


การใช้จีเอฟพีเป็นเครื่องหมายติดตามโพรไบโอติก *Bacillus* S11
ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*



นางสาวนิสา วงศ์ทางประเสริฐ

สถาบันวิทยบริการ


วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) AS A MARKER FOR
MONITORING A PROBIOTIC *Bacillus* S11 IN BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*



Miss Nisa Wongtangprasert

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science

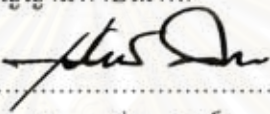
Chulalongkorn University

Academic Year 2006

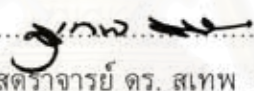
Copyright of Chulalongkorn University

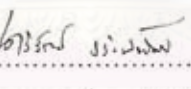
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้จีเอฟพีเป็นเครื่องหมายติดตามโพรไบโอติก <i>Bacillus S11</i>
	ในกุ้งกุลาดำ <i>Penaeus monodon</i>
โดย	นางสาวนิตา วงศ์ทางประเสริฐ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

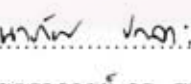
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเสวต)

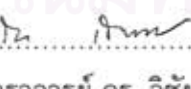
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย เชิดชีวะศาสตร์)

นิตา วงศ์ทางประเสริฐ : การใช้จีเอฟพีเป็นเครื่องหมายติดตามโพรไบโอติก *Bacillus* S11 ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. (THE USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) AS A MARKER FOR MONITORING A PROBIOTIC *Bacillus* S11 IN BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.ชนาภัทร ปาลกะ, 84 หน้า.

ติดฉลาก BS11 ด้วยโปรตีนจีเอฟพีเพื่อใช้ในการติดตาม BS11 โดยการนำพลาสมิด pAD44-12 ที่มียีน *gfpmut3a* เข้าสู่คอมพีเทนท์ BS11 ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ได้ BS11-GFP ซึ่งจะเห็นการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังจากการเลี้ยง BS11-GFP ไป 50 รุ่น ในอาหารเหลวที่ไม่มียาปฏิชีวนะเป็นตัวเลือก พบว่าความเสถียรของพลาสมิดใน BS11 เท่ากับ 77.85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสม BS11-GFP ในอาหารกุ้งในอัตราส่วนเซลล์สดต่ออาหารกุ้ง เท่ากับ 1:3 ได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^5 CFU/กรัม และเมื่อนำอาหารกุ้งไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบ BS11-GFP ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีเขียว การเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสม BS11-GFP ในระดับบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าการเจริญของกุ้ง ปริมาณ BS11 ในน้ำ และปริมาณ BS11 ในลำไส้ ไม่มีความแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงด้วย BS11 แสดงว่ายีน *gfpmut3a* ไม่มีผลต่อคุณสมบัติของ BS11 และเมื่อตัดเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบ BS11-GFP ที่มีการเรืองแสงสีเขียวบริเวณผนังลำไส้กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11-GFP แสดงว่า BS11-GFP สามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร และสามารถเข้าไปติดเกาะกับผนังลำไส้กุ้งกุลาดำได้

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต..... นิตา วงศ์ทางประเสริฐ.....
ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ชนาภัทร ปาลกะ.....

477 23439 23 : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: BS11 / GFP / PROBIOTIC / BLACK TIGER SHRIMP

NISA WONGTANGPRASERT : THE USE OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) AS A MARKER FOR MONITORING A PROBIOTIC *Bacillus* S11 IN BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. TANAPAT PALAGA, 84 pp.

A green fluorescent protein (GFP) expressing plasmid, pAD44-12 carrying *gfpmut3a* gene, was introduced into competent *Bacillus* S11 (BS11) by electroporation for labeling BS11 in order to allow *in vivo* detection. Electrotransformation of BS11 resulted in clone BS11-GFP which fluoresce green under fluorescence microscope. Plasmid stability, during approximately 50 generations of growth without antibiotic selection, was 77.85 percent. BS11-GFP was mixed into shrimp feed at the ratio of 1:3 (wet cell weight per shrimp feed) to get final concentration $\sim 10^5$ CFU g⁻¹. Detectability of green fluoresce cells under fluorescence microscope from BS11-GFP mixed-feed shrimp was observed. After feeding shrimp 3 times daily in 400 liters cement tanks for 9 weeks, average shrimp weight, number of BS11 in cultured water and in shrimp's gut showed no difference between BS11-GFP treatment and BS11 treatment. These results suggest that *gfpmut3a* gene has no effect on BS11 properties and shrimp growth. Sections of shrimp's intestines prepared by following the procedure of histological techniques were examined under fluorescence microscope. Detection of green fluoresce BS11-GFP on the surface of intestines demonstrated that BS11-GFP in shrimp feed survived and adhered on shrimp intestines' surface.

Field of study.....Biotechnology..... Student's signature..... Nisa Wongtangprasert.....
Academic year.....2006..... Advisor's signature..... Sirirat Rengpipat.....
Co-advisor's signature..... Tanapat Palaga.....

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และ ข้อคิดเห็น ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุเทพ ธนียวัน ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบ รศ.ดร. ھرรรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ รศ.ดร. วิชัย เชิดชูวิศาสตร์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบ ตลอดจนให้ความคิดเห็น คำแนะนำ และช่วยแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ศ.ดร.วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสติก pTF6 ดร.นำชัย ชีววิวรรธน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสติก pBCgfp และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อ งานวิจัย และ Prof. Jo Handelsman ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสติก pAD44-12 มาใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดี ตลอดมา

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อ สถานที่ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ที่ให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเพื่อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยตลอดมา

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.กิงแก้ว วัฒนเสริมกิจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้กรุณาความรู้ เอื้อเพื่อสถานที่และเครื่องมือในการตัดเนื้อเยื่อ

กราบขอบพระคุณ อ.ดร.ต่อศักดิ์ ลีลานันท์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้กรุณาความรู้ เอื้อเพื่อสถานที่และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ น้อง ทุกคน ที่ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ชาย น้องชาย และญาติๆ ที่ให้กำลังใจ และ สนับสนุนข้าพเจ้าในทุกเรื่อง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	4
กึ่งกุลาดำ.....	4
1. ลักษณะโดยทั่วไป.....	4
2. วิวัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกึ่งกุลาดำระยะวัยอ่อน.....	5
3. วงจรชีวิต.....	7
4. ลักษณะนิสัย.....	8
5. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกึ่งกุลาดำ.....	8
6. โรคระบาด.....	9
โพรบิโอดิก.....	10
1. คำจำกัดความ.....	10
2. ลักษณะที่ดีของโพรบิโอดิก.....	10
3. ผลประโยชน์ที่เป็นไปได้ของโพรบิโอดิก.....	10
4. โพรบิโอดิกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	11
จีเอพี.....	13
1. โครงสร้างของจีเอพี.....	13
2. การเรืองแสงของจีเอพี.....	15
3. จีเอพีมีวแทนท์.....	15
4. ประโยชน์ของจีเอพี.....	17
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	18
3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ.....	18
3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ.....	19

3.3	แบคทีเรียและพลาสมิด.....	21
3.4	การเลี้ยงและการเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	22
3.5	การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ.....	22
3.6	การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	25
3.7	การนำพลาสมิดเข้าสู่ <i>E. coli</i> DH5 α	26
3.8	การนำพลาสมิดเข้าสู่ BS11.....	27
3.9	การตรวจดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	28
3.10	การหาความเสถียรของพลาสมิดในเซลล์ BS11.....	28
3.11	การเตรียมอาหารกึ่งกูลาดำผสมกับ BS11.....	28
3.12	เลี้ยงกึ่งกูลาดำในระดับบ่อปูนซีเมนต์.....	29
3.13	ติดตาม BS11 ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งและในลำไส้กึ่งหลังจากกินอาหารที่ผสม BS11.....	29
3.14	การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology.....	30
3.15	การวางแผนการทดลอง.....	30
4	ผลการทดลอง.....	32
	การเตรียมพลาสมิดที่มียีนจีเอฟพีและพลาสมิดควบคุม.....	33
	การเตรียม BS11 ที่มีพลาสมิด.....	41
	ผลการทดลองการผสม BS11 กับอาหารเลี้ยงกึ่งกูลาดำ.....	44
	ผลการทดลองเลี้ยงกึ่งกูลาดำในบ่อระดับ 400 ลิตร.....	46
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	51
	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	51
	สรุปผลการทดลอง.....	56
	ข้อเสนอแนะ.....	56
	รายการอ้างอิง.....	57
	ภาคผนวก.....	63
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	84

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	12
2	คุณสมบัติของจีเอฟพีมีวแทนท์แบบต่างๆ.....	16
3	แบคทีเรียและจีโนไทป์.....	21
4	พลาสมีดและจีโนไทป์/ ฟิโนไทป์.....	22
5	เปอร์เซ็นต์ความเสถียรของพลาสมีด pAD44-12 และ pAD.....	78
6	ปริมาณ BS11 เมื่อผสมในอาหารกุ้งกุลาดำ.....	78
7	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำ(กรัม) ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง.....	78
8	ปริมาณ BS11 ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการทดลอง.....	79
9	ปริมาณ BS11 ในลำไส้กุ้งกุลาดำ หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์.....	79
10	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ของน้ำหนักกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นเวลา 3, 6 และ 9 สัปดาห์ และการเปรียบเทียบเชิงซ้อนเพื่อจัดกลุ่มโดยใช้ค่าสถิติ Tukey.....	80

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพ	หน้า
1	ลักษณะภายนอกทั่วไปของกึ่งกุลาดำ..... 5
2	วงจรชีวิตของกึ่งกุลาดำ..... 8
3	กลไกการเกิดโครโมฟอร์ของจีเอฟพี..... 14
4	โครงสร้างของจีเอฟพี..... 14
5	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่ 395 และ 475 นาโนเมตร และสเปกตรัมการเปล่งแสง ของจีเอฟพีที่ 508 นาโนเมตร..... 15
6	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ pTF6 และ pGEM-7Zf(+) ที่ตัดด้วย เอนไซม์ <i>EcoRI</i> 32
7	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ pTG ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i> 33
8	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ pTG ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i> และ <i>BamHI</i> 34
9	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTG..... 34
10	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ pBCgfp และ pTG ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i> 35
11	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของพลาสมิดจากทรานสฟอร์แมนท์ที่ถูกตัด ด้วยเอนไซม์ <i>BamHI</i> 36
12	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTG ที่มียีน <i>gfp</i> แทรกในลักษณะกลับทิศ..... 37
13	ผลการตัดพลาสมิด pAD44-12 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..... 39
14	ผลการตัดพลาสมิด pAD ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์..... 40
15	แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pAD..... 40
16	ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ pAD44-12 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>HindIII</i> และ pAD ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>PstI</i> 41
17	ลักษณะเซลล์ของ BS11-GFP ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า..... 42
18	เปอร์เซ็นต์ความเสถียรของพลาสมิด pAD44-12 และ pAD ของ BS11-GFP และ BS11-pAD ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5xTSB ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นตัว คัดเลือกเป็นจำนวน 50 รุ่น..... 43

ภาพ	หน้า
19 ปริมาณ BS11 ที่ตรวจพบในอาหารกึ่งกูลาดำที่ผสม BS11 ในอัตราส่วนน้ำหนัก เซลล์เปียกต่อน้ำหนักอาหารกึ่งเท่ากับ 1:3.....	44
20 ลักษณะเซลล์ของ BS11-GFP ในอาหารกึ่ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า.....	45
21 น้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งกูลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์.....	46
22 ปริมาณ BS11 ที่ตรวจพบในน้ำเลี้ยงกึ่งกูลาดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยงกึ่ง.....	47
23 ปริมาณ BS11 ที่ตรวจพบในลำไส้กึ่งกูลาดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยงกึ่ง.....	48
24 เนื้อเยื่อบริเวณต่างๆลำไส้ของกึ่งกูลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11-GFP เป็น เวลานาน 9 สัปดาห์.....	49
25 แผนที่เรสตรিকชันของ pBCgfp.....	70
26 ผลการหาลำดับเบสของ <i>gfpmut2</i> ในพลาสมิด pBCgfp.....	71
27 แผนที่เรสตริกชันของ pTF6.....	72
28 แผนที่เรสตริกชันของ pGEM-7Zf(+)......	73
29 แผนที่เรสตริกชันของ pTG ที่มียีน <i>gfpmut2</i> แทรกในลักษณะกลับทิศ.....	74
30 แผนที่เรสตริกชันของ pAD44-12.....	75
31 ผลการหาลำดับเบสของ <i>gfpmut3a</i> ในพลาสมิด pAD44-12.....	76
32 growth curve ของ BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD.....	77

บทที่ 1

บทนำ

กุ้งทะเล โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดประเภทหนึ่งของประเทศไทยและเป็นอาหารที่นิยมทั่วโลก ทั้งในเอเชีย ยุโรป และอเมริกา โดยประเทศไทยเป็นผู้นำด้านการผลิตและส่งออกกุ้งทะเลแช่เยือกแข็งมากที่สุดติดต่อกันมานานหลายปีตั้งแต่ปี พ.ศ.2534 เป็นต้นมา โดยมีปริมาณการส่งออกในปี 2549 ประมาณ 338,410 เมตริกตัน มูลค่า 86,720 ล้านบาท⁽¹⁾ ซึ่งผลผลิตกุ้งจากประเทศไทยกว่าร้อยละ 99 เป็นผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงในฟาร์ม⁽²⁾ ทั้งนี้เพราะประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลสูง ประกอบกับมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยได้แก่ มีชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนที่อุดมสมบูรณ์ มีสภาพอากาศที่เหมาะสม มีพันธุ์กุ้งที่ดี มีวัตถุดิบที่จะใช้ทำอาหารกุ้งที่เพียงพอและราคาถูก และมีแรงงานที่มีความรู้ความชำนาญ

ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2545 สหภาพยุโรปได้กำหนดใช้นโยบายซีโรทอลเลอแรนซ์ (zero tolerance) หรือกฎสารตกค้างเป็นศูนย์ คือ ต้องไม่มีสารตกค้างเลยสำหรับอาหารที่นำเข้า จึงส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของไทย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันนิยมเลี้ยงแบบหนาแน่นและกึ่งหนาแน่น ส่งผลให้เกิดสภาวะเครียดและเกิดโรคระบาดในกุ้งได้ง่าย เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งจึงแก้ปัญหาโดยการผสมสารปฏิชีวนะในอาหารและน้ำก่อนและขณะเลี้ยงกุ้ง โดยหวังว่าจะสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหาในบ่อเลี้ยง ช่วยเพิ่มอัตราการรอดและช่วยเพิ่มน้ำหนักของกุ้ง แต่ผลเสียที่สำคัญคือ เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อกุ้ง ทำให้กุ้งจากประเทศไทยถูกกีดกันทางการค้าจากตลาดต่างประเทศ

จากความเข้มงวดในการตรวจสอบสารตกค้างดังกล่าว จึงมีแนวคิดที่จะใช้จุลินทรีย์ต่อสู้กับจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ ในรูปผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์แบบต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายอินทรีย์สารต่างๆ ในบ่อ ช่วยปรับสภาพและควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง และยังช่วยควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่อยู่ในน้ำเช่นแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอได้ รวมถึงการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อจากกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารมาใช้ผสมในอาหารกุ้ง เมื่อกุ้งกินเข้าไปจุลินทรีย์นี้จะยังคงมีชีวิตอยู่ในทางเดินอาหาร ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง ช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้การย่อยอาหารของกุ้งมีประสิทธิภาพดีขึ้น มีการขับถ่ายของเสียออกมาปริมาณน้อยลง ส่งผลให้ได้ผลผลิตกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงและปราศจากสารปฏิชีวนะตกค้าง

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นำไปใช้ในกุ้งกุลาดำยังมีการศึกษาอยู่จำนวนน้อย เช่น *Thalassobacter utilis*⁽³⁾ และ *Bacillus* spp.^(4, 5, 6) ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และคณะ^(5, 7, 8, 9, 10) ศึกษาการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (BS11) ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดีจากอ่าวไทยเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำ จากการใช้ BS11 เสริมในอาหารกุ้ง

กุลาดำและเลี้ยงกุ้งทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับทดลองภาคสนาม พบว่า BS11 มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดี สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ทำให้น้ำหนักตัวและการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า BS11 ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยการตอบสนองผ่านเซลล์และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ

จีเอฟพี (green fluorescent protein, GFP) เป็นโปรตีนที่แยกได้จากพวก Coelenterates เช่น แมงกะพรุนทะเล Pacific jellyfish (*Aequoria victoria*) มีขนาดโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 ตัว⁽¹¹⁾ สามารถเรืองแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่น 508 นาโนเมตรได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงสีน้ำเงินความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร⁽¹²⁾

ข้อดีของจีเอฟพี คือ การเรืองแสงเกิดขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยพลังงานจากเซลล์ สามารถเรืองแสงได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องมีโคแฟกเตอร์หรือสารตั้งต้นใดๆ และความเข้มของการเรืองแสงไม่ลดลง จีเอฟพีไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์หรือการแสดงออกของยีนอื่น และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถแสดงออกได้ทั้งในเซลล์ยูคาริโอตและโปรคาริโอตเช่น เซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ ราเมือก พืช แมลงหวี่ ปลาหมึก ปลา หรือ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นจึงมีการนำจีเอฟพีไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางได้แก่ ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามเซลล์ที่มีชีวิต ใช้ในการติดตามการแสดงออกของยีน ติดตามโปรตีนในเซลล์ที่มีชีวิต และเป็นเครื่องหมายสำหรับติดตามเซลล์ที่ถูกทรานส์ฟอร์ม^(13, 14, 15, 16)

เนื่องจากการเรืองแสงของจีเอฟพีต้องอาศัยเวลา 1-2 ชั่วโมงหลังจากที่โปรตีนถูกสร้างขึ้น และให้แสงที่มีความเข้มต่ำ⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้เซลล์ยูคาริโอตหลายชนิดไม่สามารถสร้างจีเอฟพีได้ในปริมาณสูง⁽¹⁸⁾ เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้จึงมีการปรับปรุงโมเลกุลจีเอฟพี เพื่อให้ได้จีเอฟพีที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น Cormack และคณะ⁽¹⁷⁾ ได้ทำมิวแทนต์ยีนประมวลรหัสจีเอฟพีโดยใช้วิธี oligodirected mutagenesis ทำให้ได้จีเอฟพีมิวแทนต์ คือ GFPmut3a ที่มีความเข้มของการเรืองแสงสูงกว่าจีเอฟพีเดิมถึง 21 เท่า เนื่องจากกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 65 และ 72 ของโมเลกุลจีเอฟพีเปลี่ยนจากซีรีน (Serine) ไปเป็นไกลซีน (Glycine) และอะลานีน (Alanine) ตามลำดับ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ของ GFPmut3a มีการม้วนพับอย่างมีประสิทธิภาพ และอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ได้มากขึ้น

เซลล์ที่ผลิตจีเอฟพีจะถูกตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) หรือติดตามได้โดยใช้เทคนิค fluorescence activated cell sorting (FACS) ด้วยเครื่อง flow cytometer⁽¹⁸⁾ และเมื่อผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต โคลิของแบคทีเรียที่สร้างจีเอฟพีบนจานเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะเรืองแสงสีเขียว

ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเวกเตอร์ที่มียีนประมวลรหัสจีเอฟพีเข้าสู่เซลล์ BS11 เพื่อเป็นการติดตาม BS11 ด้วยจีเอฟพี ทำให้ได้ BS11 ที่สามารถเรืองแสงสีเขียวได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นจะติดตาม BS11 ในลำไส้กุ้งหลังจากที่กุ้งได้รับอาหารผสม BS11

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมในการทรานสฟอร์มแบคทีเรียโพรไบโอติก BS11 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน และเพื่อสร้างทรานสฟอร์มแมนท์ของ BS11 ที่มียีนจีเอฟพีเป็นเครื่องหมายในการติดตามการอยู่รอดของ BS11 ในอาหารกุ้งและในระบบการเลี้ยงกุ้ง และข้อมูลที่ได้ยังเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงกลไกการทำงานของ BS11 ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

กุ้งกุลาดำ

1. ลักษณะโดยทั่วไป

กุ้งกุลาดำ หรือ กุ้งทะเล หรือ กุ้งม้าลาย เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในชั้นครัสเตเชีย (Class Crustacea) เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อภาษาอังกฤษคือ Black tiger shrimp หรือ Giant tiger prawn หรือ Tiger prawn หรือ Jumbo tiger prawn⁽¹⁹⁾

กุ้งกุลาดำจัดเป็นกุ้งขนาดใหญ่ มีเปลือกหุ้มตัวลักษณะเรียบและมันเงาอยู่ภายนอก ลำตัวสีม่วงแดง โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ ถ้าจับจากทะเลลึกใหม่ๆ จะเห็นลำตัวเป็นสีแดงสดและมีวงแหวนสีขาวสลับดำ ในแต่ละปล้องตลอดลำตัว เปลือกหุ้มส่วนหัวมีลักษณะเกลี้ยง หนวดมีสีเทาปนเขียวหรือน้ำตาลไม่มีลาย รยางค์มักจะมีสีน้ำตาลและมีขนสีแดงอยู่โดยรอบ อย่างไรก็ตามสีของกุ้งนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปได้ตามการปรับตัวและสภาพแวดล้อม เช่น ความเค็มและความลึกของระดับน้ำ โดยมักจะพบว่ากุ้งในเขตน้ำกร่อยที่ไม่ลึกมากมีสีน้ำตาลเข้ม กุ้งที่เลี้ยงในบ่อมีสีจางซีด นอกจากนี้สีของกุ้งจะเปลี่ยนแปลงตามระยะการลอกคราบด้วย โดยจะเห็นว่ากุ้งที่ลอกคราบใหม่ๆ สีจะซีดไม่สดใส กุ้งที่กำลังลอกคราบสีก็จะจางลงกว่าปกติ เป็นต้น

ลำตัวกุ้งมีลักษณะเป็นข้อปล้องรวม 19 ปล้อง โดยแต่ละปล้องมีรยางค์หนึ่งคู่ ทำหน้าที่เฉพาะต่างกันออกไป ลำตัวกุ้งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง โดยส่วนหัวและส่วนอกจะรวมเป็นส่วนเดียวกันอยู่ภายใต้เปลือกคลุมหัว (ซึ่งโดยทั่วไปจะเรียกรวมๆ ว่าส่วนหัว) ซึ่งมีอวัยวะภายในต่างๆ เรียงตัวกันอยู่

รยางค์ที่ส่วนหัว มี 5 คู่ประกอบด้วย

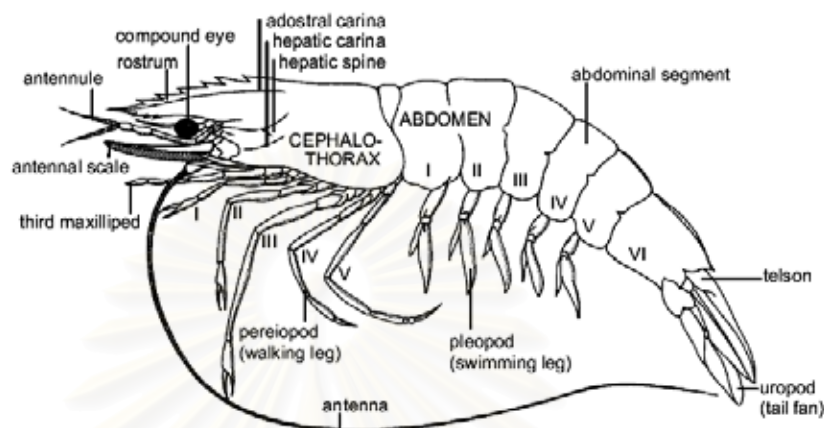
1. หนวดคู่สั้น (antennule) มีปลาย 2 แฉก มีหน้าที่ทำความสะอาด
2. หนวดคู่ยาว (antenna) ซึ่งใช้สัมผัสรับความรู้สึกทางทิศทางการว่ายน้ำและช่วยในการหาอาหารด้วย

3. รยางค์ส่วนปาก ขากรรไกรบนล่างใช้ขบเคี้ยวบดอาหารมีรวม 3 คู่

รยางค์ส่วนอกมี 8 คู่ประกอบด้วย

1. แมกซิลลิเพด (maxillipeds) 3 คู่แรก ทำหน้าที่ช่วยในการจับและกินอาหาร
2. ขาเดิน หรือเพอริโอพอด (periopods) มี 5 คู่ ทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่และต่อสู้ป้องกันตัว โดยขาเดิน 3 คู่แรก ปล้องส่วนปลายจะมีลักษณะเป็นก้าม ส่วน 2 คู่หลังมีปลายแหลมตามปกติ

รยางค์ส่วนท้อง มี 6 คู่ รยางค์ส่วนท้องนี้เรียกรวมกันว่า "ขาว่ายน้ำ" ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ พัดโบกให้เคลื่อนที่มี 5 คู่ในแต่ละปล้องแต่คู่สุดท้ายจะเปลี่ยนสภาพไปเป็นแพนหาง (uropod) ติดกับหาง (telson) ทำหน้าที่กำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของกุ้ง แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกทั่วไปของกุ้งกุลาดำ⁽²⁰⁾

