บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยทำรายได้มูลค่าหลายหมื่นล้านบาท (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2541) โดยเฉพาะการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจัดเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย เป็นอาชีพที่ให้ผลกำไรสูง จึงทำให้มีการขยายพื้นที่การเพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว ประกอบกับประเทศไทยเป็นพื้นที่ติดฝั่งทะเลอยู่มาก และยังได้รับการสนับสนุนจากภาครัฐ (สุมล สุวรรณนภาศรี และรวิวรรรณ ชยันต์ตระกูล, 2 539) ทำให้เกษตรกรที่ประกอบอาชีพเลี้ยงกุ้งมาจากหลายสาขาอาชีพทั้งที่มีความรู้และไม่มีความรู้ จากเดิมเป็นการเลี้ยงโดยอาศัยธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่มาเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนาคือจะปล่อยกุ้งในอัตราที่หนาแน่นขึ้น ให้อาหารสำเร็จรูป อากาศ และต้องมีการจัดการที่ดี (Lightner and Redman, 1998) ซึ่งเป็นเรื่องยากที่เกษตรกรที่ขาดความรู้และประสบการณ์จะทำได้และประสบความสำเร็จ จึงทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมามากมาย เช่น การให้อาหารเกินความต้องการทำให้เกิดมลพิษส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียด และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคลดต่ำลง ทำให้กุ้งเกิดโรค (โสภณ คงอ่อน และชูสินธ์ ชนะสิทธิ์, 2542) โรคที่เกิดในกุ้งจีนัสพีเนียส (*Penaeus* spp.) ซึ่งนิยมเลี้ยงทั่วไป เกิดจากสาเหตุติดเชื้อจุลินทรีย์และสาเหตุอื่นๆ เช่น สิ่งแวดล้อมไม่ดี การให้อาหารไม่สมดุลย์ การได้รับสารพิษ และปัจจัยทางพันธุศาสตร์ โรคที่เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้งและโรงเพาะฟักส่วนใหญ่เกิดจากไวรัส ริคเคทเซีย แบคทีเรีย เชื้อรา และ ปรสิต (สว่าง ไหวพริบ, 2532; ลิลา เรืองแป้น, 2524) เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคในกุ้งมีหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่จะเกิดจากเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Vibrio harveyi* (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2530) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก เชื้อ *V. harveyi* ก่อโรคเรืองแสง

(luminous vibriosis) ในลูกกุ้งวัยอ่อนที่อยู่ในโรงเพาะฟักและบ่อเลี้ยง ทำให้ลูกกุ้งตายเป็นจำนวนมาก จึงเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ในปัจจุบันการตรวจหาเชื้อ *V. harveyi* ใช้วิธีทางชีวเคมีโดยต้องแยกเชื้อจากตัวอย่างให้บริสุทธิ์เสียก่อน จึงจะตรวจจำแนกได้ ซึ่งต้องใช้เวลานานและให้ผลไม่แน่นอน ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *V. harveyi* วิธีใหม่ที่ให้ผลรวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาจึงมีความจำเป็น การบ่งชี้เชื้อโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction techniques; PCR) ได้ถูกนำมาใช้กับ *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran *et al*., 1997) และ *V. hollisae* (Vuddhakul *et al*., 2000) โดยอาศัยจีน *gyraseB* (*gyr B*) เป็นต้นแบบการออกแบบไพรเมอร์ พบว่าให้ผลการทดสอบเพียง 4-5 ชั่วโมง เท่านั้นและให้ผลถูกต้องแม่นยำสูง เมื่อเทียบกับวิธีการเลี้ยงเชื้อแล้วทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะพัฒนาวิธีการนี้มาใช้ในการบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* เพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการวินิจฉัยโรคระบาดในโรงเพาะฟักและบ่อเลี้ยงกุ้งทะเล ทำให้สามารถแก้ปัญหาและลดความสูญเสียได้ทันท่วงที

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 จีนัส Vibrio

เชื้อ Vibrio จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ในวงศ์นี้สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะสรีรวิทยา ชีวเคมี ระดับจีน และลักษณะการก่อโรคได้ 4 จีนัส คือ จีนัส Vibrio จีนัส Aeromonas จีนัส Plesiomonas และ จีนัส Photobacterium (Baumann and Baumann, 1981; Baumann and Schabert, 1984) แบคทีเรียในวงศ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติอื่นๆ ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และ Pseudomonadaceae ยกเว้นมีเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) และไวต่อสาร O/129 เชื้อในวงศ์นี้พบได้ทั่วไปทั้ง ในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม แต่ที่เป็นปัญหากับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งคือเชื้อจีนัส Vibrio เป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe คือสร้างพลังงานได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ลักษณะโดยทั่วไป จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งตรง (rod) หรือโค้งงอเล็กน้อย (curve rod) มีขนาดกว้างประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) มีเปอร์เซ็นต์ G + C อยู่ในช่วง 38-51 เปอร์เซ็นต์โมล ส่วนใหญ่มีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ (polar flagella) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-9 สามารถใช้อินทรีย์สารเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotrophs) ในสภาวะไม่มีออกซิเจนสามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโทส แมนโนส แลคโทส กาแลคโทส แมนนิทอล และฟรุคโทส เป็นต้น (Colwell *et al.*, 1974) ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไวต่อยาออกซิเตทตร้าซัยคลิน (oxytetracycline) คลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicol) นาลิดิซิค แอซิด (nalidixic acid) ออกโซลินิค (oxolinic acid) และ กานามัยซิน (kanamycin) (Ruangpan *et al.*, 1995) มีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) อะไมเลส (amylase) เจลลาตินเนส (gelatinase) ไลเปส (lipase) ไคตินเนส (chitinase) เป็นต้น (Sakazaki and Balow, 1981) เคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลวโดยใช้แฟลกเจลลาที่เป็น microtrichous หรือ multitrichous แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) จะสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ (lateral flagella) ที่สั้นกว่าที่พบที่ขั้วเซลล์ (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2540) ส่วนใหญ่ต้องการโซเดียมไอออน (Na^+) เป็นตัวกระตุ้นการเจริญ และสามารถแยก

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 จีนัส Vibrio

เชื้อ Vibrio จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ในวงศ์นี้สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะสรีรวิทยา ชีวเคมี ระดับจีน และลักษณะการก่อโรคได้ 4 จีนัส คือ จีนัส Vibrio จีนัส Aeromonas จีนัส Plesiomonas และ จีนัส Photobacterium (Baumann and Baumann, 1981; Baumann and Schabert, 1984) แบคทีเรียในวงศ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติอื่นๆ ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และ Pseudomonadaceae ยกเว้นมีเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) และไวต่อสาร O/129 เชื้อในวงศ์นี้พบได้ทั่วไปทั้ง ในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม แต่ที่เป็นปัญหากับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งคือเชื้อจีนัส Vibrio เป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe คือสร้างพลังงานได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ลักษณะโดยทั่วไป จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งตรง (rod) หรือโค้งงอเล็กน้อย (curve rod) มีขนาดกว้างประมาณ 0.5-0.8 ไมโครเมตร ยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) มีเปอร์เซ็นต์ G + C อยู่ในช่วง 38-51 เปอร์เซ็นต์โมล ส่วนใหญ่มีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ (polar flagella) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-9 สามารถใช้อินทรีย์สารเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน (chemoorganotrophs) ในสภาวะไม่มีออกซิเจนสามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโทส แมนโนส แลคโทส กาแลคโทส แมนนิทอล และฟรุคโทส เป็นต้น (Colwell *et al.*, 1974) ไม่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไวต่อยาออกซิเตทตร้าซัยคลิน (oxytetracycline) คลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicol) นาลิดิซิค แอซิด (nalidixic acid) ออกโซลินิค (oxolinic acid) และ กานามัยซิน (kanamycin) (Ruangpan *et al.*, 1995) มีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) อะไมเลส (amylase) เจลลาตินเนส (gelatinase) ไลเปส (lipase) ไคตินเนส (chitinase) เป็นต้น (Sakazaki and Balow, 1981) เคลื่อนที่ได้ในอาหารเหลวโดยใช้แฟลกเจลลาที่เป็น microtrichous หรือ multitrichous แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็ง (solid media) จะสร้างแฟลกเจลลารอบเซลล์ (lateral flagella) ที่สั้นกว่าที่พบที่ขั้วเซลล์ (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2540) ส่วนใหญ่ต้องการโซเดียมไอออน (Na^+) เป็นตัวกระตุ้นการเจริญ และสามารถแยก

เชื้อได้บนอาหาร TCBS agar (Thiosulfate citrate bile-salt sucrose agar) ที่นิยมใช้แยกเชื้อ Vibrio กันอย่างแพร่หลาย พบ Vibrio โดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ทั้งในน้ำทะเลและในตะกอนดินบริเวณชายฝั่งทะเลและบริเวณปากแม่น้ำ (พัชรี อังกุระ, 2540 ; ศุภชัย ประพัสศร, 2538; de la Pena *et al.*, 1992) และในสัตว์ทะเลหลายชนิดโดยเฉพาะกุ้งทะเลในธรรมชาติและที่เลี้ยงไว้ในบ่อเลี้ยง (Ruangpan and Kitao, 1991) เป็นเชื้อประจำถิ่นในกุ้งทะเล (Vandenbergh *et al.*, 1998) สามารถแยกเชื้อได้จากตับอ่อน (hepatopancreas) น้ำเลือด (haemolymp) และระบบทางเดินอาหาร (digestive tract) ของกุ้ง *P. vannamei* ปกติ มีจำนวนอยู่ระหว่าง 2 x 10^2–3 x 10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย *V. alginolyticus V. damsela* และ *Vibrio* spp. (Gomez-Gil *et al.*, 1998) ในประเทศไทยในช่วง เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2533 ถึง เดือนเมษายน พ.ศ. 2534 ได้แยกเชื้อจากตัวอย่างตับอ่อน ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งกุลาดำปกติที่เลี้ยงในจังหวัดชลบุรี พบว่าปริมาณเชื้อแปรตามอัตราความหนาแน่นของกุ้งในบ่อ เชื้อที่พบส่วนใหญ่คือ *Pseudomonas* spp. รองลงมาคือจีนัส Vibrio ได้แก่ *V. parahaemolyticus V. damsela V. alginolyticus V. harveyi V. fluvialis V. cholerae* (non-O1) และ *Vibrio* spp. (Ruangpan and Kitao, 1991; Ruangpan *et al.*, 1995a) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ Aeromonas Moraxella Flavobacterium Plesiomonas และ Acinetobacter ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในตัวกุ้งกุลาดำ (Ruangpan *et al.*, 1995b) แบคทีเรียในจีนัสนี้ส่วนใหญ่จะเป็นพวกฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) คือจะก่อโรคเมื่อกุ้งมีอาการเครียดซึ่งอาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม เช่น การปล่อยกุ้งในอัตราที่หนาแน่นเกินไป การจัดการระบบการเลี้ยงไม่ดีทำให้กุ้งมีภูมิคุ้มกันต่ำ (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2540; Nash *et al.*, 1992; Saulnier *et al.*, 2000) ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการรายงานการเกิดโรคจากเชื้อจีนัส Vibrio กระจายอยู่หลายประเทศ เช่น ในประเทศมาเลเซีย ฟาร์มปลาหลายแห่ง พบเชื้อ *V. ordalii V. anguillarum V. vulnificus* และ *Vibrio* spp. ก่อโรคในปลา (Daud, 1992) ในประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าเชื้อ *V. harveyi* และ *V. splendidus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อโรคในกุ้งจีนัสพีเนียสหลายชนิด (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) ในประเทศอินโดเนเซียพบเชื้อ Vibrio เป็นสาเหตุการตายของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงทั้งในบ่อดินและบ่อเพาะพันธุ์ (Adisukresno *et al.*, 1992) Vibrio หลาย

ชนิดทำให้เกิดการระบาดและก่อให้เกิดโรคในกุ้งจีนัสพีเนียสหลายชนิด โดยเฉพาะในวัยอ่อน (Prayitno and Latchford, 1995) เช่น *V. parahaemolyticus* ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (*P. monodon* Fabricius) ทั้งในตัวอ่อนและตัวเต็มวัย และก่อโรคในกุ้ง *P. orientalis* ทั้งในระยะกุ้งวัยรุ่นและตัวเต็มวัย (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990;) *V. vulnificus* และ *V. damsela* ก่อโรคในกุ้งกุลาดำทั้งที่เป็นกุ้งวัยรุ่นและตัวเต็มวัย (Ruangpan and Kitao, 1991; Nash *et al.*, 1992; Chanratchakool *et al.*, 1995) ในประเทศฟิลิปปินส์ สามารถแยกเชื้อ *V. harveyi V. parahaemolyticus V. fluvialis* และ*Vibrio* spp. จากตับอ่อนและน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำในช่วงที่มีการระบาดของโรคตัวแดง (Alapide-Tendencia and Dureza, 1997) และพบเชื้อ *V. alginolyticus V. parahaemolyticus V. splendidus V. vulnificus V. damsela* และ *V. harveyi* ในกุ้งที่เป็นโรค (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) โดยทำให้เกิด hepatopancreatic tubular necrosis ที่บริเวณ basal lamina ของท่อตับ เป็นผลให้ลูกกุ้งตาย เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์ตับตายและเกิดแกรนูโลมา (granuloma) ล้อมรอบบริเวณท่อตับอ่อนที่มีเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลาย ถ้าการติดเชื้อไม่รุนแรงจะพบเชื้อปริมาณไม่มาก ทำให้เกิดหนองบริเวณที่มีเซลล์ตายในท่อตับและพบการแทรกตัวของเม็ดเลือดที่บริเวณเนื้อเยื่อระหว่างท่อตับ ในท่อตับที่มีการติดเชื้อมากๆ จะมีเม็ดเลือดรอบๆ basal lamina เนื้อเยื่อบริเวณที่มีการติดเชื้อจะแสดงอาการบวมน้ำ เกิดแอ่งเลือดขนาดใหญ่ เกิดการรวมตัวกันของ eosinophilic granule และ amorphous matter มีการแทรกซึมของเม็ดเลือดทั้งชนิด เซมิแกรนูล (semigranular cell) และ แกรนูล (granular cell) แต่โดยส่วนใหญ่จะเป็น เซมิแกรนูล ซึ่งมีบทบาทในการกำจัดเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามา (Jiravanichpaisal *et al.*, 1995) สำหรับการตายของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะต่างๆ มักเกิดขึ้นมากที่สุดในช่วงลูกกุ้งลอกคราบเพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) เนื่องจากกุ้งเจริญเติบโตโดยการลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือระยะนอร์เพลียส (nauplius) โปรโตซูเอีย (protozoea) ไมซิส (mysis) และโพสท์ลาวา (postlarvae) ในช่วงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างนี้เป็นช่วงที่กุ้งมีความอ่อนแอมากที่สุด การติดเชื้อในระยะนอร์เพลียสส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อ เนื่องจากช่วงนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร ต่อมาระยะโปรโตซูเอียลูกกุ้งเริ่มได้รับอาหารพวกแพลงก์ตอนพืชพวกไดอะตอมในจีนัส *Chaetoceros* spp. และ

Skeletonema spp. ที่มีเชื้อ Vibrio ปนเปื้อน เช่น *V. alginolyticus V. parahaemolyticus V. fluvialis* และ *Vibrio* spp. (วารินทร์ ธนาสมหวัง และคณะ, 2537) และเมื่อลูกกุ้งพัฒนาเข้าระยะไมซิสจนถึงระยะโพสท์ลาวาลูกกุ้งจะได้รับอาหารพวกแพลงก์ตอนสัตว์ ได้แก่ ไรน้ำเค็ม ไรน้ำจืด ที่มีเชื้อปนเปื้อน (Sarkar *et al.*, 1983) ลูกกุ้งที่ติดเชื้อในระยะโปรโตซูเอีย กุ้งจะเคลื่อนที่ช้า ไม่กินอาหาร อ่อนแรง ลำตัวสีขาวขุ่น เช่นเดียวกับลูกกุ้งป่วยในระยะไมซิส แต่ลูกกุ้งในระยะโพสท์ลาวาจะสังเกตอาการได้หลายอย่าง เช่น ไม่กินอาหาร ตัวขาวขุ่น หรือแดง ลำไส้เป็นสีเหลือง ลำตัวสกปรก เป็นต้น ลักษณะเช่นนี้อาจเกิดขึ้นได้ในลักษณะใดลักษณะหนึ่ง หรือหลายลักษณะรวมกันก็ได้ ลูกกุ้งที่เข้าสู่ระยะโพสท์ลาวาส่วนใหญ่ไม่ตายในระยะต้นๆ แต่มักจะตายในระยะโพลท์ลาวาที่ 6 เป็นต้นไป ในกรณีที่มีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำที่ใช้เลี้ยงอนุบาลลูกกุ้งจำนวนมาก แม้ว่าลูกกุ้งจะเพิ่งได้รับเชื้อก็อาจตายยกบ่อได้ เนื่องจากแบคทีเรีย Vibrio สามารถสร้างพิษทั้งชนิด exotoxin endotoxin และสารประกอบฟีนอลที่เป็นพิษได้อีกด้วย (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2541) เชื้อ Vibrio ที่เกิดการระบาดและเป็นปัญหาที่ทำความเสียหายให้กับการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก ทั้งในโรงเพาะฟักและในบ่อเลี้ยงคือ เชื้อ *V. harveyi* โดยก่อให้เกิดโรคเรืองแสง (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530 ; มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2530) พบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในน้ำทะเล จึงทำให้มีโอกาสปนเปื้อนมากับน้ำทะเลที่ใช้ในโรงเพาะฟัก ซึ่งเป็นสาเหตุให้ลูกกุ้งวัยอ่อนในระยะนอร์เพลียส (nauplius) จนถึงระยะไมซิส (mysis) เสียหายสูงถึงร้อยละ 80 จนถึงตายยกบ่อ (ลิลา เรืองแป้น, 2530) ในช่วงปี พ.ศ. 2537-2538 เกิดการระบาดของ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศฟิลิปปินส์ โดยพบว่าเมื่อแยกเชื้อจากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำอายุ 1 - 60 วัน จำนวน 172 ตัวอย่าง พบว่ามีเชื้อ *V. harveyi* มากสุด ร้อยละ 27.9 รองลงมาคือ *V. splendidus* ร้อยละ 13.4 *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 11.2 และที่เหลือเป็น *Vibrio* spp.

1.2.2 เชื้อ *V. harveyi*

เชื้อ *V. harveyi* มีรายงานการพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1936 โดย Johnson และ Shank เดิมทีจัดอยู่ในจีนัส Lucibacterium ซึ่งมีอยู่เพียงสปีชีส์เดียว คือ harveyi ต่อมาเปลี่ยนมาเป็นจีนัส Beneckea (Reichelt *et al.*, 1976) และในที่สุดก็จัดมาอยู่ในจีนัส

Vibrio เป็นหนึ่งในหลายชนิดของแบคทีเรียเรืองแสง (luminous bacteria) ได้แก่ *V. fisheri* *V. splendidus* I *V. orientalis* *V. cholerae* biotype albensis *V. logei* และเชื้อจีนัส Photobacterium ได้แก่ *P. leiognathi* และ *P. phosphoreum* (Oliver *et al.*, 1986) ที่ตรวจพบในบริเวณชายฝั่งของประเทศไทยและอีกหลายประเทศทั่วโลก ในจำนวนแบคทีเรียเรืองแสงเหล่านี้ เชื้อ *V. harveyi* เป็นชนิดที่พบในแหล่งน้ำทะเลเป็นปริมาณสูงกว่าชนิดอื่นๆ โดยพบว่าบริเวณชายฝั่งทะเลจะมีแบคทีเรียเรืองแสงอยู่ในปริมาณที่สูง 0.2×10^{2}–1.4×10^{2} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ลิลา เรืองแป้น, 2530) และบริเวณที่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงสูงสุด (2.9×10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) คือ บริเวณน้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำและฟาร์มเลี้ยงปลากระพงขาว *V. harveyi* ก่อโรคในกุ้งสกุลพีเนียส กุ้งมังกรสีฟ้า (rock lobster; *Jasus verreauxi*) และในปลาทะเลอีกหลายชนิด (Alvarez *et al.*, 1998; Diggles *et al.*, 2000) และพบมากในกุ้งที่เลี้ยงในความเค็มค่อนข้างสูง ทำให้กุ้งป่วยและตายในช่วง 2-3 เดือน ภายหลังการปล่อยลูกกุ้งลงบ่อ (ลิลา เรืองแป้น, 2541)

1.2.2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อ *V. harveyi*

จำแนกตามวิธีของ “Bergey ‘s Manual of Determinative Bacteriology” ดังนี้

Kingdom Procaryote

Division Gram negative aerobic rod and cocci

Section Facultative anaerobic Gram negative rod

Family Vibrionaceae

Genus Vibrio

Specie *V. harveyi*

1.2.2.2 สัณฐานวิทยา และคุณลักษณะ

V. harveyi จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งตรง (straight rods) หรือแท่งโค้ง (curved rods) มีขนาด 0.5-0.8 ไมโครเมตร กว้าง 1.4-2.6 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้ว ซึ่งแฟลกเจลลามีถุงหุ้มอีกชั้น (sheated flagella) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *V. harveyi* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ที่เติม

เกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5 - 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าจะมีลักษณะโคโลนีเรียบ กลม นูน มีสีขาวนวล สะท้อนแสง เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2- 3 มิลลิเมตร ถ้าอยู่ในที่มืดจะเห็นโคโลนีเรืองแสง (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) และพบว่าเชื้อ *V. harveyi* สามารถเรืองแสงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luminous media (LM) ซึ่งโคโลนีมีลักษณะกลม ขาวขุ่นแบบน้ำนม (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) นอกจากนี้ยังสามารถเรืองแสงสีเขียวในอาหาร Seawater complex agar (SWC) และเมื่อเชื้อเจริญในอาหาร TCBS agar จะให้ลักษณะโคโลนี กลม เป็นมันเยิ้ม มีสีเหลืองขุ่นหรือเหลืองอมเขียว (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2530; Diggles *et al.*, 2000) เชื้อ *V. harveyi* สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ออกซิเดส (oxidase) อะไมเลส (amylase)ไลเปส (lipase) เลซิตินเนส (lecithinase) เจลาติเนส (gelatinase) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530; มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) ไคตินเนส (chitinase) ลูซิเฟอเรส (luciferase) (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Jaravanichpisal *et al.*, 1994) มีไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ออร์นิทิน ดีคาร์บอกซิเลส (ornithine decarboxylase) แต่ไม่มีอาร์จินิน ดีคาร์บอกซิเลส (arginine decarboxylase) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530; มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Jaravanichpisal *et al.*, 1994) ในแง่ของการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อ *V. harveyi* สามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาล กลูโคส (glucose) มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) แมนนิทอล (mannitol) กาแลคโตส (galactose) แลคโตส (lactose) ราฟฟิโนส (raffinose) ฟรุคโตส (fructose) และเซลโลไบโอส (cellobiose) แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) และดัลซิโทล (dulcitol) คุณลักษณะทางชีวเคมีอื่นๆ ของเชื้อ *V. harveyi* แสดงในตาราง 1.1

ตาราง 1.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* (Baumann and Schubert, 1984)

คุณลักษณะ	*Vibrio harveyi*
Gram stain	Gram negative
Rod shape	+
Flagella	Single polar
Luminescence	V
Swarming	-
Arginine decarboxylase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Growth in % NaCl:	
0	-
3	+
6	+
8	V
10	V
Catalase test	+
Oxidase test	+
Voges Proskauer test	-
Oxidation-fermention test	+
Growth at 4 °C	-
Growth at 35 °C	+
Growth at 42 °C	V
Acid from sucrose	V

ตาราง 1.1 (ต่อ)

คุณลักษณะ	*Vibrio harveyi*
Acid from mannose	+
Acid from salicin	V
Enzyme production:	
Amylase	+
Chitinase	+
Gelatinase	+
Lipase	+
Carbon sources:	
D-xylose	-
Mannose	+
Cellobiose	+
Galactose	V
Melibiose	-
Lactose	-
Mannitol	+

+ = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ, V = อาจให้ผลบวกหรือลบ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Baumann and Schubert (1984)

1.2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. harveyi*

ในธรรมชาติมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิดที่เจริญอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันไป และเป็นตัวกำหนดการเจริญและความอยู่รอดของจุลินทรีย์นั้นๆ มีการศึกษาสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* พบว่า ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และสารเคมี เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ความเค็มเป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจีนัส Vibrio ทั้งชนิดเรืองแสง และไม่เรืองแสง โดยมักจะอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอินทรีย์สาร และความเค็มค่อนข้าง

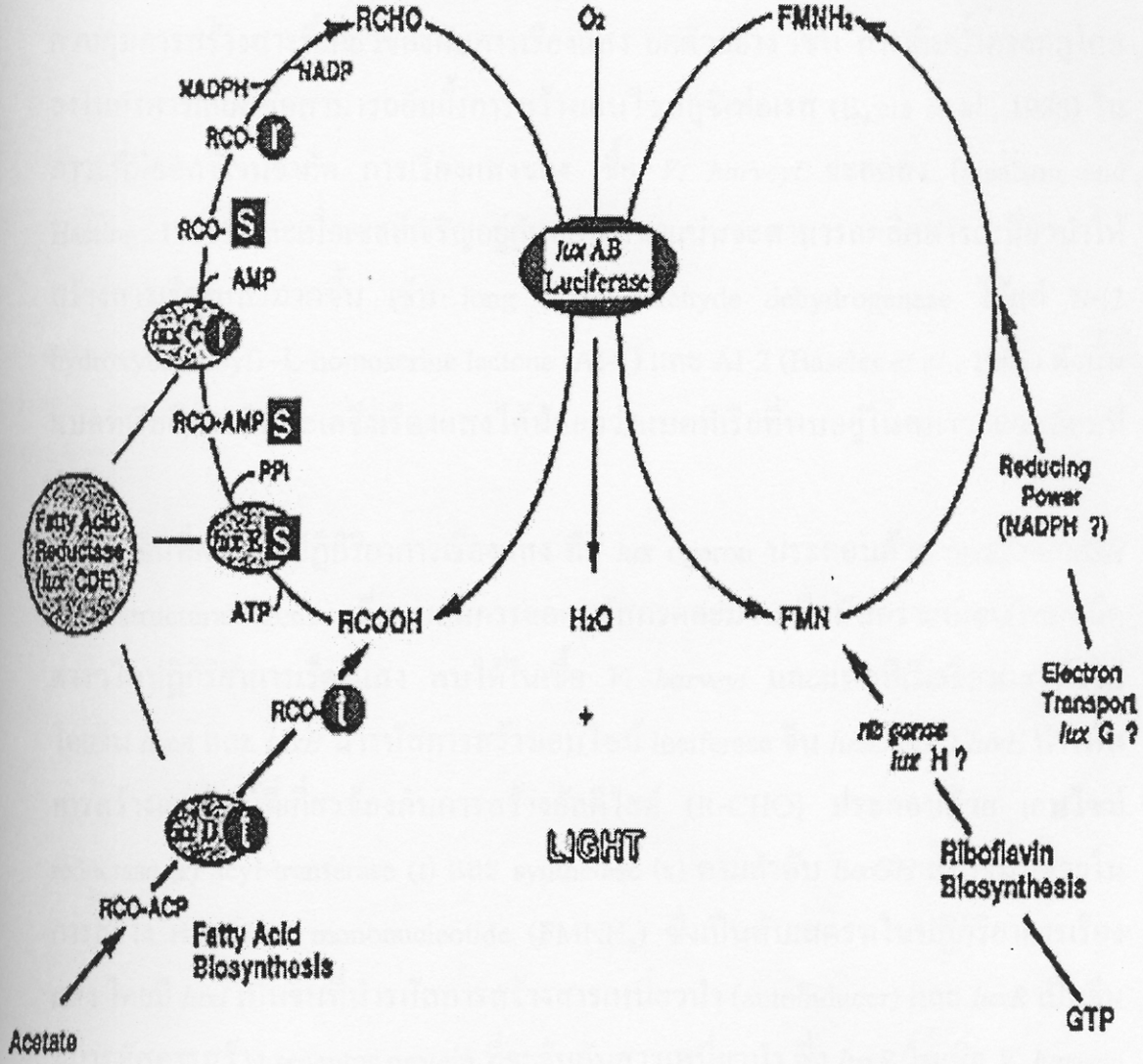
สูง (สุภฎา คีรีรัฐ และคณะ, 2543) ความเค็มที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วงความเค็มที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 1-8 หรือ 10-80 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) ดังนั้นในช่วงฤดูฝนจึงมีโอกาสพบเชื้อเรืองแสงได้น้อยกว่าฤดูร้อน (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2541) ผลของความเค็มในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำกับปริมาณเชื้อ *V. harveyi* พบว่าที่ระดับความเค็ม 30 และ 40 ส่วนในพันส่วน มีจำนวนแบคทีเรียปริมาณสูงสุดในวันที่สองของการเลี้ยงและจะลดลงช้ากว่าที่ความเค็มในช่วงอื่นๆ ในขณะที่ความเค็มที่ 0 และ 60 ส่วนในพันส่วน พบว่าแบคทีเรียมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 1 หลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว จึงพอสรุปได้ว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีที่ความเค็ม 30 หรือ 40 ส่วนในพันส่วน (นนทวิทย์ อารีย์ชน และคณะ, 2536) แต่ในบางรายงานพบว่าแบคทีเรียเรืองแสงจะมีปริมาณสูงในช่วงความเค็มตั้งแต่ 15-40 ส่วนในพันส่วน และจะตายหมดภายในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อแบคทีเรียอยู่ในที่ความเค็ม 5–10 ส่วนในพันส่วน และที่ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วนแบคทีเรียจะลดปริมาณลง 3-4 เท่า จากปริมาณที่มีอยู่เดิมภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณขึ้นมาเท่าเดิม และที่ความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน *V. harveyi* จะตายหมดภายในเวลา 1 ชั่วโมงเท่านั้น (ลิลา เรืองแป้น, 2541) เมื่อพิจารณาถึงการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar และ Brain Heart Infusion (BHI) พบว่าเชื้อ *V. harveyi* สามารถทนความเค็มได้สูงถึง 55 - 80 ส่วนในพันส่วน (นนทวิทย์ อารีย์ชน และคณะ, 2536) นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในอาหาร LM ที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 1 - 7 (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) เนื่องจากเชื้อจำเป็นต้องมีโซเดียมไอออนในการกระตุ้นการเจริญ (Kraxberger-Beatty *et al.*, 1990 ; Jiravanichpisal *et al.*, 1994; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เชื้อแบคทีเรียในน้ำเจริญได้ดีในประเทศเขตร้อนจะอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่านี้การเจริญหรือการแบ่งตัวของเชื้อแบคทีเรียจะลดลง (Karunasagar *et al.*, 1994) แต่จากการศึกษาเชื้อ *V. harveyi* บางสายพันธุ์พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เช่น สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) หรือไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533; Jiravanichpisal *et al.* 1994) *V. harveyi* บางสาย

พันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส รองลงมาที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) นอกจากนี้ปริมาณสารอินทรีย์ก็มีผลต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *V. harveyi* เมื่อปริมาณสารอินทรีย์ในน้ำเพิ่มขึ้นเชื้อจะสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วปริมาณสารอินทรีย์มีมากเกินไปจะมีผลโดยตรงต่อสภาพแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่ เพราะอินทรีย์สารจะเข้าเกาะอุดตันบริเวณซี่เหงือกขัดขวางการแลกเปลี่ยนออกซิเจน ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและจะนำไปสู่ปัญหาโรคติดเชื้อได้ง่ายขึ้น (ลิลา เรืองแป้น, 2524)

1.2.2.4 คุณลักษณะการเรืองแสง

เชื้อ *V. harveyi* รวมทั้งแบคทีเรียเรืองแสงอื่นๆมีเอนไซม์ ลูซิเฟอเรส (luciferase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็น heterodimer ประกอบด้วย 2 subunit คือ α (~42 กิโลดาลตัน) และ β (~37 กิโลดาลตัน) ควบคุมการสร้างโดยจีน *luxA* และ *luxB* ตามลำดับ (Balas *et al.*, 1982) ทั้งสองจีนมีลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันมาก ทั้งที่แยกจากเชื้อชนิดเดียวกันและแยกจากกลุ่มแบคทีเรียเรืองแสงด้วยกัน จึงเชื่อว่าเป็นจีนที่คู่กัน (duplication gene) (Cohn *et al.*, 1983; Cohn *et al.*, 1985; Johnston *et al.*, 1986) ซึ่งเอนไซม์ลูซิเฟอเรสนี้มี active site อยู่ตรงส่วนของ β subunit เป็นตำแหน่งส่วนปลายตรงหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน tryptophane จำนวน 194 และ 250 โมเลกุล เป็นส่วนที่เชื่อมต่อกับ isoallozazine ring flavin (Zhi and Meighen, 1995) ปฏิกิริยาเรืองแสงที่เกิดขึ้น เริ่มจาก riboflavin 5′ – phosphate ($FMNH_2$) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลูซิเฟอเรสในสภาวะมีออกซิเจน จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ long - chain aliphatic aldehyde (R-CHO) เกิดเป็นแสงเรือง น้ำ กรดอินทรีย์ และ Flavin mononucleotide (FMN) ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ ดังสมการและภาพประกอบ 1.1 ดังนี้ (Baumann *et al.*, 1984)

$$FMNH_2 + O_2 + R\text{-}CHO \xrightarrow{\text{luciferase}} FMN + H_2O + RCOOH + \text{light (490 nm)}$$



ภาพประกอบ 1.1 กลไกและจีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเรืองแสง

ที่มา : (http://www. notting.ac.uk/quorum/harveyi3main.htm)

การควบคุมการเรืองแสงในเชื้อ *V. harveyi* ขึ้นกับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น การได้รับอาหารของเซลล์ ปริมาณออกซิเจน ความเข้มข้นของเกลือ ปริมาณของ cAMP ในเซลล์ อุณหภูมิ การผลิตสารเหนี่ยวนำ (Manefield *et al.*, 2000) การได้รับสารพิษ พวก

โลหะหนัก ยา และสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ที่มีผลต่อการแสดงออกของจีนที่ควบคุมการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสง ยกตัวอย่าง เช่น การเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Byers *et al.*, 1988) ในภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด การเรืองแสงของ เชื้อ *V. harveyi* จะลดลง (Nealson and Hasting, 1992) และเมื่อเซลล์เจริญอยู่กันอย่างหนาแน่นจะสามารถผลิตสารเหนี่ยวนำให้สร้างสารเรืองแสงมากขึ้น เช่น long chain aldehyde dehydrogenase ได้แก่ N-(3 hydroxybutanoyl) -L-homoserine lactone (AI-1) และ AI-2 (Bassler *et al.*, 1997) ดังนั้นแบคทีเรียอิสระในทะเลจึงเรืองแสงได้น้อยกว่าแบคทีเรียที่พบอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่จำกัด

จีนที่ควบคุมปฏิกิริยาการเรืองแสง คือ *lux* operon ประกอบด้วย *luxCDABEGH* เป็น structural genes ที่ควบคุมการถอดรหัสกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดต่างๆในปฏิกิริยาการเรืองแสง พบได้ในเชื้อ *V. harveyi* และแบคทีเรียเรืองแสงทั่วไป โดยจีน *luxA* และ *luxB* นำรหัสการสร้างเอนไซม์ luciferase จีน *luxC luxD luxE* นำรหัสการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างอัลดีไฮด์ (R-CHO) ประกอบด้วย เอนไซม์ reductase (r) acyl-tranferase (t) และ synthetase (s) ตามลำดับ *luxGH* เป็นจีนที่ช่วยในการสร้าง riboflavin mononucleotide ($FMNH_2$) ซึ่งเป็นสับเสตรทในปฏิกิริยาการเรืองแสง โดยมี *luxI* เป็นจีนที่นำรหัสการสร้างสารเหนี่ยวนำ (autoinducer) และ *luxR* เป็นจีนที่นำรหัสการสร้าง receptor protein ที่จะจับกับสารเหนี่ยวนำ ซึ่ง *luxR* ในเชื้อ *V. harveyi* มีลำดับเบสคล้ายกับจีน *smcR* ในเชื้อ *V. vulnificus* โดยเป็นจีนควบคุม (regulatory genes) ปฏิกิริยาการเรืองแสง (Miyamoto *et al.*, 1988)

1.2.2.5 ลักษณะการก่อโรคในกุ้งของเชื้อ *V. harveyi*

เชื้อ *V. harveyi* ส่วนใหญ่จะก่อโรคในกุ้งจีนัสพีเนียส เช่น กุ้งกุลาดำในระยะตัวอ่อน (larvae) และระยะโพสต์ลาวา (postlarvae) (Karunasagar *et al.*, 1994) ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักของลูกกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530; มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) ซึ่งเป็นปัญหาในหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย จีน อินเดีย อินโดเนเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และประเทศไทย (Pizzutto and Hirst, 1995; Liu *et al.*, 1996) จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลูกกุ้ง

กุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทย ตรวจพบเชื้อ *V. harveyi* (Ruangpan *et al.*, 1995) และจากการศึกษาลูกกุ้งในโรงเพาะฟักที่เลี้ยงในประเทศไทยและประเทศเอควาดอร์ พบเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก สายพันธุ์ของเชื้อ *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากกว่าที่พบในประเทศเอควาดอร์ (Le Grourmellec *et al.*, 1995) การตายของลูกกุ้งในระยะต่างๆ ที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* มีความแตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุดเท่ากับ 0.18 ทำให้ลูกกุ้งกุลาดำในระยะนอร์เพลียส (nauplius) และซูเอีย (zoea) ตายร้อยละ 100 ในขณะที่กลุ่มควบคุมตายร้อยละ 34.8 และร้อยละ 25 ตามลำดับ ระยะไมซิส และโพสต์ลาวา มีลูกกุ้งตายร้อยละ 53.5 ร้อยละ 35 ตามลำดับ ในกลุ่มควบคุม ลูกกุ้งตายร้อยละ 25 และร้อยละ 20 ตามลำดับ และเมื่อใส่เชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่สูงขึ้น พบว่า อัตราการตายของลูกกุ้งเพิ่มสูงขึ้น (มณเทียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) ในลูกกุ้งแชบ๊วย พบว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทำให้ลูกกุ้งแชบ๊วยระยะนอร์เพลียสและระยะซูเอีย ตายร้อยละ 100 และร้อยละ 95 ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายเป็นร้อยละ 70 และร้อยละ 60 ตามลำดับ (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) และเมื่อฉีดเชื้อ *V. harveyi* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5x10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ให้กับกุ้งกุลาดำ ที่มีน้ำหนัก 3.7 กรัม ความยาว 82 มิลลิเมตร ทำให้กุ้งมีอัตราการตายอยู่ในช่วงร้อยละ 53 ถึง ร้อยละ 100 (Chen *et al.*, 1992; Jiravanichpisal *et al.*, 1994) ลูกกุ้งที่ติดเชื้อ *V. harveyi* ในระยะแรกๆ จะมีการเคลื่อนไหวที่ช้าลง อ่อนแอ ลำตัวสีขาวขุ่นตับอ่อนซีดมีปรากฏการเรืองแสงสีเขียวระยิบระยับคล้ายแสงหิ่งห้อยช่วงเวลากลางคืนจากซากลูกกุ้งที่ตายแล้ว (มณเทียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) กลไกในการติดเชื้อ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเข้าสู่ตัวกุ้งโดยผ่านทางพู่เหงือก (primary และ secondary gill filament) ซึ่งผนังของพู่เหงือกประกอบด้วยผิว 3 ชั้น คือชั้นนอก (epicuticle) ชั้นกลาง (exocuticle) และชั้นใน (endocuticle) จากผิวชั้นในจะมีรูทะลุผ่านผิวชั้นกลางและชั้นนอกไปเรียกว่า pore canal และใต้ผิวชั้นในจะเป็นชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelium) เรียงตัวอยู่ชั้นเดียวบางๆ ที่จุดตรงนี้แบคทีเรียจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์ ทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าไปอยู่ในพู่เหงือกได้ และเชื้อจะไปปิดกั้นการนำออกซิเจนที่จะเข้าสู่เหงือกกุ้ง ซึ่งเป็นสาเหตุ

หนึ่งที่ทำให้กุ้งเกิดโรคเหงือกสีชา (Tea Brown Gill Syndrome; TBGS) (Pasharawipas *et al.*, 1998) จากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะเข้าไปอยู่ในน้ำเลือดแล้วกระจายไปยังส่วนต่างๆ ภายในร่างกาย ส่วนใหญ่จะเข้าอยู่ในตับอ่อนเนื่องจากมีอาหารสำรองจำนวนมาก ถ้ามีแบคทีเรียในน้ำเลือดมากจะทำให้ลูกกุ้งตายอย่างฉับพลัน เนื่องจากแบคทีเรียจะใช้น้ำเลือด ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่มากเป็นอาหารและผลจากการย่อยโปรตีนจะได้แอมโมเนีย อิสระและ phenolate compound ซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างจะทำให้น้ำเลือดมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น ทำให้ความสามารถในการจับกับออกซิเจนของน้ำเลือดลดลง ออกซิเจนจึงไม่เพียงพอที่จะไปเลี้ยงเซลล์หรือนำไปใช้ในกระบวนการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) ทำให้กุ้งอ่อนแอ กินอาหารน้อยลง นอกจากนี้ยังมี endotoxin จากเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็น lipopolysaccharide มีคุณสมบัติทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที มีผลในการย่อยโปรตีนต่างๆในเซลล์ (proteolytic) ทำลายเม็ดเลือดของกุ้ง (haemolytic) และมีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) (Montero and Austin, 1999) นอกจากนี้ยังมี extracellular product (ECP) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆหลายชนิด เช่น cysteine proteases (Liu *et al.*, 1997) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน สารพิษเหล่านี้จะมีผลต่อการแข็งตัวของเลือด ซึ่งหนึ่งที่กุ้งใช้เป็นกลไกในการป้องกันการสูญเสียเลือดและการแพร่กระจายของเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย (Lee *et al.*, 1996) เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ที่สามารถย่อยเปลือกกุ้งที่มีองค์ประกอบของไคตินทำให้กุ้งเกิดโรคได้ (ยอดยิ่ง เทพธรา-นนท์, 2541) สร้างฮีโมไลซินที่มีคุณสมบัติเหมือนกันกับเอนไซม์เลซิทินเนสที่สร้างจากเชื้อ *V. mimicus* และ *V. cholerae* (Zhang *et al.*, 2001) เอนไซม์ดังกล่าวจะนำไปสู่การตายของกุ้งได้ โดยทำให้เกิดการอักเสบจนกลายเป็นเนื้อตายที่บริเวณอวัยวะต่างๆ เช่น เหงือกอักเสบ ระยางค์ฉีกขาด จุดดำตามเปลือกและ ตับอักเสบ (จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, 2541) จากการศึกษาลูกกุ้งติดเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (scanning electron microscope) พบว่ามีแบคทีรียจำนวนมากอยู่บริเวณปากและอวัยวะที่ช่วยในการกิน (feeding apparatus) และถ้าลูกกุ้งนั้นมีการติดเชื้อเป็นจำนวนมากพบว่าเชื้อแบคทีเรียจะเจริญรวมตัวเกาะกันเป็นแผ่น (plaque) จากการตัดตามขวางบริเวณทางเดินอาหารจะพบว่าในบริเวณที่มีอนุภาคอาหารอยู่จะมีเชื้อแบคทีเรียปะปนอยู่ด้วย และยังพบเชื้อเป็นจำนวนมากในบริเวณเนื้อเยื่อเหงือก แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียได้เข้าสู่

เนื้อเยื่อภายในตัวกุ้งได้หลายทางด้วยกัน เช่น เข้าทางปากในระหว่างการกินอาหาร และเข้าทางระบบหายใจ จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่าเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่เนื้อเยื่อภายในโดยการผ่านเข้าทางเปลือกหุ้ม (exoskeleton) (Lavilla-pitogo *et al.*, 1990) แต่จากลักษณะที่สำคัญของเชื้อ *V. harveyi* ที่พบว่ามีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไลเปสและไคติเนสได้ ทำให้อาจมีความเป็นไปได้ที่เชื้อแบคทีเรียจะเข้าสู่ภายในกุ้งโดยผ่านทางเปลือกได้ การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ *V. harveyi* พบว่าเชื้อแบคทีเรียจะเข้าทำลายที่บริเวณท่อตับเซลล์ด้านในของท่อตับจะเกิดการแยกตัวออกจากชั้นของ basal lamina และเกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว ทำให้มีลักษณะหนาขึ้นเนื่องจากมี collagenous fibers ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ ท่อตับที่มีการติดเชื้อจะถูกเซลล์เม็ดเลือดโอบล้อมรอบๆ basal lamina ทำให้บวม แอ่งเลือดขยายขนาดใหญ่ขึ้น เกิดการรวมกันของ eosinophilic granule amorphous matter และมีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดหลังจากเซลล์เม็ดเลือดโอบล้อมท่อตับที่ติดเชื้อก็จะกลายเป็น granulomatous capsule ส่วนที่บริเวณหัวใจจะมีการแทรกซึมของเม็ดเลือดเข้าไป ทำหน้าที่ในการจับกินแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อหัวใจและพบบริเวณผนังเส้นเลือดและบริเวณเนื้อเยื่อด้านในของต่อมน้ำเหลืองมีแบคทีเรียเข้าทำลาย บริเวณชั้นเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อจะเกิดลักษณะเซลล์ตายเป็นจำนวนมาก จากนั้นจะสลายตัวและเซลล์เม็ดเลือดก็จะแทรกซึมเข้ามาเพื่อจับกินเซลล์ที่ตายดังกล่าว นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียจำนวนมากที่บริเวณ spongy connective tissue ของหัวใจ haemal sinus และ sinus ของกระเพาะอาหาร ทางเดินอาหาร บริเวณที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ และบริเวณเซลล์กล้ามเนื้อ และพบเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการจับกินแบคทีเรียเหล่านี้ บริเวณอวัยวะที่มีการติดเชื้อ และอาจเป็นตัวพาเชื้อแบคทีเรียไปยังบริเวณซี่เหงือกและเพิ่มจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อที่บริเวณเปลือกชั้นนอก และบริเวณ spongy connective tissue ของโคนหางทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อเซลล์บุผิวที่บริเวณนี้ด้วย (Jiravanichpisal *et al.*, 1994)

V. harveyi มีความไวต่อยาคลอแรมฟินิคอล (chloramphenical) ไตรเมธโธพริม-ซัลฟาเมธอกซาโซล (trimethoprim-sulfamethoxazole) กานามัยซิน (kanamycin) เจนตามัยซิน (gentamycin) อะมิกาซิน (amikacin) ซัลฟาฟูราโซล (sulfafurazole) ซัลฟาโลธิน (sulfalothine) นาลิดิซิค แอซิค (nalidixic acid) โนโวไบโอซิน (novobiocin) นีโอมัยซิน

(neomycin) ซัลฟาไดอะซีน (sulfadiazine) และเตทตร้าซัยคลิน (tetracyclin) (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530; Baticados *et al.*, 1990; Le groumellec *et al.*, 1995) บางสายพันธุ์จะดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) เนื่องจากมีจีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ในส่วนของพลาสมิด (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530; มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533; Teo *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบบางสายพันธุ์ดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) พอลิมิกซิน บี (polymyxin B) O/129 คลอแรมฟีนิคอล และโคไตรมอกซาโซล (cotrimoxazole) (Karunanasagar *et al.*, 1994) มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบการดื้อยาของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ B8-2 ที่แยกมาจากประเทศเอควาดอร์และสายพันธุ์ BL-1 ที่แยกมาจากลูกกุ้งในประเทศไทย พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) ของยาคลอแรมฟีนิคอล ไธแอมฟิคอล (thiamphenicol) ควิโนโลน (quinolone) และเตทตร้าซัยคลินของทั้งสองสายพันธุ์ มีความแตกต่างกันและพบว่าเชื้อ *V. harveyi* ดื้อต่อยาที่มีการใช้ประจำในการเพาะเลี้ยงสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาคลอแรมฟีนิคอลและเตตร้าซัยคลินมากขึ้น (Le Groumellec *et al.*, 1995)

1.2.3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *V. harveyi*

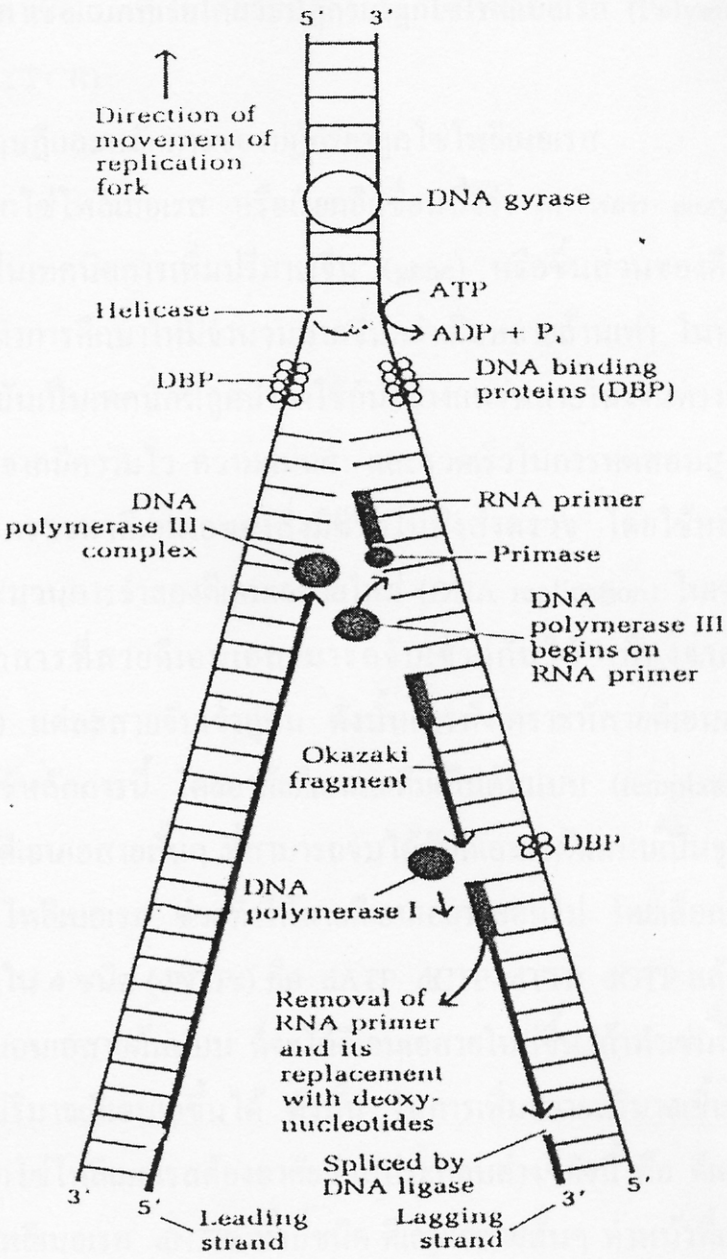
โดยทั่วไปแล้วปัญหาของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *V. harveyi* ที่ผ่านมาการวินิจฉัยอาจทำได้โดยการตรวจสอบการเรืองแสงจากตัวอย่างน้ำโดยเพาะบนอาหารแข็งที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยตรงหรือกรองด้วยกระดาษ nitrocellulose ขนาด 0.22 หรือ 0.45 ไมโครเมตร เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อก่อน ส่วนในตัวอย่างสัตว์ทะเลสามารถตรวจโดยตรงจากตัวอย่างที่ติดเชื้อ (Nealson and Hasting, 1992) โดยแยกเชื้อด้วยอาหาร TCBS agar แล้วดูการเรืองแสงของโคโลนีในที่มืด ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างในกลุ่มเชื้ออื่นที่เรืองแสงได้และเชื้อ *V. harveyi* บางสายพันธุ์ไม่เรืองแสง นอกจากนี้การดูสีโคโลนีก็ไม่สามารถช่วยในการวินิจฉัยได้เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* มีทั้งสายพันธุ์ที่หมักและไม่หมักน้ำตาลซูโครส (Baumann and Schubert, 1984) ต่อมามีการพัฒนาอาหาร Vibrio harveyi agar (VHA) (Harris *et al.*, 1996) เป็นอาหารจำเพาะที่มี pH

สูงซึ่งเหมาะสำหรับเชื้อจีนัส Vibrio ส่วนเชื้อแบคทีเรียอื่นๆไม่สามารถเจริญได้ อาหารมีสีเขียว เนื่องจากมีการเติม bromthymol blue ไม่มีแมกนีเซียมไอออน (Mg^{+}) ทำให้แบคทีเรียในทะเลหลายชนิดเจริญไม่ได้ นอกจากนี้ยังมีความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 3 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกเชื้อ *V. harveyi* จากสิ่งแวดล้อมหรือจากอาหารทะเลจะบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเชื้อ Vibrio ที่แยกจากผู้ป่วยเจริญไม่ได้ เนื่องจากต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่านี้ นอกจากนี้ในอาหารยังเติมเซลลูไบโอส (cellubiose) และออร์นิทิน เพื่อแยกความแตกต่างของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร เชื้อ *V. harveyi* สามารถใช้สารทั้งสองชนิดนี้ได้ เมื่อใช้ออร์นิทินทำให้พีเอชในอาหารเพิ่มขึ้นจะเห็นโคโลนีเป็นสีน้ำเงิน และเมื่อหมักน้ำตาลเซลลูไบโอส ทำให้พีเอชต่ำลงทำให้โคโลนีสีเขียวหรือบางครั้งจะมีขอบสีเหลืองรอบโคโลนี จากการศึกษาแยกเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้อาหาร TCBS เปรียบเทียบกับอาหาร LA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถบ่งชี้เชื้อบนอาหาร LA ได้ดีกว่า โดย *V. harveyi* จะให้โคโลนีที่สีเขียวเข้มขนาด 2-5 มิลลิเมตร อาจมีขอบสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง โคโ ลนีเรืองแสงในที่มืด การบ่งชี้เชื้อทางชีวเคมี พบว่าเชื้อ*V. harveyi* ให้ผลใกล้เคียงกับ *V. carchariae* และ *V. parahaemolyticus* (ยอดยิ่ง เทพธรานนท์, 2540; Pedersen *et al.*, 1997) และต้องใช้เวลานานในการจำแนก ส่วนการตรวจบ่งชี้ทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ในตัวลูกกุ้งกุลาดำและน้ำในโรงเพาะฟัก โดยติดฉลาก polyclonal antibody ต่อเชื้อ *V. harveyi* ด้วยเอนไซม์ ในตัวลูกกุ้งกุลาดำและน้ำในโรงเพาะฟัก พบว่าให้ผลในการตรวจสอบที่ต่ำ (10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) (Robertson *et al.*, 1998) ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์มาใช้ในการศึกษาการแพร่กระจายทางด้านระบาดวิทยา รวมถึงการตรวจบ่งชี้เชื้อหลายชนิด เช่นใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบ่งชี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran *et al.*, 1997) *V. cholerae* (Rivera *et al.*, 1995) *V. hollisae* (Vuddhakul *et al.*, 2000) แต่สำหรับเชื้อ *V. harveyi* ยังไม่มีรายงานการบ่งชี้เชื้อโดยวิธีนี้ ดังนั้นถ้าสามารถพัฒนาการชี้บ่งเชื้อ *V. harveyi* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ จะทำให้ได้ผลการตรวจที่รวดเร็วและแน่นอน ในการศึกษานี้จะพัฒนาการบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้จีน *gyrB* เป็นจีนเป้าหมาย

Central Library
Prince of Songkla University

1.2.4 การจำลองดีเอนเอ

ดีเอนเอส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติจะเป็นแบบเกลียวคู่ ซึ่งการจำลองตัวของดีเอนเอที่เป็นเกลียวคู่ เป็นแบบกึ่งอนุรักษ์ (semi conservation) คือโมเลกุลของดีเอนเอที่เกิดขึ้นจะประกอบด้วยสายโพลีนิวคลิโอไทด์สายใหม่หนึ่งสายและสายเก่าอีกหนึ่งสายพันเกลียวกลับทิศกัน (5′ ไป 3′ และ 3′ ไป 5′) กระบวนการนี้เกิดขึ้นค่อนข้างซับซ้อน เริ่มจากเอนไซม์ดีเอนเอโทโปไอโซเมอเรสทำหน้าที่คลายเกลียวซุปเปอร์คอล์ยของดีเอนเอ แล้วเอนไซม์ฮีลิเคส ทำหน้าที่คลายเกลียวดับเบิลฮีลิก (double helix) โดยการสลายพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมเบสคู่สมระหว่างดีเอนเอสายเดี่ยวสองสายเข้าด้วยกัน เพื่อให้สายดีเอนเอที่พันกันเป็นเกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวบริเวณนี้เรียก replication fork จากนั้น single strand DNA binding protein จะเข้ามาเกาะเพื่อป้องกันไม่ให้สายดีเอนเอกลับมาจับกันเป็นเกลียวคู่อีก แล้วเอนไซม์ DNA gyrase จะคลายปมในสายดีเอนเอเหนือจุดแยกนั้น โดยการตัดดีเอนเอสายหนึ่งออก เพื่อให้ดีเอนเอคลายเกลียวออกได้ บริเวณที่มีการคลายเกลียวของดีเอนเอนั้นเป็นจุดเริ่มของการสังเคราะห์ดีเอนเอ โดยเอนไซม์ RNA primase สังเคราะห์ RNA primer แล้วเข้าไปจับกับดีเอนเอจากนั้นจึงเริ่มต้นการสร้างสายดีเอนเอสายใหม่จากปลาย 5′→ 3′ (ภาพประกอบ 1.2) โดยอาศัย DNA polymerase III ทำหน้าที่เติมนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′ ของ RNA primer สายที่มีทิศการสร้างตามทิศทางการคลายเกลียวจะได้เส้นที่ต่อเนื่องเป็นสายนำ (leading strand) ส่วนอีกสายหนึ่งมีทิศทางตรงกันข้ามจะได้สายสั้นๆไม่ต่อเนื่อง (lagging strand) เมื่อมีการคลายเกลียวต่อไปอีกก็จะมีการสร้างไพรเมอร์ใหม่ และ DNA polymerase III จะนำนิวคลิโอไทด์มาต่อทำให้ได้เส้นสั้นๆ ที่เรียกว่า Okazaki fragments ซึ่งมีความยาวประมาณ 1,000 - 2,000 นิวคลิโอไทด์ เส้น Okazaki fragments เหล่านั้นจะเชื่อมต่อกันได้โดย DNA polymerase I จะตัดส่วน RNA primer ออก โดยปฏิกิริยาของ 5′ ไป 3′ exonuclease ขณะเดียวกันก็จะเติมนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′ ของดีเอนเอ ที่อยู่ถัดขึ้นมาต่อจากสายของนิวคลิโอไทด์ที่สร้างโดย DNA polymerase III ทำให้มีการแทนที่ RNA primer ด้วยดีเอนเอและจุดที่มีรอยขาดก็จะเคลื่อนไปทางปลาย 3′ (nick translation) มีการกำจัดส่วนของอาร์เอนเอออกหมดแล้วก็จะเชื่อมจุดที่ขาดด้วยเอนไซม์ DNA ligase ได้เป็นสายดีเอนเอที่สมบูรณ์



ภาพประกอบ 1.2 การจำลองดีเอนเอ (DNA replication)

ที่มา : ศูนย์พันธุวิศวะกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2528)

1.2.5 การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction method : PCR)

1.2.5.1 ทฤษฎีและหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณจีน (gene) หรือชิ้นส่วนของดีเอนเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการทำการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่า ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ปัจจุบันเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานทางวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆ เนื่องจากมีความไว ความแม่นยำ และรวดเร็วในการทดสอบสูงมาก วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาดีเอนเอของสิ่งมีชีวิตในสิ่งส่งตรวจ โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติของกระบวนการจำลองดีเอนเอสายใหม่ (DNA replication) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้หลักการที่สายดีเอนเอสามารถจับเข้าคู่กันได้ เนื่องจากมีเบสคู่สม (complementary) แต่ละสายจับเข้าคู่กัน ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอนเอขึ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการนี้ โดยอาศัยดีเอนเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัยไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอนเอสายสั้นๆ ที่สามารถจับได้กับดีเอนเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรส ช่วยทำให้สายดีเอนเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลิโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP dCTP dTTP dGTP แล้วนำมาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอนเอสายต้นแบบ ก็จะได้ดีเอนเอสายใหม่ขึ้น ถ้าทำเช่นนี้หลายๆรอบก็จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอนเอขึ้นได้ ดังนั้น ในการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอนเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต้องอาศัยส่วนประกอบต่างๆดังนี้ คือ ดีเอนเอต้นแบบ เอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรส dNTPs ทั้งสี่ชนิด ดีเอนเอสายสั้นๆ ทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอนเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ (ภาพประกอบ 1.3)

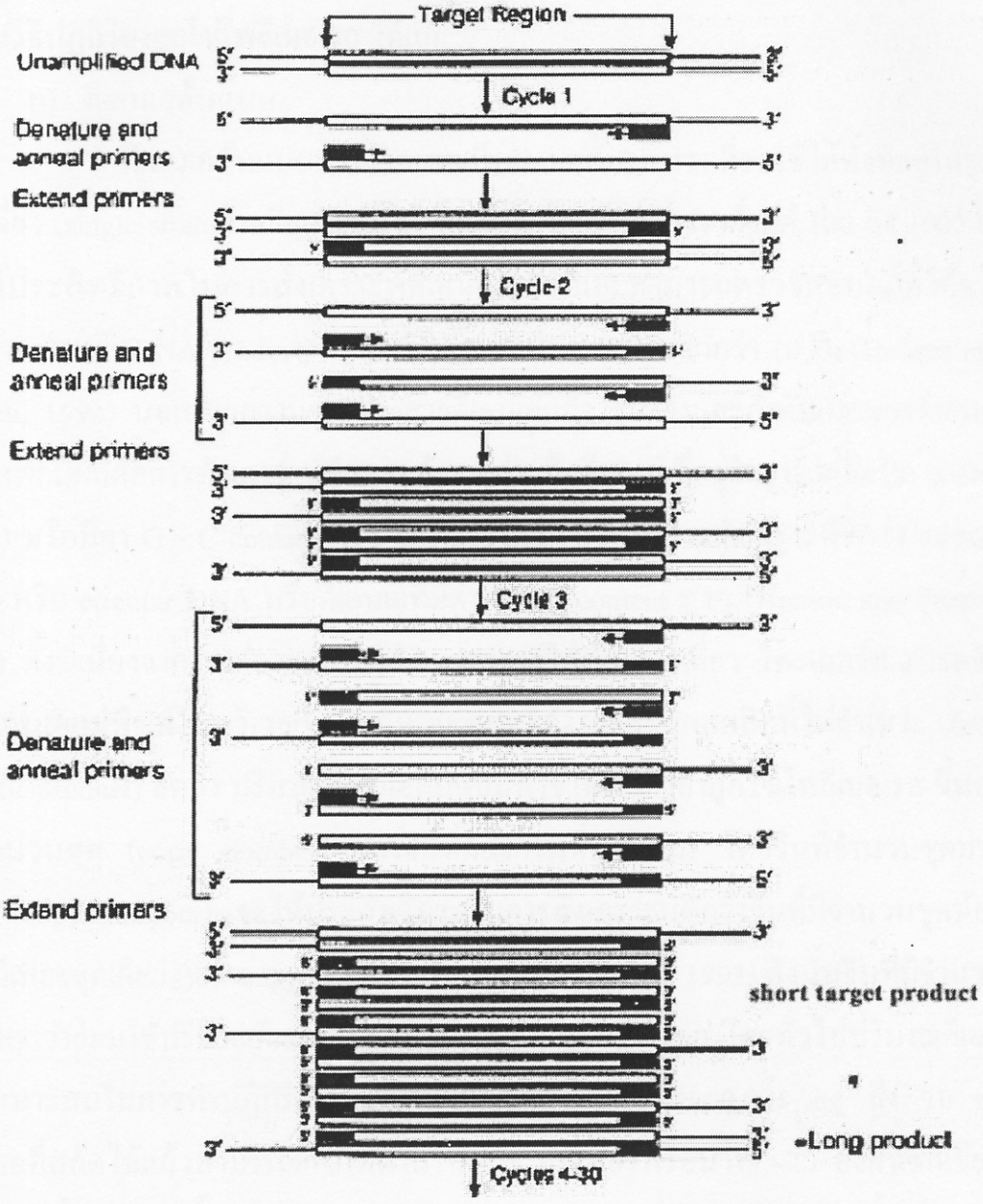
ก) Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระ ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการจำลองดีเอนเอสายใหม่ โดยใช้ความร้อนช่วงอุณหภูมิ 90 - 95 องศาเซลเซียส ต้องกำหนดอุณหภูมิให้สูงขึ้นถ้าดีเอนเอต้นแบบมี

เปอร์เซ็นต์ GC สูง แต่ต้องคำนึงว่าอุณหภูมิสูงเกินไปและหรือเวลานานเกินไป จะนำไปสู่การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไปได้

ข) Annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับนิวคลิโอไทด์เป็นคู่สมกับปลาย 5′ ของดีเอนเอแม่พิมพ์และสามารถจับกับดีเอนเอแม่พิมพ์ ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิและเวลาขึ้นกับส่วนประกอบหลายอย่าง ได้แก่ ความยาว ลำดับเบส และความเข้มข้นของไพรเมอร์ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่ำกว่าค่า temperature melting (Tm) ของไพรเมอร์ประมาณ 5 องศาเซลเซียส ปกติทำได้โดยการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 - 55 องศาเซลเซียส ส่วนเวลาที่ใช้สำหรับ primer annealing ประมาณ 30 - 60 วินาที

ค) Extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาของขั้นตอนนี้ขึ้นกับ ชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้ ในกรณีของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เวลาในการเกิด extension ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น ลำดับเบสของดีเอนเอแม่แบบ (Arnheim and Erlich, 1992; Henson and French, 1993)

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ซึ่งจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขึ้นกับปริมาณดีเอนเอต้นแบบ ถ้าหากใช้จำนวนรอบมากโอกาสที่จะได้ผลิตผลก็มากตามไปด้วย ทำให้ได้ดีเอนเอสายใหม่จำนวนมากเป็นทวีคูณ คือเท่ากับ 2^n เมื่อ n เท่ากับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา



ภาพประกอบ 1.3 ไดอะแกรมแสดงปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ที่มา : (http//www.bio.purdue.edu/courses/ biol516/pcr.gif)

1.2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะของการสังเคราะห์ดีเอนเอโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ได้แก่

ก) ดีเอนเอต้นแบบ

ดีเอนเอต้นแบบหรือดีเอนเอเป้าหมายนั้นสามารถที่จะใช้ได้ทั้งที่อยู่ในรูปสายเดี่ยว (single strand) หรือสายคู่ก็ได้ โดยที่ดีเอนเอมีความยาวตั้งแต่ 100 ถึง 1000 bp จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีเอนเอดีกว่าและสามารถตรวจสอบผลที่ได้จากการสังเคราะห์ (DNA product) ง่ายกว่าดีเอนเอที่มีความยาวมากกว่า 10 kb (Henson and French, 1993) นอกจากความยาวของสายดีเอนเอแล้ว รูปร่างและลำดับเบสของดีเอนเอแม่พิมพ์ก็มีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอนเอด้วย กล่าวคือดีเอนเอที่อยู่ในรูปปลายเปิด (linear DNA) หรือมีค่า G - C content ต่ำๆ จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีกว่า relaxed DNA หรือ circular DNA หรือดีเอนเอที่มีค่า G - C content สูงๆ (Henson and French, 1993) ทั้งนี้เนื่องจากง่ายต่อการทำให้ดีเอนเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอนเอแม่พิมพ์ในบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมได้ง่ายและมีผลผลิตที่ไม่จำเพาะ (non specific product) ลดลง ปริมาณดีเอนเอต้นแบบที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ขึ้นอยู่กับจำนวนชุด (copy number) ของจีนที่ต้องการเพิ่มจำนวน โดยจีนที่จำนวนชุดมาก (high copy number) จะให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ดีกว่าจีนที่มีจำนวนชุดน้อยหรือมีเพียงชุดเดียว (low copy number) (Henson and French, 1993) ดังนั้นจีนที่มีจำนวนชุดมากกว่าย่อมใช้ปริมาณดีเอนเอน้อยกว่าจีนที่มีจำนวนชุดน้อย โดยทั่วไปปริมาณดีเอนเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส มีค่าเท่ากับ 0.001 ng ถึง 10 ng ดีเอนเอที่สกัดได้แล้วสามารถเก็บได้นานใน TE บัฟเฟอร์หรือน้ำที่ –20 องศาเซลเซียส ควรหลีกเลี่ยงสารยับยั้งในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เช่น EDTA ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอนเอเพราะสารนี้จะไปจับกับแมกนีเซียมไอออน และบัฟเฟอร์ที่มีฟอสเฟสเป็นส่วนประกอบอยู่ ทำให้เกิดการตกตะกอนของแมกนีเซียมฟอสเฟส ($Mg_3(PO_4)_2$) ได้ในที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ส่วนของฟีนอลที่เหลืออยู่ในขั้นตอนการสกัดดีเอนเอก็ต้องกำจัดออกให้หมดเช่นกัน

ข) *Taq* DNA polymerase

ในระยะแรกของการศึกษาการเพิ่มจำนวนดีเอนเอนั้นจะใช้เอนไซม์โพลีเมอเรสจาก *E. c oli* (Klenow fragment) ในปฏิกิริยาของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแต่เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้น้อย เมื่อทำให้ดีเอนเอเสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพด้วย จึงต้องเติมเอนไซม์ลงไปใหม่ทุกครั้งในทุกรอบของการสังเคราะห์ทำให้ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเอนไซม์มีราคาแพง นอกจากนี้แล้วการเติมเอนไซม์ใหม่ทุกรอบเป็นอุปสรรคต่อการจะพัฒนาให้เป็นวิธีอัตโนมัติ เมื่อมีการค้นพบเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ที่แยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุ คือ *Thermus aquatus* ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงถึงที่ 95 องศาเซลเซียส (Chen *et al.*, 1976) โดยไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์และสามารถเร่งปฏิกิริยาการจำลองดีเอนเอได้ดีที่อุณหภูมิ 70 - 85 องศาเซลเซียส จึงนิยมใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพราะประหยัดเวลาและเอนไซม์ ไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในรอบใหม่ทุกๆรอบเหมือนกับที่ใช้ เอนไซม์โพลีเมอเรสเดิม (Arnheim and Erlich, 1992)

Taq DNA Polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94,000 ดาลตัน มีคุณสมบัติหลายอย่างคล้ายกับ DNA polymerase I ที่แยกได้จาก *E. coli* แต่ทนความร้อนได้ดีกว่า แต่ขาดคุณสมบัติ 3′ ไป 5′ exonuclease activity ที่ทำหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้อง (proofreading) มีอัตราเร่งสูงสุดในการนำนิวคลิโอไทด์เชื่อมต่อในสายดีเอนเอเท่ากับ 60 โมเลกุลต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หรือโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2,000 - 4,000 โมเลกุลต่อนาที มีครึ่งอายุ (half life) 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70 - 80 องศาเซลเซียส ในการสังเคราะห์ดีเอนเอจากปลาย 5′ PO_4 ไปยังปลาย 3′ OH โดยมีแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นโคแฟกเตอร์ (Arnheim and Erlich, 1992) และมีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการนำดีออกซิไรโบนิวคลิโอไทด์ที่ไม่ใช่คู่สมกับโมเลกุลในแม่พิมพ์เข้าเชื่อมต่อกับดีเอนเอที่กำลังสร้างเท่ากับ 10^{-5} error/base และความผิดพลาดในการนำดีออกซิไรโบนิวคลิโอไทด์หนึ่งโมเลกุลเข้าไปเชื่อมต่อกันเป็นสาเหตุให้เกิดการผ่าเหล่าแบบอ่านรหัสคร่อมโคดอน (frameshift mutation) เท่ากับ 10^{-6} error/base (Eckert *et al.*, 1990) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 75-80 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 1.0 ถึง 2.5 unit ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดีเอนเอ

แม่พิมพ์ ไพรเมอร์ dNTPs และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ การใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเกินไปมีผลทำให้เกิดผลผลิตไม่จำเพาะ (non- specific product) แต่ถ้าใช้ปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตน้อยลงด้วย นอกจากนี้ยังมีสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ formamide ที่ความเข้มข้นของสารเหล่านี้ 20 เปอร์เซ็นต์ มีอัตรายับยั้ง เท่ากับ 89 และ 61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ sodium dodecyl sulphate (SDS) ความเข้มข้นเพียง 0.01 เปอร์เซ็นต์ (W/V) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ (Eckert *et al.*, 1990) ซึ่งสารดังกล่าวมาถูกใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอนเอ จะต้องกำจัดออกให้หมด

ค) ความเข้นข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสปกติอยู่ระหว่าง 50 - 200 μM ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs รวม (4 ชนิด) จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 μM ซึ่งเพียงพอสำหรับการสร้างดีเอนเอได้ประมาณ 20 - 26 μM ต่อ 100 μl ของปฏิกิริยา ดังนั้นควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ dNTPs ที่ต่ำสุดที่เพียงพอสำหรับความยาวและส่วนประกอบของสายดีเอนเอ dNTPs ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ควรปรับ pH ให้เป็นกลาง และมีความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดที่สมดุลย์กันเพื่อให้ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้เกิดขึ้นอย่างจำเพาะและได้ปริมาณสูง ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมผิดพลาด (misincorporation) การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วเจือจางต่อให้มีความเข้มข้น 1 mM แล้วแบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ง) Oligonucleotide primer

ปัจจัยที่มีผลต่อความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อดีเอนเอแม่พิมพ์ ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ลำดับเบสของไพรเมอร์และอุณหภูมิในการ annealing ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส นั้นจะต้องมากพอที่จะทำให้ไพรเมอร์เกิดการจับกับดีเอนเอสายเดี่ยวแม่พิมพ์ (Arnheim and Erlich, 1992) คุณสมบัติที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์จะต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย ในดีเอนเอต้นแบบ นั่นคือลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอนเอต้นแบบและสามารถจับและทำให้เกิดการเข้าคู่

ที่สมบูรณ์ (stable complex) กับดีเอนเอต้นแบบที่ต้องการในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิ ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายตัวของเบสอย่างสม่ำเสมอ ไม่ควรใช้ลำดับเบสที่เรียงตัวไม่ปกติและพยายามหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ที่มี polypurine หรือ polypyrimidine ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี G+C contend อยู่ระหว่าง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ ไม่ควรเลือกให้ค่าสูงกว่านี้ หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure คือต้องไม่จับกับลำดับเบสของตัวเอง (self complementary) โดยเฉพาะที่ปลาย 3′ end ของไพรเมอร์ หลีกเลี่ยงลำดับเบสของไพรเมอร์ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง เพื่อป้องกันการ annealing กันเองกับไพรเมอร์อีกสายหนึ่ง โดยเฉพาะต้องไม่มีปลาย 3′ overlap ในคู่ไพรเมอร์เพื่อช่วยลดการเกิด primer dimer ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส ซึ่งการคำนวณค่า Tm ใช้กฎ The rule-of - thumb calculation (Thein and Wallace, 1986) โดยคิด 2 องศาเซลเซียส สำหรับค่า A หรือ T 4 องศาเซลเซียส สำหรับ G หรือ C ส่วนความยาวของไพรเมอร์ ควรมีความยาวประมาณ 18 - 30 นิวคลิโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้ โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.1 - 0.5 μM อย่างไรก็ตามความเข้นข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมยังขึ้นกับปัจจัยอื่นด้วย เช่น ลำดับเบสของไพรเมอร์ ความซับซ้อนของลำดับเบสในตัวอย่างดีเอนเอต้นแบบ และจำนวนดีเอนเอเป้าหมายที่มีในดีเอนเอต้นแบบการใช้ไพรเมอร์ในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิด primer - dime r และการจับคู่ผิดพลาด (mispriming)

จ) ปริมาณและความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์

แมกนีเซียมคลอไรด์ มีส่วนช่วยในการจับกันระหว่างดีเอนเอแม่พิมพ์ และ ไพรเมอร์และทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งมีผลทำให้เกิดการขยายสายดีเอนเอในขบวนการ extension (Arnheim and Erlich, 1992) ปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ dNTPs กล่าวคือ ถ้า dNTPs มีความเข้มข้นสูง ก็ต้องปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ให้สูงตามด้วย ทั้งนี้เพราะแมกนีเซียมไอออนบางส่วนจะจับกับ dNTPs ดังนั้นถ้าแมกนีเซียมคลอ-ไรด์มีปริมาณน้อยเกินไป จะทำให้มีผลผลิตดีเอนเอเกิดขึ้นน้อย ถ้าแมกนีเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้นมาก จะทำให้เกิดผลผลิตดีเอนเอมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันทำให้มีผลผลิต

ดีเอนเอที่ไม่จำเพาะและ primer dimer เกิดขึ้นมากด้วย โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีค่าเท่ากับ 1.5 mM (Arnheim and Erlich, 1992)

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต (PCR product) สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้แบ่งเป็น 2 เทคนิคใหญ่ๆคือ

1) Gel electrophoresis คือการนำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้มาแยกตามขนาดของดีเอนเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอนเอบนอะกาโรสเจลหรือโพลีอะคริลาไมด์เจล เปรียบเทียบกับดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน (marker) เช่น lamda (λ) Hind III digestion จากนั้นย้อมชิ้นดีเอนเอด้วยสารละลาย เอทิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลท ผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ดีควรให้ชิ้นส่วนดีเอนเอที่ชัดเจนและตรงตามขนาดที่ต้องการ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบหาผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ทราบขนาดแน่นอน

2) Nucleic acid hybridization

ในกรณีที่ดูผลจากเจลไม่ชัดเจนหรือต้องการเพิ่มความมั่นใจ วิธีนี้ต้องใช้ตัวติดตาม (probe) ที่มีเบสคู่สมกับผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และจะจับเบสคู่สมกันในสภาวะที่เหมาะสม ตัวติดตามอาจเป็นดีเอนเอหรืออาร์เอนเอก็ได้ นำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ได้มาถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือ ไนลอน (nylon) ด้วยเทคนิค Southern blotting จากนั้นนำตัวติดตามที่จำเพาะกับเบสคู่สม ซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดรังสีมาจับ (hybridization) และทำการตรวจสอบผลโดยใช้ฟิล์ม X-ray หรือดูสีที่เกิดขึ้น

1.2.6 *gyrB* gene

เอนไซม์ DNA topoisomerase ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Jim Wang จากเชื้อ *E. coli* (Wang, 1996) ทำหน้าที่คลายเกลียวสายดีเอนเอสายคู่ให้แยกออกจากกันก่อนที่จะเป็นสายเดี่ยวซึ่งเป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญในกระบวนการจำลองดีเอนเอสายใหม่และ

พันเกลียวกลับเป็นเช่นเดิมหลังจากที่สิ้นสุดการจำลองดีเอนเอ ปฏิกิริยานี้จะเป็นการเปลี่ยนแปลงกลับไปกลับมา เพื่อให้สายดีเอนเออยู่ในสภาวะเสถียรสูงสุด ป้องกันการกลายพันธุ์ที่อาจจะเกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตนั้นและเอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองดีเอนเอตั้งแต่ขั้นแรกของการจำลองดีเอนเอ (initiation), elongation จนถึงขั้น termination การถอดรหัสดีเอนเอ การซ่อมสายดีเอนเอที่ขาด เกี่ยวข้องกับพันธะโคเวเลนท์และพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ของสายดีเอนเอ DNA topoisomerase สามารถแยกโดยอาศัยโครงสร้างและกลไกการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 2 ชนิด คือ type I และ type II เอนไซม์ DNA topoisomerase type I เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลไม่ซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเพบไทด์สายเดี่ยว (monomeric structure) ม้วนขดไปมา โมเลกุลมีขนาดประมาณ 110 kDa ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการตัดสายดีเอนเอสายเดี่ยวให้เกิดรอยขาดชั่วคราว (nick หรือ gap) เพื่อให้สายดีเอนเอ supercoil แปรสภาพเป็น relaxed และเชื่อมต่อสายดีเอนเอที่ขาดนั้นด้วยการเชื่อมกับพันธะฟอสฟอไดเอสเทอร์อย่างเดิม โดยอาศัยแมกนีเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์ ในขณะที่เอนไซม์ DNA topoisomerase type II ในแบคทีเรียมี 2 ชนิดคือ topoisomerase IV ที่ถอดรหัสมาจากจีน *parC* และ *parE* และเอนไซม์ DNA gyrase ที่ถอดรหัสมาจากจีน *gyrA* และ *gyrB* (Wang, 1996)

เอนไซม์ DNA gyrase ประกอบด้วยโพลีเพบไทด์หลายสาย (multimeric structure) ขดตัวเป็นโปรตีน 2 ชนิด ที่จับอยู่ด้วยกัน (heterotetramer) คือ A2 และ B2 (Brockbank and Barth, 1993) มีส่วนสำคัญในการจำลองดีเอนเอ (Rizzo, *et al.*, 1993; Khodursky *et al.*, 2000) ทำหน้าที่คลายสายดีเอนเอที่อยู่ในรูปเกลียวเวียนขวา (negative supercoils) และเวียนซ้าย (positive supercoils) ไปเป็นรูปวงกลมปลายเปิด (relaxed DNA) ในขั้นตอน elongation ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจากการสลาย ATP และ อาศัยแมกนีเซียมไอออนเป็นโคแฟกเตอร์เช่นกัน ในขณะเดียวกัน ถ้าไม่มี ATP เอนไซม์ไม่สามารถพันเกลียว supercoil DNA ทำให้ดีเอนเออยู่ในรูป relaxed DNA (Kampranis and Maxwell, 1996) DNA gyrase มีส่วนปลาย C- terminus เป็นส่วนของ A subunit ที่ทำหน้าที่พันเกลียวซุปเปอร์คอล์ยดีเอนเอเอาไว้ ส่วนทางปลาย N- terminus เป็นตำแหน่งของ B subunit ทำหน้าที่คลายเกลียวให้อยู่ในรูป relaxed ซึ่งไม่ต้องอาศัยพลังงานช่วย โปรตีน A (*gyrA*) มี

น้ำหนักประมาณ 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะมีส่วนที่ไวต่อยาต้านจุลชีพ nalidixic acid oxolinic acid และ norfloxacin ในขณะที่ โปรตีน B (*gyrB*) มีน้ำหนักประมาณ 90 หรือ 70 kDa มีส่วนที่ไวต่อยาต้านจุลชีพ coumermycin A1 (Kranz, *et al.*, 1992) และ novobiocin (Thiara and Cundliffe, 1993) มีการนำยาสองชนิดนี้มาใช้ในการยับยั้งการจำลองดีเอนเอในเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้แล้ว DNA gyrase ยังสามารถคล้องห่วงและปลดสายดีเอนเอที่เป็นวงกลม (catenation/uncatenation) และยังม้วนสายดีเอนเอวงกลมให้ขดและคลายได้ (knotting/unknotting) (Watt and Hickson, 1994) โดยการจับกับสายดีเอนเอประมาณ 130 bp ก่อนจะม้วนสายดีเอนเอ DNA gyrase ถูกควบคุมการสร้างโดยจีน*gyrase A* และ *gyrase B* จีน *gyrB* ในแบคทีเรียมีความยาวประมาณ 1.2-1.4 กิโลเบส ซึ่งสามารถใช้ไพรเมอร์ UP-1 และ UP-2r ที่มีขนาด 18 และ 21 นิวคลิโอไทด์ ตามลำดับเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์จีนทั้งหมดได้ (Yamamoto and Harayama, 1995) ปัจจุบันมีการศึกษาจีน *gyrB* ในแบคทีเรียหลายชนิดจึงเกิดเป็นฐานข้อมูล ICB (The Identification and Classification of Bacteria) ที่รวบรวมลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 850 สายพันธุ์ (Watanabe *et al.*, 2001) เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย การวินิจฉัยโรค และพันธุศาสตร์ของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมหลายชนิด เนื่องจากจีนนี้มีคุณสมบัติที่จำเพาะสูง ไม่พบการกลายพันธุ์ในช่วงของการเจริญของเชื้อ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมทำให้ไม่มีโอกาสจะถูกส่งผ่านไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้ (horizontal transfer) เป็นจีนที่มีอัตราการวิวัฒนาการสูงกว่า 16rRNA พบอยู่ทั่วไปในแบคทีเรีย (Yamamoto and Harayama, 1995) การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ ในอดีตจะอาศัยเทคนิค DNA-DNA hybridization ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละกลุ่มแต่ละชนิด โดยอาศัยลำดับเบสของ 16sRNA หรือ 16sDNA ปรากฏว่าให้ผลในการแยกความสัมพันธ์ของเชื้อภายในจีนัสได้ไม่ชัดเจน เนื่องจาก 16sRNA มีวิวัฒนาการที่ต่ำ ต่อมาเมื่อได้นำลำดับเบสของจีน *gyrB* มาใช้กับเทคนิค DNA - DNA hybridization ทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อแบคทีเรียหลายจีนัสโดยบ่งบอกความแตกต่างของแบคทีเรียต่างจีนัสได้ (Yamamoto *et al.*, 1999) เช่น จีนัส Shewanella (Venkateswaran *et al.*, 1999) จีนัส Marinilabilia (Suzuki *et al.*, 1999) จีนัส Alishewanella (Vogel *et al.*, 2000) จีนัส Micromonospora (Kasai *et al.*, 2000)

และจีนัส Mycobacterium (Kasai *et al.*, 2000) และดีกว่า 16sRNA ดังนั้นการนำจีน *gyrB* มาใช้ในการบ่งชี้และการตรวจหาแบคทีเรียจึงเป็นที่นิยม การบ่งชี้เชื้อโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้จีน *gyrB* เป็นจีนเป้าหมายได้ถูกนำมาใช้กับเชื้อ *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran *et al.*, 1997) และ *V. hollisae* (Vuddhakul *et al.*, 2000) *Bacillus* spp. (Yamada *et al.*, 1999) และสำหรับนิเวศวิทยาของแบคทีเรียได้มีการพัฒนานำจีน *gyrB* เป็นไพรเมอร์ใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย flocculating และ non-flocculatingในระบบบำบัดน้ำเสียแบบ activated sludge system โดยอาศัยเทคนิค competitive PCR เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อแต่ละชนิดในระบบการบำบัดน้ำเสีย (Watanabe *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1999)

วัตถุประสงค์

1. หาลำดับเบสของจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi*
2. พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะจากจีน *gyrB* เพื่อนำไปใช้ในการบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส