สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ ชลบุรี 20131

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในปูแสม (*Sesarma* sp.) บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN MANGROVE CRAB (*Sesarma mederi*) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION

เบ็ญจมาพร เพียรจัด
BENJAMAPORN PIENJAD

12 ม.ค. 2557
1634

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางทะเล
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว(White spot syndrome virus, WSSV) ในปูแสม (*Sesarma* sp.) บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN MANGROVE CRAB (*Sesarma* sp.) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION
โดย	นางสาวเบ็ญจมาพร เพียรจัด
คณะ	เทคโนโลยีทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ มลฤดี สนธิ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วิจิตรา โหราเรือง

คณะเทคโนโลยีทางทะเลได้พิจารณาปัญหาพิเศษฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางทะเลของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....ผู้รักษาการแทนคณบดีคณะเทคโนโลยีทางทะเล

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณี เทอดเทพพิทักษ์)

คณะกรรมการตรวจสอบปัญหาพิเศษ

.....ประธาน

(อาจารย์มลฤดี สนธิ)

.....กรรมการ

(อาจารย์วิจิตรา โหราเรือง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

ขอบพระคุณ อาจารย์ มลฤดี สนธิ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยคำปรึกษา และความช่วยเหลือทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา อาจารย์คอยให้คำแนะนำที่ดีเสมอมา ตลอดจนสละเวลาในการตรวจทาน และแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ วิจิตรา โหราเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมซึ่งคอยให้ความรู้ คำแนะนำ ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พิชัย สนแจ้ง อาจารย์วศิน ยุวนะเตมีย์ และคณาจารย์คณะเทคโนโลยีทางทะเลทุกท่านที่ได้สั่งสอนวิชาความรู้ต่าง ๆ ตลอดจนสิ่งดี ๆ ในการใช้ชีวิตการเป็นนิสิตภายในมหาวิทยาลัยที่เป็นสี่ปีที่ไม่สามารถหาได้จากที่ไหนได้อีก

ขอขอบคุณพี่ ๆ ที่ศูนย์คุ้งกระเบนที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษากับปัญหาที่เกิดขึ้นตลอดการทดลอง

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ ที่ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเลและพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกคนที่คอยช่วยเรื่องอุปกรณ์ สถานที่ และคำแนะนำดี ๆ และให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอบคุณ เบญจา สุทธาโรที่อดทนทำแล็ปร่วมกันมาและเพื่อน ๆ คณะเทคโนโลยีทางทะเลรุ่น 4 ทุกคน ที่ไม่ได้เอ่ยนามแต่ก็ต่างรู้กันใช่ไหมว่าเราต่างผ่านอะไร ๆ มาด้วยกันมากมาย วันเวลาช่วยทำให้เราเติบโตไปด้วยกันได้ดีจริง ๆ

ขอบคุณ พักตร์เพียงเพ็ญ ศศิธร และสุภวิชญ์ แม้กำลังใจจะไม่มีตัวตนแต่ข้าพเจ้าชื่นใจทุกครั้งที่ได้รับ

สุดท้ายขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และน้องชาย แม้ชีวิตจะล้มลุกคลุกคลานสักเพียงใด เมื่อหันหลังกลับไปบุคคลเหล่านี้ไม่เคยทอดทิ้งข้าพเจ้าไปแม้สักครั้งเดียว

เพื่อน ฝ้าย ไม่มีวันไหนไม่คิดถึง

ปิญญาพร เพียรจัด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47330858 : สาขาวิชา: เทคโนโลยีทางทะเล; วท.บ.(เทคโนโลยีทางทะเล)
คำสำคัญ : ปูแสม/ เทคนิคพีซีอาร์/ โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว

เบ็ญจมาพร เพียรจัด : การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในปูแสม (*Sesarma* sp.) บริเวณพื้นที่ตำบลคลองขุด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) อาจารย์ผู้ควบคุมปัญหาพิเศษ: มลฤดี สนธิ, วท.ม., อาจารย์ผู้ควบคุมปัญหาพิเศษร่วม: วิจิตรา โหราเรือง, วท.ม., 37 หน้า. พ.ศ. 2550.

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) ในปูแสม (*Sesarma* sp.) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์(Polymerase Chain Reaction, PCR) ในบริเวณตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรีพบว่าทั้งพื้นที่มีการปรากฏของเชื้อตัวแดงดวงขาวในปูแสม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) เท่ากับ 14.81 % (40/270) โดยพบมากที่สุดคือหมู่ 9 บ้านคลองขุดบน พบว่ามีการปรากฏของเชื้อตัวแดงดวงขาวในปูแสม เท่ากับ 55.55 % (25/45) รองลงมาคือหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง เท่ากับ 22.22 % (10/45) และหมู่ 4 บ้านหมูดุดมีการปรากฏของเชื้อตัวแดงดวงขาว เท่ากับ 11.11 % (5/45) ส่วนหมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่และหมู่ 8 บ้านอัมพวาไม่พบการปรากฏของเชื้อตัวแดงดวงขาว

การปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการทดลองครั้งนี้พบค่อนข้างน้อย (14.81 %) แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่นี้ก็ยังมีความเสี่ยงในการเกิดโรคตัวแดงดวงขาวและควรมีการเฝ้าระวังการถ่ายทอดเชื้อไวรัสชนิดนี้ไปสู่กุ้งในบ่อเลี้ยง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47330858 : MAJOR: MARINE TECHNOLOGY; B.Sc. (MARINE TECHNOLOGY)
KEYWORDS : MANGROVE CRAB/ POLYMERASE CHAIN REACTION/ WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

BENJAMAPORN PIENJAD : DETECTION OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS IN MANGROVE CRAB (*Sesarma* sp.) AT CHLONGKUD AREA USING POLYMERASE CHAIN REACTION. SPECIAL PROBLEM ADVISOR: MOLRUEDEE SONTHI, M.Sc. SPECIAL PROBLEM CO-ADVISOR: WIJITRA HORARUANG, M.Sc. 37 PAGES. 2007.

Studied the outbreaks of white spot syndrome virus (WSSV) in mangrove crab (*Sesarma* sp.) at Chlongkud area, Thamai, Chanthaburi Province using WSSV 232 IC single step PCR-ready to use kit belongs to Shrimp Biotechnology Business Unit (SBBU), Biotec. All mangrove crab could be detected positive at 14.81 % (40/270). Moo.9, Chlongkud Bon had the highest WSSV outbreak (55.55 %) and Moo.10, Chlongkud Lang (22.22 %), Moo.4, Mo Dud (11.11 %), respectively. The mangrove crabs were collected from Moo.1, Suthabut, Moo.3, Naonpradu and Moo.8, Ban Umpava had determined to be WSSV negative. The presence of WSSV in this experiment had slightly positive (14.81 %), however, Clongkud is risk area that should be monitored WSSV transmission from mangrove crab to cultured shimps.

