

การเปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจหา ยีน *hemolysin* ของแบคทีเรีย*Aeromonas hydrophila* ที่ก่อโรคในปลานิลบุญทริกา ทองดอนพุ่ม^{1*} กิตติมา วานิชกุล² อุดลย์ บุญเฉลิมชัย³ สมพล แพรพันธ์⁴

Received : February 13, 2024

Revised : August 28, 2024

Accepted : September 20, 2024

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่พบในปลานิล ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตสัตว์น้ำ เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคใช้เวลานาน ทำให้ไม่สามารถควบคุมโรคได้ทัน การศึกษาวิธีการเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ก่อโรคในปลานิล โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จและวิธีการต้มด้วยความร้อน มาใช้ในการตรวจหา ยีน *hemolysin (hlyA)* ของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* เพื่อให้มีความสะดวกและรวดเร็วขึ้น ผลการตรวจหา ยีน *hlyA* ของเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ พบว่า คุณภาพดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการสกัดจากการใช้ชุดสกัดสำเร็จและวิธีต้มด้วยความร้อน สามารถตรวจหา ยีน *hlyA* ได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 592 คู่เบส และไม่พบ ผลผลิตพีซีอาร์จากดีเอ็นเอในเชื้ออื่น ๆ โดยความเข้มข้นของเชื้อน้อยที่สุด (10^6 CFU/mL) ที่นำไปสกัดดีเอ็นเอและสามารถตรวจหา ยีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์ พบว่า มีความเข้มข้นเท่ากับ 18.8 ng/ μ L และมีความบริสุทธิ์ 1.84 จากการสกัดโดยชุดสกัดสำเร็จและความเข้มข้นเท่ากับ 17.7 ng/ μ L และมีความบริสุทธิ์ 1.66 จากการสกัดโดยการต้มด้วยน้ำร้อน ดังนั้น ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี และการใช้ ยีน *hlyA* เป็นยืนยันเป้าหมาย จึงมีประสิทธิภาพต่อการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *A. hydrophila* ได้ ทั้งนี้ สามารถนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับเบส และยืนยันชนิดของยีนสำหรับใช้เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อรองรับเทคนิควิเคราะห์อย่างง่ายในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: การสกัดดีเอ็นเอ แบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ปลานิล พีซีอาร์ ยีน *hlyA*

¹ อาจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อีเมล: Boontarika@rmutt.ac.th

² อาจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อีเมล: Kittima_v@rmutt.ac.th

³ อาจารย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต อีเมล: Adun_b@rsu.ac.th

⁴ อาจารย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต อีเมล: Somphon.p@rsu.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: Boontarika@rmutt.ac.th

COMPARISON OF EXTRACTION METHODS FOR DETECTING THE HEMOLYSIN GENE IN PATHOGENIC *Aeromonas hydrophila* FROM TILAPIA

Boontarika Thongdonphum^{1*} Kittima Vanichkul² Adun Bunchaleamchai³
Somphon Phraephan⁴

Abstract

Aeromonas hydrophila, a bacterial pathogen found in tilapia, negatively affects aquatic animal production yields due to the challenges in controlling disease outbreaks caused by the lengthy diagnosis process. This study compared two DNA extraction methods for *A. hydrophila*, a causative agent of disease in tilapia: an extraction kit and the heat boiling method. The objective was to simplify and efficiently detect *A. hydrophila* carrying the hemolysin gene (*hlyA*). PCR assay results showed that both DNA extraction methods successfully detected the 592 bp amplicon of the *hlyA* gene without additional PCR products. The minimum bacterial concentration for effective DNA extraction and *hlyA* gene detection was 10^6 CFU/mL. The DNA concentrations obtained were 18.8 ng/μL and 17.7 ng/μL, with purity values of 1.84 and 1.66 for the extraction kit and heat boiling methods, respectively. These results demonstrated that both DNA extraction methods effectively detected *A. hydrophila* via the *hlyA* gene, indicating reliable identification. Furthermore, the PCR results can potentially be used for DNA sequencing and gene-specific primer verification, facilitating the future application of these simplified analytical techniques.

Keywords: DNA extraction, *Aeromonas hydrophila*, Tilapia, PCR, *hlyA* gene

¹ Faculty of Agricultural Technology, Rajamungala University of Technology Thanyaburi,
e-mail: Boontarika@rmutt.ac.th

² Faculty of Agricultural Technology, Rajamungala University of Technology Thanyaburi,
e-mail: Kittima_v@rmutt.ac.th

³ Faculty of Medical Technology, Rangsit University, e-mail: Adun_b@rsu.ac.th

⁴ Faculty of Medical Technology, Rangsit University, e-mail: Somphon.p@rsu.ac.th

* Corresponding author, e-mail: Boontarika@rmutt.ac.th

บทนำ

ในประเทศไทยการเพาะเลี้ยงปลาเป็นอาชีพที่สำคัญ เนื่องจากปลาเป็นสัตว์น้ำที่คนไทยส่วนใหญ่นิยมบริโภค เพาะเลี้ยงไม่ยาก และสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศ สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาเป็นอย่างมาก ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่ได้รับความนิยมเลี้ยงกันมากชนิดหนึ่ง ทั้งในแบบการค้าและเลี้ยงไว้บริโภคภายในครัวเรือน เนื่องจากเป็นปลาที่อดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีสามารถทนต่อความเค็มได้ถึง 20 ส่วนในพันส่วน ทนต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ดีในช่วง 6.5-8.5 ทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส กินอาหารได้แทบทุกชนิด เนื้อมีรสชาติดี ตลาดมีความต้องการสูง (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2553) แต่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลามักประสบปัญหาปลาเป็นโรค ซึ่งโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำสามารถแพร่ระบาดไปตามแหล่งน้ำหรือแหล่งเพาะเลี้ยงปลาอื่น ๆ ได้ ส่งผลกระทบต่อคุณภาพปริมาณผลผลิต และรายได้ของเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรียนับเป็นโรคติดเชื้อในปลาที่สำคัญ และพบมีการระบาดเป็นอย่างมาก เชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค Motile Aeromonas septicemia (MAS) ในปลาน้ำจืด ปลาที่ติดเชื้อมักพบภาวะเลือดออก โลหิตเป็นพิษ (Hemorrhagic septicemia) และอาจทำให้เกิดแผลเน่าเปื่อยตามผิวหนัง (Ulcer) ทำให้ปลาสามารถติดเชื้อได้ง่าย หากเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่ผิดปกติ เช่น อุณหภูมิต่ำ หรือปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำกว่าปกติ ส่งผลทำให้ปลามีความเครียด หรืออ่อนแอลง ในประเทศไทยมีรายงานว่า โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila* สร้างความเสียหายให้แก่ผู้ที่เลี้ยงปลามากที่สุด ทั้งในบ่อเพาะเลี้ยงและการเพาะเลี้ยงตามธรรมชาติ (จิราพร เกษรจันทร์, ม.ป.ป.) และยังพบการแพร่ระบาดไปสู่สัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ มีการรายงานการระบาดไปทั่วโลก โดยมีการรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่รุนแรงในประเทศจีน (Nielsen et al., 2001) ต่อมา มีการรายงานพบการแพร่ระบาดเชื้อ *A. hydrophila* สายพันธุ์ที่รุนแรงในประเทศสหรัฐอเมริกา อันเป็นสาเหตุทำให้ปลา Catfish ตายเป็นจำนวนมาก (Hossain et al., 2014)

การตรวจหาปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อทราบถึงการระบาดของเชื้อ และควบคุมโรค วิธีการตรวจวินิจฉัยสามารถทำได้โดยสังเกตอาการและรอยโรค หรือทำการตรวจหาตัวเชื้อโดยเทคนิคทางจุลชีววิทยาด้วยเทคนิคดั้งเดิม (Conventional method) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ และการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ (Mamnur Rashid et al., 2013) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูง แต่ใช้เวลานานและมีความยุ่งยาก ซึ่งความล่าช้าในการตรวจหาอาจทำให้ไม่สามารถควบคุมโรคได้ทัน ปัจจุบัน มีการนำเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ทำการเพิ่มขยายยีนเป้าหมาย มาช่วยในการตรวจหาตัวเชื้อได้อย่างรวดเร็ว (Porteen et al., 2007) ยีนเป้าหมายที่สำคัญ ได้แก่ *Aero* และ *hlyA* มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารพิษ aerolysin และ

hemolysin ในเชื้อ *Aeromonas* ซึ่งยีนทั้งสองยีนเป็นตัวบ่งชี้ความรุนแรงของเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีผลทำให้ อัตราการตายของปลาสูงนำมาสู่ความสูญเสียของการเลี้ยงปลา

ดังนั้น การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบภาวะการติดเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำจึงมีความสำคัญ ซึ่งปัจจุบันมีการใช้ชุดสกัดสำเร็จซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตของเกษตรกร การศึกษาวิธีสกัดแบบง่าย เพื่อช่วยลดต้นทุนและช่วยให้เกษตรกรสามารถคัดกรองการติดเชื้อของสัตว์น้ำ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลด ต้นทุนการผลิตให้เกษตรกรและรองรับการพัฒนาการใช้เทคนิคการตรวจสอบภาวะการติดเชื้ออื่น นอกจากการใช้เทคนิค PCR เช่น เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคเพิ่มจำนวน สารพันธุกรรมโดยไม่ต้องใช้เครื่อง Thermal cycler แต่ใช้อุณหภูมิประมาณ 60-65 °C ในการเพิ่มจำนวนสาร พันธุกรรม ที่สามารถทำได้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งเป็นเครื่องมือราคาไม่แพง มีใช้ในท้องปฏิบัติทั่วไป และสามารถอ่านผลได้ทันที จึงสามารถนำไปปรับใช้ในภาคสนามได้ (Notomi et al., 2000) เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนการ เตรียมยีนที่พบจำเพาะในโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *A. hydrophila* จะช่วยในการป้องกันโรคหรือลดระยะเวลาใน การตรวจสอบโรคที่มีจำกัด เพิ่มโอกาสให้เกษตรกรสามารถตรวจสอบโรคได้ด้วยตนเอง โดยใช้เครื่องมือที่หาซื้อ ได้ง่าย ราคาไม่แพง และประหยัดเวลา อีกทั้ง ยินดีกล่าวสามารถใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเพื่อการประเมิน ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจเชื้อที่พบในปัจจุบัน เช่น การใช้เทคนิค PCR การใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจหา ระดับของเชื้อ *A. hydrophila* ที่เหมาะสมทั้งในด้านความไวและความจำเพาะเจาะจงของเชื้อในการใช้งานได้ อย่างมีประสิทธิภาพ ในสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ อุณหภูมิ และปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อสามารถต่อยอดไปสู่ การจัดทำชุดทดสอบอย่างง่ายให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ลดขั้นตอนการตรวจโรคโดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ จำนวนมาก และไม่จำเป็นต้องซื้อชุดทดสอบที่มีราคาแพงได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพื่อการตรวจหายีน *hlyA* ที่พบจำเพาะเจาะจงในเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ในปลานิล เพื่อประโยชน์ในการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ใช้ในการเตรียมสิ่งส่งตรวจ และยืนยันการติดเชื้อก่อโรค

วิธีดำเนินการวิจัย

การตรวจยืนยันตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ทำการตรวจยืนยันตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ โดยนำเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* ATCC@35654 (AH) เป็นเชื้อควบคุม *Streptococcus agalactiae* ATCC 28056 (STA) และ *Aeromonas veronii* biogroup *sobria* ATCC 9071 (AS) สำหรับเชื้อ *Aeromonas* นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion (BHI) agar และเพาะเลี้ยง STA บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ผสมเลือด นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบการย้อมแกรม (gram staining) และทางชีวเคมี ทำการเก็บเชื้อในหลอด freezing vials ที่อุณหภูมิ -20 °C

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อควบคุม

ทำการสกัดดีเอ็นเอเชื้อ *A. hydrophila* โดยทำการเพาะเลี้ยง BHI Broth ปริมาตร 5 mL นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 เทียบเท่าเชื้อที่ละลายมีความเข้มข้น 10^8 CFU/mL นำเชื้อที่ละลาย 1 mL ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเชื้อไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) ทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยใช้ชุดดีเอ็นเอ 50 µL และสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีต้มด้วยความร้อน (boiling heat) นำตะกอนของเชื้อเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 50 µL แช่ในน้ำเดือดอุณหภูมิ 95-100 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดเก็บส่วนใส (ดีเอ็นเอ) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C วัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 โดยเครื่อง micro-spectrophotometer (nano-400A)

การทดสอบตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และยืนยันผลโดยวิธี DNA sequencing

สารละลายที่ใช้ในวิธีพีซีอาร์ ปริมาตร 25 µL ประกอบด้วย 1 x buffer with NH_4SO_4 1.5 mM Mg_2Cl 0.2 mM dNTP 0.1 µM primer forward (*hlyA_F* 5' GGCCGGTGGCCGAAGATACGGG 3') และ primer reverse (*hlyA_R* 5' GGCGGCGCCGGACGAGACGGGG 3') 1 U *taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอ 1 µL ทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้เครื่อง thermal cycler (BIO-RAD, T100) สภาวะพีซีอาร์ ประกอบด้วย initial denaturation ณ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที denature ณ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ณ อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72 °C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ final extension 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ในการทำปฏิกิริยาใช้ดีเอ็นเอของ AH เป็น positive control และดีเอ็นเอของ STA AS และน้ำกลั่น เป็น negative control นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทดสอบ 1.5% agarose gel electrophoresis จากนั้น นำผลผลิตพีซีอาร์ส่งหาลำดับเบส (sanger DNA sequencing) และนำไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม nucleotide blast ที่ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

การทดสอบหาความไววิธีการสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *A. hydrophila* ที่เตรียม นำมาเจือจางโดยวิธี ten-fold serial dilution ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 – 10^4 CFU/mL และสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จและวิธีต้มด้วยความร้อน วัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากนั้น นำดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองวิธีทดสอบตรวจหายีน *hlyA* ของเชื้อโดยวิธีพีซีอาร์ตามข้างต้น

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดปลานิล

นำตะกอนเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีความเข้มข้น 10^8 CFU/mL ผสมกับเลือดปลานิล 1 mL (EDTA-blood) นำเลือดปลานิลที่ผสมเชื้อและเลือดปลานิลไม่ผสมเชื้อ ปริมาตร 200 μ L สกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จ QIAamp DNA Blood and tissue Kits (Qiagen, Germany) ทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ทำการชะดีเอ็นเอ 50 μ L และสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการต้มด้วยความร้อน โดยนำเลือดปลานิลที่ผสมเชื้อ ปริมาตร 200 μ L ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 200 μ L ทำการปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดของเหลวส่วนด้านบนทิ้ง (อีโมโกลบิน) ทำซ้ำ 2 ครั้ง จนได้ตะกอนสีขาวและนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการต้มด้วยความร้อน จากนั้น นำดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองวิธีไปทำการทดสอบตรวจหายีน *hlyA* ของเชื้อโดยวิธีพีซีอาร์

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การตรวจยืนยันตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ผลการตรวจยืนยันตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบจากเชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็น positive control คือ *Aeromonas hydrophila* ATCC@35654 (AH) เป็นสายพันธุ์ที่มียีน *hlyA* หรือสร้างสารพิษ hemolysin ซึ่งเป็นสารพิษสำคัญที่เป็นสาเหตุการตายของปลาที่ติดเชื้อ (Yousr et al., 2007) โดยใช้ *S. agalactiae* ATCC 28056 (STA) เป็นเชื้อก่อโรคในปลานิล และ *Aeromonas veronii* biogroup sobria ATCC 9071 (AS) เป็นเชื้อที่พบได้ในแหล่งน้ำและเป็นเชื้อกลุ่มเดียวกันกับเชื้อ *A. hydrophila* (AH) ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เชื้อทั้งสองเป็น negative control และความจำเพาะของการตรวจหายีน *hlyA* ในเชื้อ AH นำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบยืนยัน โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและทดสอบทางชีวเคมี (Convention method) ผลทดสอบให้ผลยืนยันตัวเชื้อถูกต้องดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจยืนยันตัวเชื้อมาตรฐานที่นำมาใช้ทดสอบ

สายพันธุ์	Hemolysis on BA	Catalase	Oxidase	TSI	Motile	LIA	OD	AD	VP	0% NaCl	6.5% NaCl	BE
AH	β	+	+	K/Ag	+	-/-	-	+	+	G	NG	+
AS	β	+	+	K/Ag	+	-/-	-	+	+	G	NG	-
STA	β	-				PPRA +					-	-

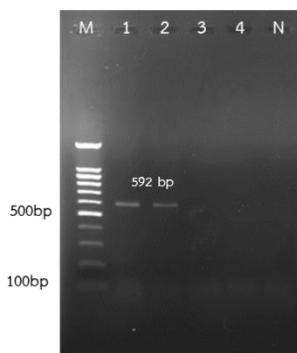
หมายเหตุ β : เม็ดเลือดแดงแตกโดยสมบูรณ์ G: growth NG: no growth K/Ag: glucose ferment และสร้าง gas

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อควบคุม

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *A. hydrophila* ปริมาตร 1 mL ที่มีความเข้มข้น 10^8 CFU/mL พบว่า ดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จ มีความเข้มข้นเท่ากับ 64.9 ng/ μ L และความบริสุทธิ์ 1.86 ในขณะที่ดีเอ็นเอจากวิธีการต้มด้วยความร้อน มีความเข้มข้นเท่ากับ 70.8 ng/ μ L และความบริสุทธิ์ 1.74 แสดงว่า การสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธีให้ความเข้มข้นใกล้เคียงกัน ค่าอัตราส่วนของ A260/A280 อยู่ในช่วง 1.7-1.9 แสดงถึง ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนที่อาจไปรบกวนปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ และมีความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สกัดได้เพียงพอสำหรับตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์

การตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์ และยืนยันผลโดยวิธี DNA sequencing

ผลการทดสอบตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์จากดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งสองวิธีข้างต้น พบว่า ให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 592 คู่เบส (bp) ทั้งสองวิธี และไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ในดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* และ *A. sobria* ที่เป็น Negative control (ภาพที่ 1) ซึ่งให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีดังกล่าวนำไปใช้ตรวจหายีน *hlyA* ของเชื้อ *A. hydrophila* และมีความจำเพาะ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์จากดีเอ็นเอไปหาลำดับเบสดังภาพที่ 2 และนำไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม nucleotide blast พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์มีลำดับเหมือนกับยีน *hemolysin* ใน *A. hydrophila* strain AH085 และ *A. hydrophila* strain JNC1007 ร้อยละ 97 และ 95 ตามลำดับ สอดคล้องกับ Rozi & Daruti (2018) ดังนั้น ไพรมเมอร์ที่ศึกษาในครั้งนี้ มีความจำเพาะต่อยีน *hlyA* ของเชื้อ *A. hydrophila* จึงสามารถนำมาใช้แยกวินิจฉัย *A. hydrophila* และบ่งชี้ถึงสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงได้



ภาพที่ 1 ผลผลิตพีซีอาร์บน 1.5 % agarose gel electrophoresis จากการทดสอบตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์ : M คือ 100 bp marker 1) ดีเอ็นเอจากการสกัดโดยชุดสกัดสำเร็จ 2) ดีเอ็นเอจากการสกัดโดยการต้มด้วยความร้อน 3) ดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* 4) ดีเอ็นเอของเชื้อ *A. sobria* และ N: no template control

>PCR product 592 bp : Hly_A_gene

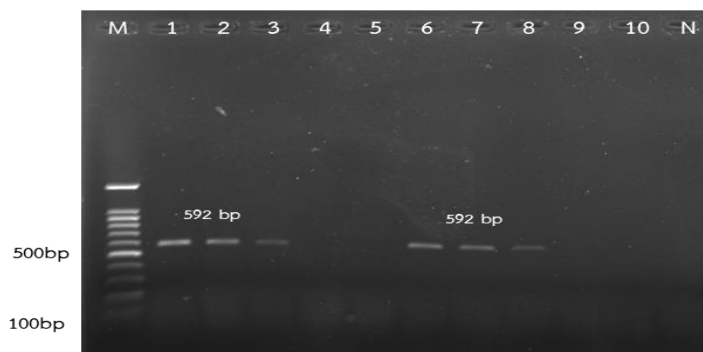
```
GGAGCAGGGTCGTCGCTCACATTCTGCGGATTGCCGTTCTCGTCGTAGAGCCCCAGCGTCCCGCTCTGCTTGT
CATGACCCAGCAGCTGATGGGCACTCAGGTTGCTGAGCGCATCGCTGTCCGCTTTCCACTCCCAGCGCTGACC
CAAGCTCAGGCTGCAGCTCTGCAGCTGGCCGAGGTTGTTGCCGTCCAGGCAGCGCGGGTATCCTGCGCGCTG
ACATAGCGGCCGTACTGGTCATAGATGAAGGACTGGGCGGCCGAGGTCCTCGTCACAGGTCACCGCGCTCAGGC
CATGGTTGGCATCCGCGCTCAGGCAGCGGTTGTCAAAGCCCCCAGCTGCAGGTTGACCGGGCGGCCACCGGT
AAACACCGGGTGTTCCAGTCCACCTTGAAGCTGGTGACGCGGTACCCGCTCTGCGCTTGTTCGGTATCTTTCG
AAGCCCTGGAAGGAGACATGGGCCCCCACCACGTAGTAGTGTGTTAGATGCCGGTATAGATGGGGCGGATGT
TGACCGAGGAGTCGATCTTGAACTCGGTGCTCCCCGTCTCGTCCGGGGCCGCCAAA
```

