View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Directory of Open Access Journals

รายงานทางเทคนิค

การใช้เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

บุญกอบ วิริยพงศ์สุธี[1] ดอกรัก ชัยสาร[2] สุภฎา คีรีรัฐนิคม[3] นุกูล อินทระสังขา[4] พูนสุข ประเสริฐสรรพ์[5] และ กิจการ ศุภมาตย์[6]

Abstract

Viriyapongsutee, B.[1], Chaisarn, D.[3], Kiriratnikom, S.[3], Intrasungkha, N.[3], Prasertsan, P.[1] and Supamattaya, K.[2]

The application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for studying the microbial communities in intestinal tissues of white shrimp (*Penaeus vannamei*)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 275-282

Fluorescence *in situ* hybridization technique is very useful for the evaluation of microbial communities in various environments. It is possible to apply this technique to study the intestinal microflora in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Different fixatives and storage temperature were tested in this technique. It was

[1]Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, [2]Department of Aquatic Sciences, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand, [3]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Muang, Songkhla 90000 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ [5]Ph.D. (Biotechnology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร [6]Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Diseases) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [2]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาชีววิทยา [3]วท.ม.(วาริชศาสตร์) [4]Ph.D. (Microbiology) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Corresponding e-mail: kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 14 กันยายน 2547 รับลงพิมพ์ 29 พฤศจิกายน 2547

found that fixation with 10% buffered formalin for 12 hours and changed to 70% ethanol shown positive results when compared to the fixation with Davidson's fixative or RF fixative. The best signaling was obtained from the samples which were stored in -20ºC. By using the DNA probe targeted to the Eubacteria domain (EUB338 probe, 5′-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′) labeled with fluorescein as a hybridizing probe, it was found that most intestinal microflora were aggregated with the intestinal contents, or dispersed in the lumen. There was not evidence of the attachment of the microflora with the intestinal epithelium in this study.

Key words : fluorescence *in situ* hybridization (FISH), microbial communities, *Penaeus vannamei*

บทคัดย่อ

บุญกอบ วิริยพงศ์สุธี ดอกรัก ชัยสาร สุภฎา ดีรีรัฐนิคม นุกูล อินทระสังขา พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และ กิจการ ศุภมาตย์

การใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 275-282

เทคนิค FISH (fluorescence *in situ* hybridization) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาชุมชนแบคทีเรีย เนื่องจากทำให้ทราบถึงชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในที่อยู่อาศัยอย่างแท้จริง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของกลุ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดินอาหารของกุ้งขาว จากการทดสอบชนิดของน้ำยารักษาสภาพ ตลอดจนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อ พบว่าการรักษาสภาพของเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวด้วยน้ำยาดอง บัฟเฟอร์ ฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทานอล 70% ให้ผลในการตรวจสอบได้ชัดเจนกว่า การเก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และ RNA friendly fixative ทั้งนี้การเก็บรักษาตัวอย่างลำไส้ของกุ้งขาวไว้ที่อุณหภูมิ -20ºC เป็นวิธีการที่สามารถให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนกว่าการเก็บรักษาตัวอย่างที่ 4ºC จากการทดลองใช้ DNA probe EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') ที่ติดฉลากด้วย fluorescein เป็น probe สำหรับการตรวจสอบ พบว่าแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ในลำไส้ของกุ้งขาวเกาะกลุ่มรวมอยู่กับอาหารบางส่วนกระจายอยู่ทั่วไปในลำไส้ ทั้งนี้ไม่พบการยึดเกาะกับผนังลำไส้โดยตรง