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 2

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย 3

แผนการดำเนินงาน 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

ปูแสม 4

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว 7

เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน 9

ประโยชน์ของ PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรค 11

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

3 วิธีดำเนินการวิจัย 14

วัสดุและอุปกรณ์ 14

สารเคมี 15

วิธีการทดลอง 16

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 การวิเคราะห์ผลการวิจัย	20
ผลการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม	20
5 อภิปรายและสรุปผล	25
อภิปรายผลการทดลอง	25
สรุปผลการทดลอง	26
ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	30
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี	31
ภาคผนวก ข ภาพประกอบการศึกษา	34
ประวัติย่อของผู้วิจัย	37

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 แสดงผลการปรากฏเชื้อตัวแดงดวงขาวของตัวอย่างปูแสม (*Sesarma* sp.)ในแต่ละหมู่บ้านของตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรีด้วยเทคนิคพีซีอาร์..... 20

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะปูแสม (*Sesarma* sp.)	4
2-2	ลักษณะดวงขาวใต้เปลือกของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว	8
2-3	ลักษณะกุ้งวัยอ่อน พี 25 ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว	8
4-1	แสดงตัวอย่างของเจลอิเล็กโตรโฟลิซิสจากตัวอย่างปูแสม (*Sesarma* sp.)	23
4-2	แผนที่แสดงพื้นที่การระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมในบ่อเลี้ยงกุ้งในเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี	24

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จังหวัดจันทบุรีเป็นจังหวัดชายฝั่งทะเลที่มีศักยภาพในการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างสูง เกษตรกรในพื้นที่และนักลงทุนจากแหล่งอื่น ๆ ได้พัฒนาและขยายพื้นที่เลี้ยงกุ้งอย่างรวดเร็วแต่ขาดการวางแผนและการจัดการทรัพยากรธรรมชาติอย่างเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งที่ขยายตัวอย่างรวดเร็วทำให้สภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งการเพาะเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไปทำให้เกิดการสะสมของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กุ้งเกิดโรคระบาดอย่างรวดเร็วอาทิเช่น โรคตัวแดงดวงขาว โรคไวรัสหัวเหลืองและโรคแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง เป็นต้น ทั้งนี้สาเหตุอีกประการหนึ่งก็เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์กุ้งเองด้วย พบว่าสายพันธุ์กุ้งในปัจจุบันค่อนข้างอ่อนแอเนื่องจากมีการผสมเลือดชิดเกิดขึ้น จากปัญหาที่เกิดขึ้นสร้างความเสียหายให้กับธุรกิจการเลี้ยงเป็นอย่างมาก

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเริ่มมีการแพร่ระบาดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวครั้งแรกเมื่อประมาณเดือนตุลาคมปี พ.ศ. 2537 การระบาดเกิดขึ้นอย่างรุนแรงและรวดเร็วมาก สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งในกุ้งระยะวัยอ่อนและกุ้งที่โตเต็มวัยแล้ว (ปภาศิริ บาร์เนทและคณะ, 2549) สาเหตุของการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถเกิดได้จากเชื้อที่อยู่ในธรรมชาติ สภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ การติดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ และการติดเชื้อจากพาหะ (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544) มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน พบว่าสัตว์ในกลุ่มนี้ทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งจะได้รับเชื้อไวรัสด้วยวิธีต่างกัน และสัตว์จำพวกปูอาจเป็นตัวเก็บเชื้อไวรัสนี้และสามารถแพร่กระจายไปยังสัตว์น้ำชนิดอื่นได้ (Supamattaya et al., 1998) มีงานวิจัยที่สนับสนุนข้อสรุปดังกล่าว โดยทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำร่วมกับปูที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ และอาศัยเทคนิคพีซีอาร์เป็นตัวตรวจสอบเนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าและให้ผลที่ค่อนข้างแม่นยำ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถถ่ายทอดจากปูมาสู่กุ้งได้ (Kanchanaphum et al., 1997)

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ระยะเวลาอันสั้นและรวดเร็ว เป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ สายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัย

ทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (*in vitro* mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

จากผลงานวิจัยที่กล่าวมาพบว่าปูสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่ตัวกุ้งได้ ซึ่งในบริเวณบ่อกุ้งส่วนใหญ่จะพบปูแสมอาศัยอยู่ จึงเป็นสาเหตุให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและสนับสนุนความคิดเกี่ยวกับการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยผ่านพาหะซึ่งได้แก่สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม ในพื้นที่ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมซึ่งอาจจะเป็นพาหะหนึ่งในการถ่ายทอดโรคไปสู่ตัวกุ้ง
3. นำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยผ่านพาหะ

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสุ่มตัวอย่างปูแสมจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งในตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาตรวจการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเลและห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ 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

บทที่2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปูแสม

ชื่อไทย : ปูแสม

ชื่อสามัญ : Meder, Mangrove Crab

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Sesarma* sp.

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea
Class	Malacostraca
Suborder	Reptantia
Family	Grapsidae
Genus	*Sesarma* sp.

ภาพที่ 2-1 ลักษณะปูแสม *Sesarma* sp.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลักษณะสำคัญของปูแสม

ด้านบนของมือมีซี่หวี 1 แถวเรียงตามยาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย ฝ่ามือมีตุ่มยื่นยกสูงเห็นได้ชัด ขอบด้านบนของนิ้วมีตุ่มเล็ก ๆ เรียงกัน จากโคนนิ้วถึงปลายนิ้ว ขนาดเม็ดใกล้เคียงกัน ลำตัวตั้งเกือบตรง ปลายโค้งมนโป่งออกอย่างสม่ำเสมอ เว้าเล็กน้อยก่อนถึงปลายสุด ช่องเปิดเพศเมียมีตุ่มกลมยื่นออกมา 2 ตุ่ม ๆ หนึ่งใหญ่อยู่ขอบนอก อีกตุ่มหนึ่งเล็กอยู่ขอบด้านใน

ลักษณะทั่วไปของปูแสม (เฉลิมวิไล ชื่นศรี, 2525)

กระดอง เกือบเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส กว้างมากกว่ายาวเล็กน้อย มีขนสั้น ๆ เป็นกลุ่ม ๆ กระจายอยู่ทั่วไปบนกระดอง ด้านข้างเกือบเป็นแนวตรงมีฟันอีก 1-2 ซี่หลังมุมนอกของตา ในเพศผู้อาจเห็นซี่ที่สองเล็ก ๆ ต่อจากซี่แรก ซี่ที่สองในเพศเมียอาจไม่มี mesogastric lobe อยู่เหนือปากตรงกลางปลายแหลมมองเห็นได้ชัด สันเหนือปากและสันข้างปากเห็นเด่นชัด มีขนาดใกล้เคียงกันทั้งสองคู่แต่สำหรับสันข้างปากนั้นตรงกลางสันยังยกเป็นสันเล็ก ๆ เห็นได้ชัด 1 สัน ร่องอกมองไม่ชัดแต่ร่องกั้นหัวใจเห็นได้ชัด บริเวณเหงือกมีสันเล็ก ๆ เฉียงอยู่ข้างละ 5-6 เส้น ขอบหลังตาโค้งนูนเช่นเดียวกับหน้าเว้าเข้าและโค้งออกเป็นสองลอนแล้วเว้าตรงเข้าพบกัน

ก้าม ซ้ายขวามีขนาดเท่าเทียมกัน ค่อนข้างอ้วน ขอบล่างด้านในของข้อที่ 4 หยักเล็ก ๆ ของขอบบนด้านในเป็นหนาม 1 อัน ข้อที่ 5 ขอบในด้านบนเป็นเม็ดเล็ก ๆ ไม่มีหนามแต่จรดกันเป็นรูปสามเหลี่ยม มือด้านในมีเม็ดตุ่มยื่นยาวออกมาเด่นมากในเพศผู้เพศเมียไม่ค่อยนูน นับเม็ดได้ประมาณ 10-11 เม็ด เป็นแถวเดี่ยวขอบด้านบนมีสันซี่หวีตามยาว 1 สัน ผิวด้านนอกและด้านในเต็มไปด้วยเม็ดเล็ก ๆ แต่ส่วนนิ้วตายค่อนข้างเรียบ นิ้วมือขอบด้านบนมีแถวสันเล็ก ๆ แบ่งเป็นเม็ดสี่เหลี่ยมขนาดใกล้เคียงกันตั้งแต่โคนจรดปลายนับได้ 40-60 อันทั้งในเพศผู้และเมีย ฟันมีซี่เล็ก ๆ เด่นที่ฟันล่างบริเวณกลางนิ้วตาย ปลายนิ้วทั้งสองมีสารไคตินห่อรับกันไว้

ขาเดิน มีขนาดใกล้เคียงกันค่อนข้างแบน คู่รองสุดท้ายยาวที่สุด มีหนามบนขอบบนปลายข้อที่ 4 หนึ่งอันทุก ๆ ขาเดิน ความยาวของขาเดินข้อที่ 4 คู่ที่ 3 จะเป็นประมาณ 2 เท่าของความกว้างส่วนข้อรองสุดท้ายจะยาวประมาณ 1.5 เท่าของข้อสุดท้าย ทั้งขอบบนและล่างของข้อสุดท้ายและรองสุดท้ายจะมีขนอ่อนประดับปลายขาเดินทุกคู่แหลมคม third maxilliped หรือรยางค์ปากคู่ที่ 3 มีความยาวของข้อที่ 4 มากกว่าข้อที่ 3 สันขนเฉียงอยู่บนข้อที่ 4 ข้อที่ 5 ติดอยู่กับข้อที่ 4 ที่มุมบนด้านนอก ขอบบนของข้อที่ 5 มีแผงขนประดับมองดูคล้ายจะเป็นแผงขนของข้อที่ 4 ขอบด้านนอกของข้อที่ 4 และ 5 ยกขึ้นให้เห็น แต่จะมองไม่เห็น exognath เนื่องจากซ่อนอยู่ยาวถึงแค่ประมาณครึ่งหนึ่งของคู่ที่ 4 มีขนตอนปลาย ขอบด้านในของข้อที่ 3 และ 4 มีแผงขนแข็ง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปล้องท้อง ปล้องรองสุดท้ายยาวกว่าปล้องสุดท้ายเล็กน้อยในเพศผู้ แต่กว้างกว่าประมาณ 2 เท่า ในเพศเมียปล้องสุดท้ายจมอยู่ในปล้องรองสุดท้ายเกือบมิด ปล้องรองสุดท้ายโค้งเรียบ ๆ เข้าหากัน ปลายและขอบปลาย ๆ ของทั้งสองปล้องมีขนประดับ

gonopod ที่ 1 ของเพศผู้ปูหรืออวัยวะเพศผู้คู่ที่ 1 ยาวจรดขอบบนของปล้องอกที่ 2 มีกระจุกขนรองรับอยู่ เป็นทรงสามเหลี่ยมปลายพับเข้าหากันเกือบเป็นมุมฉากประกบกัน ด้านที่เปิดมองเห็นนั้นจะเห็นลักษณะโคนเล็ก และค่อย ๆ ขยายไปทางปลาย ปลายจะโค้งมนขยายที่บริเวณประมาณ 1 ส่วน 3 ของตอนปลาย กลางตลอดแนวเป็นแอ่งบุ๋ม มีขนประดับที่มุมด้านที่ติดกับอกตลอดแนว ขอบปลายนั้นขลิบด้วยสาร ไคติน gonopod ที่ 2 ของเพศผู้ปูหรืออวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 มีขนาดสั้นมาก ประมาณ 1 ส่วน 3 เท่านั้น ปลายแหลมเล็กมีกระจุกขนตามขอบในกลางๆ testis นั้นคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้าปลายมน สั้นกว่า gonopod ที่ 2 ของเพศผู้ปูหรืออวัยวะเพศผู้คู่ที่ 2 ประมาณครึ่งหนึ่ง ช่องเปิดของเพศเมียมีตุ่มยื่นขึ้นรับสองตุ่มอยู่ติดกับขอบขนของปล้องอกที่ 3

สี กระดองสีน้ำตาลถึงสีม่วง กลุ่มขนสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบสีม่วง มองเผิน ๆ ตัวมีสีม่วงโดยทั่วไป

การแพร่กระจาย

พบตั้งแต่หมู่เกาะฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย อ่าวไทย ประเทศจีน และในทะเลอันดามัน ขุดรูอยู่ตามป่าไม้ชายเลน หรือบางครั้งอาจจะอาศัยอยู่ในรูร้างของปูทะเล ในประเทศไทยพบทุกจังหวัดริมอ่าวไทย ตั้งแต่ตราดจนถึงนราธิวาส

อาหาร ปูแสมจะกินใบไม้ซากสัตว์ที่ผุ เปื่อย

วงจรชีวิตของปูแสม

ในธรรมชาตินั้น ในเวลากลางวันปูแสมส่วนใหญ่จะอยู่ในรู ส่วนที่ออกจากรูมาหากินก็มีบ้างเมื่อหิว หรือเมื่อปลอดคน ส่วนใหญ่จะออกจากรู มาหากินในเวลากลางคืน เช่นเดียวกันกับปูทะเลและปูม้า ปูแสมมีการผสมภายใน (internal fertilization) ปูเพศเมียเมื่อได้รับการผสมกับปูเพศผู้แล้ว ไข่จะเจริญอยู่ภายในกระดอง เมื่อไข่แก่เต็มที่จะถูกส่งมาไปเก็บไว้ที่ใต้จับปิ้งบริเวณหน้าอก ฤดูที่ปูแสมวางไข่มี 2 ช่วง ช่วงแรกอยู่ระหว่าง เดือนเมษายน-กรกฎาคม ช่วงที่สองอยู่ระหว่างเดือนกันยายน-พฤศจิกายน ไข่จะอยู่นอกกระดองประมาณ 14 วัน ก็จะฟักเป็นตัว แม่ปูที่ขนาดความยาวกระดองระหว่าง 3.0-3.5 เซนติเมตร (น้ำหนักประมาณ 20-40 กรัม) มีไข่เฉลี่ยประมาณ 23,000-55,000 ฟอง ไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 360 ไมครอน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมื่อถึงฤดูวางไข่ ปูแสมจะเดินทางลงไปวางไข่ในน้ำ ในบริเวณปากแม่น้ำ ในป่าแสม โกงกางที่มีความเค็มระหว่าง 5-20 ส่วนในพัน (ppt.) อย่างที่ชาวบ้านเรียกว่า ฤดูปูชะไข่ ไข่เมื่อฟักเป็นตัวแล้วก็จะพัฒนาผ่านขั้นตอน 2 ระยะ ระยะแรกคือ zoea เป็นระยะที่ลูกปูจะดำรงชีวิตคล้ายแพลงก์ตอนสัตว์อื่น ๆ (planktonic life) ลูกปูจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 10-15 วัน ก็จะเปลี่ยนรูปเป็นลูกปูวัยอ่อนระยะที่สอง ที่มีชื่อเฉพาะว่า megalopa ลูกปูในระยะนี้จะเริ่มว่ายน้ำแข็ง เปลี่ยนนิสัยการกินและความเป็นอยู่จากที่เคยล่องลอยไปตามกระแสน้ำ ก็จะว่ายน้ำไปอาศัยหากินตามพื้นดิน ลูกปูจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 10-15 วัน ก็จะพัฒนาเป็นลูกปูขนาดเล็ก (เฉลิมวิไล ชื่นศรี, 2525)

เนื่องจากในพื้นที่บริเวณบ่อกุ้งเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปูแสม เราจึงมักพบปูแสมอาศัยอยู่ตามบริเวณรอบ ๆ บ่อ การทดลองส่งผ่านโรคตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำไปยังจั๊กจั่นทะเล ปูทะเลและเคย (Supamattaya et al. 1998) ได้แสดงให้เห็นว่าโรคตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำสามารถถ่ายทอดไปยังสัตว์จำพวกกลุ่มครัสเตเชียนได้ ปูแสมก็จัดอยู่ในกลุ่มครัสเตเชียนเช่นเดียวกันจึงมีความเป็นไปได้ว่าปูแสมมีความเป็นพาหะของโรคตัวแดงดวงขาวที่สามารถนำพาเชื้อเข้าสู่บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้เช่นเดียวกัน

