมอร์ เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะต่อเชื้อโรคสูง มีความแม่นยำ สามารถตรวจพบไวรัสแม้เพียงปริมาณเล็กน้อย (Kiatpathomchai et al., 2005) สำหรับประเทศไทยวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การวินิจฉัยโรคที่กรมประมงตรวจใช้ในห้องปฏิบัติการ และใช้ในงานวิจัยโดยทั่วไป คือการตรวจด้วยเทคนิค single step PCR และให้ ผลิตผลของพีซีอาร์ขนาด 232 คู่เบส ของเชื้อไวรัสซึ่งวิธีการนี้เริ่มใช้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 ประมาณ 1 ปีหลังจากการตรวจพบการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (ปกาศิริ บาร์เนท และคณะ, 2549) แต่ข้อจำกัดของเทคนิคพีซีอาร์ คือผู้ตรวจต้องผ่านการฝึกอบรมและมีความชำนาญในการตรวจอย่างมาก มีค่าใช้จ่ายสูง ต้นทุนการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อหนึ่งตัวอย่างคิดเป็นเงินประมาณ 200 บาท รวมทั้งอาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) เนื่องจากมีการปนเปื้อนของไวรัสจาก positive control หรือในระหว่างตัวอย่างด้วยกันเอง และอาจเกิดผลลบเทียม (false negative) คือตรวจไม่พบเชื้อเนื่องจากดีเอ็นเอของไวรัสถูกย่อยจากเอนไซม์ในขบวนการสกัด

ตำบลคลองขุด

ตำบลคลองขุดอยู่ในอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งอยู่ทางภาคตะวันออกของประเทศไทย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ของตำบลคลองขุด มีภูเขาตลอดแนว และพื้นที่ส่วนใหญ่ติดกับลำคลองหรือทะเล มีหมู่บ้านทั้งหมด 10 หมู่ดังนี้ หมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 2 บ้านนอกเขา หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ หมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 5 บ้านเจ้าหลาว หมู่ 6 บ้านเจ้าหลาวหัวแหลม หมู่ 7 บ้านคุ้งกระเบน หมู่ 8 บ้านอัมพวา หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง

พื้นที่ส่วนใหญ่อยู่ติดกับป่าชายเลน ประชากรส่วนใหญ่ทำอาชีพเกษตรกรทั้งเลี้ยงสัตว์น้ำและเพาะปลูก มีหมู่บ้านที่ประกอบอาชีพเลี้ยงกุ้ง 8 หมู่บ้านดังนี้ หมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ หมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 6 บ้านเจ้าหลาวหัวแหลม หมู่ 7 บ้านคุ้งกระเบน หมู่ 8 บ้านอัมพวา

หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่างในปี พ.ศ. 2550 มีจำนวนหมู่บ้านที่ประกอบอาชีพเลี้ยงกุ้งอยู่ 6 หมู่บ้าน คือ หมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ หมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 8 บ้านอัมพวา หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง สาเหตุที่ หมู่ 6 บ้านเจ้าหลาวหัวแหลม เลิกประกอบอาชีพเลี้ยงกุ้งเนื่องจากเปลี่ยนไปประกอบธุรกิจการทำรีสอร์ทซึ่งมีผลกำไรมาก และไม่เสี่ยงต่อการขาดทุนเหมือนอาชีพเลี้ยงกุ้ง ส่วนสาเหตุที่ หมู่ 7 บ้านคุ้งกระเบน เลิกประกอบอาชีพเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากเกิดปัญหาโรคระบาดในกุ้งติดต่อกัน ทำให้ไม่มีทุนในการเลี้ยงกุ้ง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์ (2542) ศึกษาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพาหะนำเชื้อ และสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติจำพวกกุ้ง หอย ปู ปลา เพรียง สัตว์หน้าดิน และแพลงก์ตอน บริเวณฟาร์มเลี้ยงกุ้งแถบชายฝั่งตะวันออก และตะวันตกของภาคใต้ของประเทศ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ผลการศึกษาตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงขาวในกุ้ง เช่น กุ้งเคย (*Acetes* sp.) และ *Euphausia* sp. กุ้งดีด (*Alpleus euphrosyne*) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) ปู 2 ชนิด คือ ปูแสม (*Sesarma merderi*) และ ปูเสฉวน (*Eupaqurus bernberdus*) ปลา 3 ชนิด คือปลาหัวตะกั่ว (*Aplocheilus panchax*) ปลาตีน (*Periophthalmus* sp.) และปลาปู่แคระ (*Gnathogobius aliceae*) หอยขี้นก (Family Cerithidae) เบนโตส (polychaete) และตรวจพบในตัวอย่างแพลงก์ตอนพวก copepods, rotifers, moinas, oscillatoria ตัวอ่อนของสัตว์น้ำบางชนิดรวมอยู่ด้วย ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสตรวจพบไวรัสในตัวอย่างที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำแสดงว่าสิ่งมีชีวิตดังกล่าวสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมาติดต่อสู่กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง

Wang et al. (1998) ได้ทำการทดสอบการติดเชื้อโรคตัวแดงดวงขาว (white spot baculovirus, WSBV) ของสิ่งมีชีวิตในบ่อเลี้ยงกุ้ง และสัตว์ในกลุ่ม decapods ในประเทศไต้หวัน โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความรุนแรงของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมี 2 ชนิด คือชนิดเฉียบพลันที่มีลักษณะการตายอย่างรวดเร็ว ภายใน 2 สัปดาห์ สามารถพบได้ใน *P. monodon* และ *P. japonicus* อีกชนิดหนึ่ง คือชนิดแฝงตัว หรือภาวะเก็บเชื้อ ส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุที่ทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นติดเชื้อได้ พบใน *Macrobrachium* sp., lopters และสัตว์ในกลุ่มปู สาเหตุที่สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมา เป็นไปได้ว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งได้ เนื่องจากไม่พบลักษณะการตายจากอาการจุดขาวในการเพาะเลี้ยงปู และ lopters ในประเทศไต้หวัน และประเทศอื่น ๆ ในภูมิภาคเอเชียที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวระบาดอยู่

Zhang et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพาหะ และการนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในโรติเฟอร์ (*Brachionus urceus*) โดยใช้เทคนิค nested PCR ในประเทศจีน การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองนำเอาโรติเฟอร์ซึ่งเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนมาทำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แล้วนำโรติเฟอร์ที่ได้ ไปให้กุ้งกิน ผลปรากฏว่ากุ้งที่กินโรติเฟอร์ที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่สามารถติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ และมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งที่เป็นชุดควบคุม กล่าวได้ว่าโรติเฟอร์สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกุ้งได้โดยผ่านการกิน และกุ้งแสดงอาการติดเชื้อมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว

Hameed et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยการให้อาหารที่มีชีวิตขนาดเล็กที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยผ่านการกินแก่ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะต่าง ๆ ในระบบการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นตรวจสอบกุ้งระยะวัยอ่อนทุกระยะที่ได้รับอาหารจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่าการให้อาหารสด หรืออาหารที่มีชีวิตที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ในลูกกุ้งทุกระยะ ลูกกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปริมาณมากมีอัตราการตายมากกว่าลูกกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงวดงขาวปริมาณน้อยกว่า กล่าวได้ว่าอัตราการตายของลูกกุ้งขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ลูกกุ้งได้รับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermo cycler (รุ่น PX2 Thermal) (Bio-Active)
- เครื่อง UV transiluminator (Spectroline) (รุ่น Dolphin Series Gel Image V.1)
- เครื่อง gel electrophoresis
- เครื่อง Centrifuge (Sigma)
- ตู้ Larmina flow
- เครื่อง Microwave
- เครื่อง Autoclave
- ตู้ Oven
- Water bath
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- ตู้เย็น
- ตู้แช่แข็ง
- Micropipette ขนาด 0-10 µl, 0-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl
- PCR tube แบบผนังบาง ขนาด 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml
- อุปกรณ์ผ่าตัด
- ที่บดตัวอย่าง
- ถุงมือ
- กระดาษ Parafilm
- eppendorf tube
- Tip ขนาด 0-10, 0-200, 100-1000 µl

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. สารเคมี

- Lysis buffer แบบ salt extraction (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก)
- 75 M Ammonium Acetate
- Isopropanal
- 70% ethanol
- 70% absolute alcohol
- คลอรีน
- น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.1 สารเคมีที่ใช้ในงานพีซีอาร์

ชุด KIT ของ Ezee Gene (Shrimp Biotechnology Business Unit) ประกอบด้วย

1) Master mix
   - 1X PCR bubffer II
   - 1.5 mM $MgCl_2$ solution
   - 0.5 µM WSSV 232-ICF
   - 0.5 µM WSSV 232-ICR
   - 200 µM dNTPs
   - น้ำกลั่นบริสุทธิ์
2) *Taq* DNA polymerase
3) DNA marker ชนิด 100 bp DNA ladder

2.2 สารเคมีที่ใช้ในงานอิเล็กโตรโฟรีสิส

- 1.2% Agarose gel
- 10X TBE buffer pH 8.0
- 1X TBE buffer pH 8.0
- Loading dye
- Ethidium bromide

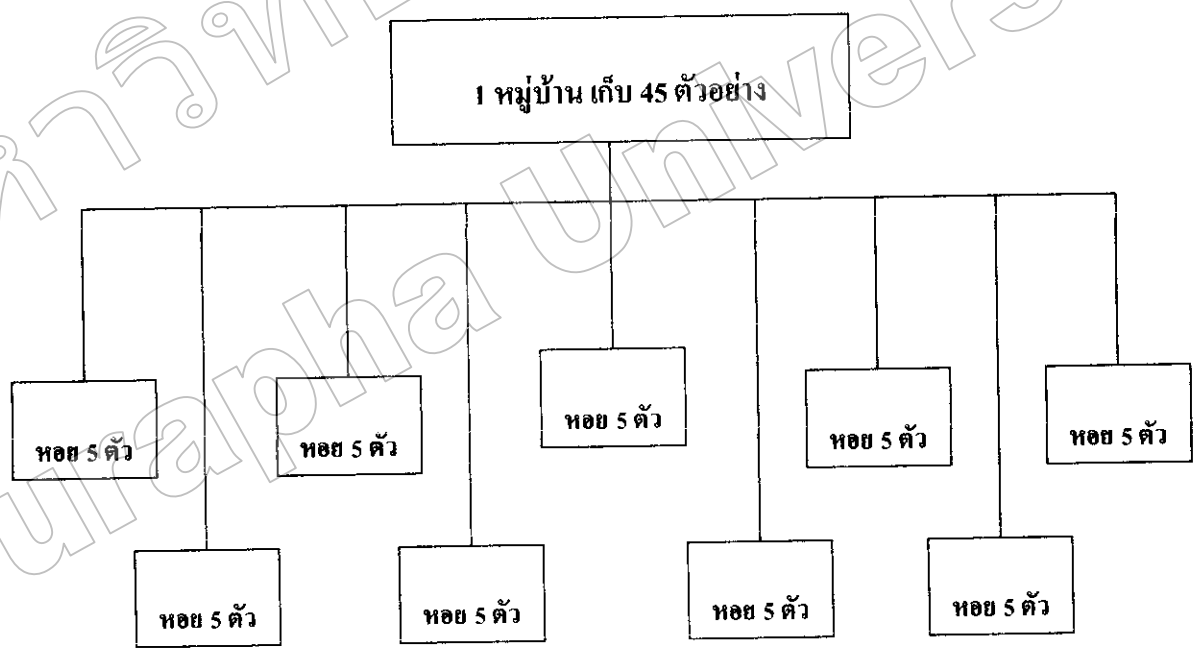
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ในหอยเจดีย์ หรือหอยขึ้นก ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1. การเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 6 หมู่บ้านได้แก่ หมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ หมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 8 บ้านอัมพวา หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน และหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง ในเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนสิงหาคม ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2550โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์หมู่บ้านละ 45 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างหอยเจดีย์ออกเป็น 9 ชุดตัวอย่าง แต่ละชุดตัวอย่างประกอบด้วยหอย 5 ตัว รวมทั้งตำบลคลองขุดใช้ตัวอย่างหอยเจดีย์ทั้งหมด 270 ตัวอย่าง



ภาพที่ 3-1 แสดงรูปแบบการเตรียมตัวอย่างหอยเจดีย์เพื่อการสกัดดีเอ็นเอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อที่อยู่บริเวณปากของตัวอย่างหอย 5 ตัว ของแต่ละซ้ำ มาบดรวมกันเพื่อรวมตัวอย่าง เพื่อให้ได้น้ำหนักของเนื้อหอยรวมกันประมาณ 50 มิลลิกรัม โดยตัดส่วนที่เป็นทางเดินอาหารออกให้หมด

3. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างหอยเจดีย์

นำเนื้อเยื่อหอยที่บดแล้ว 50 มิลลิกรัม มาใส่ในหลอด eppendorf tube ที่มีขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วบดให้ละเอียด บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นเติม Ammonium Acetate 75 โมล ปริมาณ 150 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้น นำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำส่วนที่ใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanal แช่เย็น 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน บ่มที่ -22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส เติม 70% ethanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นซ้ำด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บส่วนที่เป็นตะกอนดีเอ็นเอ ตากทิ้งไว้ข้างหลอดให้แห้งเติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร นำหลอดตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายดีเอ็นเอจากหลอดมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ

$$\text{สูตรคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ} = \frac{\text{ค่า } OD_{260} \times 50 \times \text{dilution factor} \times \text{vol.eluted}}{100}$$

$$\text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} = \text{ค่า } OD_{260} / \text{ค่า} OD_{280}$$

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) โดยดูดสารละลายแต่ละชนิดตามปริมาตรที่กำหนดไว้ตามชุด Ezee Gene KIT ของ Shrimp Biotechnology Business Unit, SBBU ใส่หลอดทดสอบแบบผนังบาง (thin wall) ที่ใช้สำหรับงานพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันดังต่อไปนี้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ตารางที่ 3-1 แสดงส่วนประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ต่อหนึ่งปฏิกิริยา
1. Master mix ประกอบด้วย - 1× PCR buffer II - 1.5 mM $MgCl_2$ solution - 0.5 µM WSSV 232-ICF - 0.5 µM WSSV 232-ICR - 200 µM dNTPs - น้ำกลั่นบริสุทธิ์	44.75 ไมโครลิตร
2. 5 µl Ampli *Taq* DNA Polymerase	0.25 ไมโครลิตร
3. DNA (สกัดได้จากตัวอย่างหอยเจดีย์)*	5.00 ไมโครลิตร
รวม	50.00 ไมโครลิตร

หมายเหตุ * = ดีเอ็นเอมีความเข้มข้น 50-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความบริสุทธิ์ 1.8-2.0

ในการเตรียม reaction mix จะเตรียมส่วนผสมสำหรับ positive และ negative control ด้วยทุกครั้ง positive control เป็นดีเอ็นเอ ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วน negative control คือน้ำกลั่น จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler (รุ่น PX2 Thermal)

โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Pre-denaturation temperature	95 °C	5 นาที	
ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา			
Denaturation	95 °C	30 วินาที	40 รอบ (cycle)
Annealing	60 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	50 วินาที	
Post-extension temperature	72 °C	7 นาที	

1648

จากนั้นแช่หลอดผลิตผลพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ผลิตผลที่ได้ (Analysis of PCR products) ด้วยเทคนิคเอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีสิส (Agarose gel electrophoresis)

1. เตรียม 1.2% (w/v) agarose gel โดยชั่ง agarose 1.2 กรัมผสมใน 1X TBE buffer 100 มิลลิลิตร ต้มจนละลาย ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส

2. เทสารละลาย agarose ลงในถาดที่ใส่ comb ไว้แล้วตั้งทิ้งให้ agarose แข็งตัว ดึง comb ออก นำถาดไปวางไว้ใน electrophoresis chamber เติม 1X TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้า agarose gel ไล่ฟองอากาศที่อยู่ภายในหลุมออกให้หมด

3. ผสม PCR products 10 ไมโครลิตร กับ loading dye 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันบนกระดาษ Parafilm แล้วดูดสารผสม PCR products และ loading dye ลงในหลุม agarose gel โดยใส่ DNA marker ชนิด 100 bp DNA ladder ในหลุมแรก

4. ต่อ electrophoresis chamber เข้ากับ power supply เปิด switch ตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้า 60-80 โวลต์ ให้กระแสไหลผ่าน ประมาณ 40-50 นาที

5. นำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในถาดทึบแสง นาน 5-10 นาที แล้วล้างเจล (destain) ด้วยน้ำกลั่น 30 นาที

6. นำเจลที่ได้มาวางบน UV-transluminator (รุ่น Dolphin Series Gel Image vertion 1.0) เปิดแสงยูวีเพื่อส่องดูแถบของ PCR product เปรียบเทียบกับ positive และ negative control โดยข้อกำหนดผลจากชุดทดสอบ Ezee gene คือ Positive แสดงผล 2 แบบ คือเกิดแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบ ขนาด 122 คู่เบส และ 232 คู่เบส หรือเกิดแถบเดียวขนาด 232 คู่เบส ส่วน Negative แสดงแถบดีเอ็นเอแถบเดียวขนาด 122 คู่เบส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4

การวิเคราะห์ผลการวิจัย

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus,WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.)

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.)ที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุดทั้งหมด 6 หมู่บ้านโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ซึ่งใช้ชุดทดสอบ Ezee Gene ของ Shrimp Biotechnology Business Unit ได้ผลดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.)

ชื่อหมู่บ้าน	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	การปรากฏเชื้อ WSSV (ตัว)		เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ WSSV (%)
		ผลบวก	ผลลบ	
หมู่ 1 บ้านสัตบุตร	45	15	30	33.33
หมู่ 3 บ้านเนินประดู่	45	0	45	0.00
หมู่ 4 บ้านหมูดุด	45	25	20	55.56
หมู่ 8 บ้านอัมพวา	45	0	45	0.00
หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน	45	15	30	33.33
หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง	45	30	15	66.67
รวม	270	85	185	31.48

<u>หมายเหตุ</u> + = ผลบวก (positive) พบ PCR prodroduct ขนาด 232 คู่เบส และ 122 คู่เบส แสดงว่าพบ WSSV

\- = ผลลบ (negative) พบ PCR prodroduct ขนาด 122 คู่เบส แสดงว่าไม่พบ WSSV

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากตารางที่ 4-1 พบว่าหมู่ 1 บ้านสัตบุตร พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปรากฏเชื้อ WSSV เป็น 33.33 %

หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ ไม่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปรากฏเชื้อ WSSV เป็น 00.00 %

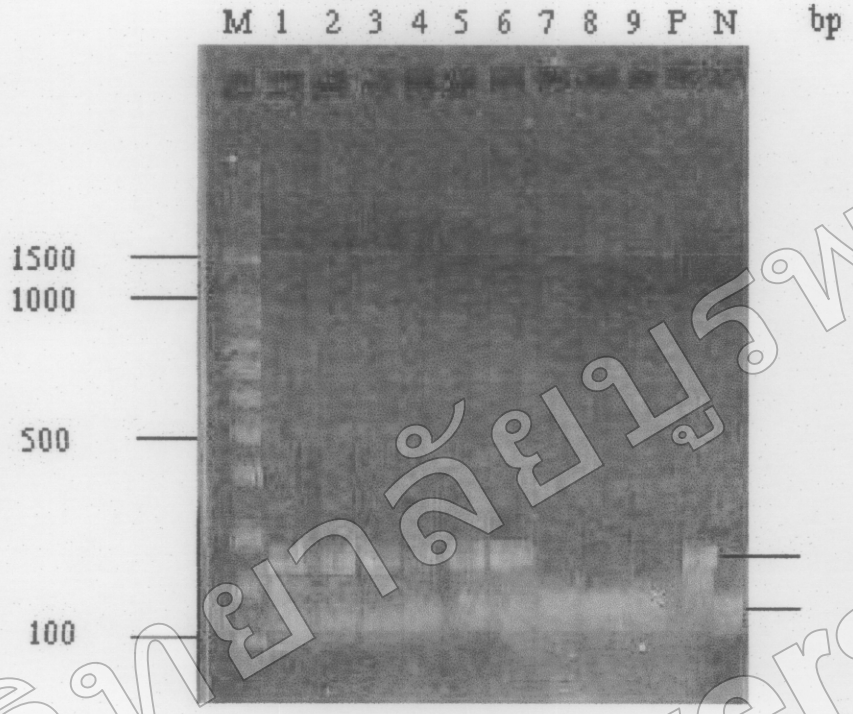
หมู่ 4 บ้านหมูดุด พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปรากฏเชื้อ WSSV เป็น 55.56 %

หมู่ 8 บ้านอัมพวา ไม่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปรากฏเชื้อ WSSV เป็น 00.00 %

หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปรากฏเชื้อ WSSV เป็น 33.33 %

หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การปรากฏเชื้อ WSSV เป็น 66.67 %

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างรูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างพอยแจดีย์ (*Cerithium* sp.) ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ที่แยกดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นเอกาโรส 1.2%

Lane M = DNA marker ชนิด 100 คู่เบส + 1500 คู่เบส

Lane 1-6 = ให้ผลบวก (positive) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 232 คู่เบส และ 122 คู่เบส

Lane 7-9 = ให้ผลลบ (negative) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 122 คู่เบส

Lane P = WSSV positive Control ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 232 คู่เบส และ 122 คู่เบส

Lane N = Negative Control (น้ำกลั่น) ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 122 คู่เบส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการทดลอง

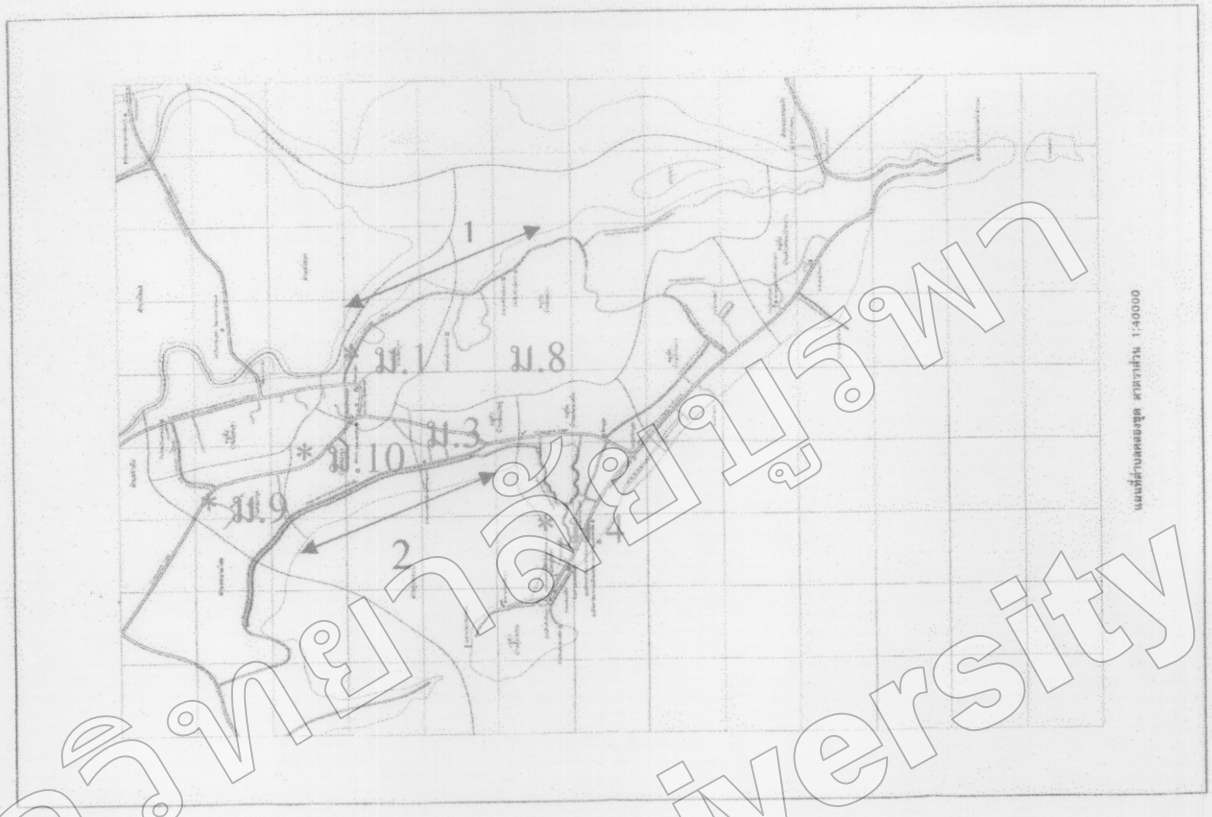
การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในหอยเจดีย์ (*Cerithium* sp.) ที่ได้จากบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ทั้งหมด 85 ตัวอย่าง จากตัวอย่างหอยเจดีย์ 270 ตัวอย่าง คิดเป็น 31.48 % (85/270) ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์ (2542) ที่ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ หรือหอยขี้นก (Family Cerithidae) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างหอยเจดีย์ 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 54.17 % จากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ และบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตพื้นที่ชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกในภาคใต้ของประเทศไทย

จากผลการทดลองพบว่าหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่างพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์มากที่สุด สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากบริเวณพื้นที่ดังกล่าวยังมีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่ และมีการเลี้ยงแบบธรรมชาติมีการถ่ายเทน้ำระหว่างบ่อเลี้ยงกุ้งกับทางน้ำด้านนอกตลอดเวลา อาจทำให้ตัวอ่อนของหอยเจดีย์ที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้ามาสู่บ่อเลี้ยงกุ้งได้มากขึ้น ทั้งนี้ยังพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์บริเวณพื้นที่บ่อเลี้ยงกุ้งในหมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน และหมู่ 1 บ้านสัตบุตร ทำให้พื้นที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่ ที่มีความเสี่ยงต่อการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งโดยผ่านพาหะได้ ส่วนพื้นที่บ่อเลี้ยงกุ้งในหมู่ 3 บ้านเนินประดู่ และหมู่ 8 บ้านอัมพวา ไม่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวเกษตรกรมีการเฝ้าระวัง กำจัดพาหะที่อาศัยอยู่ในบ่อกุ้ง และมีการเลี้ยงแบบระบบปิดในหมู่ 8 บ้านอัมพวา แต่พื้นที่ดังกล่าวอยู่ในภาวะเสี่ยง และสมควรแก่การเฝ้าระวัง คิดตามการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากล้อมรอบด้วยพื้นที่ ที่มีการแพร่ระบาดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ และใช้น้ำจากทางน้ำเดียวกัน (ภาพที่ 5-1) อาจมีการหลุดรอดของตัวอ่อนของหอยเจดีย์หรือพาหะชนิดอื่น ที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่เข้ามาในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ ทั้งนี้พาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่ได้พบในหอยเจดีย์ชนิดเดียวเท่านั้น ยังรวมไปถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เช่น กุ้งเคย ปู ปลา และสัตว์น้ำวัยอ่อนอีกหลายชนิดซึ่งสอดคล้องกับ Lo et al. (1996, 1997) ที่พบ

เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSBV) ในปู กุ้ง และกลุ่มอาร์โทรปอดอื่น ๆ หลายชนิดทั้งที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และบ่อเลี้ยงกุ้งบริเวณชายฝั่งของประเทศไต้หวันซึ่งสามารถเป็นพาหะนำเชื้อติดต่อไปสู่กุ้งในบ่อเลี้ยงได้ รวมทั้งรายงานของ Flegel (2007) ที่ได้ทำการศึกษาการพัฒนาความเป็นพาหะของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง พบว่าเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูง และพบการระบาดอย่างกว้างขวาง ซึ่งมีการถ่ายทอดเชื้อจากกลุ่มสัตว์ ในพวกแมลง และกลุ่มอาร์โทรปอดได้

จากการสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในบริเวณพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ พบว่าหมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน และหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่างพบการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ในบริเวณพื้นที่ดังกล่าว ส่วนหมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ และหมู่ 8 บ้านอัมพวาไม่พบการการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองที่พบว่าหมู่ 1 บ้านสัตบุตรพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ กล่าวได้ว่าพาหะอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งได้ แต่การเกิดโรคไวรัสตัวแดงดวขาวในกุ้งไม่ได้มีปัจจัยที่เกิดจากพาหะเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ยังมีปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ความรุนแรงของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และความอ่อนแอของตัวกุ้งเองรวมอยู่ด้วย

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว การระบาดของโรคก่อให้เกิดความสูญเสียต่อวงการเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศอย่างมาก และยังพบการระบาดอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน การพบพาหะนำเชื้อเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรเพื่อสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในบ่อเลี้ยงกุ้งช่วงต้น ๆ (มนตรี ไชยชาติ, 2546) จากข้อมูลการพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถบอกได้ว่าพื้นที่นั้นมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพาหะได้ เนื่องจากหอยเจดีย์สามารถเก็บเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ดังนั้นเมื่อมีพาหะอยู่ในบ่อเลี้ยงก็สามารถโน้มนำให้เกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งได้มากกว่าบ่อที่ไม่พบพาหะ จากรายงานของพรเลิศ จันทร์รัชชกูล (2539) กล่าวว่าสาเหตุหนึ่งของการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวมาจากพาหะที่เกิดในฟาร์ม ดังนั้น ก่อนปล่อยกุ้งควรกำจัดสัตว์พวกนี้ออกก่อนเตรียมการปล่อยกุ้ง ซึ่งสอดคล้องกับ ทิม วิลเลียม ฟลีเกล (2548) รายงานว่าถ้าจะเลี้ยงกุ้งในบริเวณที่เคยมีการระบาดของโรคตัวแดงดวงดวงขาวมาก่อนนั้น ควรมีการฆ่าพาหะในน้ำ ได้แก่สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติด้วยคลอรีนผง และมีการกำจัดหอยที่อยู่ในบ่อกุ้ง โดยการทยอยเก็บหอยที่อาศัยอยู่ในพื้นบ่อออกให้มากที่สุดก่อนการปล่อยกุ้ง ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการเฝ้าระวังการเกิดพาหะตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงกุ้ง



ภาพที่ 5-1 แผนที่แสดงพื้นที่ที่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์ในบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุด

พื้นที่บ่อเลี้ยงกุ้งหมู่ 3 บ้านเนินประดู่ หมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน และหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง ใช้ทางน้ำจากคลองส่งน้ำจากศูนย์ศึกษาอ่าวคุ้งกระเบน ส่วนพื้นที่บ่อเลี้ยงกุ้งในหมู่ 1 บ้านสัตรบุตร และหมู่ 8 บ้านอัมพวา ใช้ทางน้ำจากเขื่อนวังโตนด เขื่อนโขมง ที่เชื่อมต่อกับปากแม่น้ำแขมหนู

หมายเหตุ * = หมู่บ้านที่พบการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์

1 ↔ = ทางน้ำจากเขื่อนวังโตนด เขื่อนโขมง ที่เชื่อมต่อกับปากแม่น้ำแขมหนู

2 ↔ = ทางน้ำจากคลองส่งน้ำจากศูนย์ศึกษาอ่าวคุ้งกระเบน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สรุปผลการทดลอง

1. หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่างพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์มากที่สุดที่ 66.67 % (30/45)

2. หมู่ 4 บ้านหมูดุดพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์รองลงมาที่ 55.56 % (25/45)

3. หมู่ 1 บ้านสัตบุตร และหมู่บ้านที่ 9 บ้านคลองขุดบนพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์น้อยที่สุดที่ 33.33 % (15/45)

4. หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ และหมู่ที่ 8 บ้านอัมพวาไม่พบของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยเจดีย์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาความสัมพันธ์เกี่ยวกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวในด้านอื่น ๆ เช่น ด้านสิ่งแวดล้อม เชื้อโรค และกุ้ง เพื่อประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง

2. ควรมีการศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในพาหะชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยในบ่อกุ้ง เช่น กุ้งเคย ปลาบู่ ปู เป็นต้น เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการประเมินสาเหตุการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ไปสู่กุ้ง

3. ควรมีการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากหอยเจดีย์ไปสู่ตัวกุ้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บรรณานุกรม

กฤษณา รัตนอาภา. (2540). *ผลกระทบของหอยขี้นก* (*Cerithium* sp. Bruguere) *ต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ* (*Penaeus monodon Fabricius*) *แบบพัฒนาระบบปิด*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 193 หน้า.

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย. (2544). นักวิชาการแนะนำการควบคุมโรคในกุ้งกุลาดำ. *เพื่อนชาวกุ้ง*, 4(36), 55-60.

จิราพร เกษรจันทร์. (2537). *คู่มือปฏิบัติการการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสในกุ้งทะเล ด้วยวิธี PCR และ RT-PCR* . สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง: สำนักงานวิจัยและพัฒนาชายฝั่ง กรมประมง: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 142 หน้า.

จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์. (2542). การตรวจหาดีเอ็นเอไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพาหะเชื้อและสิ่งมีชีวิตธรรมชาติโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส. ใน *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์* ครั้งที่ 37 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2542 กรุงเทพฯ.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, (2543). *กุ้งไทย 2000.* กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์. 260 หน้า.

ชวาล ประมวลสุข, (2550, 18 กันยายน). เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งหมู่ที่ 9 ตำบลคลองขุด. สัมภาษณ์.

ทิม วิลเลียม เฟลเกล. (2544). ข้อมูลล่าสุดโรคตัวแดงดวงขาว. *อินไซด์ กุ้งไทย*, 1(2), 33-36.

ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร, (2536). Thermostable DNA Polymerases. ใน วัชรี และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, *ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology* (หน้า 13). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์เรือนแก้ว.

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. (2540). *สัตววิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 458 หน้า.

บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์. (2546). *สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง II แอนเนลิดา ถึง โพรโทคอร์คาทา*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 434 หน้า.

ปภาศิริ บาร์เนท อมรเทพ โชติช่วง กุลวลา แสงรุ่งเรือง สมพิศ แย้มเกษม และไพศาล สิทธิกรกุล. (2549). *การเปรียบเทียบการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิคทาง PCR และ Immunodot blot*. รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2549 กรมประมงร่วมกับศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ วันที่ 25-27 กรกฎาคม 2549.

พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. (2539). โรคตัวแดงดวงขาว. *สวัสดีกุ้งไทย*, 1(2), 15-18.

ไพบูลย์ โล่สุนทร. (2538). *ระบาดวิทยา*.พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 504 หน้า.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

มนตรี ไชยชาติ. (2546). *การติดเชื้อก่อโรคตัวแดงดวงขาวของลูกกุ้งกุลาดำ และลูกกุ้งขาว.* ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวารินชศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี. 38 หน้า.

ยุพา ผลโภค, สุมิตรา คงชื่นสิน, บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. (2546). *หลักพันธุศาสตร์.* กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสาตร์ฯ. 416 หน้า.

ลิลา เรืองแป้น และรังสิไชย ทับแก้ว. (2539). การทดลองใช้สารเบลูสไซด์กำจัดหอยเจดีย์. *วารสารการประมง, 2*, 163-170.

สนิท กิจชล, (2550, 23 สิงหาคม). เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งหมู่ที่ 4 ตำบลคลองขุด. สัมภาษณ์.

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตาชู, เยาวลักษณ์ จิตรรามวงศ์ และศิริวรรณ จันทเดมีย์. (2538). *สังขวิทยา-Malacology*. กรุงเทพฯ: ศักดิโสภาการพิมพ์. 517 หน้า.

สุนันท์ ทวยเจริญ, ผานิต วรอินทร์ และวรรณา รัตนโกลีย์. (2527). *ผลกระทบของการใช้เบรสแตน-60 ต่อเนื้อเยื่อหอยแครง.* เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2527. กองประมงน้ำกร่อย, กรมประมง.

อากัสสรา ชมิดท์. (2537). *เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส Electrophoresis techniques.* กรุงเทพฯ: รั้วเขียว. 85 หน้า.

อุไรรรณ วิจารณกุล. (2545). *ดีเอ็นเอเทคโนโลยี DNA Technology.* พิษณุโลก: ตระกูลไทย. 313 หน้า.

Flegel, T.W. (2007). Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropod. *BIOTEC Thailand. 31*, 217-231.

Hameed, A.S., Murthi, B.L., Rasheed, M., Sathish, S., Yoganandhan, K., Murugan, V. and Jayaraman, K. (2002). An investigation of artemia as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. *C. Abdul Hakeem College. 204*, 1-10.

Kiatpathomchai, W., Taweetungtragoon, A., Jittivadhana, K., Wongteerasupaya, C., Boonsaeng, V. and Flegel, T.W. (2005). Target for standard Thai PCR assay identical in 12 white spot syndrome virus (WSSV) types that differ in DNA multiple repeat leng*th*. *BIOTEC Thailand.130*, 79-82.

Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, Lui, K.F., Chiu, Y.L., Yeh, Peng, S.E., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome (WSBV) in cap brooder of Penaeus monodon with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org. 30*, 53-72.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, Chou, H.Y., Wang, C.H. and Kou, G.H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penacid shrimps by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org. 20*, 133-141.

Wang, Y.C., Lo, C.F., Chang, P.S. and Kou, G.H. (1998). Experiment infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture. 1641*, 221–231.

Zhang, J.S., Dong, S.L., Tian, X.L., Dong, Y.W., Liu, X.Y. and Yan, D.C. (2006). Studies on the rotifer (Br*achionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture. 261*, 1181–1185.

http://www.kungthai.com/virus.html#sembv (วันที่สืบค้นข้อมูล 8 สิงหาคม 2550).

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียม buffer แบบ salt extraction

1. เตรียม Stock

1 M Tris HCl	100	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	100	มิลลิลิตร
1 % SDS	100	มิลลิลิตร
5 M NaCl	100	มิลลิลิตร

2. ผสมสารดังต่อไปนี้

100 mM Tris HCl	10	มิลลิลิตร
100 mM EDTA	20	มิลลิลิตร
0.5 % SDS	50	มิลลิลิตร
0.2 M NaCl	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 10X TBE Buffer pH 8.0

ชั่ง Trisma base 108 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม Boric acid 55 กรัม ละลายจนหมด และเติม EDTA 0.5 โมล พีเอช 8.0 จำนวน 40 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล นาน 15 นาทีเก็บในอุณหภูมิห้อง

การเตรียม 1X TBE Buffer pH 8.0

ละลาย 10X TBE Buffer พีเอช 8.0 จำนวน 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล นาน 15 นาที 900 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียม 0.5 M EDTA pH 8.0

ชั่ง EDTA 16.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 8.0 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรได้ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล นาน 15 นาทีเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลาย Ethidium bromide

Stock Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา (ป้องกันแสง) เก็บในอุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

ภาพประกอบการศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ข

ภาพประกอบการศึกษา

ภาพที่ ข-1 หอยเจดีย์ที่อาศัยในพื้นบ่อที่มีกุ้งที่ตายด้วยโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว

ภาพที่ ข-2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermo cycler (รุ่น PX2 Thermal)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ ข-3 เครื่อง UV transilluminator (Spectroline) (รุ่นDolphin Series Gel Image vestion 1.0)

ภาพที่ ข-4 เครื่อง gel electrophoresis

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	เบญจา สุทธาโร
วัน เดือน ปี เกิด	12 กุมภาพันธ์ 2529
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลพระปกเกล้า จันทบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	14 ม.8 ต.คลองขุด อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจมราชูทิศ จันทบุรี
พ.ศ. 2543	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเบญจมานุสรณ์ จันทบุรี
พ.ศ. 2550	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) เทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ผลงานการร่วมกิจกรรม	
พ.ศ. 2551	- อบรมบุคลิกภาพ มหาวิทยาลัยบูรพา
พ.ศ. 2550	- ฝึกงานด้านวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี
	- ฝึกงานด้านเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์ เกาะสีชัง ชลบุรี
พ.ศ. 2549	- เข้าค่ายโครงการ Young Thai Science
	- อุปนายกสโมสรคณะเทคโนโลยีทางทะเล
พ.ศ. 2547	- นิสิตวิทยากร ณ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University