ปัจจุบันเทคนิค rRNA approach ซึ่งอาศัยข้อมูลจากยีน rRNA โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S และ 23S rRNA ของโปรคาริโอต (prokaryotes) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาชุมชนแบคทีเรีย เทคนิคดังกล่าวนอกจากจะทำให้สามารถนับปริมาณหรือสัดส่วนของแบคทีเรียได้แล้วยังสามารถจำแนกประเภทของแบคทีเรียได้จากความสัมพันธ์ตามสายวิวัฒนาการ (phylogenetics) ในระบบนิเวศต่างๆ ได้ (Amann *et al*., 1995) เทคนิค fluorescence *in situ* hybridization (FISH) เป็นส่วนหนึ่งของเทคนิค rRNA approach โดยอาศัยข้อมูลจากฐานข้อมูลยีน rRNA เป็นจำนวนมากที่สามารถเข้าไปใช้ได้อย่างสะดวกโดยผ่านระบบเครือข่ายคอมพิวเตอร์ เช่น Ribosomal Database Project (RDP) ที่มีความทันสมัยในการออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (oligonucleotide probe) (Amann *et al*., 1997) โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบที่ใช้มักจะเป็น DNA ที่มีความยาวประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorochrome) เรียกสั้นๆ ว่าโพรบมีความจำเพาะกับแบคทีเรียตั้งแต่ระดับไฟลัมไปจนถึงสปีชีส์ โดยมีเป้าหมายอยู่ที่ rRNA ซึ่งมีปริมาณมากคือประมาณ 1,000 หน่วย/เซลล์ (Amann *et al*.,1997) เมื่อ

โพรบจับกับเป้าหมายก็สามารถตรวจสอบได้จากการเรืองแสง ดังนั้นการศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลจะทำให้ทราบถึงชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในที่อยู่อาศัยอย่างแท้จริง ซึ่งปัจจุบันเทคนิค FISH เป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับและใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น ระบบบำบัดน้ำเสีย ตะกอนดิน แหล่งน้ำธรรมชาติ หรือศึกษาจุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiosis) เป็นต้น (Amann *et al*., 2001; Moter and Gobel, 2000)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค FISH ไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อโดยตรงในงานหลายด้าน เช่น การตรวจสอบแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ที่ดื้อยาในกระเพาะอาหารมนุษย์ (Trebesius *et al*., 2000) แบคทีเรีย *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* ที่ก่อโรคในลูกสุกร (Jensen *et al*., 2000) แบคทีเรียที่ก่อโรค lyme borreliosis ในไรซึ่งเป็นพาหะนำโรคไปสู่สัตว์มีกระดูกสันหลัง (Hammer *et al*., 2001) และแบคทีเรียในฟองน้ำ (Manz *et al*., 2000) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการนำเอาเทคนิค FISH มาใช้ในการศึกษาแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง มีเพียงรายงานถึงการใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบการติดโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย necrotizing hepato-pancreatitis bacterium ในเซลล์ตับอ่อนของกุ้งขาวในสหรัฐอเมริกา (Loy *et al*., 1996) การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค FISH โดยการใช้น้ำยาดองตัวอย่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารของกุ้งขาวด้วยวิธีบดลำไส้ และการตรวจสอบด้วยโพรบบนเนื้อเยื่อกุ้งขาวโดยตรง ซึ่งจะมีประโยชน์สำหรับการศึกษาจำนวนหรือตรวจสอบติดตามประชากรแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของกุ้ง หรือแม้แต่การตรวจสอบติดตามแบคทีเรียที่สนใจในทางเดินอาหารกุ้ง เช่น โปรไบโอติก เป็นต้น หรืออาจจะประยุกต์ใช้โพรบที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรียที่สนใจในการศึกษาครั้งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

กุ้งขาวสำหรับการทดลองนำมาจากฟาร์มเกษตรกรจังหวัดปัตตานี น้ำหนักเฉลี่ย 9.29±0.42 กรัม จำนวน 60 ตัว เป็นกุ้งปกติไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง ตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และไวรัส Taura syndrome virus (TSV) ตรวจโดยวิธีทางชีวโมเลกุล นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในบ่อซิเมนต์ขนาด 5 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ระดับความเค็มของน้ำ 15 ส่วนในพันส่วน ให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

การเตรียมตัวอย่างลำไส้บด

เตรียมตัวอย่างกุ้งขาวโดยรักษาสภาพในน้ำยาดอง 3 ชุด คือ ชุดที่ 1 กุ้งขาว จำนวน 20 ตัว ดองในน้ำยาฟอร์มาลิน 10% เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเก็บในเอทานอล 70% ชุดที่ 2 กุ้งขาว จำนวน 20 ตัว ดองในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Humason, 1972) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเก็บในเอทานอล 70% และชุดที่ 3 กุ้งขาวจำนวน 20 ตัว ดองในน้ำยา RNA friendly fixative (Hasson *et al*., 1997) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทานอล 70% โดยแต่ละชุดแยกเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งขาวจำนวน 10 ตัวที่อุณหภูมิ -20°C และจำนวน 10 ตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นนำตัวอย่างกุ้งขาวจำนวน 5 ตัว จากแต่ละชุดสภาพการเก็บรักษามาเลาะเฉพาะส่วนลำไส้ นำมาบดให้ละเอียดด้วยวิธีการปลอดเชื้อโดยใช้โกร่งขนาดเล็ก เกลี่ยตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวบดลงบนสไลด์ที่เคลือบเจลลาติน 1% ทิ้งให้แห้ง นำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) ด้วยเอทานอล 80% และ 100% ความเข้มข้นละ 1 ครั้งๆ 3 นาที ตามลำดับ แล้วทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เตรียมตัวอย่างกุ้งขาวจำนวน 5 ตัว จากแต่ละชุดที่เก็บรักษาในน้ำยาดองต่างๆ คือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10% น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และน้ำยา RNA friendly fixative ทั้งที่อุณหภูมิ -20°C และที่อุณหภูมิ 4°C นำมาเลาะเฉพาะส่วนลำไส้ออกมา แล้วนำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยนำตัวอย่างลำไส้ใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ (cassette) แล้วแช่ในเอทานอลเข้มข้น 70%, 80% และ 100% ความเข้มข้นละ 1 ครั้งๆ 3 นาที ตามลำดับ แช่ใน

ไซลีน (xylene) 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที และพาราพลาสท์ (paraplast) 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ฝังเนื้อเยื่อด้วยพาราพลาสท์ (embed) โดยใส่ใน embedding glasses แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องให้ความเย็น (cooling) ให้พาราพลาสท์แข็งตัว นำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตมแบบ rotary microtome ให้ได้ความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน นำไปลอยในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 45-50°C ใช้แผ่นสไลด์ตักตัวอย่างที่ลอยอยู่ในน้ำกลั่นผสมเจลาตินที่อุณหภูมิ 45-50° C ขึ้นมา นำไปอบที่ 45°C เป็นเวลาข้ามคืน (ดัดแปลงจาก Loy *et al*., 1996) นำแผ่นสไลด์ตัวอย่างผ่านขั้นตอนการนำพาราพลาสท์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaplast) โดยการแช่ในไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที และเอทานอล 100% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์ที่ผ่านขั้นตอนการนำพาราพลาสท์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaplast) ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH

เทคนิค FISH

ทำการ hybridization ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Amann (1995) โดยบ่มตัวอย่างกับโพรบ EUB338 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5′-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′ ที่จำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (domain bacteria) (Amann *et al*., 1990) ติดฉลากโพรบด้วยสารเรืองแสงสีเขียว (fluorescein) โดยโพรบมีความเข้มข้น 25 ng/µl ใน hybridization buffer (NaCl 0.9 M, Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01%, formamide 20%) นำตัวอย่างกับโพรบบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (TECHNE, Hybridizer HB-1D) ที่อุณหภูมิ 46°C ในสภาพที่เต็มไปด้วยไอของ hybridization buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01%, NaCl 0.225 M) 1 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 48°C เป็นเวลา 15 นาที หยดด้วย anti-fading solution (p-phenylenediamine 0.1% ในสารละลายผสมของ $NaCO_3$ กับ glycerol) ลงบนสไลด์ เพื่อชะลอการจางหายของสารเรืองแสง แล้วจึงปิดด้วย coverglass ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence (Olympus, BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง cooled CCD (Olympus, DP50)

ผลการทดลอง

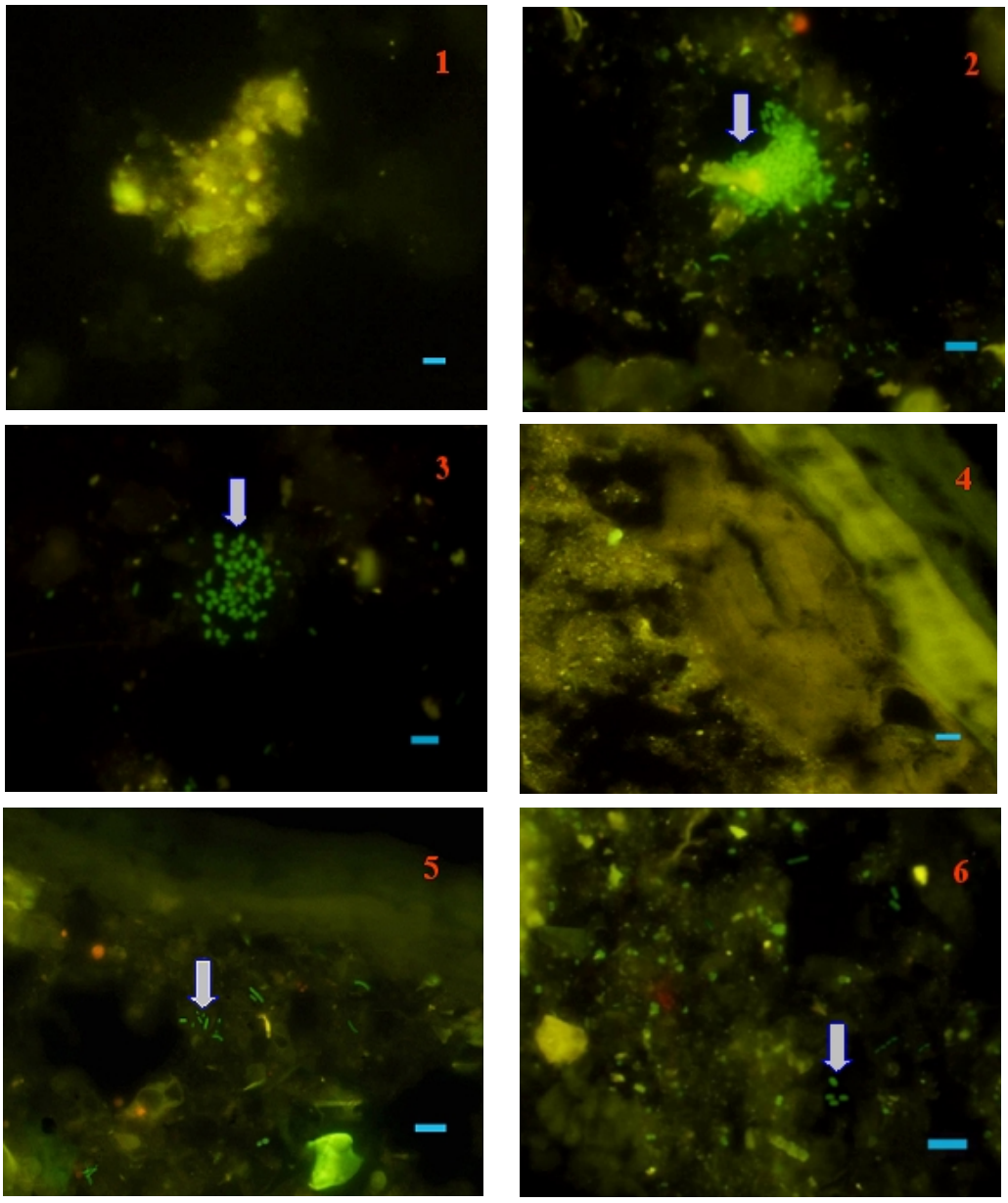
การตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH โดยใช้วิธีบดลำไส้

การตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH โดยใช้วิธีบดลำไส้ที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาดองชนิดต่างๆ คือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10% น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และน้ำยา RNA friendly fixative พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH ในลำไส้ที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10% แต่ไม่สามารถตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH ในลำไส้ที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และน้ำยา RNA friendly fixative

เนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10% ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยไม่เติมโพรบ EUB338 จึงไม่มีการเรืองแสงของจุลินทรีย์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาว แต่พบว่ามีการเรืองแสงของวัตถุหรือเศษอาหารต่างๆ ในตัวอย่างเกิดขึ้น (Figure 1) ส่วนตัวอย่างลำไส้ของกุ้งขาวที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10% แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอทานอล 70% ทั้งที่อุณหภูมิ -20°C และ 4°C นำไป hybridization ด้วยโพรบ EUB338 ซึ่งมีความจำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (domain bacteria) (Amann *et al*., 1990) พบแบคทีเรียเรืองแสงในตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาว โดยแบคทีเรียมีการเกาะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่กับก้อนของอาหาร (Figure 2 และ 3)

การตรวจสอบแบคทีเรียในทางเดินอาหารกุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH บนเนื้อเยื่อ

การใช้น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) (Humason, 1972) และ RNA friendly fixative (Hasson *et al*., 1997) ดองตัวอย่างกุ้งขาวเพื่อนำมาเตรียมเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH พบว่าไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียในตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวได้เลย แต่เมื่อเปลี่ยนน้ำยาเป็นฟอร์มาลิน 10% แล้วนำมาตัดเนื้อเยื่อโดยผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา ที่ดัดแปลงจากวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้ง



Figures 1-6. **Epifluorescence micrographs of microbial communities (arrow) detected by FISH and the EUB 338 fluorescein-labeled gene probe. 1. Crushed intestine tissue of white shrimp hybridized by hybridization buffer with non EUB 338 fluorescein-labeled gene probe (Negative control). 2. Bacterial colonization on food bolus in the midgut (arrow), as detected by FISH technique and the EUB 338 fluorescein-labeled gene probe (crushed intestine tissue fixed and stored at -20°C probe). 3. Crushed intestine tissue fixed and stored at 4°C. 4. Intestine tissue of white shrimp hybridized by hybridization buffer with non EUB 338 fluorescein-labeled gene probe (negative control). 5. Tissue sample fixed and stored at -20°C. 6. Tissue sample fixed and stored at 4°C. Bar, 5 µm.**

เพื่อทำ *in situ* hybridization โดยทั่วไป ซึ่งตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตมแบบ rotary microtome ให้ได้ความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน แล้ว hybridization ด้วยโพรบ EUB338 ที่จำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (domain bacteria) พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้โดยมองเห็นเซลล์เรืองแสงสีเขียวขึ้นมา สำหรับเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10% ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH โดยไม่เติมโพรบ EUB338 จึงไม่มีการเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียเกิดขึ้นแต่อย่างใด (Figure 4) ส่วนเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวที่รักษาสภาพในฟอร์มาลิน 10% แล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอล 70% เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH สามารถตรวจพบการเรืองแสงสีเขียวของเซลล์แบคทีเรียเกาะกลุ่มรวมอยู่กับอาหาร และบางส่วนกระจายอยู่ทั่วไปในลำไส้ ทั้งนี้ไม่พบการยึดเกาะกับผนังลำไส้โดยตรง (Figure 5) ในขณะที่เนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวที่รักษาสภาพที่อุณหภูมิ 4°C ก็สามารถพบการเรืองแสงของเซลล์แบคทีเรียได้เช่นกัน แต่จากการสังเกตโครงสร้างของเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาว พบว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C มีโครงสร้างของเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ที่สมบูรณ์และคงสภาพได้ดีกว่าการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C (Figure 6)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าการประสบความสำเร็จในการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH โดยการบดลำไส้และการตัดเนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญคือ น้ำยาดองตัวอย่างและอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอย่างลำไส้ ที่จะทำให้เนื้อเยื่อลำไส้ของกุ้งขาวมีโครงสร้างของเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ที่สมบูรณ์คงสภาพได้ดี และรักษาเป้าหมายของโพรบคือ 16S rRNA ภายในเซลล์แบคทีเรียไว้ไม่ให้ถูกทำลาย แบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้ของกุ้งขาวที่ตรวจพบมักเกาะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่กับก้อนของอาหาร ทั้งยังมีปริมาณที่หนาแน่น บางส่วนก็กระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณที่มีอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับ Thimm และ Tebbe (2003) ที่ใช้เทคนิค FISH โดยใช้โพรบ EUB338 ที่มีความจำเพาะกับ 16S rRNA ของแบคทีเรีย ศึกษาการเกาะติดของแบคทีเรียที่มีอยู่ในลำไส้และเนื้อเยื่อของ *Folsomia candida* (Collembola) ซึ่งอยู่ในไฟลัมอาร์โทรพอด

การใช้น้ำยาดองตัวอย่างสูตรดั้งเดิมที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้งขาว สำหรับเทคนิค *in situ* hybridization คือน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ที่ใช้ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยทั่วไป พบว่าไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค FISH บนเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาว เนื่องจากน้ำยาดังกล่าวมีความเป็นกรดสูง (ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 3.5-4.0) มีผลให้อาร์เอ็นเอสลายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีการเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานานๆ (Hasson *et al*., 1997) เช่นเดียวกันกับการทดลองด้วยน้ำยาที่มีการปรับให้เหมาะสมต่อการรักษา RNA ในตัวอย่างไว้คือ RNA friendly fixative ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 6.0-7.0 ก็พบว่าน้ำยา RNA friendly fixative ไม่สามารถช่วยให้ตรวจสอบแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อลำไส้กุ้งขาวด้วยเทคนิค FISH ได้เช่นกัน ทั้งนี้สาเหตุอาจจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของฟอร์มาลินในน้ำยา RNA friendly fixative สูงเกินไปคือ มีฟอร์มาลินเป็นส่วนประกอบถึง 34.9% ในขณะที่น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) มีฟอร์มาลิน 22% ซึ่งจากผลการทำเทคนิค FISH กับเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นของฟอร์มาลินแตกต่างกัน พบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของฟอร์มาลินมากเกิน 10% เป็นต้นไป จะทำให้สัดส่วนของจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เรืองแสงลดลง โดยที่ยังมองเห็นเซลล์เหล่านั้นอยู่แต่เซลล์ไม่มีการเรืองแสง (ผลการทดลองไม่ได้แสดง) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟอร์มาลินที่ความเข้มข้นสูงอาจจะทำลายเป้าหมายของโพรบได้ แต่ในขณะเดียวกัน หากลดความเข้มข้นของฟอร์มาลินต่ำเกินไป เมื่อนำไปดองเนื้อเยื่อกุ้งก็จะทำให้เนื้อเยื่อกุ้งเปื่อยยุ่ย ไม่สามารถคงสภาพได้ ดังนั้นการใช้น้ำยาดองเป็นฟอร์มาลิน 10% นั้น พบว่ามีความเหมาะสมที่จะรักษาสภาพเนื้อเยื่อกุ้งให้คงสภาพได้ดี และรักษาเป้าหมายสำหรับโพรบที่จะเข้าไป จับในเซลล์ของแบคทีเรียคือ 16S rRNA เอาไว้ได้ ดังนั้นการเลือกน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างจึงมีความสำคัญเป็นลำดับแรก ซึ่งต้องมีความเหมาะสมที่จะรักษาสภาพทั้งเนื้อเยื่อกุ้งและเป้าหมายของโพรบซึ่งก็คือ อาร์เอ็นเอในเซลล์แบคทีเรียด้วย

นอกจากนี้การเลือกใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสาร

เรืองแสง fluorescein (ดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นประมาณ 492 นาโนเมตร) พบว่าสามารถช่วยลดการเกิด autofluorescence ของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH ได้ดี หากใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงในกลุ่มของ rhodamine ที่มีค่าความยาวคลื่นของการถูกกระตุ้นด้วยแสงช่วงประมาณ 557 นาโนเมตร หรือ Cy3 ซึ่งมีช่วงความยาวคลื่นของการถูกกระตุ้นด้วยแสงประมาณ 550 นาโนเมตร (Moter and Gobel, 2000) จะทำให้เกิดการ autofluorescence ขึ้นได้มาก เนื่องจากช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นทั้ง Cy3 และ rhodamine อาจจะไปช่วยกระตุ้นให้วัตถุต่างๆ ในลำไส้ของกุ้งเกิด autofluorescence ดังนั้นจึงควรเลือกชนิดของสารเรืองแสงให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่จะทำการตรวจสอบ

นอกจากนี้แล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า เมื่อนำตัวอย่างที่ตัดเนื้อเยื่อด้วยความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ epifluorescence ทำให้เกิดการหลุดจากจุดโฟกัสของตัวอย่าง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของกล้อง epifluorescence แบบธรรมดาที่ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีความหนาได้ ปัญหาดังกล่าวนี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีความสามารถในการตรวจสอบการเรืองแสงของวัตถุที่มีความหนา ซึ่งจะทำให้สามารถตรวจสอบการเรืองแสงของตัวอย่างที่มีความหนาตามระดับความลึกตามที่ต้องการได้ ตัวอย่างเช่น กล้อง confocal laser scanning microscope (CLSM) (Trebesius *et al*., 2000)

จากผลการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่า สามารถที่จะนำเอาเทคนิค FISH มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งขาวในเชิงคุณภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาแบคทีเรียต่างๆ ที่สนใจด้วยโพรบที่มีความจำเพาะกับแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Amann, R.I. 1995. *In situ* identification of microorganism by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic probe. **In**: A.D.C.AK-kermans (J.D.van Elsas, and F.J.de Bruijn eds). Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919-1925.

Amann, R.I., Fuchs, B.M. and Behrens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 231-236.

Amann, R.I., Glöckner, F.O. and Neef, A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiol. Rev. 20: 191-200.

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. FEMS Microbiol. Rev. 59: 143-169.

Hammer, B., Moter, A., Kahl, O., Alberti, G., Gobel, U.B. 2001. Visualization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on whole-body sections of *Ixodes ricinus* ticks and gerbil skin biopsies. Microbiology. 147: 1425-1436.

Hasson, K.H., Hasson, J., Aubert, H. and Redman, R.M. 1997. A new RNA-friendly for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. J. Virol. Methods. 66: 227-236.

Humason, G.L. 1972. Animal Tissue Techniques. 3rd ed. W.H. Freeman, San Francisco, CA.

Jensen, T.K., Moller, K., Boye, M., Leser, T.D. and Jorsal, S.E. 2000. Scanning electron microscopy and fluorescent *in situ* hybridization of experimental *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* infection in growing pigs. Vet. Pathol. 37: 22-32.

Loy, J.K., Dewhirst, F.E., Weber, W. and Frelier, P. 1996. Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepato-

pancreatitis in shrimp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3439-3445.

Manz, W., Arp, G., Schumann-Kindel, G., Szewzyk, V. and Reitner, J. 2000. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescent *in situ* hybridization to show the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. J. of Microbiol. Methods. 40: 125-134.

Moter, A. and Gobel, U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. of Microbiol. Methods. 41: 85-112.

Thimm, T. and Tebbe, C.C. 2003. Protocol for rapid fluorescence *in situ* hybridisation of bacteria in cryosection of microarthopods. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2875-2878.

Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J. and Haas, R. 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridization. Gut. 46: 608-614.