โรคไวรัสตัวแดงดวงขาว

นับจากปลายปี 2537 เป็นต้นมา โรคตัวแดงดวงขาว (white spot disease) ในกุ้งกุลาดำอายุประมาณ 2 เดือน ได้ทำความเสียหายอย่างมากให้แก่เกษตรกร ผู้เลี้ยงกุ้งในภาคใต้และภาคตะวันออกสร้างความหวาดหวั่นให้แก่เกษตรกร ผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรในภาคตะวันออก แถวจังหวัดจันทบุรีและตราด ซึ่งเป็น 2 จังหวัดที่ได้รับความเสียหายมาก คิดเป็นพื้นที่ร่วมกันถึง 6,000 ไร่ ทางภาคใต้ถึงแม้ว่าการระบาดจะเกิดขึ้นก่อน แต่ความเสียหายที่เกิดขึ้นยังน้อยกว่าเมื่อเทียบกับทางภาคตะวันออก จังหวัดที่มีการระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในภาคใต้ได้แก่ นครศรีธรรมราช ตรัง สงขลา สตูล สุราษฎร์ธานี และปัตตานี จนถึงปลายปี 2538 โรคตัวแดงดวงขาวก็ยังแพร่ระบาดมากยิ่งขึ้นในจังหวัดระนอง กระบี่ พังงา ภูเก็ตและจังหวัดอื่น ๆ ที่มีการเลี้ยงกุ้ง และในปัจจุบันปัญหาของโรคตัวแดงดวงขาว ก็ยังพบอยู่ สร้างความเสียให้ให้กับธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างมาก โรคตัวแดงดวงขาวสามารถถ่ายทอดมาจากแม่พันธุ์กุ้งและแพร่ระบาดจากพาหะต่าง ๆ เช่น ปูชนิดต่าง ๆ กุ้ง เคย เป็นต้น (จิรศักดิ์ ตั้งตรง-ไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544)

สภาพแวดล้อมที่ก่อให้เกิดโรค

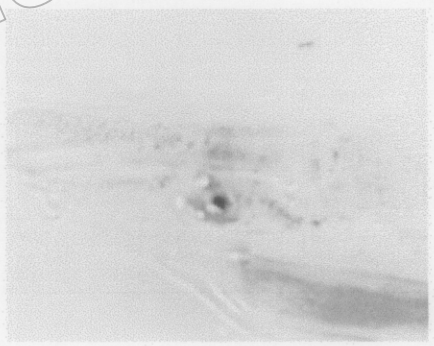
ความเค็ม 29-25 ส่วนในพัน อุณหภูมิและ pH เปลี่ยนแปลงมากในรอบวัน สีน้ำล้ม บ่อสกปรก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาการของโรคตัวแดงดวงขาว

ผิวใต้เปลือกกุ้งตลอดทั้งตัวมีสีแดงเรื่อ ๆ ชมพูถึงเข้ม บางครั้งจะพบออกเป็นสีส้มและพบจุดขาวขนาด 0.1-2 มิลลิเมตร ใต้เปลือกบริเวณส่วนหัวและตัว กุ้งที่เป็นโรคจะว่ายอยู่ผิวน้ำ เกยขอบบ่อ อ่อนแอ กินอาหารลดลง ลอกคราบไม่ออก ตัวนิ่ม อัตราการตาย 80-100 % ภายใน 4-5 วัน หลังจากตรวจพบเชื้อ

ภาพที่ 2-2 ลักษณะดวงขาวใต้เปลือกของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาว



ภาพที่ 2-3 ลักษณะกุ้งวัยอ่อน พี 25 ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
(http://www.kungthai.com/virus.html#sembv วันที่เข้าถึง 25/09/07)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง

ปัจจัยหลักที่สำคัญที่มีอิทธิพลเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และการแพร่ระบาดของโรคในชุมชนมีสามประการดังต่อไปนี้ (ไพบูลย์ โล่สุนทร, 2538)

เชื้อโรค (pathogen)

สิ่งมีชีวิตที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาวได้ในกุ้ง ได้แก่ พวกพาหะต่างๆ เช่น กุ้งฝอย ปูแสม หอยเจดีย์ แมลง นก เป็นต้น หรืออาจเกิดจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีอยู่ในธรรมชาติ

สิ่งแวดล้อม (environment)

เป็นสิ่งที่อยู่รอบ ๆ ตัวกุ้งมีความสัมพันธ์ และส่งผลกระทบต่อความเป็นอยู่ต่อตัวกุ้งโดยตรง เช่น อัตราความหนาแน่นในการเลี้ยงมากเกินไป คุณภาพน้ำต่ำกว่าระดับมาตรฐาน อุณหภูมิต่ำเกินไป สภาพอากาศแปรปรวน ช่วงรอยต่อฤดูกาล เศษอาหารที่ตกค้างในพื้นบ่อ ก่อให้เกิดของเสีย เชื้อโรค และสัตว์ต่าง ๆ ที่เป็นพาหะนำโรคได้ เป็นต้น

กุ้ง (shrimp)

กุ้งในตระกูล Penaeus หลายชนิดสามารถยอมรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และเจนนุช ว่องธวัชชัย, 2544) การได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวขึ้นอยู่กับความไวในการติดเชื้อของตัวกุ้งเอง ลูกพันธุ์อ่อนแอ ถือเป็นปัจจัยภายในของเจ้าบ้าน (intrinsic factors) กุ้งสามารถแสดงอาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้เมื่อเลี้ยงไปประมาณ 30-40 วัน หรือการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อแม่พันธุ์

เทคนิคโพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน (Polymerase chain reaction, PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิคพีซีอาร์ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น (จิราพร เกษรจันทร์, 2537)

หลักการของพีซีอาร์

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA poloymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่พีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มี 3 ขั้นตอน (จิราพร เกษรจันทร์, 2537) และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 18-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ปัจจุบันเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่นิยมใช้เป็น thermostable DNA polymerase ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคง คุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย จำนวนดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยาพีซีอาร์จะมีค่าเป็น 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตร้าไวโอเลต ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น

ประโยชน์ของพีซีอาร์ในการตรวจวินิจฉัยโรค

ปัจจุบันนี้นับได้ว่าพีซีอาร์เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตรสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน ทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนในสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย (ไพบูลย์ โล่สุนทร, 2538) จึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เกิดในปูแสมได้

ประโยชน์ของพีซีอาร์ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น โรคเอดส์ วัณโรค มาลาเรีย การตรวจหายีนก่อมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งประโยชน์ของพีซีอาร์ทางการแพทย์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ทางด้านการเกษตรพีซีอาร์มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบพันธุ์พืช การตรวจวินิจฉัยโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรครวมทั้งศึกษายีนอื่น ๆ ของพืชและเชื้อโรค และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์นี้ช่วยให้เข้าใจถึงพันธุกรรมของเชื้อโรคพืชตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ

ขณะนี้เทคนิคพีซีอาร์ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย 4-5 หมื่นล้านบาทต่อปี เนื่องจากปัจจุบันนี้เกษตรกรเริ่มประสบปัญหาจากโรคระบาดในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีผลต่อผลผลิตกุ้งส่งออกทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้ถึงปีละ 1-2 หมื่นล้านบาท สาเหตุของโรคระบาดในกุ้งที่พบ ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งต้องใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบ ทำให้สามารถป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ทันท่วงที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นอกจากนี้การคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งที่ดีเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic diversity หรือ variation) สูงจะไม่สามารถดำเนินไปได้ถ้าไม่ใช้วิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพ และถูกต้องถึงระดับพันธุกรรม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Supamattaya et al.(1998) ได้ศึกษาการถ่ายทอดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในสัตว์จำพวกครัสเตเชียนทุกชนิดที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยการได้รับเชื้อไวรัสด้วยวิธีต่าง ๆ กัน คณะผู้วิจัยทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและเทคนิค DNA hybridization และยังพบว่าสัตว์จำพวกปูอาจเป็นตัวเก็บเชื้อไวรัสนี้ และแพร่กระจายไปยังสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ Kanchanaphum et al. (1997) มีงานวิจัยที่สนับสนุนข้อสรุปดังกล่าวโดยพบว่ามีการกระจายตัวของโรคตัวแดงดวงขาวจากปูมายังกุ้งได้เมื่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำกับปูที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ คณะผู้วิจัยพบว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำที่มีการติดเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์เป็นวิธีตรวจหาโรคได้เร็วกว่าวิธี *in situ* hybridization และการย้อมสี H&E แต่คณะผู้วิจัยไม่ได้อภิปรายถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจจะส่งผลโน้มนำให้มีการกระจายไวรัสจากปูมาสู่กุ้งเร็วขึ้นเป็นต้นว่า คุณภาพน้ำ ปริมาณน้ำ พฤติกรรมต่าง ๆ ของสัตว์น้ำ ยังมีงานวิจัยที่กล่าวถึงการเป็นพาหะของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวที่รายงานโดย Zhang et al. (2007) พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในโคพีพอดโดยการตรวจด้วย nested-PCR ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันถึงความเป็นพาหะที่เกิดขึ้นในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง Zhang et al. (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพาหะและการนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในโรติเฟอร์ (*Brachionus urceus*) โดยใช้เทคนิค nested-PCR ในประเทศจีน การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองนำเอาโรติเฟอร์ซึ่งเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนมาทำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แล้วนำโรติเฟอร์ที่ได้ไปให้กุ้งกิน ผลปรากฏว่ากุ้งที่กินโรติเฟอร์ที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่สามารถติดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ และมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งที่เป็นชุดควบคุม กล่าวได้ว่าโรติเฟอร์สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกุ้งได้โดยผ่านการกิน และกุ้งที่แสดงอาการติดเชื้อมีอัตราการตายอย่างรวดเร็ว

Wang et al. (1998) ได้ทำการทดสอบการติดเชื้อโรคตัวแดงดวงขาว (white spot baculovirus, WSBV) ในสิ่งมีชีวิตในบ่อเลี้ยงกุ้ง และสัตว์ในกลุ่ม decapods ในประเทศไต้หวันโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความรุนแรงของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมี 2 ชนิด คือ ชนิดเฉียบพลันที่มีลักษณะการตายอย่างรวดเร็ว ภายใน 2 สัปดาห์ สามารถพบได้ใน *P. monodon* และ *P. japonicus* อีกชนิดหนึ่ง คือ ชนิดแฝงตัวหรือภาวะเก็บเชื้อ ส่วนใหญ่จะเป็นสาเหตุที่ทำให้

สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นติดเชื้อได้พบใน *Macrobrachium* sp. , lopters และสัตว์ในกลุ่มปู สาเหตุที่สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมา เป็นไปได้ว่าสิ่งมีชีวิตเหล่านี้เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งได้ เนื่องจากไม่พบลักษณะการตายจากอาการจุดขาวในการเพาะเลี้ยงปู และ lopters ในประเทศไต้หวัน และประเทศอื่น ๆ ในภูมิภาคเอเชีย ที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวระบาดอยู่

งานวิจัยของ จรีพร เรืองศรี และกิจการ ศุภมาตย์ (2542) แสดงให้เห็นว่ามีดีเอ็นเอของไวรัสตัวแดงดวงขาวในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง คณะผู้วิจัยทำการศึกษาในช่วงเดือนตุลาคม 2540 ถึงเดือนกันยายน 2541 โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ขั้นตอน ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 643 และ 330 คู่เบส คณะผู้วิจัยสรุปว่าสัตว์น้ำดังกล่าว ได้แก่ กุ้ง ปู ปลา หอย แพลงก์ตอน และตัวอ่อนของสัตว์น้ำบางชนิดเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่คณะผู้วิจัยไม่ได้กล่าวถึงวิธีการถ่ายทอดไวรัสจากสิ่งมีชีวิตดังกล่าวมายังกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง นอกจากนี้แล้วยังมีงานวิจัยที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ งานวิจัยของ Vaseeharan (2003) ได้มีการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้ง ปู และสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมาตรวจหาการติดเชื้อโรคตัวแดงดวงขาวโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีการติดเชื้อเกิดขึ้น

สุดา ตัณฑวณิช และฉันทนา แก้วตาปี (2543) ได้ตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำที่อายุต่าง ๆ และสัตว์น้ำชนิดอื่นที่เป็นพาหะ โดยใช้วิธีพีซีอาร์ในช่วงระยะเวลาเดือนตุลาคม 2539-เดือนธันวาคม 2540 ผู้วิจัยพบว่าอัตราการติดเชื้อไวรัสในกุ้งวัยอ่อนใกล้เคียงกับอัตราการติดเชื้อในกุ้งพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งมีข้อสังเกตจากงานวิจัยครั้งนี้คือคณะผู้วิจัยใช้วิธีที่แตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งอาจจะมีผลต่อขั้นตอนการทำพีซีอาร์และต่อเปอร์เซ็นต์ของการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่รายงานมาด้วย

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, 0-20, 10-100, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
- PCR tube แบบผนังบาง ขนาด 0.2, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
- อุปกรณ์ผ่าตัด
- ที่บดตัวอย่าง
- ถุงมือ
- กระดาษ parafilm
- eppendorf tube
- tip ขนาด 0-10, 0-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. สารเคมี

- lysis buffer แบบ salt extraction (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก)
- 75 โมลาร์ ammonium acetate
- isopropanal
- 70% ethanol
- 70% absolute alcohol
- คลอรีน
- น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.1 สารเคมีที่ใช้ในงานพีซีอาร์

ชุด KIT ของ Ezee Gene ของบริษัท Shrimp Biotechnology Business Unit, SBBU

ประกอบด้วย

1) Master mix
   - 1X PCR buffer II
   - 1.5 มิลลิโมล $MgCl_2$ solution
   - 0.5 ไมโครโมลาร์ WSSV 232-ICF
   - 0.5 ไมโครโมลาร์ WSSV 232-ICR
   - 200 ไมโครโมลาร์ 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

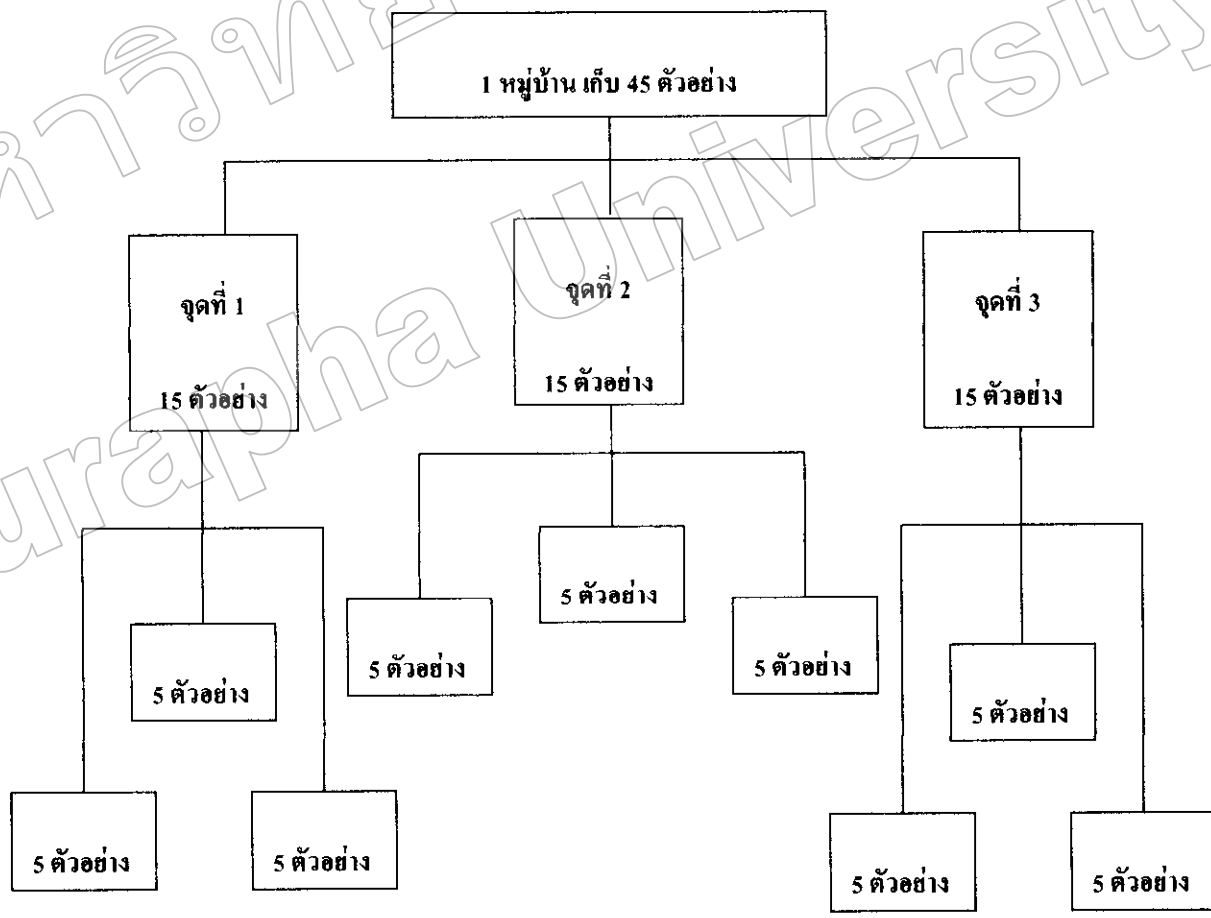
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ในปูแสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1. การเก็บตัวอย่างปูแสม

สุ่มเก็บตัวอย่างปูแสมในบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 6 หมู่บ้านได้แก่ หมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ หมู่ 4 บ้านหมูคุด หมู่ 8 บ้านอัมพวา หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน และหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง ในเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างปูแสมหมู่บ้านละ 45 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างปูแสมออกเป็น 3 จุด จุดละ 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยตัวอย่างปูแสม 5 ตัว รวมทั้งตำบลคลองขุดใช้ตัวอย่างปูแสมทั้งหมด 270 ตัวอย่าง



ภาพที่ 3-1 แสดงรูปแบบการเตรียมตัวอย่างปูแสมเพื่อการสกัดดีเอ็นเอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อที่อยู่บริเวณเหงือกของตัวอย่างปูแสม 5 ตัว ของแต่ละซ้ำ มาบดรวมกันเพื่อรวมตัวอย่าง เพื่อให้ได้น้ำหนักของเนื้อปูแสมรวมกันประมาณ 50 มิลลิกรัม

3. การสกัด DNA จากตัวอย่างปูแสม

นำเนื้อเยื่อปูแสมที่บดแล้ว 50 มิลลิกรัม มาใส่ในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วบดให้ละเอียด บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นเติม ammonium acetate ความเข้มข้น 75 โมลาร์ จำนวน 150 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanal แช่เย็น 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน บ่มที่ -22 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และนำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส แล้วเติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส เก็บส่วนที่เป็นตะกอนดีเอ็นเอ ตากทิ้งไว้ข้างหลอดให้แห้งเติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร นำหลอดตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายดีเอ็นเอจากหลอด มาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอ

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

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR

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

ตารางที่ 3-1 แสดงส่วนประกอบและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

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

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

ในการเตรียม reaction mix ให้เตรียมส่วนผสมสำหรับ positive และ negative control ด้วยทุกครั้ง positive control จะเป็น DNA ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วน negative control คือน้ำกลั่น จากนั้นนำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไปใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycler (รุ่น PX2 Thermal)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

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

จากนั้นแช่หลอดผลผลิต PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผลที่ได้ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ (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 product 10 ไมโครลิตรกับ loading dye 3 ไมโครลิตร ให้เข้ากันบนกระดาษ parafilm แล้วใส่ลงในหลุมจนหมดตัวอย่าง 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-transiluminator (รุ่น Dolphin Series Gel Image vertion 1.0) เปิดแสง UV เพื่อส่องดูแถบของ PCR product เปรียบเทียบกับ positive และ negative control โดยข้อกำหนดผลจากชุดทดสอบ Ezee gene คือ Positive แสดงผล 2 แบบ คือปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาด 122 คู่เบส และ 232 คู่เบส หรือปรากฏแถบเดียวขนาด 232 คู่เบส ส่วน Negative ปรากฏแถบดีเอ็นเอแถบเดียวขนาด 122 คู่เบส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
การวิเคราะห์ผลการวิจัย

ผลจากการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม (*Sesarma* sp.) ของตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างและนำเอาส่วนเนื้อเยื่อจำนวน 0.05 กรัม มาวิเคราะห์หาการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม (*Sesarma* sp.) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอให้มีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอในช่วงประมาณ 1.8-2.0 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส (Agarose gel electrophoresis technique) ได้ผลดังข้อมูลตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของตัวอย่างปูแสม (*Sesarma* sp.) ในแต่ละหมู่บ้านของตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

หมู่บ้าน	จำนวนตัวอย่างปูแสม (ตัว)	การปรากฏเชื้อ WSSV (ตัว)		เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ(%)
		ผลบวก	ผลลบ	
หมู่ 1 บ้านสัตบุตร				
จุดที่ 1	15	0	15	0.00
จุดที่ 2	15	0	15	0.00
จุดที่ 3	15	0	15	0.00
หมู่ 3 บ้านเนินประดู่				
จุดที่ 1	15	0	15	0.00
จุดที่ 2	15	0	15	0.00
จุดที่ 3	15	0	15	0.00
หมู่ 4 บ้านหมูดุด				
จุดที่ 1	15	0	15	0.00
จุดที่ 2	15	5	10	33.33
จุดที่ 3	15	0	15	0.00

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

หมู่บ้าน	จำนวนตัวอย่างปูแสม(ตัว)	การปรากฏเชื้อ WSSV (ตัว)		เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ(%)
		ผลบวก	ผลลบ	
หมู่ 8 บ้านอัมพวา				
จุดที่ 1	15	0	15	0.00
จุดที่ 2	15	0	15	0.00
จุดที่ 3	15	0	15	0.00
หมู่ 9 บ้านคลองขุดบน				
จุดที่ 1	15	10	5	66.67
จุดที่ 2	15	15	0	100.00
จุดที่ 3	15	0	15	0.00
หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่าง				
จุดที่ 1	15	0	15	0.00
จุดที่ 2	15	10	5	66.67
จุดที่ 3	15	0	15	0.00
รวม	270	40	230	14.81

จากการศึกษาพบว่า ปูแสมในตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยจากตัวอย่างทั้งหมด 270 ตัวอย่างคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ได้เท่ากับ 14.81 % (40/270)

จากตารางที่ 4.1 ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมของหมู่ 1 บ้านสัตบุตร ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไม่ปรากฏการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ทั้ง 3 จุดเป็น 0.00 %

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปูแสมของหมู่ 3 บ้านเนินประดู่ ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไม่ปรากฏการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ทั้ง 3 จุดเป็น 0.00 %

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปูแสมของหมู่ 4 บ้านหมูคุด ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในจุดที่ 2 คิดเป็น 33.33 % ส่วนในจุดที่ 1 และจุดที่ 3 ไม่ปรากฏการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม คิดเป็น 0.00 %

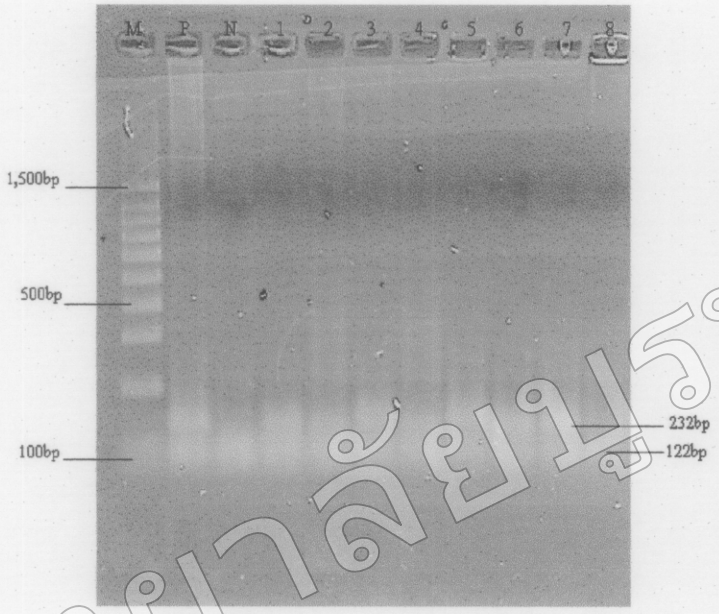
ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปูแสมของหมู่ 8 บ้านอัมพวา ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไม่ปรากฏการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ทั้ง 3 จุดเป็น 0.00 %

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปูแสมของหมู่ 9 บ้านคลองขุดบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) พบว่ามีการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในจุดที่ 1 คิดเป็น 66.67 % และจุดที่ 2 คิดเป็น 100 % ส่วนในจุดที่ 3 คิดเป็น 0.00 %

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปูแสมของหมู่ 10 บ้านคลองขุดบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในจุดที่ 2 คิดเป็น 66.67 % ส่วนในจุดที่ 1 และจุดที่ 3 เป็น 0.00 %

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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



ภาพที่ 4-1 ตัวอย่างรูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปูแสม (*Sesarma* sp.) ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) พี่แยกดีเอ็นเอบนแผ่นวุ้นเอกาโรส เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Lane M : DNA marker ชนิด 100 bp + 1500 bp

Lane N : negative control (น้ำกลั่น) ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 122 bp

Lane P : WSSV positive control ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 232 bp และ122 bp

Lane 8 : ให้ผลลบ (negative) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 122 bp

Lane 1-7 : ให้ผลบวก (positive) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 232 bp และ122 bp

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1631

ภาพที่ 4-2 แผนที่แสดงพื้นที่การระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมในบ่อเลี้ยงกุ้ง ในเขตตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หมายเหตุ * = จุดที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างปูแสม แต่ไม่ปรากฏเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม

* = จุดที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างและพบการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ได้นำตัวอย่างปูแสมมาจากการสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละหมู่บ้านของตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรีเพื่อตรวจสอบหาการแพร่ระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus, WSSV) โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากการสำรวจพบว่ามีหมู่บ้านที่ทำการเลี้ยงกุ้งจำนวน 6 หมู่บ้านจากหมู่บ้านในตำบลคลองขุดทั้งหมด 10 หมู่บ้าน จากผลการตรวจสอบหาการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมพบว่าตัวอย่างปูแสมในหมู่ 9 มีเปอร์เซ็นต์ (%) การติดเชื้อตัวแดงดวงขาวมากที่สุด จึงทำให้เป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวในกุ้งได้ เนื่องจากพบว่ามีรายงานที่ศึกษาถึงการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในสัตว์จำพวกครัสเตเซียน (Crustacean) ทุกชนิดที่อาศัยอยู่ในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งโดยการได้รับเชื้อไวรัสด้วยวิธีต่างกัน และยังพบว่าสัตว์จำพวกปูอาจเป็นตัวเก็บเชื้อไวรัสนี้และแพร่กระจายไปยังสัตว์น้ำชนิดอื่น (Supamattaya et al.,1998) และมีงานวิจัยที่สนับสนุนข้อสรุปดังกล่าวโดยพบว่ามีการกระจายตัวของโรคตัวแดงดวงขาวจากปูมายังกุ้ง เมื่อทำการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำร่วมกับปูที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ และเมื่อใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบ(Kanchanaphum et al., 1997)

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวในปูแสมทั้งพื้นที่ของตำบลคลองขุดโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) ปูแสมติดเชื้อทั้งหมดเท่ากับ 14.81% (40/270) ซึ่งมีบางพื้นที่ในตำบลคลองขุดที่ไม่พบการปรากฏของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าพื้นที่นั้นจะไม่เกิดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคตัวแดงดวงขาว เนื่องจากปูแสมเป็นพาหะที่สามารถเคลื่อนที่ไปสู่บ่อเพาะเลี้ยงในพื้นที่อื่น ๆ ได้ หลังจากทำการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมของทุกหมู่บ้านแล้ว ได้มีการกลับไปเก็บข้อมูลจากจุดที่เก็บตัวอย่างซึ่งก็คือบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร พบว่าหมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่และหมู่ 8 บ้านอัมพวา ไม่พบว่ากุ้งที่อยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงมีการเกิดโรคตัวแดงดวงขาว เป็นข้อมูลที่สัมพันธ์กับตาราง 4.1 ซึ่งไม่พบการปรากฏเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมที่นำมาตรวจ แต่หมู่ 4 บ้านหมูดุด หมู่ 9 บ้านคลองขุดบนและหมู่ 10 บ้านคลองขุดล่างพบว่ากุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงมีการติดโรคตัวแดงดวงขาว จากข้อมูลดังกล่าว

สามารถใช้เป็นแนวทางที่เกษตรกรควรจะเฝ้าระวัง และคอยกำจัดพาหะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นบริเวณบ่อเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับตัวกุ้ง

การระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อเกษตรกร แนวทางที่ดีที่สุดที่จะลดความเสียหายที่เกิดขึ้นคือการทราบถึงพื้นที่การระบาด ซึ่งจะเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคอันเนื่องมาจากพาหะต่าง ๆ เนื่องจากตรวจพบว่าในเนื้อเยื่อของปูแสมมีการปรากฏของเชื้อตัวแดงดวงขาว ปูแสมจึงอาจเป็นพาหะของเชื้อไวรัสชนิดนี้ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจึงควรมีระบบจัดการบ่อเพาะเลี้ยงให้มีคุณภาพที่ดีไม่ว่าจะเป็นในด้านคุณภาพน้ำ อาหาร สิ่งแวดล้อม หรือพาหะที่จะก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวในบ่อกุ้งได้ โดยมีการตรวจสอบและจัดการหรือกำจัดพาหะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงเพื่อไม่ให้บ่อเพาะเลี้ยงเกิดเป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการแพร่ระบาดของโรคตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งที่ทำการเพาะเลี้ยง

การระบาดของโรคในกุ้งมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องโดยตรงกับฤดูกาล แหล่งเลี้ยง ความเค็ม และการจัดการฟาร์ม พบว่าการเลี้ยงที่เหมาะสมและพบปัญหากุ้งติดเชื้อตัวแดงดวงขาวน้อยที่สุดคือช่วงเดือนมีนาคมจนถึงเดือนกันยายน ส่วนช่วงที่พบการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวมากที่สุดคือ ตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ต่อเนื่องไปจนถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป (ชลอลิ้มสุวรรณและพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547) ที่สำคัญคือระบบสุขาภิบาลฟาร์มหรือการจัดการฟาร์มเลี้ยงที่ต้องเข้าใจคือการจัดการพื้นบ่อ คุณภาพน้ำในระหว่างเลี้ยงรวมไปถึงการกำจัดพาหะที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงได้เป็นอย่างดี การป้องกันที่ดีที่สุดคือหลีกเลี่ยงการปล่อยกุ้งในฤดูที่มีความเสี่ยง ในกรณีที่ต้องการจะเลี้ยงกุ้งในช่วงเวลาดังกล่าวควรมีการคัดเลือกสายพันธุ์ให้มีคุณภาพที่ดีมีความแข็งแรง ปราศจากโรค มีการจัดการบริเวณบ่อเพาะเลี้ยงให้ปลอดจากพาหะ เนื่องจากพาหะนำโรคก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ ซึ่งก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

สรุปผลการทดลอง

1. หมู่ 9 บ้านคลองขุดบนพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมมากที่สุดที่ 55.56 % (25/45)

2. หมู่ 10 บ้านคลองขุดล่างพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมรองลงมาที่ 22.22 % (10/45)

3. หมู่ 4 บ้านหมูดุดพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสมน้อยที่สุดที่ 11.11 % (5/45)

4. หมู่ 1 บ้านสัตบุตร หมู่ 3 บ้านเนินประดู่ และหมู่ 8 บ้านอัมพวาไม่พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูแสม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ในปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย อาทิเช่น ปัจจัยสิ่งแวดล้อม การจัดการรอบบริเวณบ่อเพาะเลี้ยง เป็นต้น

2. จากการวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานในการสำรวจการแพร่กระจายของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว ควรมีการศึกษาวิธีการแพร่เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากปูแสมไปยังตัวกุ้งเพื่อเป็นข้อมูลยืนยันและใช้เป็นแนวทางในการยับยั้งการติดเชื้อที่จะเกิดกับตัวกุ้ง

3. ควรศึกษาสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่สามารถเป็นพาหะในการถ่ายทอดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งในบ่อเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการหาสาเหตุของการเกิดโรคที่แท้จริง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บรรณานุกรม

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

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.

เฉลิมวิไล ชื่นศรี. 2525. *ปูแสมในประเทศไทย*. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 149 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.

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

สุดา ตัณฑวณิช และ ฉันทนา แก้วตาปี. (2543). *การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำและสัตว์น้ำที่อาจเป็นพาหะในพื้นที่ฝั่งอันดามัน*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2543, ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอันดามัน. 9 หน้า.

Zhang J.S., Dong S.L., Dong Y.W., Tian X.L., Hou C.Q. (2007). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *Aquaculture*. *160*, 19-30.

Kanchanaphum, P., Boonsaeng V., Ponyim S., Wongteerasupaya C., Tassanakajon A., Withyachumnarnkul B. and T.W. Flegel. (1997). Experimental transmission of white-spot baculovirms (WSBV) from crabs to shrimp (*Penaeus monodon*). ในสัมมนาวิชาการ "เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง" วันที่ 13 ธันวาคม 2540 ณ ห้องประชุม 101อาคาร สวทช. กรุงเทพฯ จัดโดย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. หน้า 62-72.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Supamattaya, K., Hoffman, R.A., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphum, P. (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Porunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis. Aquat. Org*, *32* (2), 79–86.

Vaseeharan, B., Jayakumar., R. and Ramasamy., P. (2003). PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. *Letters in Applied Microbiology*, *37*, 443–447.

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*. *164*, 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 (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*. *261*, 1181–1185.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก
สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. การเตรียม buffer แบบ salt extraction

1.1 เตรียม Stock

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

1.2 ผสมสารดังต่อไปนี้

100 มิลลิโมลาร์ Tris HCl	10	มิลลิลิตร
100 มิลลิโมลาร์ EDTA	20	มิลลิลิตร
0.5 % SDS	50	มิลลิลิตร
0.2 โมลาร์ NaCl	4	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียม 10X TBE buffer pH 8.0

ชั่ง Trisma base 108 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม Boric acid 55 กรัม ละลายจนหมด และเติม 0.5 โมล EDTA pH 8.0 จำนวน 40 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บในอุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม 1X TBE buffer pH 8.0

ละลาย 10X TBE buffer pH 8.0 จำนวน 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 900 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การเตรียม 0.5 โมลาร์ EDTA pH 8.0

ชั่ง EDTA 16.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH 8.0 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรได้ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมสารละลาย ethidium bromide

นำ stock ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา (ป้องกันแสง) เก็บในอุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

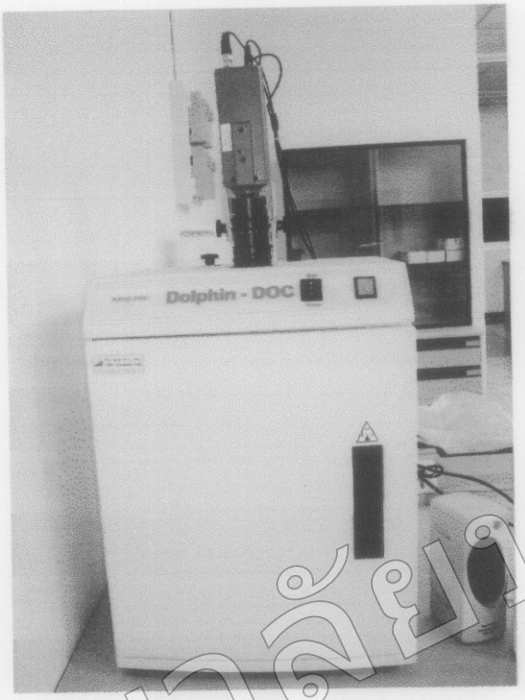
ภาพประกอบการศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

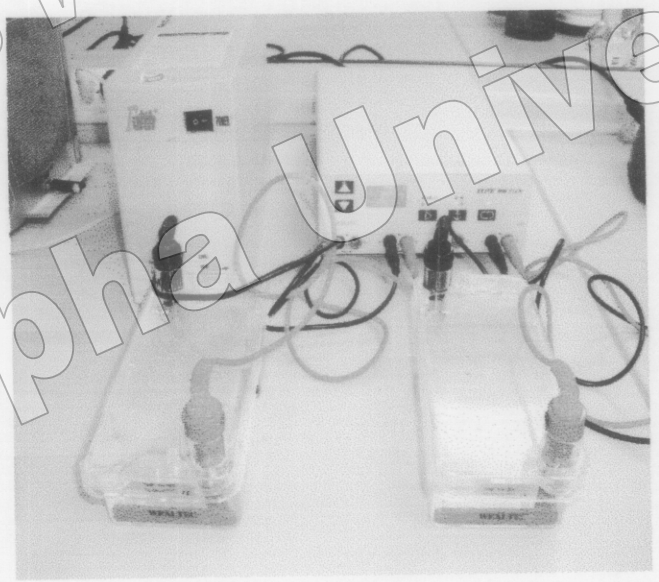
ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการศึกษา

ภาพที่ ข-1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermo cycler (รุ่น PX2 Thermal) (Bio-active)

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University



ภาพที่ ข-2 เครื่อง UV transiluminator (Spectroline) (รุ่น Dolphin Series Gel Image version 1)



ภาพที่ ข-3 เครื่อง gel electrophoresis

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวเบ็ญจมาพร เพียรจัด
วัน เดือน ปี เกิด	21 กันยายน พ.ศ.2527
สถานที่เกิด	จังหวัดชลบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	79 หมู่ที่7 ต.ทุ่งนนทรี อ.เขาสมิง จ.ตราด

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2541	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสิงห์สมุทร
พ.ศ. 2545	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสิงห์สมุทร
พ.ศ. 2550	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) เทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ผลงานการร่วมกิจกรรม

พ.ศ. 2551	ฝึกอบรมบุคลิกภาพ ณ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
พ.ศ. 2549	ฝึกงานที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลฝั่งอันดามัน จ.ภูเก็ต
พ.ศ. 2549	ศึกษาดูงาน WenZhou Medical College และ Zhejiang Mariculture Research Institute ณ ประเทศจีน
พ.ศ. 2547	นิสิตวิทยากร ณ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University