ภาพที่ 2 ลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 592 คู่เบส จากการทดสอบตรวจหายีน *hlyA* ในเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีพีซีอาร์จากดีเอ็นเอที่สกัดโดยชุดสำเร็จ

การตรวจหาความไวของวิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์

จากการทดสอบหาความไวของวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *A. hydrophila* สำหรับตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 - 10^4 CFU/mL พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดทั้งจากการใช้ชุดสกัดสำเร็จและการต้มด้วยความร้อนให้ผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 592 bp ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^7 และ 10^6 CFU/mL ทั้งสองวิธี ในขณะที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^5 และ 10^4 CFU/mL ไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ (ภาพที่ 3) ดังนั้น ความเข้มข้นของเชื้อ 10^6 CFU/mL เป็นความเข้มข้นของเชื้อน้อยที่สุดที่นำไปสกัดดีเอ็นเอและสามารถตรวจหายีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์ได้ โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 18.8 ng/ μ L และมีความบริสุทธิ์ 1.84 จากการสกัดโดยชุดสกัดสำเร็จ และความเข้มข้นเท่ากับ 17.7 ng/ μ L และมีความบริสุทธิ์ 1.66 จากการสกัดโดยการต้มด้วยน้ำร้อน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2003) ทำการตรวจหายีน *hemolysin* ใน *A. hydrophila* และ *A. sobria* โดยวิธี

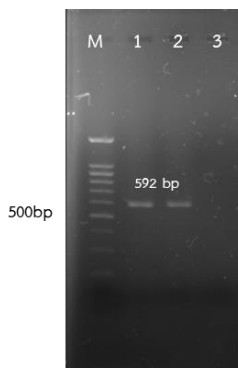
มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 ng/ μ L อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Latif-Eugenín et al. (2016) สามารถตรวจหา ยีน glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (gcat) โดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ *A. hydrophila* 2.5-25 CFU/mL



ภาพที่ 3 ผลผลิตพีซีอาร์ บน 1.5% agarose gel electrophoresis จากการตรวจหา ยีน *hlyA* จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อที่มีความเข้มข้นต่างกัน การสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จ : M คือ 100 bp marker 1) 10^8 CFU/mL 2) 10^7 CFU/mL 3) 10^6 CFU/mL 4) 10^5 CFU/mL 5) 10^4 CFU/mL การสกัดด้วยการต้มด้วยความร้อน 6) 10^8 CFU/mL 7) 10^7 CFU/mL 8) 10^6 CFU/mL 9) 10^5 CFU/mL 10) 10^4 CFU/mL และ N: no template control

การทดสอบประสิทธิภาพวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดปลานิล

ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดปลานิลผสมเชื้อ *A. hydrophila* โดยชุดสกัดดีเอ็นเอแบบสำเร็จและการต้มด้วยความร้อนร่วมกับการสลายเม็ดเลือดแดงด้วยน้ำกลั่น พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดทั้งสองวิธีสามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 592 คู่เบส (ภาพที่ 4) ดังนั้น วิธีการสกัดทั้งสองวิธีสามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจ เพื่อตรวจแยกวินิจฉัยเชื้อ *A. hydrophila* โดยวิธีพีซีอาร์ได้ การศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่สกัดโดยชุดสกัดสำเร็จและการต้มด้วยความร้อน สามารถนำไปตรวจหา ยีน *hlyA* ด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ โดยให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ที่ใกล้เคียง เมื่อสกัดจากเชื้อความเข้มข้นของเชื้อเท่ากัน และสามารถสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจได้ อย่างไรก็ตาม การสกัดดีเอ็นเอโดยการต้มด้วยความร้อน เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และราคาไม่แพง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือนอกสถานที่ได้ โดยมีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้เพียงพอต่อการตรวจหา ยีน ด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น LAMP และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการสกัดสิ่งส่งตรวจอื่นเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อในปลาได้



ภาพที่ 4 ผลผลิตพีซีอาร์ บน 1.5 % agarose gel electrophoresis จากดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเลือดผสมเชื้อ : M คือ 100 bp marker 1) ดีเอ็นเอจากชุดสกัดดีเอ็นเอแบบสำเร็จ 2) ดีเอ็นเอจากการต้มด้วยความร้อน และ 3) ดีเอ็นเอจากเลือดที่ไม่ผสมเชื้อ

สรุป

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* @ATCC 35654TM โดยชุดสกัดดีเอ็นเอแบบสำเร็จ และวิธีต้มด้วยความร้อน สามารถนำไปตรวจหา ยีน *hlyA* โดยวิธีพีซีอาร์ ซึ่งเป็นยืนยันเป้าหมายที่สามารถวินิจฉัยหรือจำแนก *A. hydrophila* ออกจากเชื้อก่อโรคในปลาชนิดอื่นและเชื้อในกลุ่มเดียวกันได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจเลือดโดยความเข้มข้นเชื้อไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/mL และเลือกใช้วิธีสกัดที่เหมาะสมกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ ลำดับเบสจากผลผลิตพีซีอาร์ สามารถนำไปใช้เป็นแม่แบบในการออกแบบไพรเมอร์โดยเทคนิคอณูชีววิทยาอื่น ๆ ได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อตรวจหา ยีน *hemolysin* เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ๆ ในการวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในปลาให้มีความง่ายและสะดวก และสามารถนำไปใช้กับการตรวจหาชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิคอณูชีววิทยาอื่น ๆ นอกเหนือจากวิธีพีซีอาร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณแหล่งทุนจาก กองทุนส่งเสริมงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ในการสนับสนุนคณะผู้วิจัยดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

จิราพร เกษรจันทร์. (ม.ป.ป). **กรมประมง กับ สถานการณ์ TiLV**. สืบค้นจาก

<http://www.kuva.or.th/seminar2017/semina09/file/03.pdf>

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. (2553). **เอกสารคำแนะนำ การเพาะเลี้ยงปลานิล**. ฝ่ายเผยแพร่ ส่วนเผยแพร่การประมง, สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Hossain, M.J., Sun, D., McGarey, D.J., Wrenn, S., Alexander, L.M., Martino, M.E., Xing, Y., Terhune, J.S., & Liles, M.R. (2014). An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish. **mBio**, 5(3), e00848-14.

Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R., & María José, F. (2016). A Culture Independent Method for the Detection of *Aeromonas* sp. from Water Samples. **Italian Journal Food Safety**, 5(1), 5489.

Mamnur Rashid, M., Hossain, M.S., & Ali, M.F. (2013). Isolation and Identification of *Aeromonas hydrophila* from silver carp and its culture environment from Mymensingh region. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, 11(2), 373-376.

Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., & Larsen, J.L. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?. **Diseases of Aquatic Organisms**, 46, 23-29.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, 28(12), e63.

Porteen, K. Agarwal, R.K., & Bhilegaonkar, K.N. (2007). Detection of *Aeromonas* sp. From Chicken and Fish Samples by Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Food Technology**, 2(1), 30-37.

Rozi, K.R., & Daruti, D.N. (2018). Detection and analysis of hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* isolated from Gouramy (*Osphronemus gouramy*) by polymerase chain reaction (PCR). In ASEAN-FEN international fisheries symposium. **Earth and Environmental Science**, 137, 012001.

- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M., Caldeira, R., Woodward, D.L., & Rodgers, F.G. (2003). Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(3), 1048-1054.
- Yousr, A.H., Napis, S., Rusul, G.R.A., & Son, R. (2007). Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. **Asian Food Journal**, 14(2), 115-122.