2. วิวัฒนาการและการเปลี่ยนรูปร่างของกุ้งกุลาดำระยะวัยอ่อน

1. ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะหนึ่ง (ระยะหอยเพเลียส) ลูกกุ้งที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ จะมีขนาดเล็ก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทั้งหมด 6 ครั้งดังต่อไปนี้

หอยเพเลียสที่ 1 ขนาดลำตัวประมาณ 0.30 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม หัวโตเรียวเล็กไปทางด้านหาง มีรยางค์ 3 คู่ มีตาอันเดียวอยู่ระหว่างรยางค์คู่ที่ 1

หอยเพเลียสที่ 2 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.30 - 0.36 มิลลิเมตร รยางค์เริ่มแบ่งออกเป็นปล้อง หนามปลายหางใหญ่ และยาวออก

หอยเพเลียสที่ 3 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.36 - 0.38 มิลลิเมตร เริ่มปรากฏฐานของรยางค์ท้อง ปลายหางเรียวเล็ก มีหนาม 3 คู่

หอยเพเลียสที่ 4 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.36 - 0.40 มิลลิเมตร ปลายของรยางค์ท้องแยกออกเป็นสองแฉก มีหนามที่ปลายหาง 4 คู่

หอยเพเลียสที่ 5 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.40 - 0.44 มิลลิเมตร เริ่มมีเปลือกหัวขากรรไกรกลม ลำตัวยาวออก ปลายหางแยกเป็น 2 แฉก

หอยเพเลียสที่ 6 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 0.42 - 0.50 มิลลิเมตร เปลือกหัวใหญ่ขึ้น ขากรรไกรยาวออกมีหนามที่ปลายหาง 7 คู่

การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดจะเกิดขึ้นภายในเวลา 40 - 50 ชั่วโมง โดยในระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร อาหารส่วนใหญ่จะได้จากถุงอาหารที่ติดตัวมาและจะมีชีวิตส่วนใหญ่อยู่ตามหน้าดิน

2. ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สอง (โปรโตซัวเอีย) ในระยะนี้ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆ ลอยตัวขึ้นสู่น้ำและเริ่มกินอาหาร โดยอาหารของลูกกุ้งส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงก์ตอนพืชเล็กๆ ลูกกุ้งจะเดินทางเข้าหาฝั่งและจะอยู่ในระยะที่สองประมาณ 4 วัน ในช่วง 4 วันนี้ลูกกุ้งจะมีการเปลี่ยนแปลงลอกคราบสามครั้ง โดยแต่ละครั้งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างดังนี้คือ

โปรโตซัวเอียที่ 1 ขนาดลำตัวยาว 0.85 – 1.00 มิลลิเมตร ลำตัวแบ่งออกเป็นสามส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ส่วนอกแยกเป็น 6 ปล้อง ส่วนหัวมีเปลือกคลุมตลอด ตายังอยู่ในเปลือกมองเห็นเป็นจุดดำ แยกออกเป็น 2 ตา แต่ยังไม่มีการวางไข่ที่ 3 เปลี่ยนหน้าที่จากการช่วยในการว่ายน้ำมาทำหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ปลายหางมีหนาม 7 คู่ ระบบทางเดินอาหารเห็นได้ชัดเจนตลอดลำตัว

โปรโตซัวเอียที่ 2 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 1.20 – 1.40 มิลลิเมตร ตาโผล่พ้นเปลือกหัว มีก้านตายาว กริแหลมยื่นไปข้างหน้า ระหว่างตามีหนาม 1 คู่ บนเปลือกหัว เปลือกหัวเริ่มขยายออกคลุมส่วนอกและที่ส่วนท้องเริ่มแบ่งเป็น 5 ปล้อง ส่วนหางแยกเป็นสองแฉกและมีขนข้างละเจ็ดเส้น

โปรโตซัวเอียที่ 3 ขนาดลำตัวยาวประมาณ 1.50 – 2.00 มิลลิเมตร แพนหางชั้นนอกมีขนาดใหญ่กว่าแพนหางชั้นใน รอบๆ แพนหางมีขน มีรยางค์ว่ายน้ำเกิดขึ้นที่ปล้องอกทั้ง 5 ปล้อง

3. ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สาม (ระยะไมซิส) ลูกกุ้งในระยะนี้สามารถมองเห็นได้ชัดเจนและมีลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น ระยะนี้กินเวลาประมาณ 7 วัน และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบ่งย่อยอีก 3 ระยะ คือ

ไมซิสที่ 1 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกัน รยางค์ออกยังคงทำหน้าที่ว่ายน้ำ ปลายรยางค์แบ่งเป็น 2 แฉก ส่วนท้องแบ่งออกเป็น 6 ปล้อง หนามบนปล้องท้องที่ 1 และ 2 หายไป ปลายหางมีหนาม 8 คู่ หนวดคู่ที่ 1 แบ่งเป็น 3 ปล้อง ปลายหางเป็นสองแฉก ลำตัวมีความยาวประมาณ 2.50 – 3.00 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 2 ส่วนหัวกับส่วนอกเชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ มีเปลือกหัวคลุมตลอดรยางค์คู่ที่ 1 ถึง 3 ตรงปลายเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ รยางค์ว่ายน้ำที่ปล้องท้องเจริญขึ้น หนามบนปล้องที่ 3 หายไป หางเว้าเล็กน้อย ลำตัวมีความยาวประมาณ 3.00 – 3.45 มิลลิเมตร

ไมซิสที่ 3 ขาวว่ายน้ำเจริญขึ้น แบ่งออกเป็น 2 ปล้อง มีพินกรี 1 - 2 อัน ที่สันกรีบ ลำตัวมีความยาวประมาณ 4.04 – 4.50 มิลลิเมตร

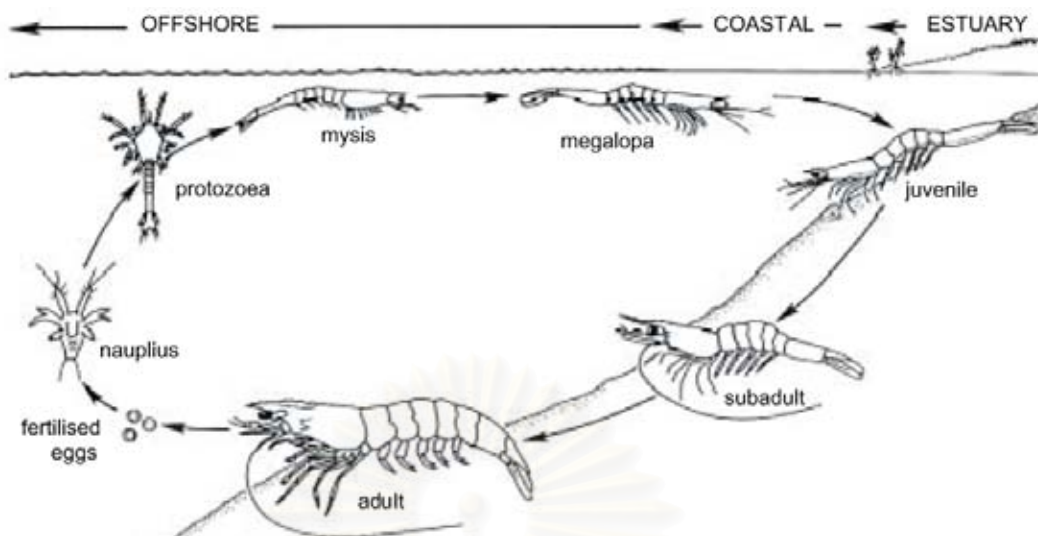
4. ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะที่สี่ (ระยะโพสลาวา) เป็นระยะตัวอ่อนขั้นสุดท้าย ลำตัวของลูกกุ้งจะยาวประมาณ 5.50 มิลลิเมตร มีรยางค์ครบเหมือนตัวเต็มวัยและมีวิวัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น โดยแบ่งเป็น 25 ระยะ ภายใน 25 วัน เรียกว่าโพสลาวาที่ 1 (พี 1) เรื่อยไปถึง

โพสลาวาที่ 25 (พี 25) หลังการลอกคราบแต่ละครั้งรูปร่างลักษณะจะเปลี่ยนแปลงสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ลูกกุ้งจะมีสีเหลืองใส มีลายหรือจุดเกิดขึ้น นามบนลำตัวหายไปหมด

การลอกคราบ เปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้ ดังนั้นในการเจริญเติบโตเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเปลือกเก่าทิ้งไป แล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน เรียกขั้นตอนนี้ว่า “การลอกคราบ” กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และจะลอกคราบไปตลอดชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งตัวโดยเร็วเมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมด ลำตัวจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 3 - 8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งอยู่ภายใต้การควบคุมของระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมน 2 ชนิดที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น แต่โดยทั่วไปนั้นการลอกคราบของกุ้งมักขึ้นกับปัจจัยหลายๆ ด้านด้วย เช่น วัยของกุ้ง อาหาร แสง และอุณหภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับกุ้งจะลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 20 - 30 วัน

3. วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำมีอายุขัยประมาณ 18 - 24 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30 - 40 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเล ไข่จะเกิดการปฏิสนธิในน้ำโดยการพัดโบกไปมาของขาวายน้ำ ไข่ที่ผสมแล้วจะฟักออกเป็นลูกกุ้งวัยอ่อน และเคลื่อนเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง พร้อมทั้งเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยวิธีลอกคราบ⁽²¹⁾ เป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะต่างๆ ดังนี้ ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะแรกจะฟักออกจากไข่ภายในเวลา 14 - 15 ชั่วโมง เรียกวัยอ่อนระยะแรกว่า นอเพลียส (Nauplius) มี 6 ระยะ ผ่านการลอกคราบ 5 ครั้ง เป็นเวลา 48 - 56 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 2 เรียกว่า ระยะโซเอีย (Zoea) มีการลอกคราบ 3 ครั้งภายในเวลา 4 - 5 วัน จึงพัฒนารูปร่างเข้าสู่ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่ 3 เรียกว่า ระยะไมซิส (Mysis) ซึ่งจะมีการลอกคราบ 3 ครั้ง เป็นเวลา 4 - 5 วัน จึงเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะสุดท้าย เรียกว่า ระยะโพสลาวา (Postlarvae) หรือระยะกุ้งคว่ำ มีลักษณะเหมือนกุ้งตัวเต็มวัย นับตั้งแต่เป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะโพสลาวาวันแรกใช้เวลาประมาณ 3 - 4 เดือน จึงจะเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่น (Juvenile) และมีการพัฒนาเฉพาะเรื่องของขนาดเท่านั้น ส่วนรูปร่างต่างๆ เหมือนเดิม⁽²²⁾ เมื่อพัฒนาเป็นกุ้งโตเต็มวัย (Adult) จึงเดินทางสู่ทะเลลึกเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป และกลับมาวางไข่ เป็นวงจรชีวิต เช่นนี้ตลอดไปจนกว่าจะหมดอายุขัย วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ⁽²³⁾

4. ลักษณะนิสัย

กุ้งกุลาดำสามารถเลี้ยงในบ่อให้โตได้ถึง 150 – 200 กรัม โดยมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในระยะเวลา 3 – 4 เดือน กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงสภาพของน้ำในบ่อได้เร็ว และอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีช่วงความเค็มค่อนข้างกว้าง คือประมาณ 0.2 – 70 ส่วนในหนึ่งพัน แต่จะโตเร็วในน้ำที่มีช่วงความเค็มระหว่าง 15 – 30 ส่วนในหนึ่งพัน

กุ้งกุลาดำสามารถกินอาหารได้ทั้งที่เป็นพืชและสัตว์ แต่ชอบที่จะกินเนื้อสัตว์มากกว่า โดยมีประสิทธิภาพคือหนวด กุ้งจะกินอาหารที่อยู่บริเวณหน้าดินโดยใช้ขาเดินคู่ที่ 1 หรือ 2 จับอาหารและแทะกิน ดังนั้นอาหารกุ้งจึงควรมีลักษณะที่จมน้ำละลายน้ำได้ช้า กุ้งกุลาดำไม่ใช่สัตว์สังคมนิสัยยึดครองอาหารไม่แบ่งปันกัน นอกจากนี้ในช่วงเวลาที่กุ้งลอกคราบกุ้งจะหยุดกินอาหารและจะกินมากหลังจากที่ลอกคราบเสร็จใหม่ๆ

5. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ⁽¹⁹⁾

1. อุณหภูมิในน้ำ 25 – 30 องศาเซลเซียส
2. ความเค็มของน้ำ 15 – 30 ส่วนในพันส่วน
3. ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่น้อยกว่า 3 – 5 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
4. พีเอชของน้ำ 7.5 - 8.5
5. แอมโมเนีย ไม่ควรเกิน 0.1 ส่วนในล้านส่วน
6. ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่ควรเกิน 0.033 ส่วนในล้านส่วน⁽²⁴⁾
7. ธาตุอาหารในน้ำ ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ ซิลิกา ไม่ควรมีมากเกินไป
8. ปราศจากสารพิษต่างๆ ในน้ำ ได้แก่ ยาปราบวัชพืช ยาฆ่าแมลง และโลหะหนักจำพวกปรอท ทองแดง สังกะสี แคดเมียม และอื่นๆ
9. ความขุ่นใสของน้ำ ไม่ควรเกิน 25 ส่วนในล้านส่วน

10. สภาพพื้นบ่อไม่ควรเน่าเสีย ป้องกันโดยดูแลควบคุมการให้อาหาร และควบคุมปริมาณของแพลงก์ตอนพืชในบ่อ

6. โรครระบาด⁽²⁵⁾

1. สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุการตายของกุ้งที่สำคัญและพบอุบัติการณ์เชื้อก่อโรคเกิดการต้อยาสูงขึ้นเรื่อยๆ

วิบริโอซิส (Vibriosis) เป็นโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งที่เกิดจากแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้แก่

- *Vibrio harveyi* (สาเหตุโรคเรืองแสง)
- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Vibrio vulnificus* (สาเหตุโรคเสียนดำ)
- *Vibrio splendidus*

นอกจาก *Vibrio* sp. แล้วอาจเกิดจาก *Aeromonas* sp. ได้แก่เล็กน้อย

2. สาเหตุเกิดจากไวรัส

โรคติดเชื้อไวรัสเป็นโรคที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ไวรัสที่ก่อโรครังในประเทศไทยได้แก่

- *Penaeus monodon baculovirus* (MBV)
- Lymphoid organ virus
- Infectious hematopoietic and hypodermal necrosis virus (IHHNV)
- Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV)
- Yellow head virus (YHV)
- Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV)

3. สาเหตุเกิดจากเชื้อรา

โรคติดเชื้อรามักจะเป็นโรคฉวยโอกาสไม่ค่อยก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจมากนัก เชื้อราที่ก่อโรครังได้แก่

- *Lagenidium* sp.
- *Fusarium* sp.

4. สาเหตุเกิดจากพยาธิ

พยาธิภายนอก ได้แก่

- *Zoothamnium* sp.
- *Epistylis* sp.
- *Vorticella* sp.
- *Acineta* sp.

พยาธิภายใน ได้แก่

- *Agmasoma penaei* (microsporidian)

โพรไบโอติก

1. คำจำกัดความ

โพรไบโอติก (probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” (for life)⁽²⁶⁾ Metchnikoff (1907) ถือว่าเป็นผู้ให้กำเนิดโพรไบโอติก มีผลงานตีพิมพ์ในหนังสือ *The Prolongation of Life*⁽²⁶⁾ หลังจากนั้นคำว่าโพรไบโอติก ถูกนำไปใช้ในหลายๆ ทางด้วยกัน และมีผู้ให้คำจำกัดความต่างๆ กัน คือ

Lilly และ Stillwell⁽²⁷⁾ หมายถึง “สารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และมีผลกระตุ้นการเจริญของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง”

Parker⁽²⁸⁾ หมายถึง “จุลินทรีย์และสารที่ช่วยปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร”

Fuller⁽²⁹⁾ หมายถึง “จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมในอาหาร และให้ผลประโยชน์แก่สัตว์เจ้าบ้าน(host) โดยช่วยเสริมจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์นั้นๆ ให้อยู่ในสภาพที่สมดุล”

Havenaar และ Huis in't Veld⁽³⁰⁾ หมายถึง “จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เพาะเลี้ยงเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดี่ยวหรือแบบผสม นำไปเสริมให้กับสัตว์และคน แล้วมีผลประโยชน์ต่อสัตว์และคนนั้นๆ โดยช่วยเสริมคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น”

2. ลักษณะที่ดีของโพรไบโอติก^(29, 30)

2.1 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลประโยชน์ต่อตัวสัตว์ที่ได้รับโพรไบโอติก เช่น เพิ่มการเจริญเติบโต หรือต้านทานการเกิดโรค

2.2 ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค จุลินทรีย์โพรไบโอติกและองค์ประกอบของเซลล์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ของเซลล์ต้องไม่สร้างปฏิกิริยาที่เป็นพิษหรือก่อมะเร็งกับตัวเจ้าบ้าน

2.3 อยู่ในลักษณะเซลล์ที่มีชีวิต และมีปริมาณมากพอ

2.4 สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีระดับพีเอชต่ำ

2.5 สามารถเจริญ และ/หรือ ตั้งรกราก ในระบบทางเดินอาหารได้

2.6 ผลิตง่าย สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานภายใต้สภาพการเก็บรักษา หรือเมื่อนำไปผสมอาหาร

2.7 เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่ ไม่มีการถ่ายทอดพลาสมิด

3. ผลประโยชน์ที่เป็นไปได้ของโพรไบโอติก⁽²⁹⁾

3.1 ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดย:

3.1.1 สร้างสารต่อต้านจุลชีพ

3.1.2 แย่งอาหารกับจุลินทรีย์อื่น

3.1.3 แยมพื้นที่จับกับผนังทางเดินอาหาร

3.2 เปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร

3.2.1 เพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีประโยชน์ เช่น β -galactosidase ที่ช่วยบรรเทาภาวะที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในระบบทางเดินอาหารได้

3.2.2 ลดประสิทธิภาพของเอนไซม์บางชนิด เช่น β -glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็ง โดยปล่อยสารก่อมะเร็งในทางเดินอาหาร

3.3 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

3.3.1 เพิ่มระดับแอนติบอดี (antibody)

3.3.2 เพิ่มประสิทธิภาพของแมคโครฟาจ (macrophage)

4. โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

โพรไบโอติกมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ใช้ได้ผลทั้งในมนุษย์⁽³¹⁾ และสัตว์บก เช่น สุกร วัว แพะ และ ไก่^(26, 32) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการใช้โพรไบโอติกไม่แพร่หลายนัก โดยเริ่มมีการใช้โพรไบโอติกภายใน 10 ปีที่ผ่านมา วัตถุประสงค์การนำมาใช้คือเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีการใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชนิดสัตว์น้ำ	จุลินทรีย์โพรไบโอติก	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค	ผลการศึกษา	รายการอ้างอิง
ปลาซัลมอน	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Vibrio salmonicida</i> <i>Yersinia ruckeri</i> type I	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin และคณะ (1992)
ปลาซัลมอน	<i>Pseudomonas fluorescens</i> สายพันธุ์ F19/3	<i>A. salmonicida</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Smith และ Savey (1993)
หอยนางรม (ระยะตัวอ่อน)	CA 2	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดสูง	Douillet และ Langdon (1994)
ปลาซัลมอน	<i>V. alginolyticus</i>	<i>A. salmonicida</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. ordalii</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Austin และคณะ (1995)
ปลาซัลมอน	<i>L. plantarum</i> (สามารถยับยั้ง <i>V. anguillarum</i>)	<i>A. salmonicida</i>	- ไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่ <i>L. plantarum</i> สามารถตั้งรกรากเกาะที่ผนังลำไส้	Gildberg และคณะ (1995)
ปลา flounder	<i>Lactobacillus</i> สายพันธุ์ DS12	ไม่ได้วิเคราะห์	- กระตุ้นการเจริญเติบโต	Byun และคณะ (1997)
หอยแครง (ระยะตัวอ่อน)	<i>Vibrio</i> sp.	<i>V. anguillarum</i> related (VAR) pathogen	- ควบคุมโรคได้ดี	Riquelme และคณะ (1997)
กุ้งกุลาดำ	<i>Bacillus</i> sp.	ไม่ได้วิเคราะห์	- มีอัตราการรอดสูง	Moriarty (1998)
กุ้งกุลาดำ	<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11	<i>V. harveyi</i>	- กระตุ้นการเจริญเติบโตและมีอัตราการรอดสูง - ควบคุมโรคได้ดี	Rengpipat และคณะ (1998a)
ปลา rainbow trout	<i>P. fluorescens</i> สายพันธุ์ AH2	<i>V. anguillarum</i>	- ควบคุมโรคได้ดี	Gram และคณะ (1999)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rengpipat และคณะ⁽³³⁾

วรรณิกา เพ็ญนภักตร์⁽⁷⁾ ศึกษาการใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้งกุลาดำเป็นครั้งแรก โดยใช้ *Bacillus* สายพันธุ์ S11 (BS11) ที่แยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ผสมในอาหารกุ้ง และเลี้ยงกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา 30 เป็นเวลา 100 วัน พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ผสม BS11 จะมีการเจริญเติบโต อัตราการรอดและความต้านทานต่อโรคสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับอาหารที่ผสม BS11 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สมบัติ รักประทานพร⁽³⁴⁾ รายงานการใช้ BS11 ในการเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ โดยทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อที่มีระบบหมุนเวียนแบบปิดเป็นเวลา 90 วัน พบว่าน้ำหนักรวมและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งระยะโพสลาวากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม BS11 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการกลืนและทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยวิธีฟาโกไซโทซิส ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ฟาโกไซโทซิส ฟาโกไซโทซิสอินเดกซ์ และปริมาณฟีนอลออกซีเดสในเม็ดเลือดกุ้งกลุ่มที่ได้รับการเสริมโปรไบโอติก BS11 ยังเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่า BS11 นอกจากจะเร่งการเจริญเติบโต ยังอาจทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำด้วย

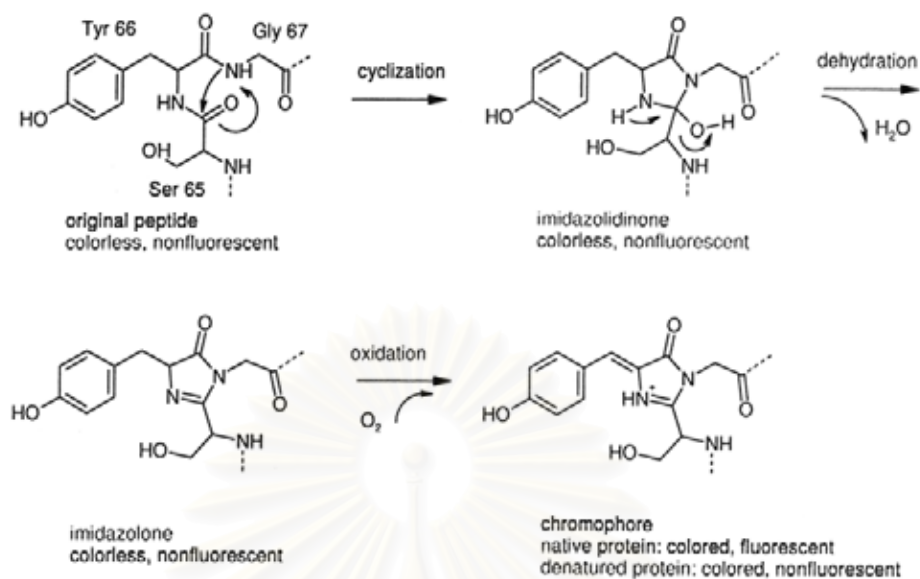
อรุณ ธีชญานันท์⁽³⁵⁾ รายงานการใช้ BS11 เสริมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในระดับทดลองภาคสนาม ในบ่อดินขนาด 1,000 ตารางเมตร พบว่า BS11 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำระยะโพสลาวา โดยมีผลเพิ่มน้ำหนักตัวและการรอดชีวิตมากกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม และผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองเลี้ยงกุ้งในกระชังขนาด 2 ตารางเมตร เป็นเวลา 100 วัน และจากการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วย *V. harveyi* สายพันธุ์ 1526 พบว่ากุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม BS11 มีอัตราการตายสะสมน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม

จีเอฟพี

จีเอฟพี (green fluorescent protein, GFP) เป็นโปรตีนที่เรืองแสงได้ด้วยตัวเอง พบในแมงกะพรุนทะเล (*Aequoria victoria*) หรือ ดอกไม้ทะเล (*Renilla reniformis*)⁽¹⁶⁾ ค้นพบโดย ดร. Shimamura ในปีค.ศ. 1961

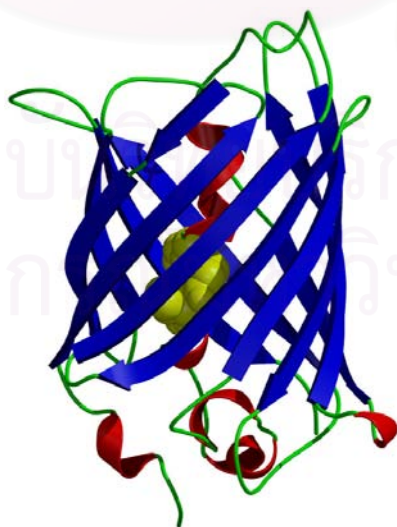
1. โครงสร้างของจีเอฟพี

Prasher และคณะ⁽¹⁶⁾ สร้าง cDNA ของจีเอฟพี และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีเอฟพี พบว่าจีเอฟพีประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 หน่วย มีขนาดประมาณ 27 กิโลดาลตัน โดยกรดอะมิโนในลำดับที่ 65-67 คือ ซีรีน-ไทโรซีน-ไกลซีน จะมีการจัดเรียงโมเลกุลโดยอาศัยปฏิกิริยา cyclization, dehydration และ oxidation เกิดเป็น *p*-hydroxybenzylidene-imidazolinone ซึ่งเป็นโครโมฟอร์ของจีเอฟพี การเกิดโครโมฟอร์แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงกลไกการเกิดโครโมฟอร์ของจีเอฟพี (คัดลอกจาก Palm G. J. และคณะ⁽³⁶⁾)

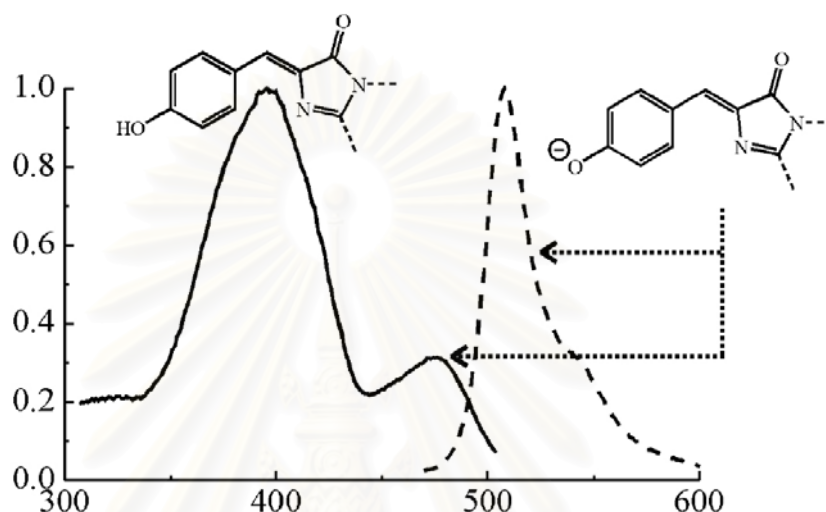
โครงสร้างของจีเอฟพีประกอบด้วยสายเพปไทด์แบบแผ่นพับบีตา (β -sheet) 11 สายเรียงตัวแบบ antiparallel จนเกิดเป็นโครงสร้างทรงกระบอก (cylinder) ในช่วงบนและล่างของแผ่นพับบีตายังมีสายเพปไทด์แบบเกลียวอัลฟา (α -helix) ทำหน้าที่เสมือนเป็นโครงให้กับโครโมฟอร์ ซึ่งจะอยู่บริเวณกลางของทรงกระบอก การจัดเรียงตัวของเพปไทด์ในลักษณะนี้ทำให้เกิดโปรตีนคลาสใหม่⁽¹⁵⁾ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครงสร้างของจีเอฟพี ลูกศรแสดงโครงสร้างรูปแผ่นพับบีตา มีปลายลูกศรชี้ไปทางปลาย C ของพอลิเพปไทด์ สีแดงแสดงโครงสร้างรูปเกลียว และสีเหลืองแสดงโครโมฟอร์⁽³⁷⁾

2. การเรืองแสงของจีเอฟพี

โครงสร้างของจีเอฟพีดังกล่าวทำให้จีเอฟพีมีคุณสมบัติเป็นฟลูออเรสเซนต์โปรตีน คือสามารถเกิดการเรืองแสงได้โดยอัตโนมัติ จีเอฟพีสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 395 นาโนเมตร และ 475 นาโนเมตร (ช่วงแสงสีน้ำเงิน) แล้วปลดปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่น 508 นาโนเมตร (ช่วงแสงสีเขียว) ได้⁽¹²⁾ แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง (เส้นทึบ) ที่ 395 และ 475 นาโนเมตร และสเปกตรัมการเปล่งแสงของจีเอฟพี (เส้นประ) ที่ 508 นาโนเมตร คัดลอกจาก Tsien และคณะ⁽¹²⁾

3. จีเอฟพีมีวแทนท์

จีเอฟพีสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 395 และ 475 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงคลื่นที่สั้นกว่าแหล่งกำเนิดแสงในอุปกรณ์ทั่วไป เช่น อาร์กอนเลเซอร์ในกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนฟोकอล (confocal scanning laser microscope) และในเครื่อง fluorescence activated cell sorting (FACS) ที่ให้ความยาวคลื่นประมาณ 488 นาโนเมตร^(17, 38) จีเอฟพีเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าความยาวคลื่นที่ฟิลเตอร์รับแสงในอุปกรณ์ทั่วไปรับได้⁽³⁹⁾ การเปล่งแสงของจีเอฟพีให้แสงที่มีความเข้มต่ำและต้องใช้เวลา 1 – 2 ชั่วโมงหลังจากที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้สร้างจีเอฟพี⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้เซลล์ยูคาริโอตหลายชนิดไม่สามารถสร้างจีเอฟพีได้ในปริมาณสูง⁽¹⁸⁾ จึงมีการปรับปรุงโมเลกุลจีเอฟพีโดยทำมิวแทนชันประมวลรหัสจีเอฟพี

ปีค.ศ.1996 Cormack และคณะ⁽¹⁷⁾ ทำมิวแทนชันประมวลรหัสจีเอฟพีโดยใช้วิธี oligodirected mutagenesis เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 20 ตัวบริเวณโครโมฟอร์ ทำให้ได้โมเลกุลจีเอฟพีมีวแทนท์ที่มีการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นสูงขึ้นคือ GFPmut3a ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 501 นาโนเมตร แล้วปลดปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่น 511 นาโนเมตร และมีการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร สูงกว่าจีเอฟพีเดิมถึง 21 เท่า เนื่องจากการดัดแปลงที่ตำแหน่ง 65 และ 72 ของโมเลกุลจีเอฟพี เปลี่ยนจากซีรีน (Serine) ไป

เป็นไกลซีน (Glycine) และอะลานีน (Alanine) ตามลำดับ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ของ GFPmut3a มีการม้วนพับอย่างมีประสิทธิภาพ และอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ได้มากขึ้น

ในปัจจุบันมีการทำมิวแทนชันของยีนจีเอฟพีจำนวนมาก เพื่อให้ได้จีเอฟพีมิวแทนท์ที่เหมาะสมกับการใช้งานที่หลากหลาย เช่น จีเอฟพีมิวแทนท์ที่เหมาะสมกับเจ้าบ้านชนิดต่างๆ, จีเอฟพีมิวแทนท์ที่มีความเข้มของการเรืองแสงมากขึ้น หรือ จีเอฟพีมิวแทนท์ที่ให้การเรืองแสงที่มีสีต่างจากเดิม เป็นต้น จีเอฟพีมิวแทนท์แสดงดังตาราง

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของจีเอฟพีมิวแทนท์แบบต่างๆ

Protein	Mutation	Excitation (nm)	Emission (nm)	Main features (intensity relative to wild type)
wGFP	None	395(470)	510	Wild type, green fluorescence
GFPmut1	F64L/S65T	488	507	Red-shifted excitation maximum(35x)
GFPmut2	S65A/V68L/S72A	481	507	Red-shifted excitation maximum(19x)
GFPmut3	S65G/S72A	501	511	Red-shifted excitation maximum(21x)
GFPuv	F99S/M153T/V163A	360-400	509	Optimally excited by UV light
sg12	Ala1b/F64L/Q80R	398	509	(9-12x)
sg11	Ala1b/F64L/Q80R/I167T/K238N	471	508	(19-38x)
sg25	Ala1b/F64L/S65C/Q80R/I167T/K238N	474	509	(50-100x)
d2EGFP	F64L/S65T	488	507	Destabilized mutant, human codon optimized(35x)
BFP	Y66H	383	447	Blue mutant
sg42	Ala1b/F64L/Y66H/Q80R	386	450	Blue mutant (27x)
sg49		386	450	Blue mutant (37x)
sg50	Ala1b/F64L/Y66H/Q80R/V163A	386	450	Blue mutant (63x)
EBFP	F64L/S65T/Y66H/Y145F	380	440	Blue mutant, human codon optimized (2-3x)
EYFP	S65G/V68L/S72A/T203Y	513	527	Yellow mutant, human codon optimized

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bermudez และคณะ⁽¹³⁾ และ Palm และ Wlodawer⁽³⁶⁾

4. ประโยชน์ของจีเอฟพี

เนื่องจากจีเอฟพีเป็นโปรตีนที่มีความเสถียร⁽¹⁶⁾ การเรืองแสงของจีเอฟพีเกิดขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยพลังงานจากเซลล์ ดังนั้นจึงเรืองแสงได้นานและตลอดอายุของเซลล์⁽¹⁴⁾ การเรืองแสงต้องการเพียงออกซิเจนเท่านั้น ไม่ต้องมีโคแฟกเตอร์หรือสารตั้งต้นใดๆ และความเข้มของการเรืองแสงไม่ลดลง⁽¹⁵⁾ จีเอฟพีไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์หรือการแสดงออกของยีนอื่น และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์⁽¹³⁾ นอกจากนี้จีเอฟพียังสามารถแสดงออกได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งยูคาริโอตและโปรคาริโอต จึงมีการนำจีเอฟพีมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง เช่น

1. เป็นเครื่องหมายสำหรับติดตามเซลล์ที่ถูกทรานสฟอร์ม^(40, 41)
2. วัดการแสดงออกของยีน^(42, 43, 44)
3. ติดตามและติดตามโปรตีน⁽⁴⁵⁾
4. ใช้ในการศึกษาการขนส่งโปรตีนในเซลล์⁽⁴⁶⁾
5. ติดตามเซลล์ในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เพื่อติดตามปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ที่สนใจกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่นแบคทีเรียในไบโอฟิล์ม⁽⁴⁷⁾, แบคทีเรียที่ใช้เป็นไบโोकอนโทรลในพืช^(48, 49, 50, 51), แบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติก^(52, 53), แบคทีเรียก่อโรค⁽⁵⁴⁾
6. ติดตามเซลล์ในสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ เพื่อศึกษา cell lineages⁽⁵⁵⁾
7. ใช้คัดแยกสิ่งมีชีวิตที่ปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม เช่น sterile insects⁽⁵⁶⁾

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-352 ของบริษัท Tomy, USA
- ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean Model. V6 ของบริษัท Lab Service, Thailand
- เครื่องชั่ง รุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo, China
- เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น innova™ 2100 ของบริษัท New Brunswick Scientific, USA
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น SK-737 ของบริษัท Amerex Instruments, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ของบริษัท Beckmann, Germany
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น UV/VIS Spectrometer Lambda 25 ของบริษัท PerkinElmer instruments, USA
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S-20K ของบริษัท Mettler Toledo, China
- ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson, France
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น Modell 800 ของบริษัท Memmert, Western Germany
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) รุ่น WB 7/14/22/29/45 ของบริษัท Memmert, Western Germany
- ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
 - รุ่น Mini Sub-Cell ของบริษัท Bio-Rad, USA
 - รุ่น i-Mupid ของบริษัท Cosmo Bio, Japan
- เครื่องดูเจลด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (gel documentation) ของบริษัท Bio-rad, USA

- เครื่องถ่ายทอดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (electroporator) รุ่น Gene-Pulser II ของบริษัท Bio-rad, USA
- กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) รุ่น Labophot-2 ของบริษัท Nikon, Japan
รุ่น BX51 และ ฟิลเตอร์ EYFP ของบริษัท Olympus, Japan
- Microtome รุ่น RM 2125 R.T ของบริษัท Leica, Germany

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

- ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- เด็กซ์โตรส (dextrose) ของบริษัท E Merck, Germany
- น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท E Merck, Germany
- น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E Merck, Germany
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Sigma, USA
- สารปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน (ampicillin) และ คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ของบริษัท Sigma, USA
- ไลโซไซม์ (lysozyme) ของบริษัท Sigma, USA
- Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA
- SDS (sodium lauryl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Sigma, USA
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck, Germany
- กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท E. Merck, Germany
- กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E. Merck, Germany
- ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Miniprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
- ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณมาก QIAprep Midiprep Kit ของบริษัท Qiagen, Germany
- ชุดสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของบริษัท Qiagen, Germany

- ไอโซโพรพานอล ของบริษัท E. Merck, Germany
 - อะกาโรส (agarose) ของบริษัท Bio-rad, USA
 - สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ (loading buffer) ของบริษัท Fermentas, USA
 - สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder DNA) ของบริษัท Fermentas, USA
 - เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *HindIII*, *EcoRI* และ *PstI* ของบริษัท Fermentas, USA
 - เอนไซม์นิวคลีเอส (mung bean nuclease) ของบริษัท New England Biolab, United Kingdom
 - เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (calf intestine alkaline phosphatase) ของบริษัท Fermentas, USA
 - เอนไซม์ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA ligase) ของบริษัท Fermentas, USA
- สารเคมีสำหรับเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology
- เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70%, 90%, 95% ของบริษัท E. Merck, Germany
 - นอร์มอลบิวทิลแอลกอฮอล์ (n-butyl alcohol) ของบริษัท Lab Scan Analytical Science, Thailand
 - ฟอรัลดีไฮด์ (formaldehyde) ของบริษัท Carlo Erba Reagenti
 - ไซลีน (xylene) ของบริษัท J. T. Baker, USA
 - พาราพลาส พลัส พาราฟิน (paraplast plus paraffin) ของบริษัท Tyco Healthcare Group LP, USA

3.3 แบคทีเรียและพลาสมิด

แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 แบคทีเรียและจีโนมไทป์

แบคทีเรีย	จีโนมไทป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	<i>supE</i> , Δ <i>lac</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR</i> , <i>recA</i> <i>endA</i> , <i>gyrA</i> , <i>thi</i> , <i>relA</i>	Sambrook และคณะ ⁽⁵⁷⁾
<i>E. coli</i> JM109 pBC <i>gfp</i>	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด pBC <i>gfp</i>	Matthysse และคณะ ⁽⁵⁸⁾ *
<i>E. coli</i> DH5 α pGEM-7Zf(+)	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pGEM-7Zf(+)	บริษัท Promega
<i>Bacillus subtilis</i> pTF6	<i>B. subtilis</i> ที่มีพลาสมิด pTF6	Hirata และคณะ ⁽⁵⁹⁾ **
<i>E. coli</i> DH5 α pTG	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTG	สร้างในการทดลองนี้
<i>E. coli</i> DH5 α pAD44-12	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAD44-12	Dunn และคณะ ⁽⁴⁷⁾ ***
<i>E. coli</i> DH5 α pAD	<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAD	สร้างในการทดลองนี้
BS11	<i>Bacillus</i> สายพันธุ์ S11 โพรไบโอติกในกุ่มกุลาดำ	วรรณิกา เพ็ญนภัทร ⁽⁷⁾
BS11-GFP	BS11 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAD44-12	สร้างในการทดลองนี้
BS11-pAD	BS11 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pAD	สร้างในการทดลองนี้

* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. นำชัย ชีววิวรรณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

** ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

*** ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Dr. Jo Handelsman, Department of Plant Pathology University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA.

ตารางที่ 4 พลาสมิดและ จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์

พลาสมิด	จีโนไทป์/ ฟีโนไทป์	ขนาด(กิโลเบส)	เอกสารอ้างอิง
pBCgfp	Cm ^r , gfpmut2	4.15	Matthysse และคณะ ⁽⁵⁸⁾
pGEM-7Zf(+)	Ap ^r , αlac/MCS	2.997	บริษัท Promega
pTF6	Km ^r , Cm ^r	5.1	Hirata และคณะ ⁽⁵⁹⁾
pTG	Ap ^r , Km ^r , Cm ^r	8.1	สร้างในการทดลองนี้
pAD44-12	Ap ^r , Cm ^r , gfpmut3a	9.5	Dunn และคณะ ⁽⁴⁷⁾
pAD	Ap ^r , Cm ^r	5.1	สร้างในการทดลองนี้

3.4 การเลี้ยงและการเก็บรักษาแบคทีเรีย

3.4.1 เลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (ภาคผนวก ก1) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ ใช้แอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข1) เมื่อทำเป็นอาหารแข็ง LB เติมผงวุ้น 1.2% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.4.2 เลี้ยง BS11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกชอย (ภาคผนวก ก2) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะ ใช้คลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข1) เมื่อทำเป็นอาหารแข็งทริปติกชอย เติมผงวุ้น 1.2% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.4.3 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* และ BS11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอล ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 4:1 โดยปริมาตร บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.5 การเตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.5.1 การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Plasmid Miniprep (ภาคผนวก ข2)

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิด ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ถายน้ำเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายใน

สารละลาย I 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 4% SDS 100 ไมโครลิตร และสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 นอร์มัล 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลอดไปมาเบาๆ 5-6 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที จากนั้นเติมสารละลาย III ที่เย็น 150 ไมโครลิตร กลับลอดไปมาเบาๆ 5-6 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ถ่ายเฉพาะส่วนน้ำใสใส่งในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมเอทานอล 100% ปริมาตร 2 เท่าของส่วนน้ำใส กลับลอดไปมาเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทเอทานอล 95% ทิ้ง แล้วเติมเอทานอล 70% 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนเอทานอล 70% ทิ้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ สุดท้ายทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดไมโครพิวจ์ลงบนกระดาษทิชชู เป็นเวลา 10 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุ 30 ไมโครลิตร และใส่ RNase A เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข3)

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* หรือ BS11 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการ และปั่นเก็บเซลล์ตามวิธีในข้อที่ 3.5.1 แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับลอดไปมาจนกระทั่งสารละลายเริ่มหนืดและใสขึ้นภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร ผสมทันทีโดยการกลับลอดไปมา 4-6 ครั้ง สารละลายจะเกิดตะกอนสีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสลงใน QIAprep Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง แล้วย้ายคอลัมน์ใส่งในหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติบบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที พลาสมิดดีเอ็นเอจะถูกชะออกจากคอลัมน์อยู่ในส่วนน้ำใส เก็บสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

สำหรับ BS11 เลี้ยงเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.8-1.2 (ประมาณ 3-4 ชั่วโมง) และใช้บัฟเฟอร์ P1 ที่เติมไลโซไซม์ให้ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเติบบัฟเฟอร์ P2

3.5.3 การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดปริมาณมาก QIAprep Spin Midiprep Kit(Qiagen, Germany) (ภาคผนวก ข4)

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ 25 มิลลิกรัม นำไปเขย่าที่ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 6,000xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ P1 4 มิลลิกรัม จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 4 มิลลิกรัม ผสมโดยการกลับหลอดไปมาสารละลายจะเริ่มหนืดและใสขึ้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P3 4 มิลลิกรัม ผสมทันทีโดยการกลับหลอดไปมา สารละลายจะเกิดตะกอนสีขาว ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 20,000xg เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนน้ำใสลงในหลอดใหม่แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดตะกอนขาวที่เหลือ เติมบัฟเฟอร์ QBT 4 มิลลิกรัม ลงในคอลัมน์ QIAGEN-tip100 รอให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านคอลัมน์จนหมด จากนั้นดูดส่วนน้ำใสลงในคอลัมน์ รอให้สารละลายไหลผ่านคอลัมน์จนหมด ล้างคอลัมน์โดยเติมบัฟเฟอร์ QC 10 มิลลิกรัม รอให้บัฟเฟอร์ไหลผ่านคอลัมน์จนหมด (ทำ 2 รอบ) สะพลาสมิดออกจากคอลัมน์โดยการเติมบัฟเฟอร์ QF 5 มิลลิกรัม เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ในหลอดเซนตริฟิวจ์ (ต้องไม่เป็นพลาสติกชนิดโพลีคาร์บอเนต) ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมไอโซโพรพานอล 3.5 มิลลิกรัม กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000xg เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมเอทานอล 70% 2 มิลลิกรัม ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000xg เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ เทส่วนใสทิ้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ สุดท้ายทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดเซนตริฟิวจ์ลงบนกระดาษทิชชู เป็นเวลา 10 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุ

3.5.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

(A_{260} และ A_{280})

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอคำนวณได้จากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่ (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) = $A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณได้จากอัตราส่วนระหว่าง A_{260} และ A_{280} ค่าที่

เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ถ้าค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนสูง ถ้าค่าสูงกว่า 2.0 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

3.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

3.6.1 ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาผสมกับส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น โดยใช้จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

3.6.2 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เพื่อวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของพลาสมิด โดยมีวิธีการดังนี้คือ เตรียมอะกาโรสเจล 1% ในบัฟเฟอร์ 1xTAE (ภาคผนวก ข5) โดยใช้ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mupid หรือ ชุดทำอิเล็กโทรโฟเรซิส Mini Sub-Cell GT ผสมพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณที่เหมาะสมกับสีติดตาม นำมาหยอดลงในช่องและใช้สารละลายดีเอ็นเอ 1 กิโลเบสผสมกับสีติดตามเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของบรอมไฟนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาเกือบถึงขอบเจลอีกด้าน หยุดให้กระแสไฟฟ้า ปิดเครื่อง นำอะกาโรสเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ตรวจสอบดูแถบดีเอ็นเอและถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation

3.6.3 การแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) (ภาคผนวก ข6)

ทำตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตดังนี้ ตัดอะกาโรสเจลตรงบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดและนำชิ้นเจลใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลหลอมละลายหมด จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน QIAquick column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างคอลัมน์โดยเติมน้ำบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบและเวลาเดิม เทส่วนใสทิ้ง กำจัดส่วนน้ำที่เหลือติดคอลัมน์โดยการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้ายคอลัมน์มายังหลอดไมโครพิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบและเวลาเดิม สารละลายดีเอ็นเอจะอยู่ในส่วนน้ำใส เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.4 การกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส

นำซินดีเอ็นเอมาผสมกับส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดไมโครพิวจ์ ประกอบด้วย เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น โดยใช้จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิและเวลาบ่มที่เหมาะสมตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

3.6.5 การทำให้เป็นปลายทู่โดยใช้เอนไซม์นิวคลีเอส

นำซินดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวมาผสมกับส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดไมโครพิวจ์ ประกอบด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น โดยใช้จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิและเวลาบ่มที่เหมาะสมตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

3.6.6 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่โดยใช้เอนไซม์ทีโพร์ดีเอ็นเอไลเกส

นำซินดีเอ็นเอที่มีปลายทู่มาผสมกับส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดไมโครพิวจ์ ประกอบด้วยเอนไซม์ทีโพร์ดีเอ็นเอไลเกส สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ 50%PEG และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น โดยใช้จำนวนหน่วยของเอนไซม์ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายบัฟเฟอร์ อุณหภูมิและเวลาบ่มที่เหมาะสมตามที่ระบุไว้โดยบริษัทผู้ผลิต

3.7 การนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 α

3.7.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ *E. coli* DH5 α (ภาคผนวก ข7)

เขี่ยโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* DH5 α ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 500 ไมโครลิตร ไปยัง Klett flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A_{600}) ประมาณ 0.2-0.5 จากนั้นถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วแช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์ในอ่างน้ำแข็ง เติมสารละลาย RF I ที่เย็น 5 มิลลิลิตร ค่อยๆ กระจายเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) เติมสารละลาย RF I ที่เย็นเพิ่มอีก 12 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย RF II ที่เย็น 4 มิลลิลิตรลงในตะกอนเซลล์ ค่อยๆ กระจายเซลล์เบาๆ ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาที ดูดแบ่งใส่หลอดไมโครพิวจ์ที่เย็นหลอดละ 50 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่น แช่หลอดในไนโตรเจนเหลว 30 วินาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสทันที

3.7.2 การทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 α

การทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* DH5 α จะใช้วิธี heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5 α ออกจากตู้แช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส แช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ เมื่อเซลล์ละลายแล้วเติมพลาสมิด (ควรมีปริมาตร 1-10 ไมโครลิตร) ลงในคอมพีเทนท์เซลล์ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ทันที โดยย้ายหลอดลงในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาทีแล้วย้ายกลับไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาทีทันที เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 1 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

3.8 การนำพลาสมิดเข้าสู่ BS11 (ดัดแปลงจาก Liu และคณะ⁽⁴⁹⁾)

3.8.1 การเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ BS11

เชื้อโคลนีเดี่ยวของ BS11 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปขยายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 2.5 มิลลิลิตร ไปยัง Klett flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 200 มิลลิลิตร นำไปขยายด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร (A_{650}) ประมาณ 0.2 จากนั้นถ่ายน้ำเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตรลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เย็นและแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ SG (ภาคผนวก ข8) ที่เย็นจัด 5 รอบ สุดท้ายละลายเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ SG 500 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวจ์ที่เย็นหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ที่ -70 องศาเซลเซียส

3.8.2 การทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่ BS11

การทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่ BS11 จะใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) ดังนี้ นำคอมพีเทนท์เซลล์ BS11 ออกจากตู้แช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส แช่ในอ่างน้ำแข็งให้ละลายช้าๆ เมื่อเซลล์ละลายแล้วเติมพลาสมิดที่ต้องการทรานสฟอร์ม 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ผสมกับเซลล์ แล้วดูดใส่คิวเวตต์สำหรับอิเล็กโทรพอเรชันที่มีช่องว่างระหว่างแผ่นตัวนำ (gap) กว้าง 2 มิลลิเมตรที่เย็นจัด (ระวังอย่าให้เกิดฟอง) เช็ตรอบคิวเวตต์ให้แห้ง นำเข้าเครื่องถ่ายทอดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ที่ตั้งค่าความต่างศักย์ 1.6 กิโลโวลต์ ความจุไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด และความต้านทาน 200 โอห์ม ปลดปล่อยกระแสไฟฟ้า 1 ครั้ง (เวลาที่ใช้ในการปล่อยกระแสไฟฟ้าประมาณ 5/1000 วินาที) หลังจากให้กระแสไฟฟ้าแล้ว ถ่ายเชื้อจากคิวเวตต์ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกชอย 1 มิลลิลิตรทันที นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส

บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 0.5xTSA ที่มีคลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน

การตรวจหา BS11 ที่ได้รับพลาสมิด ทำโดยคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งทริปติกชอยที่มีคลอแรมเฟนิคอล สกัดพลาสมิดด้วยชุด QIAprep Miniprep Kit และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับ สำหรับ BS11 ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *gfp* ตรวจสอบการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

3.9 การตรวจดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์

ใช้ลูปแตะโคโลนีที่ต้องการตรวจสอบ มากระจายลงในหยดน้ำบนกระจกสไลด์ที่สะอาด แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 10 เท่าและ 40 เท่า แบบที่เรียกที่ได้รับพลาสมิดที่มียีนจีเอฟพีจะมีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.10 การหาความเสถียรของพลาสมิดในเซลล์ BS11

เลี้ยง BS11-GFP และ BS11-pAD ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5xTSB 5 มิลลิลิตรที่มีคลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อ 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5xTSB 50 มิลลิลิตรที่มีคลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (A_{600} อยู่ในช่วง 1.6) ถ่ายเชื้อ 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกๆ 12 ชั่วโมง

นับจำนวน BS11 ที่มีและไม่มีพลาสมิดในแต่ละรุ่น โดยนำเชื้อมาเจือจางในด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วเพาะเชื้อบนอาหาร 0.5xTSA และอาหารแข็ง 0.5xTSA ที่มีคลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.11 การเตรียมอาหารกึ่งกลูตาตัมผสมกับ BS11

เลี้ยง BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD ในอาหารเลี้ยง BS11 (ภาคผนวก ก3) เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะเซลล์ ล้างเซลล์ 3 รอบ ด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมเซลล์สดกับอาหารกึ่งในอัตราส่วน 1:3 คลุกอาหารกึ่งและเซลล์ BS11 ให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำให้อาหารแห้งโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กระจายไม่ให้อาหารติดกันเป็นก้อน เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น

ตรวจสอบและติดตาม BS11 ในอาหารกึ่ง โดยนำอาหารกึ่งที่ผสม BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD มาทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพราะเชื้อบนอาหารแข็งทริปติกชอยและอาหารแข็งทริปติกชอยที่มีคลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.12 เลี้ยงกึ่งกลาดำในระดับบ่อปูนซีเมนต์

เลี้ยงกึ่งกลาดำระยะโพสลาวา-18 ที่ได้จากบ่อพักในจังหวัดฉะเชิงเทรา ในบ่อปูนซีเมนต์ที่บรรจุน้ำประมาณ 400 ลิตร ความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน ปลอยกึ่งกลาดำบ่อละ 45 ตัว จำนวน 3 บ่อต่อกลุ่มการทดลอง เลี้ยงปรับสภาพให้กึ่งคุ้นเคยกับบ่อด้วยอาหารปกติ และเริ่มทำการทดลองเมื่อกึ่งกลาดำระยะโพสลาวา-24 โดยการทดลองแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มควบคุม เลี้ยงโดยให้อาหารปกติที่ไม่มีการผสมแบคทีเรียโพรไบโอติก
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมแบคทีเรีย BS11
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมแบคทีเรีย BS11-GFP
- กลุ่มทดลอง เลี้ยงโดยให้อาหารที่ผสมแบคทีเรีย BS11-pAD

ให้อากาศตลอดเวลา กรองน้ำโดยใช้ระบบหมุนเวียนแบบปิด (Closed recirculating water system) อาหารที่ใช้เลี้ยงกึ่งกลาดำตลอดการทดลองเป็นอาหารเม็ดสำเร็จรูป ให้อาหาร 10% ของน้ำหนักตัว โดยให้วันละ 3 มื้อ คือเวลา 9.00 น. 13.00 น. และ 18.00 น. ระหว่างทำการเพาะเลี้ยงกึ่ง สังเกตอัตราการเจริญของกึ่งโดยการชั่งน้ำหนักกึ่งกลาดำทุกตัว ทุกๆ 3 สัปดาห์ เป็นเวลา 9 สัปดาห์

หลังจากการทดลอง ทำลายกึ่งที่เหลือโดยการนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และฆ่าเชื้อน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งโดยใช้สารละลายคลอรีน

3.13 ติดตาม BS11 ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกึ่งและในลำไส้กึ่งหลังจากกินอาหารที่ผสม BS11

ตรวจนับปริมาณ BS11 ในน้ำเลี้ยงกึ่งและในลำไส้กึ่ง โดยนับจำนวนโคโลนีบนอาหารแข็งทริปติกชอยและอาหารแข็งทริปติกชอยที่มีคลอแรมเฟนิคอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตรวจนับสปอร์ของ BS11 ในน้ำเลี้ยงกึ่ง ใช้วิธี heat shock โดยนำน้ำไปแช่ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์ จากนั้นทำการเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วเพาะเชื้อในอาหารแข็งทริปติกชอยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.14 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

นำตัวอย่างกึ่งที่เก็บจากการทดลอง นำมาตัดแยกกล้ามเนื้อ แล้วเตรียมเนื้อเยื่อตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการทำให้คงรูป (Fixation) แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอมาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20-30 เท่าของเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างออกด้วยน้ำประปาหลายๆ รอบ แล้วแช่เก็บไว้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จนกว่าจะเริ่มขั้นตอนต่อไป (ควรเปลี่ยนเอทิลแอลกอฮอล์ทุกๆ สัปดาห์)

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้ คือ แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ซ้ำมึน 2 รอบ และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนนำสารใหม่เข้ามาแทนที่ (Clearing) แช่ไซลีน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนการ (Infiltration) ในพาราพลาสต์ แช่ไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลว ปริมาณ 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, พาราพลาสต์หลอมเหลว 30 นาที และพาราพลาสต์หลอมเหลว 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนการฝังพาราพลาสต์ (Embedding) เทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงในพิมพ์ นำส่วนกล้ามเนื้อจัดเรียงในพิมพ์สี่เหลี่ยม จากนั้นเทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงไปให้เต็มพิมพ์ รอจนแข็งตัวจึงแกะพิมพ์ออก จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (Section cutting) ตัดเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่ฝังในพาราพลาสต์ด้วยเครื่องมือโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้แต่ละชั้นมีความหนา 7 ไมครอน เรียงต่อกัน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้ว โดยหยดน้ำกลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 40 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตั้งเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการยึดเกาะของ BS11 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยสังเกตจากการเรืองแสงสีเขียว ที่บริเวณต่างๆ ของกล้ามเนื้อ

3.15 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และจัดกลุ่มข้อมูลโดยใช้ค่าสถิติ Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS 10.0 for Windows

สรุปขั้นตอนการทดลองในงานวิจัยนี้

- ขั้นตอนที่ 1 เตรียมพลาสมิดที่มียีนจีเอฟพีและพลาสมิดควบคุม
- ขั้นตอนที่ 2 เตรียม BS11 ที่มีพลาสมิด
- นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ BS11 โดยวิธี electroporation และคัดเลือก
 - ตรวจสอบความเสถียรของทรานสฟอร์มแมนท์
- ขั้นตอนที่ 3 เตรียมอาหารกิ้งที่มี BS11 และ BS11 ที่มีพลาสมิด
- ตรวจสอบและติดตาม BS11 และ BS11 ที่มีพลาสมิด ในอาหารกิ้ง
- ขั้นตอนที่ 4 เลี้ยงกิ้งกลาดำในบ่อปูนซีเมนต์ระดับ 400 ลิตร
- ติดตาม BS11 และ BS11 ที่มีพลาสมิด ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกิ้งและในลำไส้ กิ้งหลังจากกินอาหารที่ผสม BS11 และ BS11 ที่มีพลาสมิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

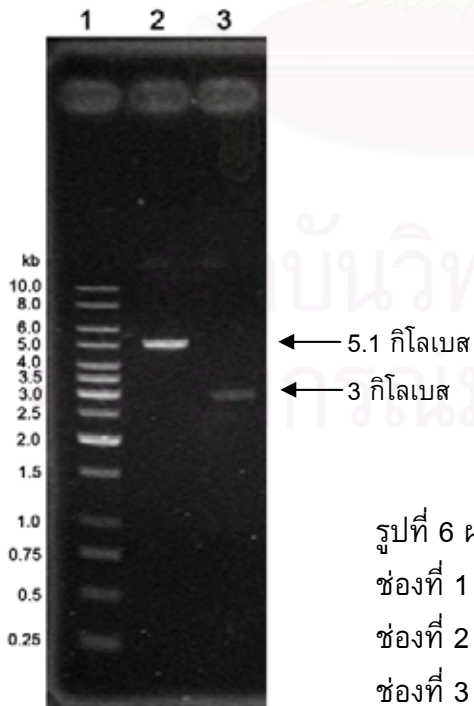
ผลการทดลอง

การเตรียมพลาสมิดที่มียีนจีเอฟพีและพลาสมิดควบคุม

วิธีที่ 1 เตรียมจากพลาสมิด pTF6, pGEM-7Zf(+) และ pBCgfp

เนื่องจากยีน *gfpmut2* อยู่ในพลาสมิด pBCgfp (รูปที่ 25 ภาคผนวก ง) ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนและมีการถ่ายแบบได้ใน *E. coli* เท่านั้น อีกทั้งการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *gfpmut2* และสามารถถ่ายแบบได้ในเจ้าบ้านที่เป็น *Bacillus* ทำได้ยากเพราะ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่เรียกลุ่มแกรมบวก มีผนังเซลล์หนา ดังนั้นจึงต้องทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน *E. coli* ก่อน ซึ่งพลาสมิดนี้จะต้องเป็นซัทเทิลเวกเตอร์ที่สามารถถ่ายแบบได้ทั้งในเจ้าบ้านที่เป็น *E. coli* และ *Bacillus* จากนั้นแทรกยีน *gfpmut2* ลงในซัทเทิลเวกเตอร์นี้ เพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน *E. coli* แล้วจึงทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น BS11 โดยซัทเทิลเวกเตอร์สร้างจากการเชื่อมพลาสมิด pTF6 (รูปที่ 27 ภาคผนวก ง) ที่สามารถถ่ายแบบได้ใน *Bacillus* และมีโปรโมเตอร์ *P-bgaB* เข้ากับ pGEM-7Zf(+) (รูปที่ 28 ภาคผนวก ง) ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สามารถถ่ายแบบได้ใน *E. coli*

จากการสกัดพลาสมิด pTF6 จาก *B. subtilis* และสกัดพลาสมิด pGEM-7Zf(+) จาก *E. coli* DH5 α แล้วตัดพลาสมิดทั้งสองด้วยเอนไซม์ *EcoRI* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.1 และ 3 กิโลเบส ตามลำดับ ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 6



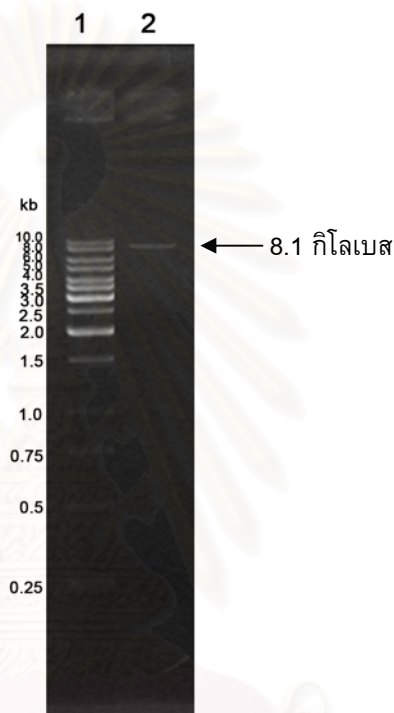
รูปที่ 6 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 pTF6 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*

ช่องที่ 3 pGEM-7Zf(+) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI*

หลังจากนั้นกำจัดหมู่ฟอสเฟสที่ปลาย 5' ของ pGEM-7Zf(+) ที่ถูกตัดด้วย *EcoRI* แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ไลเกส จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่ดื้อยาแอมพิซิลลินมาสกัดพลาสมิดจากการสกัดพลาสมิดออกจากทรานสฟอร์มแมนท์และตัดด้วยเอนไซม์ *PstI* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 8.1 กิโลเบส ซึ่งผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 7 ดังนั้นจากขั้นตอนนี้ได้ซัทเทิลเวกเตอร์ของ *E. coli* และ *Bacillus* ให้ชื่อว่า “pTG”

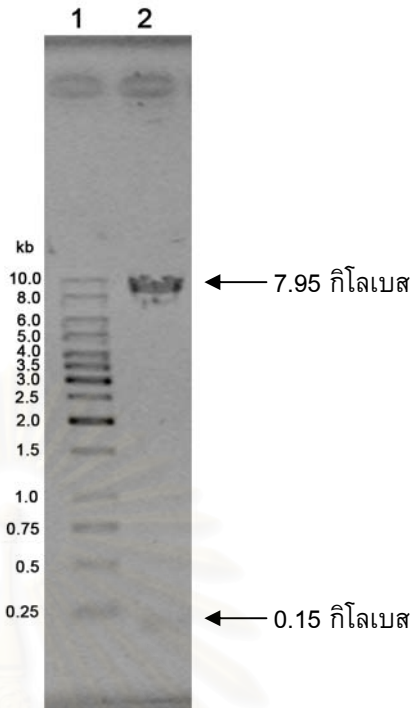


รูปที่ 7 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

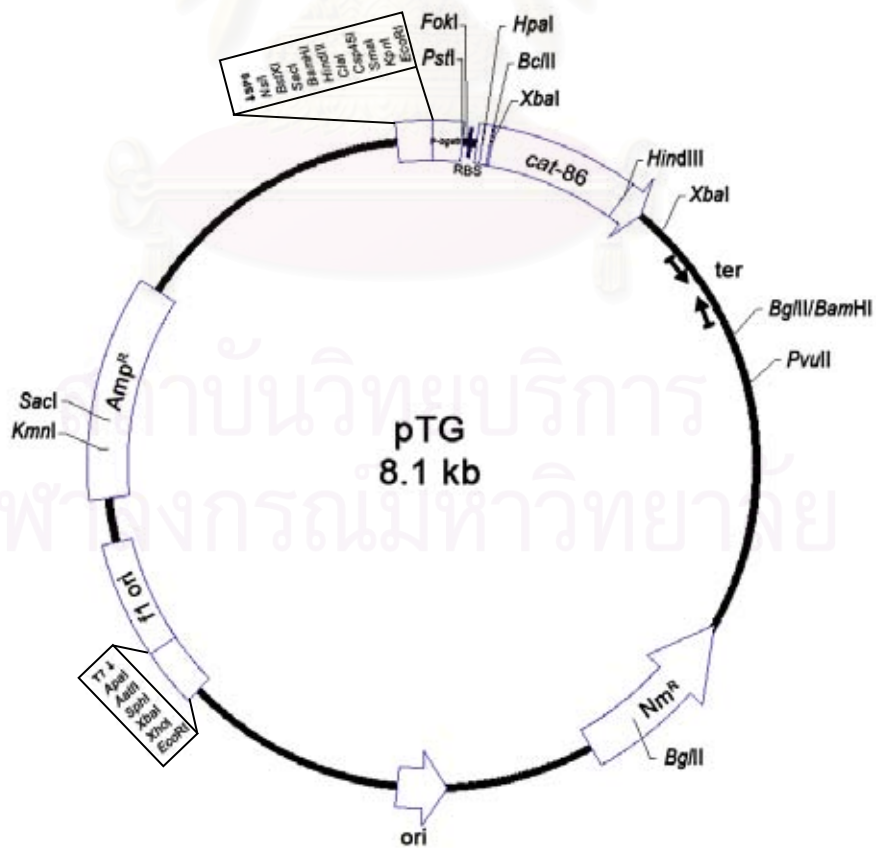
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 pTG ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*

ทำการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อ โดยการตัด pTG ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI* และ *BamHI* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 7.95 และ 0.15 กิโลเบส ดังนั้น pTG จึงมีแผนที่เรสทริกชันดังรูปที่ 9

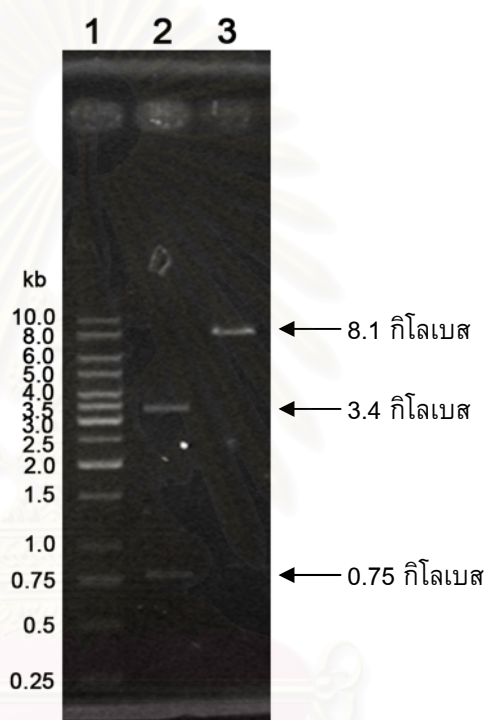


รูปที่ 8 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส
 ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder
 ช่องที่ 2 pTG ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I และ *Bam*HI



รูปที่ 9 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTG

ขั้นตอนต่อไปคือการแทรกยีน *gfpmut2* จากพลาสมิด *pBCgfp* เข้าไปที่ตำแหน่ง *PstI* ของพลาสมิด *pTG* หลังจากสกัดพลาสมิด *pTG* จาก *E. coli* DH5 α แล้วตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *PstI* ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 8.1 กิโลเบส กำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อป้องกัน self-ligation จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 0.75 กิโลเบสซึ่งได้จากการตัดพลาสมิด *pBCgfp* ด้วยเอนไซม์ *PstI* ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 10 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ดื้อยาแอมพิซิลลินมาสกัดพลาสมิด



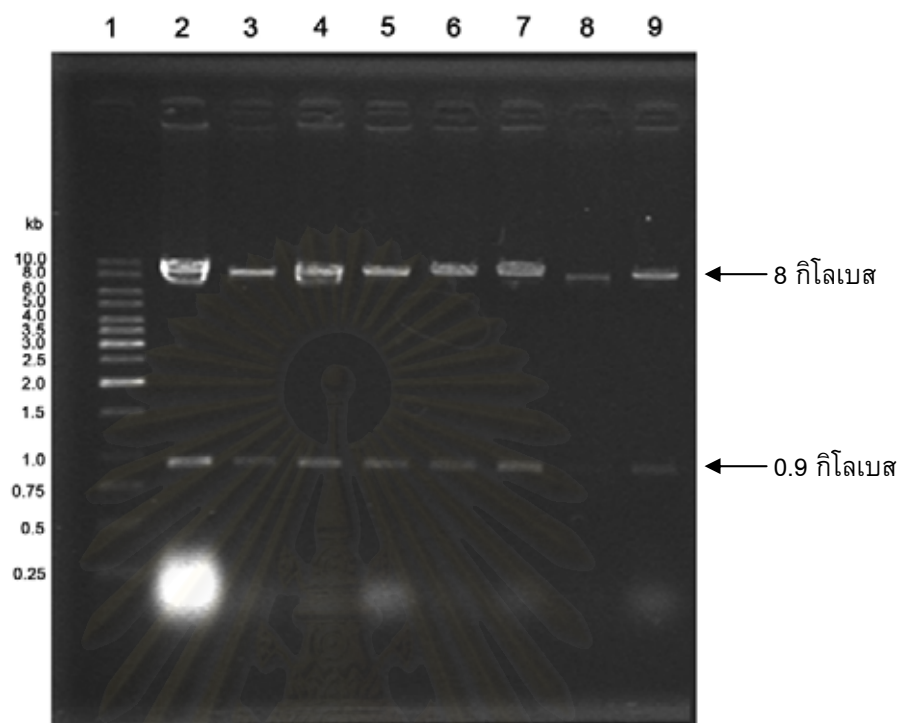
รูปที่ 10 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2 *pBCgfp* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*

ช่องที่ 3 *pTG* ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*

จากการสกัดพลาสมิดออกจากทรานสฟอร์มแมนท์จำนวน 69 โคโลนีและตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 0.9 และ 8 กิโลเบส ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 11 แสดงว่าได้ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีน *gfpmut2* แทรกอยู่ในลักษณะกลับทิศทั้งหมด ซึ่งจะมีแผนที่เรสทริกชันดังรูปที่ 12

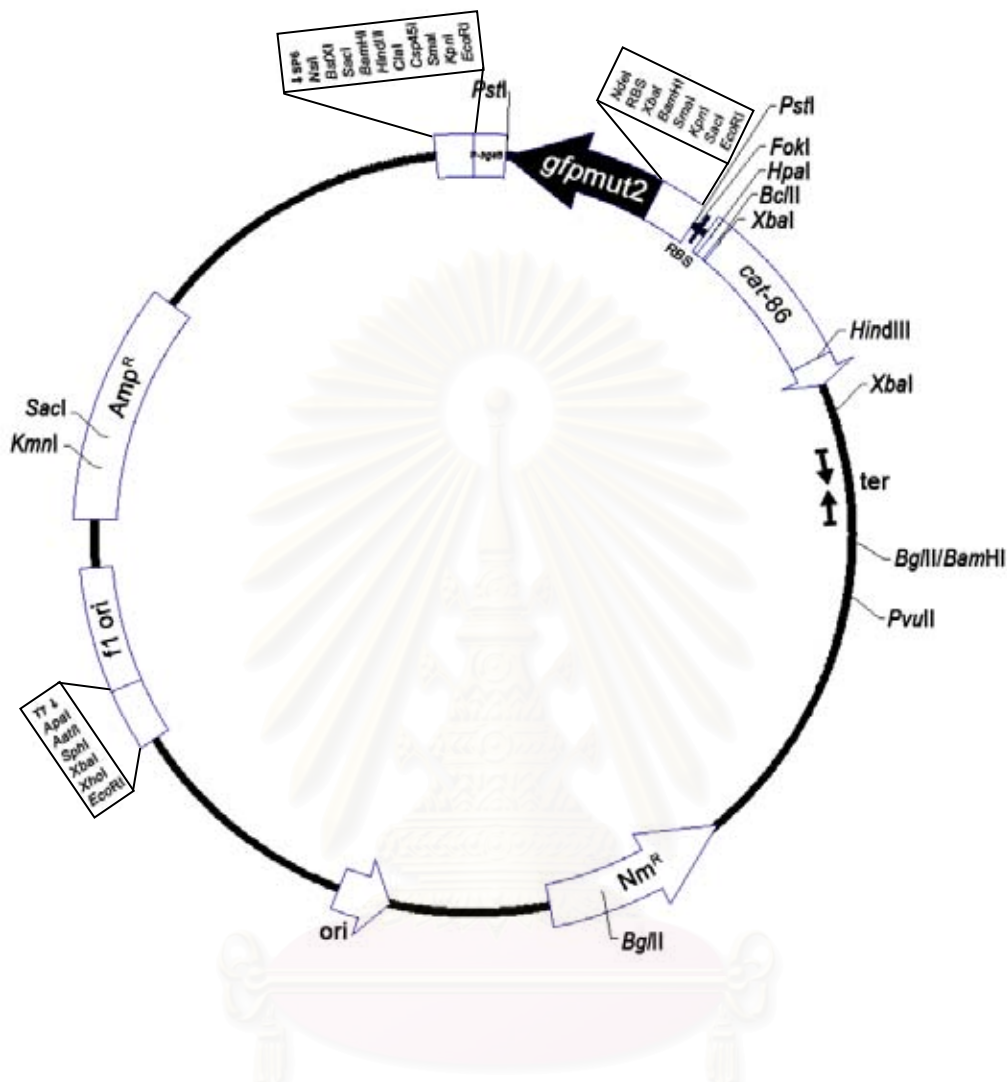


รูปที่ 11 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

ช่องที่ 2-9 พลาสมิดจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ถูกตัดด้วย *Bam*HI

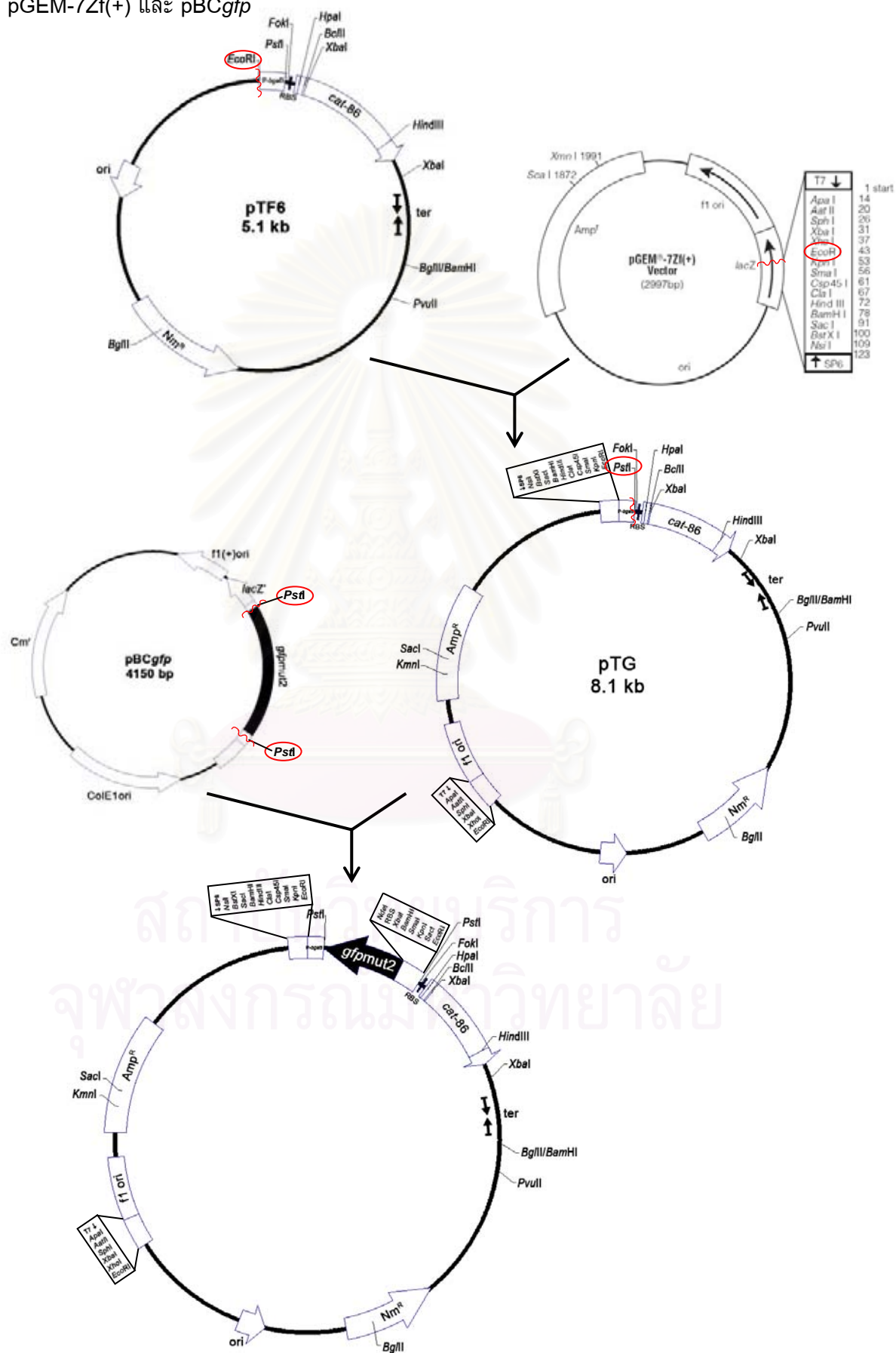
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pTG ที่มียีน *gfp* แทรกในลักษณะกลับทิศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

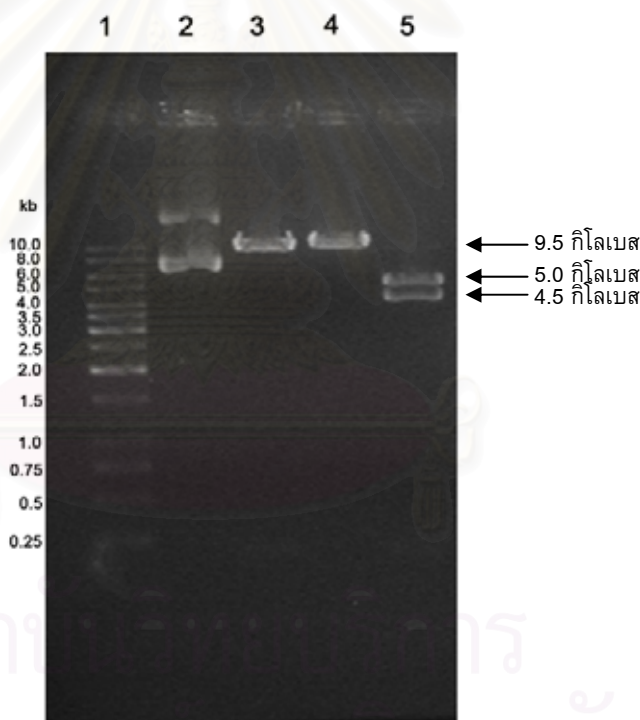
สรุปการเตรียมพลาสมิดที่มียีนจีเอฟพีและพลาสมิดควบคุม จากพลาสมิด pTF6, pGEM-7Zf(+) และ pBCgfp



วิธีที่ 2 ใช้พลาสมิด pAD44-12

เนื่องจากการเตรียมพลาสมิดตามวิธีที่ 1 ไม่เป็นผลสำเร็จ จึงใช้พลาสมิด pAD44-12 (รูปที่ 30 ภาคผนวก ง) ซึ่งเป็นพลาสมิดของ *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus*⁽⁴⁷⁾ มีขนาด 9.5 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนต้านแอมพิซิลลิน ยีนต้านคลอแรมเฟนิคอล และยีน *gfpmut3a* ซึ่งอยู่ภายใต้โปรโมเตอร์จาก *B. cereus* UW85

การเตรียมพลาสมิดควบคุมซึ่งจะเป็นพลาสมิดที่ไม่มียีน *gfpmut3a* และโปรโมเตอร์ โดยการสกัดพลาสมิด pAD44-12 จาก *E. coli* DH5 α และตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5 และ 4.5 กิโลเบส หลังจากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5 กิโลเบสออกมา ทำให้ดีเอ็นเอเป็นปลายทุ่ทั้งสองด้านโดยใช้นิวคลีเอส และเชื่อมปลายทุ่ทั้งสองเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ไลเกส ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 13 จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α โดยวิธี heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ดื้อแอมพิซิลลิน และไม่มีการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์มาสกัดพลาสมิด



รูปที่ 13 ผลการตัดพลาสมิด pAD44-12 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

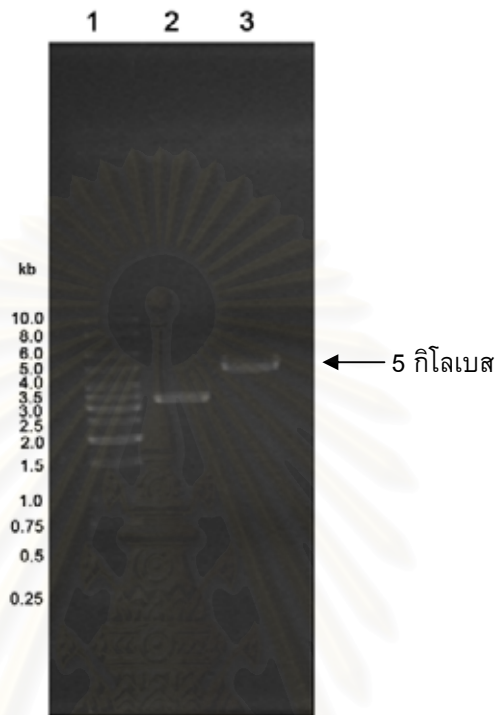
ช่องที่ 2 pAD44-12

ช่องที่ 3 pAD44-12 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III

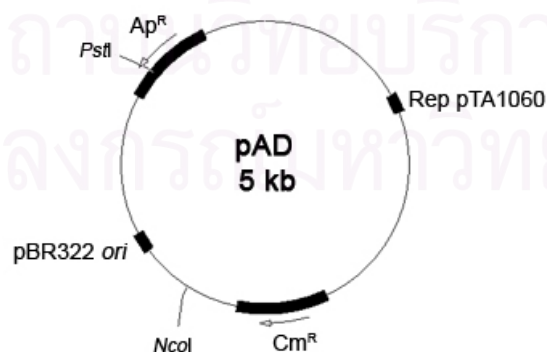
ช่องที่ 4 pAD44-12 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI

ช่องที่ 5 pAD44-12 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI

จากการสกัดพลาสมิดจากทรานสฟอร์มเม้นท์ และตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5 กิโลเบส ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงดังรูปที่ 14 ดังนั้นจากขั้นตอนนี้ได้พลาสมิดควบคุมคือ “pAD” ซึ่งจะมีแผนที่เรสทริกชันดังรูปที่ 15



รูปที่ 14 ผลการตัดพลาสมิด pAD ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์
 ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder
 ช่องที่ 2 pAD
 ช่องที่ 3 pAD ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I



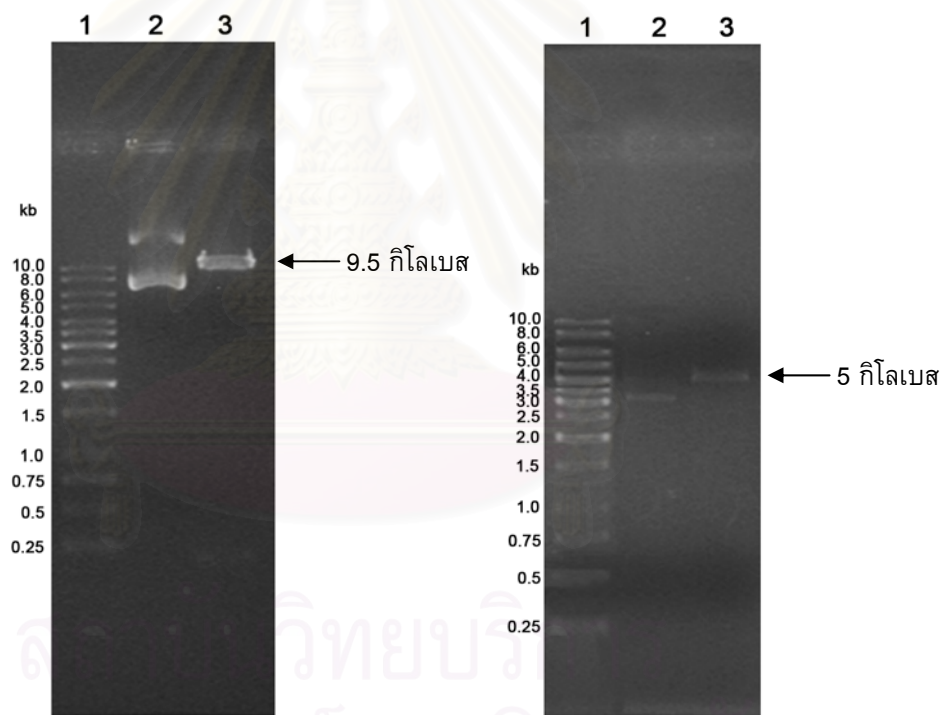
รูปที่ 15 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pAD

การเตรียม BS11 ที่มีพลาสมิด

การทรานสฟอร์ม pAD44-12 และพลาสมิดควบคุม pAD เข้าสู่ BS11 ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน โดยใช้พลาสมิดปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อคอมพีเทนท์ BS11 10^6 เซลล์ และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่ดื้อคลอแรมเฟนิคอล พบว่าโอกาสในการได้ทรานสฟอร์มแมนท์มีประมาณ 3.37×10^{-8} ทรานสฟอร์มแมนท์ต่อเซลล์

จากการสกัดพลาสมิดออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้จากการทรานสฟอร์ม BS11 ด้วยพลาสมิด pAD44-12 และตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับ pAD44-12 คือ 9.5 กิโลเบส และสกัดพลาสมิดออกจากทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้จากการทรานสฟอร์ม BS11 ด้วยพลาสมิด pAD และตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI* พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับ pAD คือ 5 กิโลเบส ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแสดงดังรูปที่

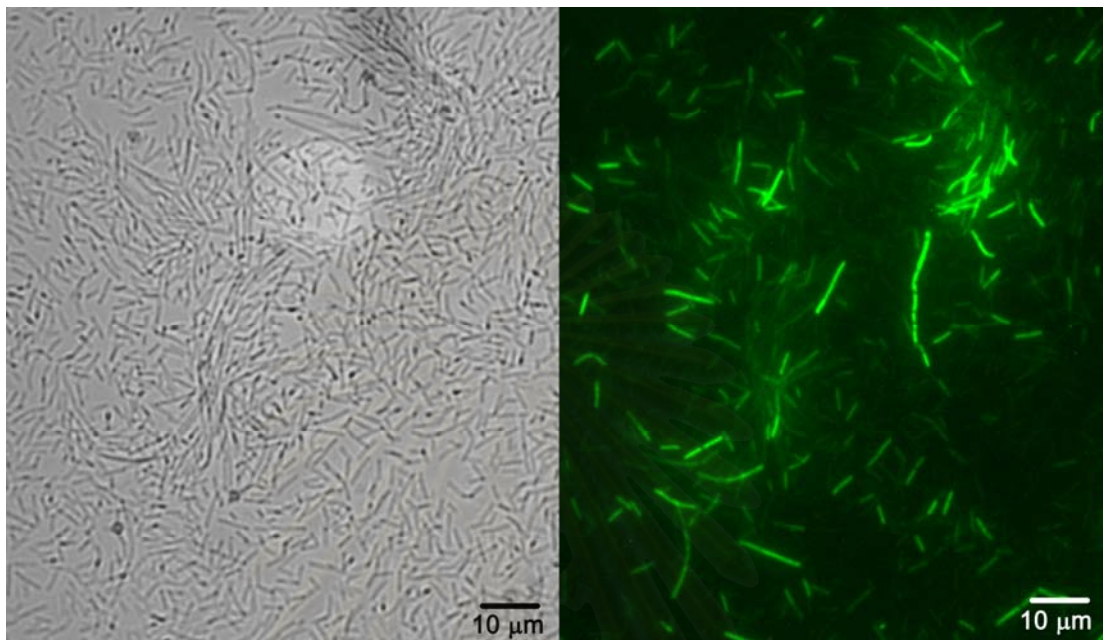
16



รูปที่ 16 ผลการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

- ก ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder
- ช่องที่ 2 pAD44-12
- ช่องที่ 3 pAD44-12 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *HindIII*
- ข ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder
- ช่องที่ 2 pAD
- ช่องที่ 3 pAD ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *PstI*

BS11 ที่มีพลาสมิด pAD4412 ให้ชื่อว่า “BS11-GFP” ติดต่อสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลล และมีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ดังรูปที่ 17 ส่วน BS11 ที่มีพลาสมิด pAD ให้ชื่อว่า “BS11-pAD”



ก

ข

รูปที่ 17 ลักษณะเซลล์ของ BS11-GFP ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า

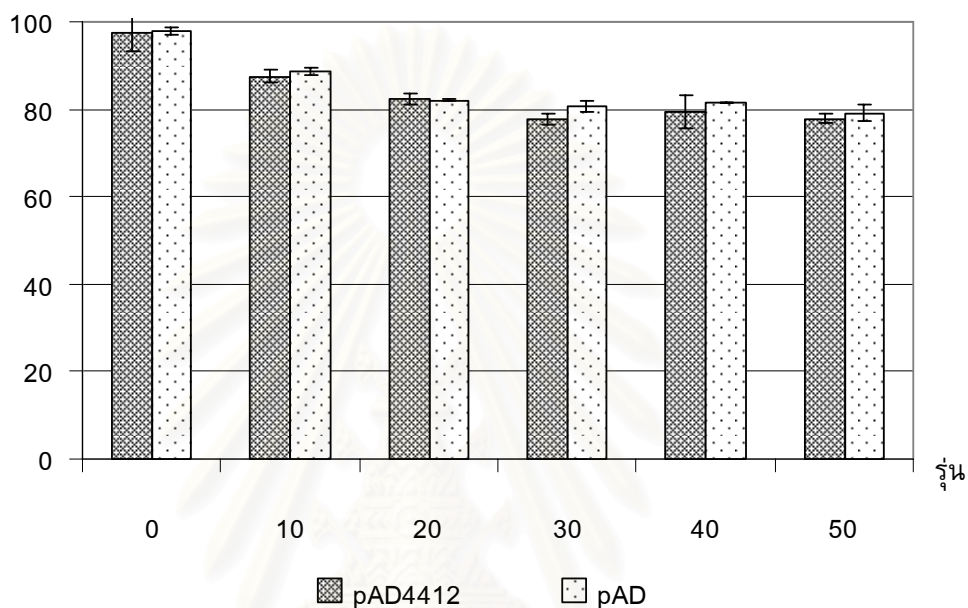
ก แสงธรรมดา

ข แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนซ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบความเสถียรพลาสมิด pAD44-12 และ pAD โดยการเลี้ยง BS11-GFP และ BS11-pAD ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5xTSB ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นตัวคัดเลือกเป็นจำนวน 50 รุ่น พบว่า BS11-GFP และ BS11-pAD ยังคงรักษาพลาสมิดอยู่ได้ถึง 77.85 และ 79.18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 18

เปอร์เซ็นต์ความเสถียร



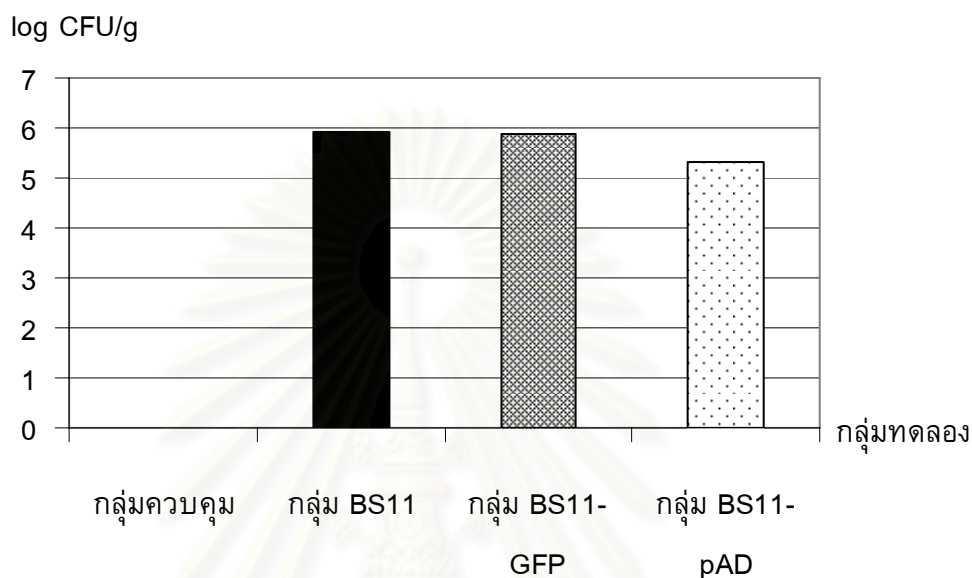
รูปที่ 18 เปอร์เซ็นต์ความเสถียรของพลาสมิด pAD44-12 และ pAD ของ BS11-GFP และ BS11-pAD ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5xTSB ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นตัวคัดเลือกเป็นจำนวน 50 รุ่น (แสดงค่าในตารางที่ 5 ภาคผนวก จ)

หมายเหตุ เครื่องหมาย I แสดงค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

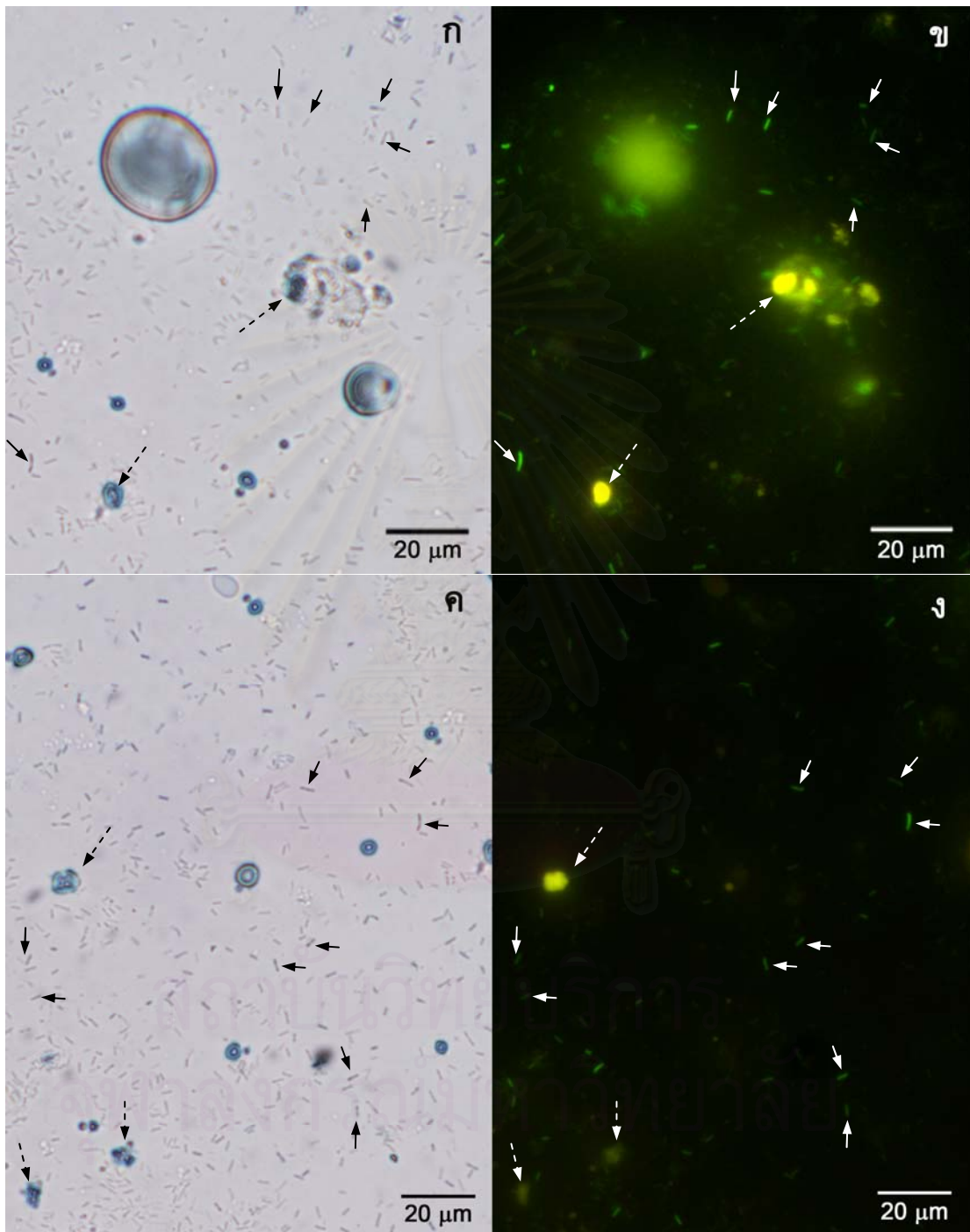
ผลการทดลองการผสม BS11 กับอาหารเลี้ยงกึ่งกลาดำ

เมื่อนำ BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD มาผสมกับอาหารกึ่งในอัตราส่วนน้ำหนักรักษาเซลล์เปียกต่อน้ำหนักอาหารกึ่งเท่ากับ 1:3 แล้วตรวจนับจำนวน BS11 ต่อกรัมอาหารกึ่ง พบว่าปริมาณ BS11 ในอาหารที่ผสม BS11 ทั้ง 3 กลุ่มอยู่ในช่วง 10^5 แสดงผลดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 ปริมาณ BS11 ที่ตรวจพบในอาหารกึ่งกลาดำที่ผสม BS11 ในอัตราส่วนน้ำหนักรักษาเซลล์เปียกต่อน้ำหนักอาหารกึ่งเท่ากับ 1:3 (แสดงค่าในตารางที่ 6 ภาคผนวก จ)

อาหารกึ่งที่ผสม BS11-GFP พบเซลล์แบคทีเรียที่มีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ดังรูปที่ 20 ซึ่งต่างจากอาหารกึ่งที่ผสม BS11 และ BS11-pAD ที่ไม่พบเซลล์แบคทีเรียที่มีการเรืองแสงสีเขียว



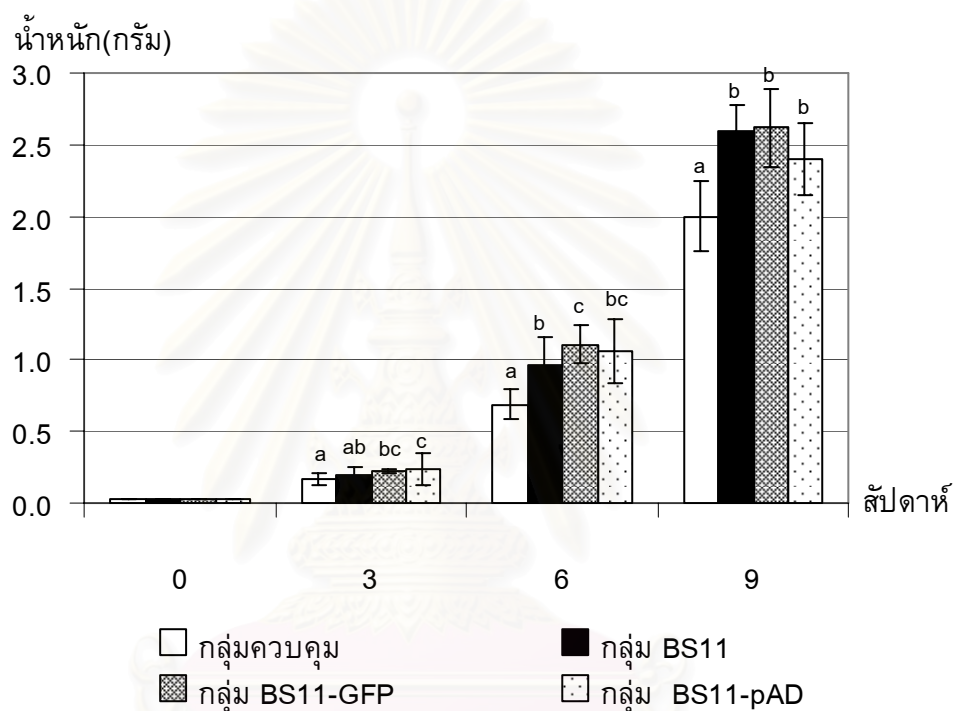
รูปที่ 20 ลักษณะเซลล์ของ BS11-GFP (ลูกศรเส้นทึบ) ในอาหารกึ่ง (ลูกศรเส้นประ) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า

ก และ ค แสงธรรมดา

ข และ ง แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนซ์

ผลการทดลองเลี้ยงกุ้งกุลาดำใหม่ระดับ 400 ลิตร

เมื่อนำอาหารกุ้งที่ไม่ผสม BS11, อาหารกุ้งที่ผสม BS11, อาหารกุ้งที่ผสม BS11-GFP และอาหารกุ้งที่ผสม BS11-pAD ไปใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำในระยะโพสลาวา 24 โดยทำการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ และทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ 3 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 9 กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11 ทั้ง 3 กลุ่ม มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ BS11 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ) น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำในกลุ่มการทดลองต่างๆ แสดงดังรูปที่ 21



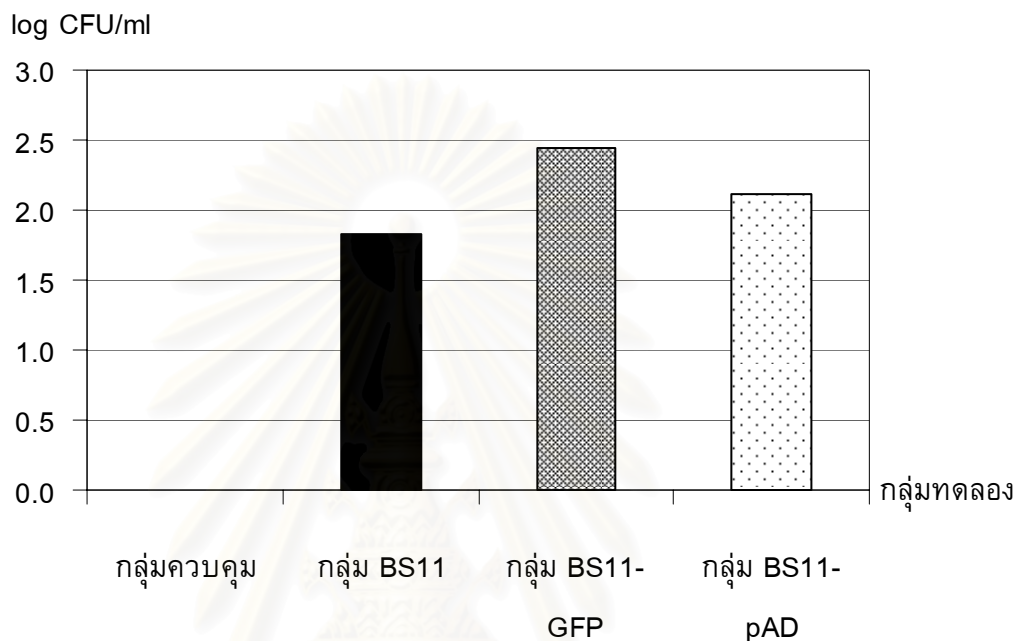
รูปที่ 21 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ (แสดงค่าในตารางที่ 7 ภาคผนวก จ)

หมายเหตุ เครื่องหมาย \bar{I} แสดงค่าความแปรปรวนของกลุ่มประชากร (SD)

a, b, c อักษรต่างกันแสดงค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

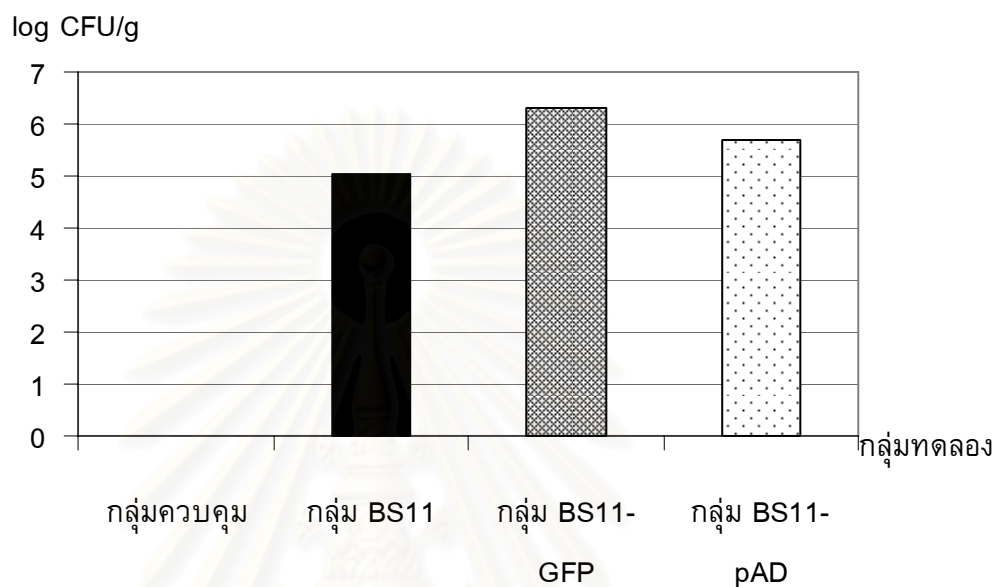
การตรวจคุณภาพน้ำระหว่างการเลี้ยงกุ้งในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่า ค่าของปัจจัยต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำและค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ได้แก่ ความเค็ม 17-22 ส่วนในพันส่วน ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.5-7.0 อุณหภูมิประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำประมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนประมาณ 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียรวมประมาณ 0-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.1-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

การทดลองหาปริมาณ BS11 และสปอร์ในน้ำเลี้ยงกิ้งกูดดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยงกิ้ง พบว่าไม่พบ BS11 ในน้ำจากบ่อควบคุม แต่พบ BS11 และสปอร์ในน้ำจากบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD ประมาณ 10^2 CFU/ml ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 ปริมาณ BS11 ที่ตรวจพบในน้ำเลี้ยงกิ้งกูดดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยงกิ้ง (แสดงค่าในตารางที่ 8 ภาคผนวก จ)

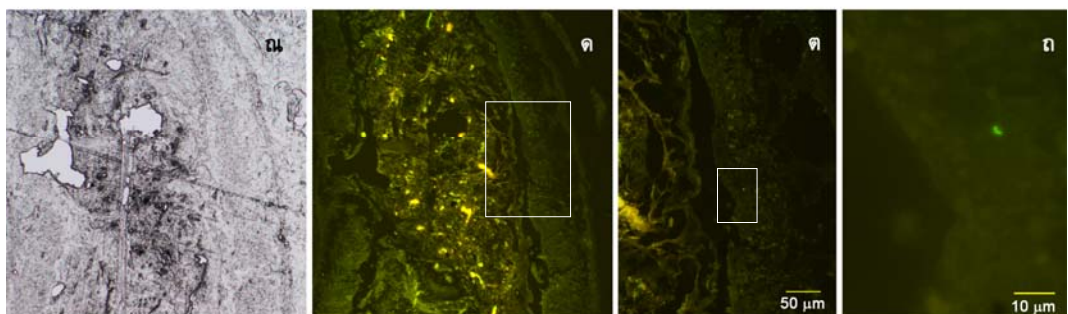
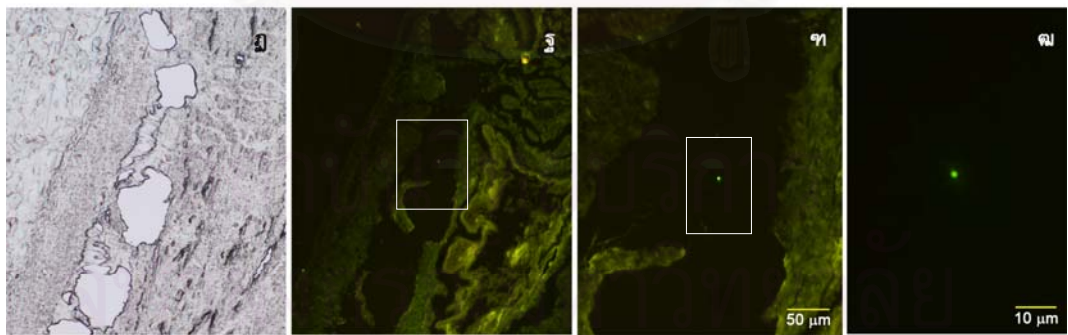
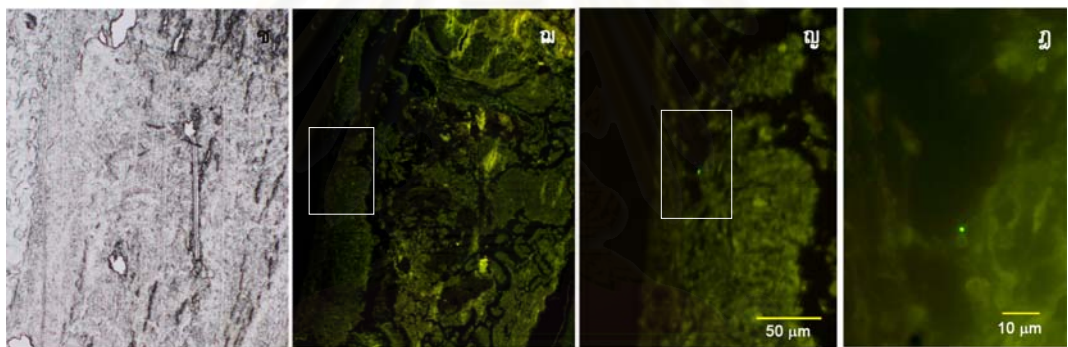
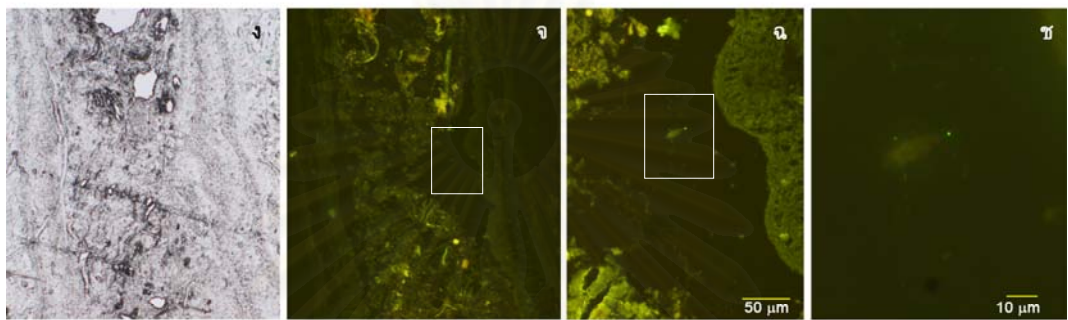
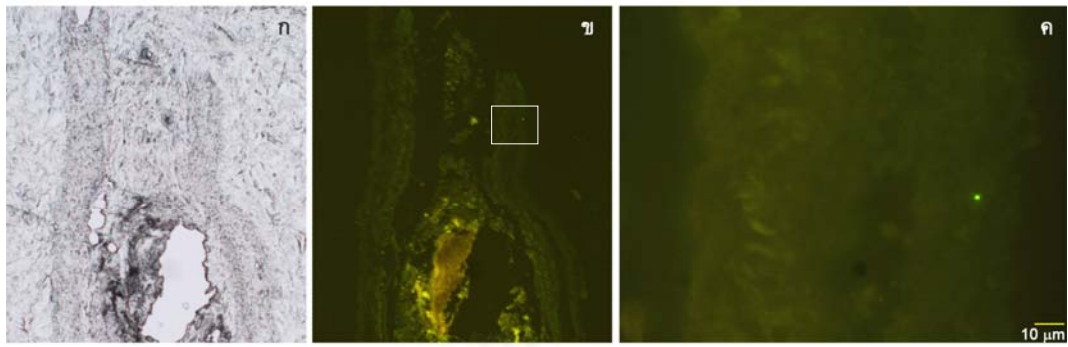
หลังเลี้ยงกุ้งกุลาดำครบ 9 สัปดาห์ นำกุ้งแต่ละกลุ่มทดลองมาตรวจนับปริมาณ BS11 ในลำไส้ พบว่าปริมาณ BS11 ในลำไส้กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD ประมาณ $10^5 - 10^6$ CFUต่อกรัม แต่ไม่พบ BS11 ในทางเดินอาหารของกุ้งกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 ปริมาณ BS11 ที่ตรวจพบในลำไส้กุ้งกุลาดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการเลี้ยงกุ้ง (แสดงค่าในตารางที่ 9 ภาคผนวก จ)

การตรวจหา BS11-GFP ในทางเดินอาหารกุ้งกุลาดำหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยสังเกตจากการเรืองแสงสีเขียวของ BS11-GFP ที่บริเวณต่างๆ ของลำไส้กุ้ง ดังแสดงในรูปที่ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 เนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ลำไส้ของกิ้งกูดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11-GFP เป็นเวลา นาน 9 สัปดาห์ โดยสังเกตเห็นเซลล์ BS11-GFP ที่มีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ก ช ฎ ณ แสงธรรมดากำลังขยาย 20 เท่า

ข จ ฒ ฐ ด แสงฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 20 เท่า

ฉ ญ ฑ ต แสงฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 50 เท่า

ค ช ฎ ฒ ถ แสงฟลูออเรสเซนซ์กำลังขยาย 200 เท่า



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

Rengpipat และคณะ^(5, 7, 8, 9, 10) ได้ทำการทดลองและพิสูจน์แล้วว่า BS11 เป็นโพรไบโอติกที่ดีสำหรับกุ้งกุลาดำ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ ทำให้น้ำหนักตัวและการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า BS11 ช่วยเสริมภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยการตอบสนองผ่านเซลล์และสารน้ำในกุ้งกุลาดำ แต่ยังไม่มีการทดลองใดสามารถติดตาม BS11 ในกุ้งกุลาดำได้โดยตรง ทั้งนี้เนื่องจากในทางเดินอาหารกุ้งมีจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Klebsiella*^(6, 7) เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำการติดตาม BS11 ด้วยจีเอฟพีมาใช้ เพื่อให้สามารถติดตาม BS11 ได้ ทั้งในอาหารเลี้ยงกุ้ง น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง และในทางเดินอาหารของกุ้ง

งานวิจัยที่ผ่านมา Schultz และคณะ⁽⁵¹⁾ ที่ได้ทรานสฟอร์มพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสจีเอฟพี (pUC-gfp) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Nissle 1917 ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในคน เพื่อใช้ติดตามโพรไบโอติกทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* และเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์กับเซลล์เจ้าบ้าน Hurst และคณะ⁽⁵³⁾ ใช้จีเอฟพีติดตามแบคทีเรีย *Serratia entomophila* ที่เป็นสาเหตุของโรค New Zealand grass grub ในตัว *Costelytra zealandica* เพื่อใช้ติดตามแบคทีเรียในทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน Zhang และคณะ⁽⁴⁸⁾ ติดตามแบคทีเรียที่เป็นไบโอคอนโทรลในข้าวบาร์เลย์ คือ *Brevibacillus brevis* ZJY-1 และ *Bacillus subtilis subtilis* ZJY-116 เพื่อติดตามแบคทีเรียและศึกษาผลของการใช้ไบโอคอนโทรลในระดับภาคสนาม ในการยับยั้ง *Fusarium graminearum* ซึ่งเป็นราก่อโรคในข้าวบาร์เลย์ จากตัวอย่างงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้จีเอฟพีติดตามจุลินทรีย์ที่สนใจเพื่อติดตามจุลินทรีย์ในสภาพ *in vivo*

เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีชั้นเปปทิโดไกลแคนที่ผนังเซลล์หนา จึงเป็นการยากที่จะตัดต่อยีนและทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เป็น *Bacillus* โดยตรง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำสร้างชัทเทิลเวกเตอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *E. coli* และ *Bacillus* คือชัทเทิลเวกเตอร์ pTG ที่เกิดจากการเชื่อม pTF6 และ pGEM7Zf(+)

การเตรียมพลาสมิดที่มียีนจีเอฟพีโดยการตัดยีน *gfpmut2* จากพลาสมิด pBCgfp ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pTG ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Pst*I แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์มเมอร์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีแอมพิซิลลินจำนวน 69 โคโลนีมาสกัดพลาสมิด แล้วตรวจสอบทิศทางการสอดแทรกของยีน *gfpmut2* โดยการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Bam*HI แล้ววิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า

ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 0.9 และ 8 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี ยีน *gfpmut2* สอดแทรกในลักษณะกลับทิศทั้งหมด

เนื่องจากการนำยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อให้เจ้าบ้านผลิตโปรตีนที่ต้องการ โปรตีนบางชนิดจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงไม่ได้เซลล์ที่ผลิตโปรตีนตามต้องการ นอกจากนี้การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอที่มีปลายทั้งสองด้านเหมือนกัน ทิศทางการเชื่อมต่อจะเกิดขึ้นอย่างสุ่ม⁽⁶⁰⁾ แต่ในงานวิจัยนี้เกิดการสอดแทรกของยีน *gfpmut2* ในพลาสมิดพาหะ pTG เกิดขึ้นในทิศทางเดียวคือกลับทิศทั้งหมด สาเหตุไม่ได้เกิดจากการสอดแทรกในทิศทางที่ถูกต้องสร้างโปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ เพราะว่าจีเอฟพีเป็นโปรตีนที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์⁽¹³⁾ สาเหตุดังกล่าวน่าจะเกิดจากกลไกบางอย่างในขั้นตอนการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ไลเกส ทำให้เลือกเกิดการเชื่อมต่อในแบบเดียวเท่านั้น

พลาสมิด pAD44-12 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Jo Handelsman เป็นซิทเทิลเวกเตอร์ระหว่าง *E. coli* และ *B. cereus* มียีน *gfpmut3a* อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์จาก *B. cereus* UW85 มีขนาดประมาณ 9.5 กิโลเบส ในงานวิจัยนี้สามารถทรานสฟอร์ม pAD44-12 เข้าสู่ BS11 ได้สำเร็จโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน แต่โอกาสในการได้ทรานสฟอร์มแมนท์มีน้อยมาก การทำอิเล็กโทรพอเรชันแต่ละครั้งต้องใช้พลาสมิดปริมาณมาก (ประมาณ 1 ไมโครกรัม ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และต้องมีวิธีการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ที่ดี ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Liu และคณะ⁽⁴⁹⁾

ทรานสฟอร์มแมนท์ BS11 ที่ได้รับพลาสมิด pAD44-12 ใช้ชื่อว่า BS11-GFP สามารถเจริญในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลได้ และเกิดการแสดงออกของยีน *gfpmut3a* โดยสังเกตเห็นเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แต่การเรืองแสงไม่ได้เกิดขึ้นในทุกเซลล์ (ดังรูปที่ 17) และไม่เห็นการเรืองแสงจากโคโลนีภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ทั้งนี้เนื่องจากยีน *gfpmut3a* ในพลาสมิด pAD44-12 อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์จาก *B. cereus* UW85 จึงไม่สามารถแสดงออกได้อย่างเต็มที่ใน BS11 นอกจากนี้โปรตีนจีเอฟพีจาก *gfpmut3a* มีช่วงการดูดกลืนแสงที่ 508 นาโนเมตร และเปล่งแสงที่มีความยาวคลื่น 511 นาโนเมตร⁽¹⁷⁾ ดังนั้นการสังเกตการเรืองแสงสีเขียวจากโคโลนีจึงทำได้ยาก เพราะต้องอาศัยอุปกรณ์ เช่น แหล่งกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่นใกล้ช่วง 508 นาโนเมตร และฟิลเตอร์ที่สามารถคัดกรองเฉพาะแสงที่มีความยาวคลื่นช่วง 511 นาโนเมตรเท่านั้น

เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Webb และ Resnekov⁽⁶¹⁾ ที่รายงานว่า เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตลงบนโคโลนีของ *B. subtilis* ที่มียีนประมวลรหัสจีเอฟพีเชื่อมอยู่กับโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการสร้าง coat protein พบว่าไม่สามารถเห็นการเรืองแสงจากโคโลนีได้ เนื่องจากการสร้างโปรตีนเกิดขึ้นในระดับที่ไม่สูงพอ

Gray และคณะ⁽⁶²⁾ ได้อธิบายวิธีการตรวจดูการเรืองแสงโดยใช้อุปกรณ์อย่างง่าย คือจะต้องมีแหล่งกำเนิดแสงสีน้ำเงินที่มีความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เมื่อตัวอย่างได้รับแสงจะ

เปล่งแสงสีเขียวออกมาพร้อมกับแสงสีน้ำเงินจากแหล่งกำเนิดแสง ซึ่งแสงสีน้ำเงินนี้จะถูกกันออกด้วยฟิลเตอร์ที่ยอมให้แสงสีเขียวผ่านเท่านั้น

เพื่อตรวจสอบว่าพลาสมิดที่ใช้จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของ BS11 จึงทำการสร้างพลาสมิดที่จะนำไปใช้เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งจะทำในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ก่อน โดยการตัดยีน *gfpmut3a* และส่วนโปรโมเตอร์ออกจากพลาสมิด pAD44-12 เชื่อมต่อพลาสมิดส่วนที่เหลือด้วยเอนไซม์ไลเกส แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5 α คัดเลือกโคโลนีของทรานสฟอร์มแมนท์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีแอมพิซิลลินมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบขนาดของพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ขนาด 5 กิโลเบส ให้ชื่อว่าพลาสมิด pAD ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีเพียงยีนต้นสารปฏิชีวนะและจุดเริ่มต้นของการถ่ายแบบเท่านั้น จากนั้นทรานสฟอร์ม pAD เข้าสู่ BS11 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีคลอแรมเฟนิคอล ทรานสฟอร์มแมนท์ BS11 ที่ได้รับพลาสมิด pAD ใช้ชื่อว่า BS11-pAD

การหาความเสถียรของพลาสมิด pAD44-12 และ pAD ในเจ้าบ้านที่เป็น BS11-GFP และ BS11-pAD พบว่า ในสภาพที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นตัวคัดเลือก พลาสมิดทั้งสองยังสามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อมกับการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน BS11 ได้ แต่จะคงเหลืออยู่ 77.85 และ 79.18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากการแบ่งเซลล์ไป 50 รุ่น ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Dunn และคณะ⁽⁴⁷⁾ ที่ pAD44-12 จะคงเหลืออยู่ใน *B. cereus* UW85 ประมาณ 29.33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการแบ่งเซลล์ไป 35 รุ่น และงานวิจัยของ Zhang และคณะ⁽⁴⁸⁾ ที่ pRP22 จะคงเหลืออยู่ใน *Brevibacillus brevis* ZJY-1 และ *Bacillus subtilis* ZJY-116 ประมาณ 55.3 และ 47.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากการแบ่งเซลล์ไป 50 รุ่น

การทดลองใช้ BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD ผสมในอาหารกึ่งในอัตราส่วนระหว่างเซลล์สดต่ออาหารกึ่งเท่ากับ 1:3 จะทำให้ได้ความเข้มข้นของ BS11 ในอาหารกึ่งเท่ากับ 10^5 CFUต่อกรัม และเมื่อนำอาหารกึ่งที่ผสม BS11-GFP ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบการเรืองแสงสีเขียวของเซลล์ BS11-GFP ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์ แต่ไม่พบเซลล์ที่เรืองแสงในลักษณะนี้ในอาหารกลุ่มควบคุมทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ผสม BS11, กลุ่มที่ผสม BS11 และกลุ่มที่ผสม BS11-pAD

ในงานวิจัยนี้ทำการทดลองเลี้ยงกึ่งในระยะเวลาโพลลวา 24 ด้วยอาหารที่ผสม BS11-GFP โดยมีกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ผสม BS11 เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ผสม BS11 และกลุ่มที่ผสม BS11-pAD เป็นกลุ่มโพรไบโอติกควบคุม ในบ่อปูนซีเมนต์ขนาด 400 ลิตร ทำการทดลองเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ให้อาหารวันละ 3 มื้อ เปรียบเทียบน้ำหนักโดยการชั่งน้ำหนักทุกๆ 3 สัปดาห์ พบว่าในสัปดาห์ที่ 9 น้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งกุดาต้ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11 ทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่ากึ่งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ BS11 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD มากกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 30,

31 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rengpipat และคณะ⁽⁵⁾ ที่กุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับ BS11 มีการเจริญเติบโตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังจากใช้ BS11 ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 100 วัน นอกจากนี้ในการทดลองนี้ยังตรวจพบ BS11 และสปอร์ในน้ำเลี้ยงกุ้งกุลาดำจากบ่อที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD ประมาณ 10^2 CFU/ml แต่ไม่พบ BS11 ในน้ำจากบ่อควบคุม ในขณะที่เดียวกันตรวจพบ BS11 ในลำไส้กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD ประมาณ $10^5 - 10^6$ CFUต่อกรัม แต่ไม่พบ BS11 ในทางเดินอาหารของกุ้งกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองเลี้ยงกุ้งข้างต้น แสดงว่ายีน *gfpmut3a* ที่อยู่ในพลาสมิด pAD44-12 ไม่มีผลกระทบต่อคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของ BS11 ซึ่งสอดคล้องกับ Bermudez และคณะ⁽¹³⁾ ที่รายงานว่าจีโอเอฟพีไม่มีผลกระทบต่อเจริญของเซลล์หรือการแสดงออกของยีนอื่นและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถใช้กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกุ้งผสม BS11-GFP เป็นตัวแทนของกุ้งที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติก BS11 ได้

ในการเก็บตัวอย่างกุ้งหลังการเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำกุ้งมาหาปริมาณ BS11 ในลำไส้ และนำลำไส้กุ้งมาตัดเนื้อเยื่อเพื่อนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผู้วิจัยได้งดให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการเก็บตัวอย่างกุ้ง เพราะต้องการจัดปัญหาในขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อลำไส้ด้วยไมโครทอม เนื่องจากถ้าในลำไส้มีเศษอาหารตกค้างอยู่อาจมีเศษกวอดหรือทราย จะทำให้ใบมีดไมโครทอมไม่คมและขัดขวางการตัดเนื้อเยื่อ ด้วยเหตุนี้เองทำให้ BS11 ในลำไส้กุ้งมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่เลี้ยงด้วย BS11 ในงานวิจัยของวรรณีก่อนหน้านี้⁽⁷⁾

การตรวจหา BS11-GFP ในลำไส้กุ้งกุลาดำหลังเลี้ยงครบ 9 สัปดาห์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ พบเซลล์แบคทีเรียที่มีการเรืองแสงของจีโอเอฟพีบริเวณผนังลำไส้ส่วนปลายของลำไส้กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม BS11-GFP แต่ไม่พบการเรืองแสงในลำไส้กุ้งกุลาดำกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารกลุ่มควบคุมทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ผสม BS11, กลุ่มที่ผสม BS11 และกลุ่มที่ผสม BS11-pAD แสดงว่าเมื่อกุ้งได้รับ BS11 ที่ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้ง BS11 สามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร และสามารถเข้าไปยึดเกาะกับผนังลำไส้กุ้งกุลาดำได้

Lee และคณะ⁽⁶³⁾ กล่าวว่า ความสามารถในการยึดเกาะที่ลำไส้เป็นปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จของโพรไบโอติกแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดของ Verschuere และคณะ⁽⁶⁴⁾ ที่โพรไบโอติกแบคทีเรียจะแข่งขันและแย่งพื้นที่ยึดเกาะ แย่งอาหารและพลังงานกับแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นการพบ BS11 บริเวณผนังลำไส้ของกุ้งกุลาดำในการทดลองนี้ เป็นการสนับสนุนคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกในกุ้งกุลาดำของ BS11

การตรวจหา BS11-GFP ในลำไส้กุ้ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ต้องอาศัยเทคนิคทาง histology ในการตัดเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งให้เป็นชิ้นบาง ๆ เพื่อให้แสงฟลูออเรสเซนซ์จาก

กล้องจุลทรรศน์ส่องลงไปถึงจีเอฟพี (ที่ถูกผลิตจาก BS11-GFP) และแสงสีเขียวที่จีเอฟพีเปล่งออกมาเข้าสู่ตัวกล้องได้ ซึ่งเทคนิคนี้ต้องอาศัยการเตรียมเนื้อเยื่อหลายขั้นตอน เนื้อเยื่อต้องผ่านการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำประปาหลายครั้ง แช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ แช่ในไซลีนและพาราพลาสติก แม้ว่าจีเอฟพีจะไม่เสียหาย แต่จากการที่เนื้อเยื่อลำไส้ต้องแช่ในสารละลายเหล่านี้หลายๆ ครั้ง ทำให้จุลินทรีย์ที่ผิวหน้าลำไส้สามารถหลุดออกไปได้ นอกจากนี้การตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 7 ไมครอน ทำให้ได้ชิ้นเนื้อเยื่อจำนวนมาก การนำชิ้นเนื้อเยื่อเหล่านี้มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นไปอย่างสุ่ม ดังนั้น BS11-GFP ที่ตรวจพบในลำไส้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงเป็นเพียงส่วนหนึ่ง และไม่สามารถบอกปริมาณที่แท้จริงได้

จากงานวิจัยอื่นๆ ที่ทำการติดตามจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยใช้จีเอฟพีเป็นตัวติดตาม ฉลาก เช่น Geoffroy และคณะ⁽⁶⁵⁾ ได้ให้ *Lactobacillus plantarum* GFP⁺ 10 ไมโครลิตร (10⁹ CFU) แก่หนู BALB/c ซึ่งเป็นโมเดลในการทดลอง โดยวิธี intragastric lavage หลังจากนั้น 90 นาที ตัด Payer's patches และลำไส้ แช่ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ ผึ่งในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อ และนำเนื้อเยื่อไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ฝังอยู่กับเยื่อเมือกหรืออยู่กระจายในลำไส้ มีบางตัวเท่านั้นที่เกาะกับผิวหน้าลำไส้ แต่ไม่พบแบคทีเรียที่ Payer's patches เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียในการทดลองแบบ *in vivo* เจือจางมาก นอกจากนี้ Schultz และคณะ⁽⁵²⁾ ได้ให้ *E. coli* สายพันธุ์ Nissle 1917 200 ไมโครลิตร (5x10¹⁰ CFU) แก่หนู BALB/c ซึ่งเป็นโมเดลในการทดลอง โดยให้ผ่านทางช่องปาก และตัดลำไส้หนูหลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลาต่างๆ กัน และนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียอยู่ใกล้กับผิวหน้าของกระเพาะและลำไส้ ดังนั้นการผสม BS11 โดยการคลุกกับเม็ดอาหารกึ่ง แล้วนำไปเลี้ยงกึ่งในบ่อขนาด 400 ลิตร จะทำให้แบคทีเรียมีความเจือจางมาก วิธีนี้จึงไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในการติดตาม BS11-GFP

เมื่อ BS11-GFP เข้าเกาะที่ลำไส้กึ่งและสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ มีการจัดเรียงโมเลกุลเพื่อสร้างโครโมฟอร์ ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องอาศัยออกซิเจนในการเกิดออกซิเดชัน⁽³⁶⁾ (ดังรูปที่ 3) แต่เนื่องจากในทางเดินอาหารของสัตว์เป็นสภาวะไร้ออกซิเจน ดังนั้นการเรืองแสงจึงถูกยับยั้งได้ จึงสอดคล้องกับผลการทดลองที่ตรวจพบ BS11-GFP ในเนื้อเยื่อลำไส้กึ่งส่วนปลายเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ BS11-GFP ที่นับได้จากการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง (ประมาณ 10² CFU/g) จึงควรจะพบ BS11-GFP ที่เรืองแสงในลำไส้จำนวนมากกว่านี้

สรุปผลการทดลอง

1. ติดฉลาก BS11 ด้วยโปรตีนจีเอฟพี โดยการนำพลาสมิดที่มียีน *gfpmut3a* เข้าสู่คอมพีเทนท์ BS11 ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ได้ BS11-GFP ซึ่งจะเห็นการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์
2. ความเสถียรของพลาสมิดใน BS11 เท่ากับ 77.85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเลี้ยงเชื้อไป 50 รุ่น ในอาหารเหลวที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นตัวคัดเลือก
3. นำ BS11-GFP ผสมในอาหารกุ้งในอัตราส่วนเซลล์สดต่ออาหารกุ้ง เท่ากับ 1:3 ได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^5 CFU/กรัม และตรวจพบ BS11-GFP ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์
4. เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่ผสม BS11-GFP เป็นเวลา 9 สัปดาห์ พบว่าการเจริญของกุ้งปริมาณเชื้อในน้ำ และปริมาณเชื้อในลำไส้ ไม่มีความแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงด้วย BS11
5. ตรวจพบ BS11-GFP ที่มีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ บริเวณผนังลำไส้กุ้งกุลาดำ

ข้อเสนอแนะ

1. ทดลองแทรกยีนประมวลรหัสของโปรตีนชนิดอื่นลงในซีทเทิลเวกเตอร์ pTG ที่ตำแหน่ง *PstI*
2. ปรับปรุงโปรโมเตอร์ในพลาสมิด pAD44-12 ให้เหมาะกับ BS11 เพื่อให้การแสดงออกของยีน *gfpmut3* มีประสิทธิภาพสูงที่สุด
3. หาแหล่งแสงและฟิลาเตอร์ที่เหมาะสมกับจีเอฟพี เพื่อให้ตรวจดูการเรืองแสงจากโคลนนี้ของแบคทีเรียได้โดยตรง
4. ติดฉลาก *Bacillus* สายพันธุ์ที่ไม่เป็นโพรไบโอติกด้วยจีเอฟพี แล้วนำไปทดลองเลี้ยงกุ้งเปรียบเทียบกับ BS11-GFP
5. ติดฉลาก *Vibrio harveyi* ด้วยโปรตีนที่มีการเรืองแสงสีอื่น แล้วนำไปเหนี่ยวนำให้กุ้งที่เลี้ยงด้วย BS11-GFP เกิดโรค จากนั้นตรวจดูทางเดินอาหารของกุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อให้เข้าใจกลไกระหว่างเจ้าบ้าน โพรไบโอติก และเชื้อก่อโรค

รายการอ้างอิง

- (1) ศุกลากร, กรม. 2550. การส่งออกกุ้งไทย ปี 2549. วารสารเครือเจริญโภคภัณฑ์ ข่าวกุ้ง. 18 (มกราคม): 4.
- (2) อุตสาหกรรม, กระทรวง. 2541. กุ้งดำ ขุมทรัพย์ชายฝั่ง 2,600 กม. วารสารอาหาร. 2: 5-12.
- (3) Maeda, M., and Liao, I. C. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquac. 21: 25-29.
- (4) Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture. 164: 351-358.
- (5) Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture. 167: 301-313.
- (6) ศิริเพ็ญ สังข์ชัย. 2546. โพรไบโอติก *Bacillus subtilis* BP11 สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อป้องกัน *Vibrio harveyi*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- (7) วรรณิกา เพ็ญนภักตร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- (8) Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium(*Bacillus* S11). Aquaculture. 191: 271-288.
- (9) Rengpipat, S., Tunyanun, A., Fast, A. W., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 2003. Enhanced growth and resistance to *Vibrio* challenge in pond-reared black tiger shrimp *Penaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. Dis. Aquat. Organ. 55: 169-173.
- (10) พิสมัย โพธิ์เวชกุล. 2547. เปรียบเทียบผลของโพรไบโอติกจากแบคทีเรียกับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเชิงพาณิชย์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- (11) Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene. 111: 229-233.

- (12) Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67: 509-544.
- (13) Bermudez, L. E., Sangari, F. J., and Parker, A. 1999. Green fluorescent protein in the measurement of bacteria-host interactions. In Conn, P. M. (ed.), Method in Enzymology, vol. 302, pp. 285-295. San Deigo: Academic Press.
- (14) Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 263: 802-805.
- (15) Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N., Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. Nat. Biotechnol. 14: 1246-1251.
- (16) Prasher, D. C. 1995. Using GFP to see the light. TIG August. 11: 320-323.
- (17) Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein(GFP). Gene. 173 : 33-38.
- (18) Kondepudi, A. Green fluorescent protein applications. Amersham Biosciences Application Note # 61 [Online]. Amersham Biosciences. Available from: [http://www6.gelifesciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/217852891-B500/\\$file/63002872.pdf](http://www6.gelifesciences.com/applic/upp00738.nsf/vLookupDoc/217852891-B500/$file/63002872.pdf) [2005, May 5]
- (19) วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- (20) Primavera, J. H. 1990. External and internal anatomy of adult penaeid prawns/shrimps. The Philippines : SEAFDEC Aquaculture Department. (Poster)
- (21) นันทริกา ชันช้อย. 2540. ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ. ใน ศุภชัย นิลวานิช (ผู้รวบรวม), กุ้งกุลาดำ ทางเลือก-ทางรอด, หน้า 15-24. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มติชน.
- (22) ประจวบ หล้าอุบล. 2533. กุ้ง. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- (23) Motosh, H. 1984. Biology and ecology of *Penaeus monodon*. Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimp. 27-36. Iloilo City : SEAFDEC Aquaculture Department.
- (24) ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. กรุงเทพมหานคร: ฐานเศรษฐกิจ.
- (25) Flegel, T. W., and others. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand. In Fulks, W., and Main, K. L. (eds.), Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States, pp. 57-112. Hawaii: The Oceanic Institute.

- (26) Fuller, R. 1992. History and Development of probiotics. In Fuller, R (ed.), Probiotics the Scientific Basis, 1st ed, pp. 1-8. London: Chapman & Hall.
- (27) Lilly, D. M., and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganism. Science. 147: 747-748.
- (28) Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. Anim. Nutr. Health. 29: 4-8.
- (29) Fuller, R. 1989. Probiotics, in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.
- (30) Havenaar, R., and Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: a general view. In Wood, B. J. W. (ed), The lactic acid bacteria in health & disease, vol. 1, pp.151-170. London: Elsevier Applied Science.
- (31) Holzapfel, W. H., Harberer, P., Snel, J., Schillingger, U., and Huis in't Veid, J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41: 85-101.
- (32) Fox, S. M. 1988 Probiotic: intestinal inoculants for production animals. Vet. Med. 83: 806-830.
- (33) Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P. 1998. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In Flegel, T. W. (ed.), Advances in shrimp biotechnology, pp. 177-181. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- (34) สมบัติ รักประทานพร. 2542 การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- (35) อรุณ ชาญญนันท์. 2544. การเสริม *Bacillus* S11 ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระดับทดลองภาคสนาม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- (36) Palm, G. J., and Wlodawer, A. 1999. Spectral variants of green fluorescent protein. In Conn, P. M. (ed.), Method in Enzymology, vol. 302, pp. 378-394. San Deigo: Academic Press.
- (37) Carson, M. 1987. Ribbon models of macromolecules. J. Mol. Graphics. 5: 103-6.
- (38) Kain, S. R., and Ma, J.-T. 1999. Early detection of apoptosis with annexin V-enhance green fluorescent protein. In Conn, P. M. (ed.), Method in Enzymology, vol. 302, pp. 38-43. San Deigo: Academic Press
- (39) Heim, R., Cubitt, A. B., and Tsien, R. Y. 1995. Improved green fluorescence. Nature. 373: 663-664.

- (40) Harper, B. K., and others. 1999. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. Nat. Biotechnol. 17: 1125-1129.
- (41) Handler, A. M., and Harrell, R. A. 2001. Transformation of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a piggyBac vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 199–205.
- (42) Webb, C. D., Decatur, A., Teleman, A., and Losick, R. 1995. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 177: 5906-5911.
- (43) Stretton, S., Techkarnjanaruk, S., McLennan, A. M., and Goodman, A. E. 1998. Use of green fluorescent protein to tag and investigate gene expression in marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2554-2559.
- (44) Freitag, N. E., and Jacobs, K. E. 1999. Examination of *Listeria monocytogenes* intracellular gene expression by using the green fluorescent protein of *Aequorea victoria*. Infect. Immun. 67: 1844-1852.
- (45) Cronin, S. R., and Hampton, R. Y. 1999. Measuring protein degradation with green fluorescent protein. In Conn, P. M. (ed.), Method in Enzymology, vol. 302, pp. 58-73. San Deigo: Academic Press.
- (46) Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J., and Robinson, C. 2001. Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 39: 47-53.
- (47) Moller, S., and others. 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: Evidence of metabolic interactions between community members. Appl. Environ. Microbiol. 64: 721-732.
- (48) Dunn, A. K., and Handelsman, J. 1999. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. Gene. 226: 297-305.
- (49) Zhang, X., and others. 2005. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-116 on the spikes of barley in the field. J. Zhejiang Univ., SCI. 68: 770-777.
- (50) Liu, X., Zhao, H., and Chen, S. 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. Curr. Microbiol. 52: 186-190.

- (51) Normander, B., Hendriksen, N. B., and Nybroe, O. 1999. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: Localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4646-4651.
- (52) Schultz, M., and others. 2005. Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) *in vivo*. J.Microbiol. Methods. 61: 389-398.
- (53) Scott, K. P., Mercer, D. K., Richardson, A. J., Melville, C. M., Glover, L. A., and Flint, H. J. 2000. Chromosomal integration of the green fluorescent protein gene in lactic acid bacteria and the survival of marked strains in human gut simulations. FEMS Microbiol. Lett. 182: 23-27.
- (54) Hurst, M. R. H., and Jackson, T. A. 2002. Use of the green fluorescent protein to monitor the fate of *Serratia entomophila* causing amber disease in the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. J.Microbiol. Methods. 50: 1-8.
- (55) Zernicka, G. M., and Pines, J. 2000. Cell lineage analysis. Applications of green fluorescent protein. Methods Mol. Biol. 135: 279-287.
- (56) Horn, C., Schmid, B. G. M., Pogoda, F. S., and Wimmer, E. A. 2002. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1221-1235.
- (57) Sambrook, J., Fritsch, E.J., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (58) Matthyse, A. G., Stretton, S., Dandie, C., McClure, N. C., and Goodman, A. E. 1996. Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 145: 87-94.
- (59) Hirata, H., Fukuzawa, T., and Okada, H. 1986. Structure of a β -Galactosidase gene of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 166: 722-727.
- (60) Damier, L., and Tagu, D. 2006. Restriction enzymes. In Tagu, D., and Moussard, C. (eds.), Techniques for molecular biology. Enfield, NH: Science Publishers.
- (61) Webb, C. D., and Resnekov, O. 1999. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization in *Bacillus subtilis*. In Conn, P. M. (ed.), Method in Enzymology, vol. 302, pp. 136-153. San Deigo: Academic Press.

- (62) Gray, D. J., Jayasankar, S., and Li, Z. T. 2005. A simple illumination system for visualizing green fluorescent protein. In Trigiano, R. N., and Gray, D. J. (eds.), Plant development and biotechnology. Florida: CRC Press LLC.
- (63) Lee, Y. K., Lim, C. Y., Teng, W. L., Ouwehand, A. C., Tuomola, E. M., and Salminen, S. 2000. Quantitative Approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3692-3697.
- (64) Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 655-671.
- (65) Geoffroy, M.-C., Guyard, C., Quatannens, B., Pavan, S., Lange, M., and Mercenier, A. 2000. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. Appl. Environ. Microbiol. 66: 383-391.
- (66) Stratagene. pBC phagemids Instruction manual[Online]. USA: Available from: <http://www.stratagene.com> [2005, July 19]
- (67) วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรม เล่มที่ 1. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- (68) Promega corporation. 2004. pGEM-7Zf(+) Vector[Online]. USA: Available from: <http://www.promega.com> [2005, July 30]



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB)

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic Soy Broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.3 ± 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ BS11

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โทรส (Dextrose)	2.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. สารปฏิชีวนะ

แอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/น้ำ 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทขนาดรูกว้าง 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

คลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้น 34 มิลลิกรัม/เอทานอล 1 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในหลอดไมโครพิวจ์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน

2. สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Plasmid Miniprepation

2.1 สารละลาย I

กลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลาย Tris-HCl พีเอช 8.0	25	มิลลิโมลาร์
สารละลาย EDTA พีเอช 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 สารละลาย SDS 4%

ชั่ง sodium dodecyl sulfate (SDS) 4 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อละลายหมดปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยการดิวต์โรคลอริกเข้มข้นให้เป็น 7.2 เติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 1.6 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 100 มิลลิลิตร

2.4 สารละลาย III

สารละลายโพแทสเซียมอะซีเตทเข้มข้น 5.0 โมลาร์	60	มิลลิลิตร
กรดอะซีติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5	มิลลิลิตร

2.5 สารละลาย RNase A เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง RNase A 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. ชุดสกัดพลาสมิตปริมาณน้อย QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer N3

Buffer PB

Buffer PE

Buffer EB

RNase A

Collection tube

QIAprep Spin Column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิตครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer P1 และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเติมเอทานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

4. ชุดสกัดพลาสมิตปริมาณมาก QIAprep Spin Midiprep Kit (Qiagen)

ประกอบด้วย

Buffer P1

Buffer P2

Buffer P3

Buffer QBT

Buffer QC

Buffer QF

RNase A

QIAGEN-tip100

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิตครั้งแรกให้เติม RNase A ลงใน Buffer P1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

5.1 สารละลายบัฟเฟอร์ 50xTAE

ทริส-เบส (Trisma base)	242 กรัม
กรดอะซีติก	57.1 กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 8.0	100 มิลลิลิตร

ละลายทุกส่วนในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5.2 อะกาโรสเข้มข้น 1%

อะกาโรส (Agarose)	1.0 กรัม
สารละลายบัฟเฟอร์ 1xTAE	100 มิลลิลิตร

5.3 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในน้ำ

ชั่งเอธิเดียมโบรไมด์และละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

6. ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

ประกอบด้วย

Buffer QG

Buffer PE

Buffer EB

RNase A

QIAquick Column

ก่อนใช้ชุดสกัดครั้งแรกให้เติมเอทานอลปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

7. สารละลายสำหรับเตรียมคอมพีเทนท์เซลล์ของ *E. coli*

7.1 สารละลาย RF I

RbCl	6 กรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.9 กรัม
สารละลายโพแทสเซียมอะซีเตท 1 โมลาร์ พีเอช 7.5	15 มิลลิลิตร
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.75 กรัม
กลีเซอรอล	75 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.8 ด้วยกรดอะซีติก 0.2 โมลาร์ แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7.2 สารละลาย RF II

สารละลาย MOPS 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8	10 มิลลิลิตร
RbCl	0.6 กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5.5 กรัม
กลีเซอรอล	75 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลายบัฟเฟอร์ SG

ซูโครส	46.5 กรัม
กลีเซอรอล 87%	86.2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	500.0 มิลลิลิตร

9. สารละลายน้ำเกลือ 0.85%

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.5 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
การให้อาหารกึ่งกุลาดำ

1. สูตรอาหารกึ่ง

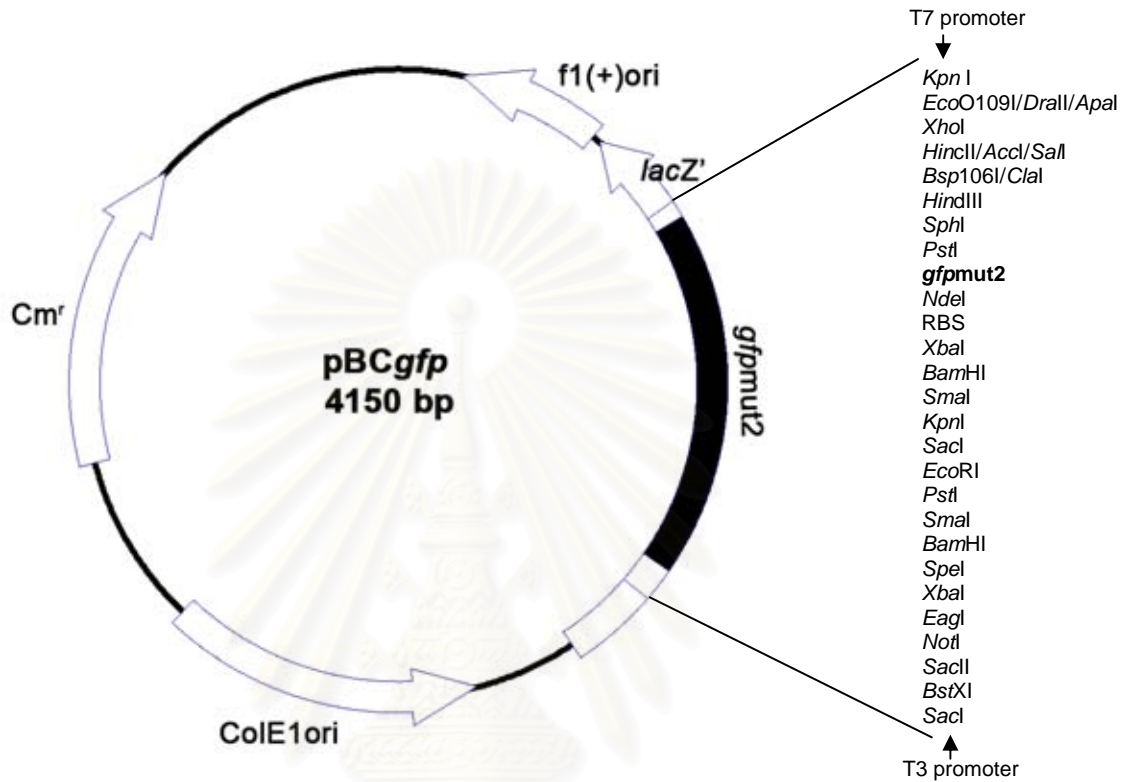
ปลาป่น	32.0	%(w/w)
ถั่วเหลืองป่น	25.0	%(w/w)
หัวกุ้งป่น	10.0	%(w/w)
เลซิทิน	1.0	%(w/w)
แป้งสาลี	20.0	%(w/w)
กลูเตน	5.0	%(w/w)
วิตามินรวม	2.0	%(w/w)
เกลือแร่รวม	3.0	%(w/w)
น้ำมันปลา	5.0	%(w/w)
ผสมอาหารให้เข้ากันแล้วนำไปอัดเม็ด		

2. อัตราการให้อาหารกึ่งกุลาดำ

PL15 – PL30	50% ของน้ำหนักตัว	3-5 ครั้งต่อวัน
PL30 – 1 กรัม	20% ของน้ำหนักตัว	3-5 ครั้งต่อวัน
1 – 5 กรัม	10% ของน้ำหนักตัว	3 ครั้งต่อวัน
5 – 10 กรัม	6% ของน้ำหนักตัว	3 ครั้งต่อวัน
10 – 20 กรัม	4% ของน้ำหนักตัว	4 ครั้งต่อวัน
20 – 30 กรัม	3% ของน้ำหนักตัว	4 ครั้งต่อวัน
มากกว่า 30 กรัม	2% ของน้ำหนักตัว	4 ครั้งต่อวัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง



รูปที่ 25 แผนที่เรสตริกชันของ pBCgfp^(58, 66)

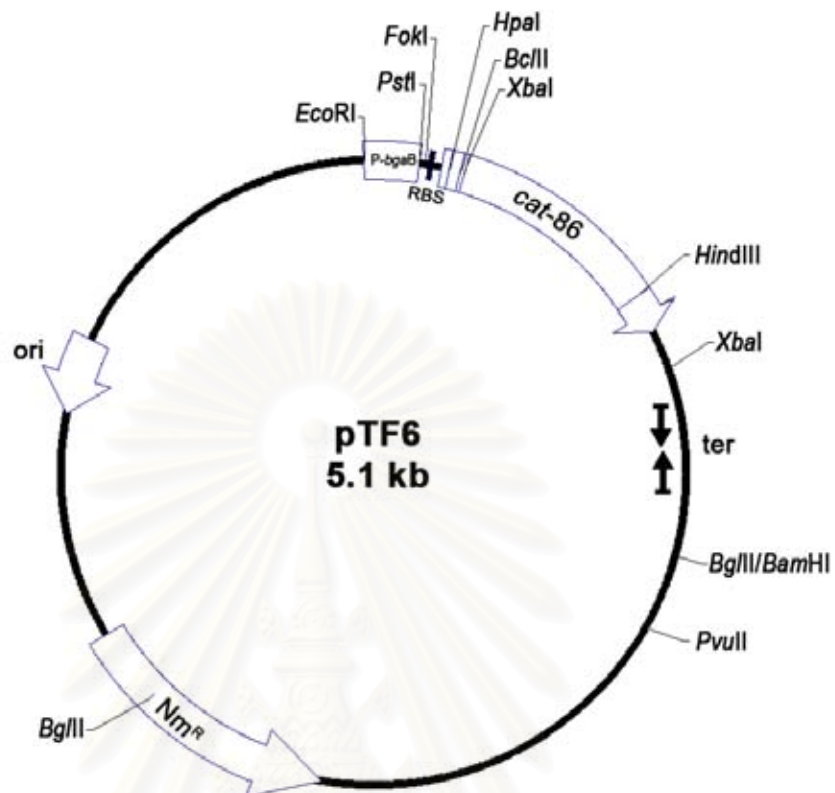
หมายเหตุ RBS คือ ribosome binding site

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

>060317-14_G06_pBCGFP-T3.ab1 853 0 853 ABI

NNAATGATCCGCGGGGCGGCCGCTCTGAATAGTGGATCCCCCGGGCTGCAI
BamHI SmaI PstI
 GGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATAT
EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI XbaI
start
NdeI ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTG
 TTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAG
 GGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCAC
 TACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTTCGCGT
 ATGGTCTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGAC
 TTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATT
 TTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAG
 GTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAA
 GATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACACTATAACTCACACAA
 TGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCA
 AAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTAT
 CAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCA
 TTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAG
 ACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGC
stop
PstI SphI HindIII
 ATGGATGAAC TACAATAATGTCCAGACCTGCAAGGCATGCAAGCTTA
 TCG

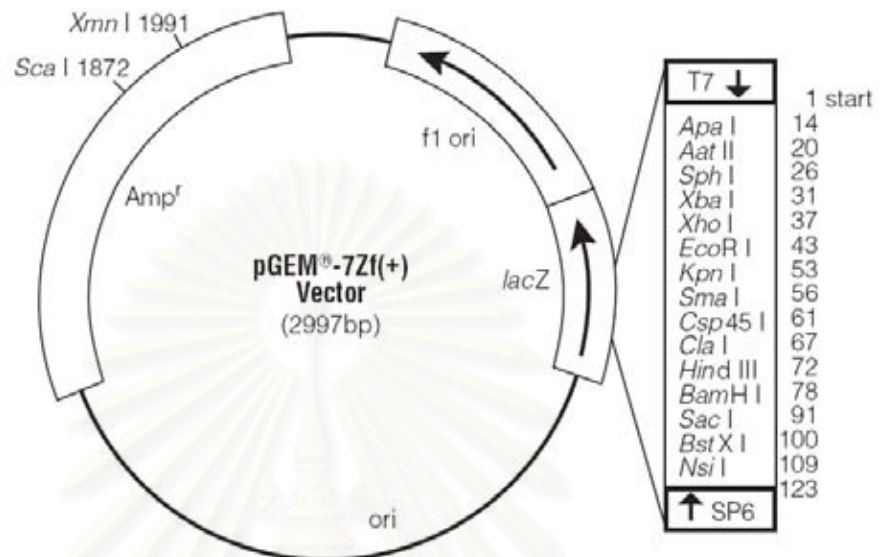
รูปที่ 26 ผลการหาลำดับเบสของ *gfpmut2* ในพลาสมิด pBC*gfp* โดยใช้ T7 promoter
 หมายถึง ตัวอักษรสีเขียวแสดงลำดับเบสบริเวณยีน *gfpmut2*



รูปที่ 27 แผนที่เรสตริกชันของ pTF6⁽⁶⁷⁾

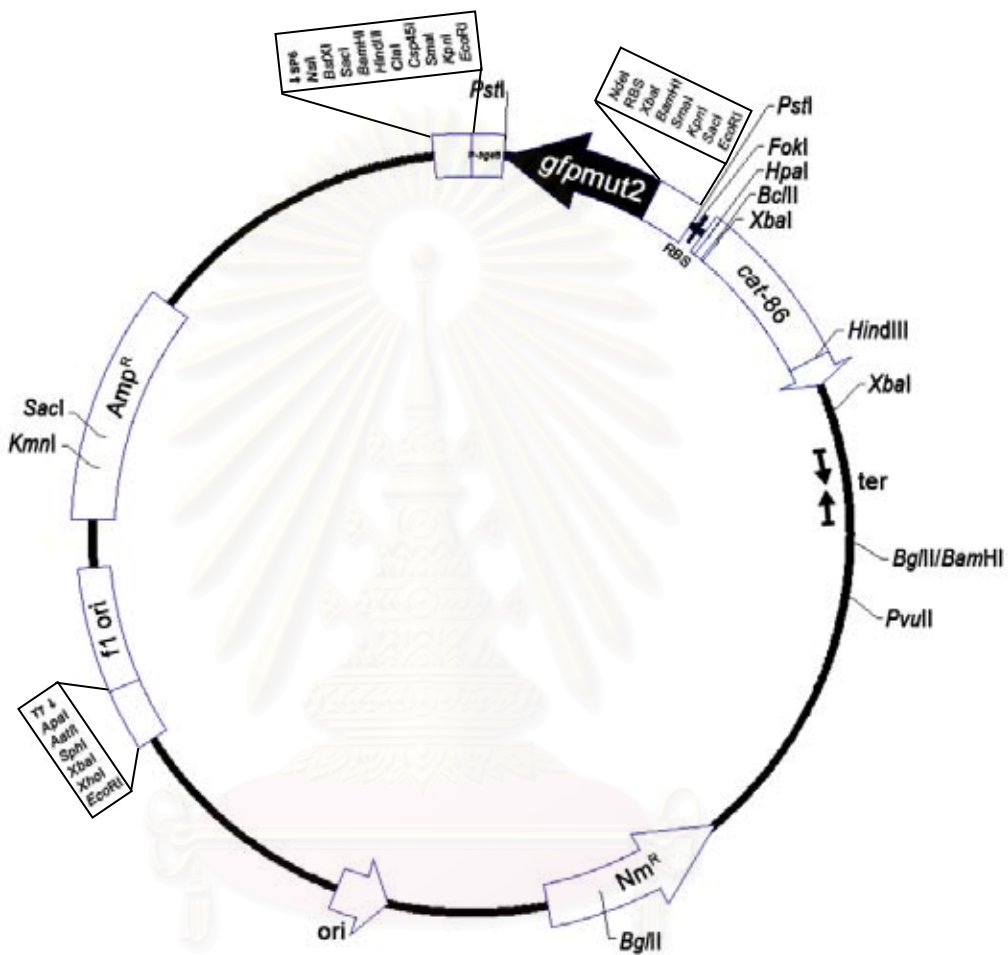
P-*bgaB* คือ promoter fragment (ขนาด 119 คู่เบส) จาก β -galactosidase gene ของ *B. stearothermophilus* ซึ่งจะ express ในช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะ vegetative stage

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



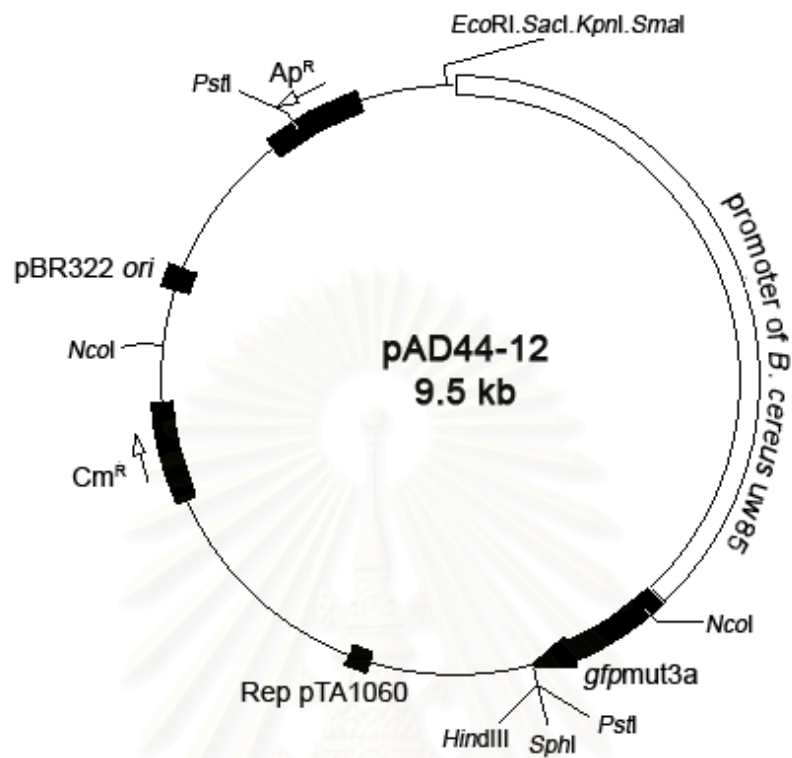
รูปที่ 28 แผนที่เรสตริกชันของ pGEM-7Zf(+)⁽⁶⁸⁾

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 แผนที่เรสทริกชันของ pTG ที่มียีน *gfpmut2* แทรกในลักษณะกลับทิศ

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 แผนที่เรสตริกชันของ pAD44-12⁽⁴⁰⁾

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

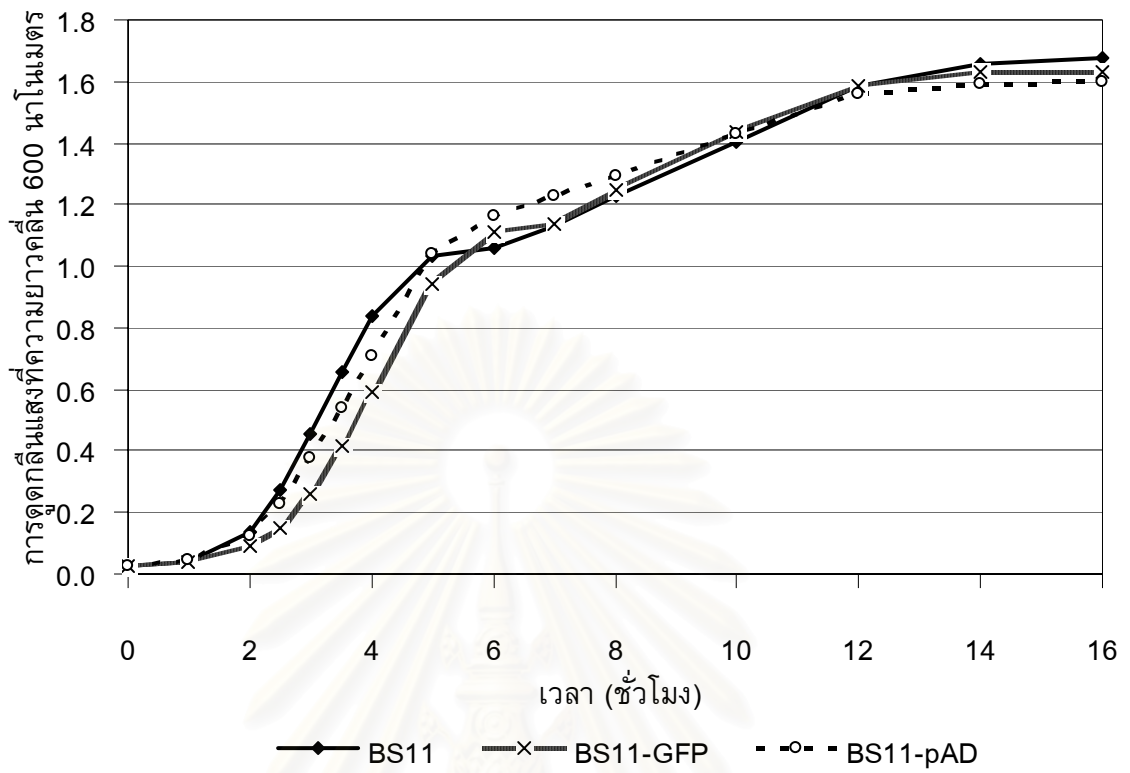
060914-03_M03_pAD4412-primerGFPmut3.ab1 863 0 863 ABI

GGGNNNGGTGTACGTAGTTTCGTAGTGCAATAAATTTAAGGGTAAGTT
 TTCCGTATGTTGCATCACCTTCACCCTCTCCACTGACAGAAAATTTGTGC
 CCATTAACATCACCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAACCTCCAGTGAA
 AAGTTCTTCTCCTTTACTCA^{start}TATGTATATCTCCTTCTTAAAT^{XbaI}CTAGAGGA
 TCGCGAGTAAATCCACCAAATCCAAACATATTATTTATCTTCCTTTCTTG
 TTTTCACGGACTCATTTTTTCTTACTTTATATTATAAAAACAGTACGTTT
 TTTATATCTTTATCCTTTTTGTAGATAAATTTCTACAAAAACTCATAAA
 TCACATTATAAAACAAAATAAGTAAAAAGCATAGTCTTAAATATGACCTT
 TTTCTTTAAACTCACGAATTTATGGTCACCTATTATAAATAGTGATAGG
 TAAGAAAAACCACGACTTTACTCGTTTGGACTTCTTTTCCCCCACTTCA
 CACCGTACGTGAGACTTTCACCTCATACGGCGTTCCATCAACTCAATTAT
 TTACGTTAATCCCAATTTTTCTCTAAACCTAGAACCTTTTCCCAAATTA
 CTTTTCCGACCATGGAATAATCTTTTGAAGTGTGAATCATTGATGGCAA
 TGTTTCATGTAGGGATGCAAGGTTAGGAACACGATTTACTTCTTCTATGGG
 GAGTTTTGGGTTGACATGGTGTATGTGTACATCATCCCCCTGAAGTAACT
 CTCCACATACTCGACATCTTCCTTTATCACGGTTAAATGCATAGGCTCGA
 TTCATAAAGTATTCAAAGTTGTACAATTTTCCCTTATGTCCGATTTTGAT
 AATCTTGGACCAN

รูปที่ 31 ผลการหาลำดับเบสของพลาสมิด pAD44-12

หมายเหตุ ตัวอักษรสีเขียวแสดงลำดับเบสบริเวณยีน *gfpmut3a*

ตัวอักษรสีดำแสดงลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์จาก *B. cereus* UW85



รูปที่ 32 growth curve ของ BS11, BS11-GFP และ BS11-pAD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความเสถียรของพลาสมิด pAD44-12 และ pAD ของ BS11-GFP และ BS11-pAD เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 0.5xTSB ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นตัวคัดเลือก

จำนวนรุ่น	BS11-GFP	BS11-pAD
0	97.35±4.23	97.85±0.91
10	87.60±1.64	88.53±0.88
20	82.36±1.10	82.04±0.16
30	77.80±1.36	80.71±1.41
40	79.25±3.82	81.38±0.06
50	77.85±1.10	79.18±1.74

ตารางที่ 6 ปริมาณ BS11 เมื่อผสมในอาหารกึ่งกึ่งน้ำตาล

เชื้อที่ผสมในอาหารกึ่ง	จำนวน BS11 / กรัมอาหารกึ่ง (CFU/g)
ไม่ผสม(กลุ่มควบคุม)	0
BS11	8.47×10^6
BS11-GFP	7.50×10^6
BS11-pAD	2.17×10^6

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของกึ่งน้ำตาล (กรัม) ทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง

สัปดาห์ที่	กลุ่มควบคุม	กลุ่ม BS11	กลุ่ม BS11-GFP	กลุ่ม BS11-pAD
0	0.03	0.03	0.03	0.03
3	0.17±0.04	0.20±0.05	0.23±0.02	0.23±0.11
6	0.69±0.11	0.97±0.19	1.11±0.13	1.06±0.22
9	2.00±0.24	2.60±0.19	2.62±0.27	2.40±0.25

ตารางที่ 8 ปริมาณ BS11 ในน้ำเลี้ยงกึ่งกลาดำ ในสัปดาห์ที่ 9 ของการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	จำนวน BS11 ในน้ำ(CFU/ml)
กลุ่มควบคุม	0
กลุ่ม BS11	1.85×10^2
กลุ่ม BS11-GFP	3.10×10^2
กลุ่ม BS11-pAD	5.39×10^2

ตารางที่ 9 ปริมาณ BS11 ในลำไส้กึ่งกลาดำ หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 9 สัปดาห์

กลุ่มการทดลอง	จำนวน BS11 ต่อกรัมลำไส้ (CFU/g)
กลุ่มควบคุม	0
กลุ่ม BS11	1.14×10^5
กลุ่ม BS11-GFP	4.84×10^6
กลุ่ม BS11- pAD	4.86×10^5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) ของน้ำหนักกุ้ง
กุลาค่าที่เลี้ยงเป็นเวลา 3, 6 และ 9 สัปดาห์ และการเปรียบเทียบเชิงซ้อนเพื่อจัดกลุ่มโดยใช้
ค่าสถิติ Tukey

3 สัปดาห์

ANOVA

WEIGHT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.239	3	7.954E-02	9.594	.000
Within Groups	3.324	401	8.290E-03		
Total	3.563	404			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WEIGHT

Tukey HSD

(I) TREATMEN	(J) TREATMEN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-3.1242E-02	1.388E-02	.110	-6.6897E-02	4.412E-03
	3.00	-5.8893E-02*	1.369E-02	.000	-9.4051E-02	-2.3734E-02
	4.00	-6.5026E-02*	1.338E-02	.000	-9.9402E-02	-3.0650E-02
2.00	1.00	3.124E-02	1.388E-02	.110	-4.4123E-03	6.690E-02
	3.00	-2.7650E-02	1.260E-02	.125	-6.0028E-02	4.728E-03
	4.00	-3.3784E-02*	1.227E-02	.030	-6.5310E-02	-2.2574E-03
3.00	1.00	5.889E-02*	1.369E-02	.000	2.373E-02	9.405E-02
	2.00	2.765E-02	1.260E-02	.125	-4.7277E-03	6.003E-02
	4.00	-6.1333E-03	1.205E-02	.957	-3.7098E-02	2.483E-02
4.00	1.00	6.503E-02*	1.338E-02	.000	3.065E-02	9.940E-02
	2.00	3.378E-02*	1.227E-02	.030	2.257E-03	6.531E-02
	3.00	6.133E-03	1.205E-02	.957	-2.4831E-02	3.710E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

WEIGHT

Tukey HSD^{a,b}

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	75	.1679		
2.00	101	.1991	.1991	
3.00	108		.2268	.2268
4.00	121			.2329
Sig.		.076	.144	.965

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 98.140.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

6 สัปดาห์

ANOVA

WEIGHT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.929	3	2.310	22.998	.000
Within Groups	37.660	375	.100		
Total	44.588	378			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WEIGHT

Tukey HSD

(I) TREATMEN	(J) TREATMEN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-.2637*	5.090E-02	.000	-.3945	-.1330
	3.00	-.3860*	5.001E-02	.000	-.5145	-.2575
	4.00	-.3545*	4.933E-02	.000	-.4812	-.2278
2.00	1.00	.2637*	5.090E-02	.000	.1330	.3945
	3.00	-.1223*	4.475E-02	.032	-.2372	-7.3044E-03
	4.00	-9.0765E-02	4.399E-02	.165	-.2038	2.224E-02
3.00	1.00	.3860*	5.001E-02	.000	.2575	.5145
	2.00	.1223*	4.475E-02	.032	7.304E-03	.2372
	4.00	3.150E-02	4.296E-02	.884	-7.8851E-02	.1419
4.00	1.00	.3545*	4.933E-02	.000	.2278	.4812
	2.00	9.077E-02	4.399E-02	.165	-2.2238E-02	.2038
	3.00	-3.1503E-02	4.296E-02	.884	-.1419	7.885E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

WEIGHT

Tukey HSD^{a,b}

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1.00	65	.6965		
2.00	96		.9602	
4.00	113		1.0510	1.0510
3.00	105			1.0825
Sig.		1.000	.217	.909

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 90.550.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

9 สัปดาห์

ANOVA

WEIGHT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.387	3	5.129	10.648	.000
Within Groups	158.480	329	.482		
Total	173.867	332			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: WEIGHT

Tukey HSD

(I) TREATMEN	(J) TREATMEN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-.5595*	.1191	.000	-.8655	-.2536
	3.00	-.6130*	.1169	.000	-.9133	-.3128
	4.00	-.3753*	.1139	.005	-.6680	-8.2594E-02
2.00	1.00	.5595*	.1191	.000	.2536	.8655
	3.00	-5.3493E-02	.1060	.958	-.3257	.2187
	4.00	.1842	.1027	.276	-7.9655E-02	.4481
3.00	1.00	.6130*	.1169	.000	.3128	.9133
	2.00	5.349E-02	.1060	.958	-.2187	.3257
	4.00	.2377	.1001	.082	-1.9549E-02	.4950
4.00	1.00	.3753*	.1139	.005	8.259E-02	.6680
	2.00	-.1842	.1027	.276	-.4481	7.965E-02
	3.00	-.2377	.1001	.082	-.4950	1.955E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

WEIGHT

Tukey HSD^{a,b}

TREATMEN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1.00	58	2.0274	
4.00	103		2.4027
2.00	82		2.5870
3.00	90		2.6404
Sig.		1.000	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 79.592.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

หมายเหตุ TREATMENT

- 1.00 คือ กลุ่มควบคุม
- 2.00 คือ กลุ่ม BS11
- 3.00 คือ กลุ่ม BS11 pAD44-12
- 4.00 คือ กลุ่ม BS11 pAD



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิสา วงศ์ทางประเสริฐ เกิดเมื่อวันที่ 1 พฤษภาคม 2526 ที่จังหวัดระยอง สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

การเสนอผลงานวิจัย

Wongtangprasert, N., Palaga, T., and Rengpipat, S. 2006. The use of green fluorescent protein (GFP) as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In The 18th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, November 2-3, The Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand.

ทุนวิจัย

ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์และกลุ่มวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2548 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย