บทที่ 3

ผลการทดลอง

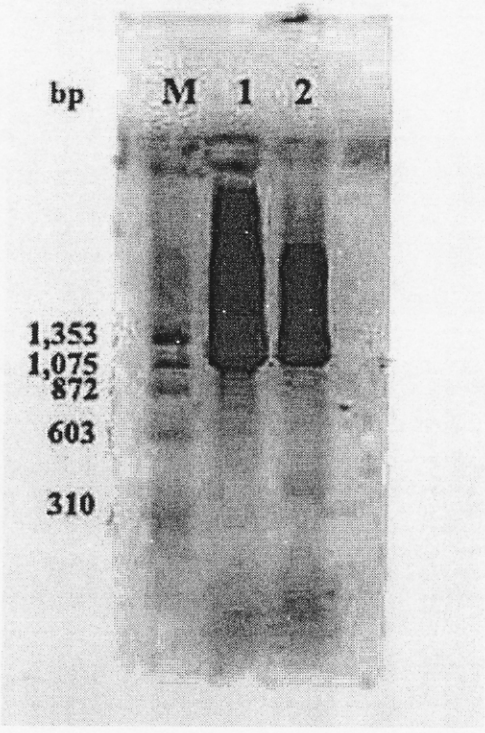
3.1 ผลการเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi*

จากการสกัดโครโมโซมอลดีเอนเอจากเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ NICA 1416 โดยวิธี phenol - chloroform ได้ดีเอนเอความเข้มข้น 18.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เมื่อนำไปเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ UP-1 และUP-2r โดยมีเชื้อ *V. parahaemolyticus* (มีรายงานว่าสามารถเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* กับไพรเมอร์ UP-1 และUP-2r ได้) เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส ได้ (ภาพประกอบ 3.1)

3.2 ผลการโคลนและหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi*

จากการเชื่อมจีน *gyrB* เข้ากับพลาสมิด pGEM-T Easy แล้วนำเข้าสู่ competent เซลล์ *E. coli* เมื่อทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาว ของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด แล้วนำไปสกัดและตรวจยืนยันโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Not* I สามารถตัดพลาสมิดได้ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็นเวคเตอร์ p GEM T-Easy ขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส และส่วนของจีน *gyrB* ที่แทรกเข้าไป ขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (ภาพประกอบ 3.2)

ผลการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi* โดยเริ่มจากนิวคลิโอไทด์ที่เป็น T7 และ SP6 (ภาพประกอบ 2.1) เมื่อทำการหาลำดับนิวคลิโอไทด์หมดทั้งจีน พบว่ามีขนาด 1,174 คู่เบส (ภาพประกอบ 3.3)

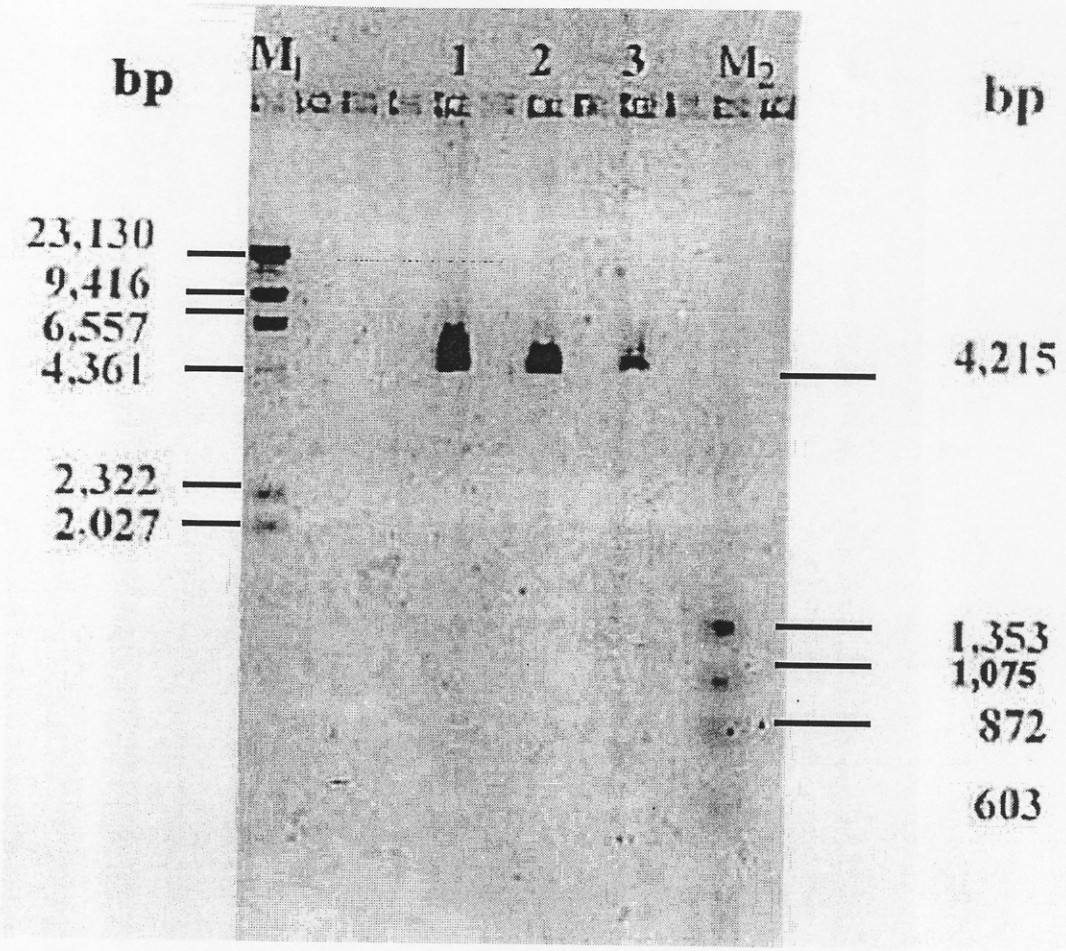


ภาพประกอบ 3.1 ผลการเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi* โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ UP-1 และ UP-2r

M เป็น molecular weight marker (ϕX 174 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III)

แถวที่ 1. เป็นจีน *gyrB V. parahaemolyticus*

แถวที่ 2. เป็นจีน *gyrB V. harveyi* สายพันธุ์ NICA 1416



ก

ภาพประกอบ 3.2 ผลการเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi* กับพลาสมิด pGEM T- easy ขนาด 1,200 คู่เบส โดยการโคลนเข้าเชื้อ *E. coli*

ก. จีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR I*

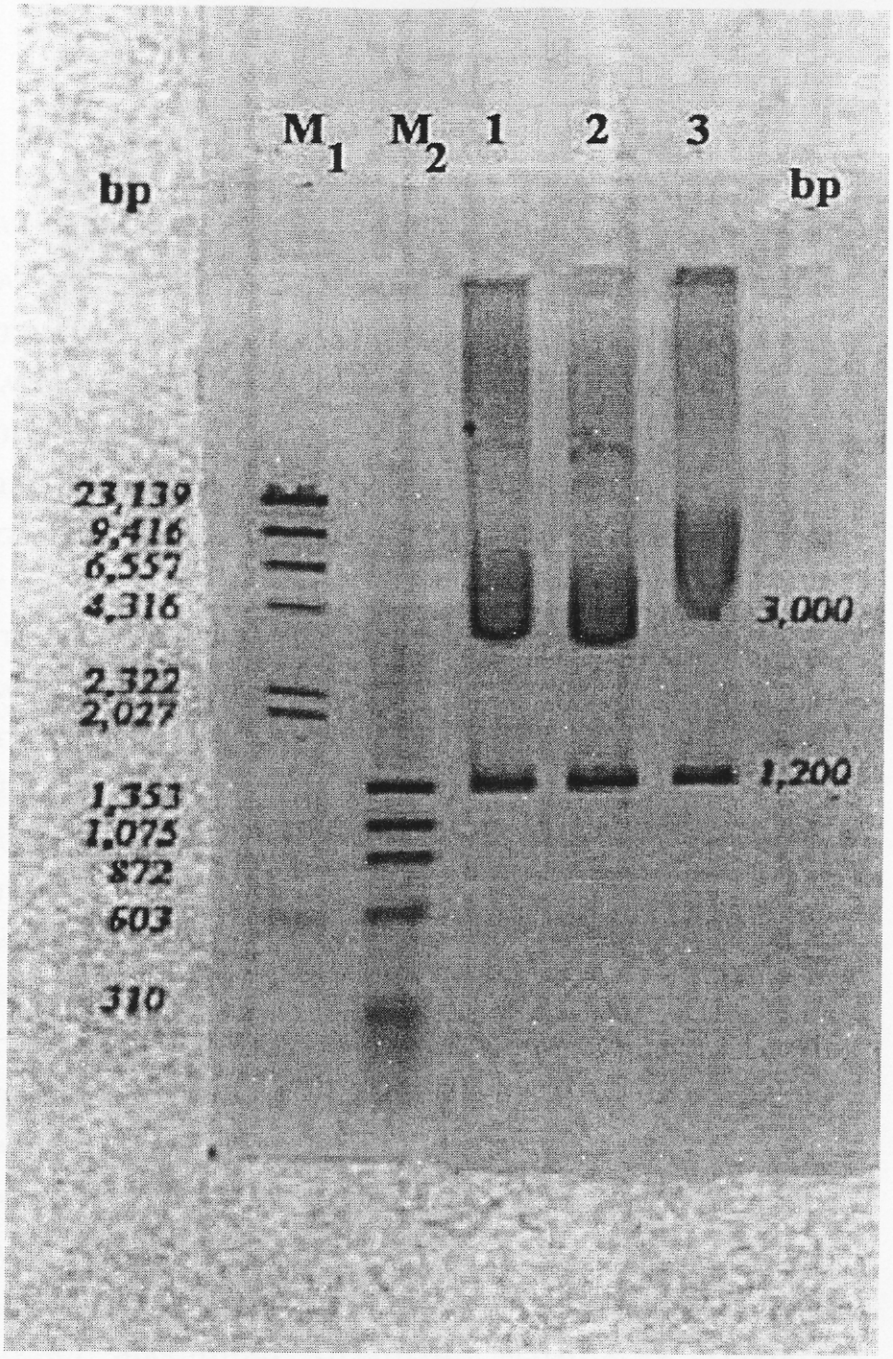
M_1 เป็น molecular weight marker λ *Hind* III

M_2 เป็น molecular weight marker (ϕX 174 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III)

แถวที่ 1 เป็น จีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy โคลน 1

แถวที่ 2 เป็น จีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy โคลน 3

แถวที่ 3 เป็นจีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy โคลน 5



ข

ข. *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy หลังตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR I*

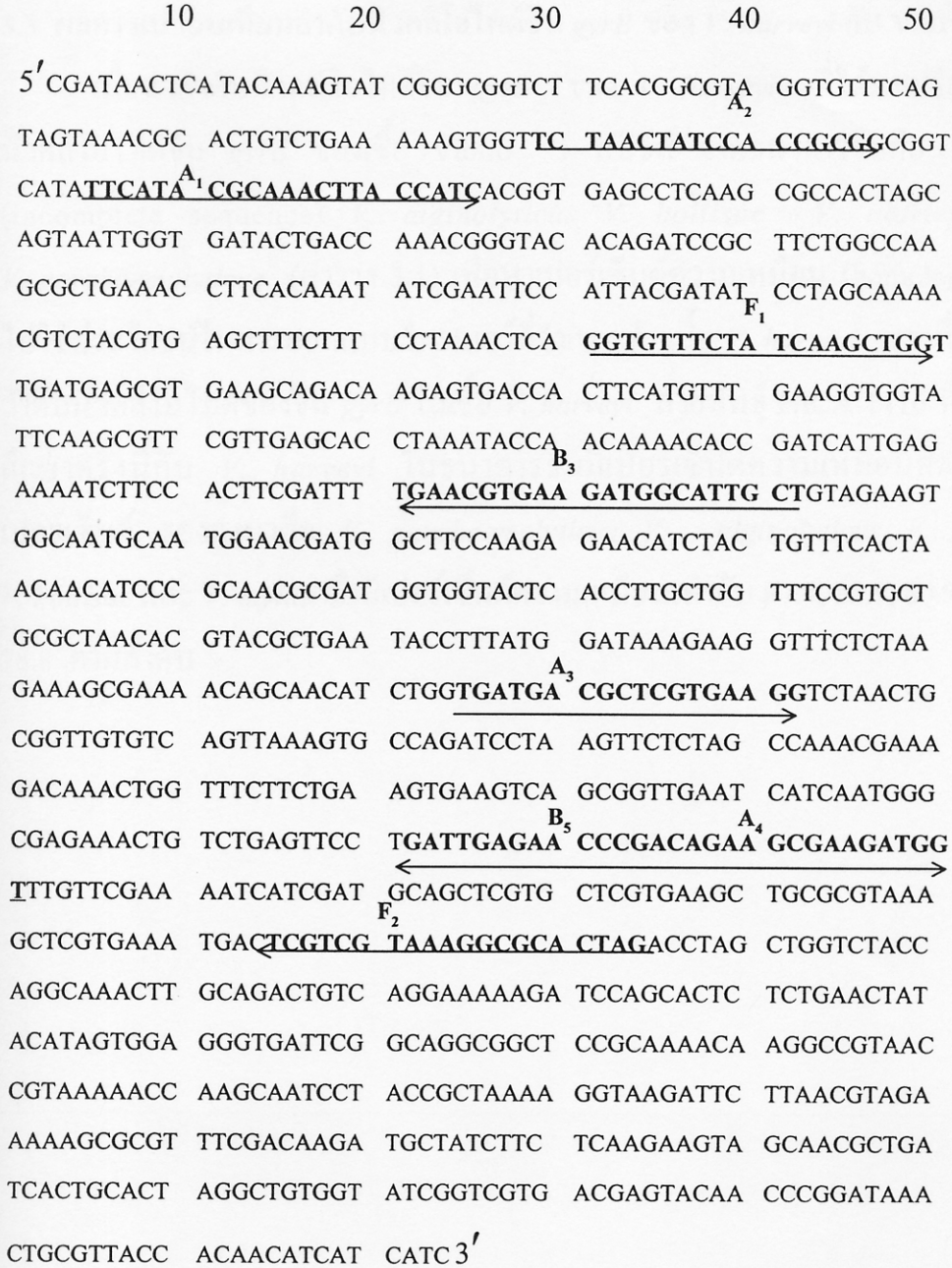
M_1 เป็น molecular weight marker λ *Hind* III

M_2 เป็น molecular weight marker ϕ *Hae* III

แถวที่ 1. เป็น จีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy โคลน 1

แถวที่ 2. เป็น จีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy โคลน 2

แถวที่ 3. เป็น จีน *gyrB* + พลาสมิด pGEM T- easy โคลน 3



ภาพประกอบ 3.3 ลำดับเบสของจีน *gyrB* ทั้งหมด ของเชื้อ *V. harveyi* จำนวน 1,174 คู่เบส

3.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์จีน *gyrB* ของ *V. harveyi* กับ Vibrio ชนิดอื่น

เมื่อนำลำดับนิวคลิโอไทด์จีน *gyrB* ของ *V. harveyi* ที่ได้มาเปรียบเทียบกับนิวคลิโอไทด์จีน *gyrB* ของเชื้อ Vibrio 5 สปีชีส์ จากธนาคารจีนคือ *V. harveyi* (incomplete sequence) *V. alginolyticus V. hollisae V. natriegens* และ *V. parahaemolyticus* (ตาราง 3.1) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) และนำไปใช้ประโยชน์ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *V. harveyi* มากที่สุด พบว่าลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* ในเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ NICA 1416 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับ *V. harveyi* ในธนาคารจีนมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนคิดเป็น 96.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus V. alginolyticus V. natriegens V. hollisae* และ *V. mytilii* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 87.4, 85.9, 80.9, 79.1 และ 78.8 ตามลำดับ

ตาราง 3.1 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi* กับเชื้อ Vibrio ชนิดอื่นๆ ในธนาคารจีน (Gene bank)

ตำแหน่งเริ่มต้น	จำนวนนิวคลิโอไทด์ที่เปรียบเทียบ (bp)	ความเหมือน (%)
V. harveyi *	1,174	96.8
V. harveyi **	406	
V. harveyi *	1,174	87.4
V. parahaemolyticus	1,173	
V. harveyi *	1,174	85.9
V. alginolyticus	1,174	
V. harveyi *	1,174	80.9
V. natriegens	403	
V. harveyi *	1,174	79.1
V. hollisae	1,173	
*V. harveyi**	1,174	78.8
V. mytilii	403	

V. harveyi * สายพันธุ์ NICA 1416 ที่ได้หาลำดับนิวคลิโอไทด์ในครั้งนี้

V. harveyi **จากธนาคารจีน

3.4 การออกแบบไพรเมอร์และทดสอบความจำเพาะกับ *V. harveyi*

ใช้โปรแกรม Oligo primer 4.0 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *V. harveyi* จากลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* ได้ forward primers จำนวน 5 เส้น ได้แก่ F_1 A_1 A_2 A_3 และ A_4 และ reverse primers จำนวน 3 เส้น ได้แก่ F_2 B_3 และ B_5 โดยมีลำดับนิวคลิโอไทด์ ความยาว และตำแหน่ง ในตาราง 3.2 เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดมาจับคู่ โดย forward primer จับกับ reverse primer ได้จำนวน 9 คู่ ได้แก่ F_1F_2 A_2B_3 A_3F_2 A_2F_2 F_1B_5 A_1B_3 A_2B_5 A_3B_5 และ A_4F_2 (ตาราง 3.3) เมื่อนำมาทดสอบกับ *V. harveyi* *Vibrio* spp. อื่นอีก 27 สปีชีส์ และ *Aeromonas hydrophila*, *Escherichai coli*, *Shigella flexneri*, *S. boydii* และ *Staphylococcus aureus* ผลปรากฏว่า ไพรเมอร์ทั้งหมด (9 คู่) สามารถเพิ่มจำนวนนิวคลิโอไทด์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* ได้ที่ขนาดคู่สม (amplicon) ต่างๆ กัน แต่มี 8 คู่ ให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบวกกับเชื้อ Vibrio ชนิดอื่นได้ด้วย คือ ไพรเมอร์ F_1F_2 ให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบวกกับเชื้อ *V. carchariae*, *V. damsela*, *V. mimicus* และ *V. hollisae* ที่มีขนาดคู่สมเท่ากับ 604 เบส (ตาราง 3.4) ไพรเมอร์ A_3F_2 ให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบวกกับเชื้อ *V. carchariae*, *V. damsela* และ*V. mimicus* ที่มีขนาดคู่สมเท่ากับ 160 เบส ไพรเมอร์ A_1B_3 และ F_1B_5 ให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบวกกับเชื้อ *V. carchariae* และ *V. hollisae* ซึ่งมีขนาด คู่เบส เท่ากับ 337 และ 502 คู่เบส ตามลำดับ ในขณะที่ไพรเมอร์ A_2F_2, A_4F_2, A_3B_5 และA_2B_5 ให้ผลปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสบวกกับเชื้อ *V. carchariae* ขนาดคู่สมเท่ากับ 806 100 168 และ 714 เบส ตามลำดับ ส่วนคู่ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* มากที่สุด คือ ไพรเมอร์ A_2B_3 จะให้ขนาดคู่สมเท่ากับ 363 เบส (ภาพประกอบ 3.4) ในการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ A_2B_3 นี้ มีส่วนประกอบและสภาวะดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. Milli Q water	8.2	-
2. 10 x PCR buffer	2	1x
3. $MgCl_2$ (25 mM)	1.6	2 mM
4. dNTP (2.5 mM)	1.6	0.2 mM
5. Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.1	0.025 U
6. 2 μmol primer A_2 (forward)	2.5	250 nmol
7. 2 μmol primer B_3 (reverse)	2.5	250 nmol
8. DNA	1.5	-
ปริมาตรทั้งหมด	20	

สภาวะอุณหภูมิและเวลาการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

- แยกสายดีเอนเอครั้งแรก	96 °C	5 นาที	1 รอบ
- แยกสายคู่ของดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว (Denaturation)	94 °C	1นาที	30 รอบ
- ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอนเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (Annealing)	63 °C	1 นาที	
- สร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ (Extension)	72 °C	1 นาที	
- สร้างสายดีเอนเอสายใหม่ขั้นสุดท้ายให้สมบูรณ์	72 °C	7 นาที	1 รอบ

ตาราง 3.2 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของจีน *gyrB* ในเชื้อ *V. harveyi*

ไพรเมอร์	สายที่	ลำดับเบส 5′⟶3′	ความยาว	ตำแหน่ง
	F_1	GGTGTTTCTATCAAGCTGGT	20	281-300
	A_1	TTCATACGCAAACTTACCATC	21	105-125
forward	A_2	TCTAACTATCCACCGCGG	18	79-96
	A_3	TGATGACGCTCGTGAAGG	18	625-642
	A_4	GACAGAAGCGAAGATGGT	18	784-801
	F_2	CTAGTGCGCCTTTACGACGA	20	865-884
reverse	B_3	AGCAATGCCATCTTCACGTTC	21	421-441
	B_5	GCTTCTGTCGGGTTCTCAATC	21	772-792

3.5 ความไวในการบ่งชี้ *V. harveyi* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

เมื่อนำไพรเมอร์ A_2B_3 มาทำการบ่งชี้ *V. harveyi* ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.0-2.0 x10^9เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า สามารถตรวจสอบ *V. harveyi* ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดได้ที่ความเข้มข้น 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพประกอบ 3.5)

ตาราง 3.3 จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบการบ่งชี้ในเชื้อ *V. harveyi*

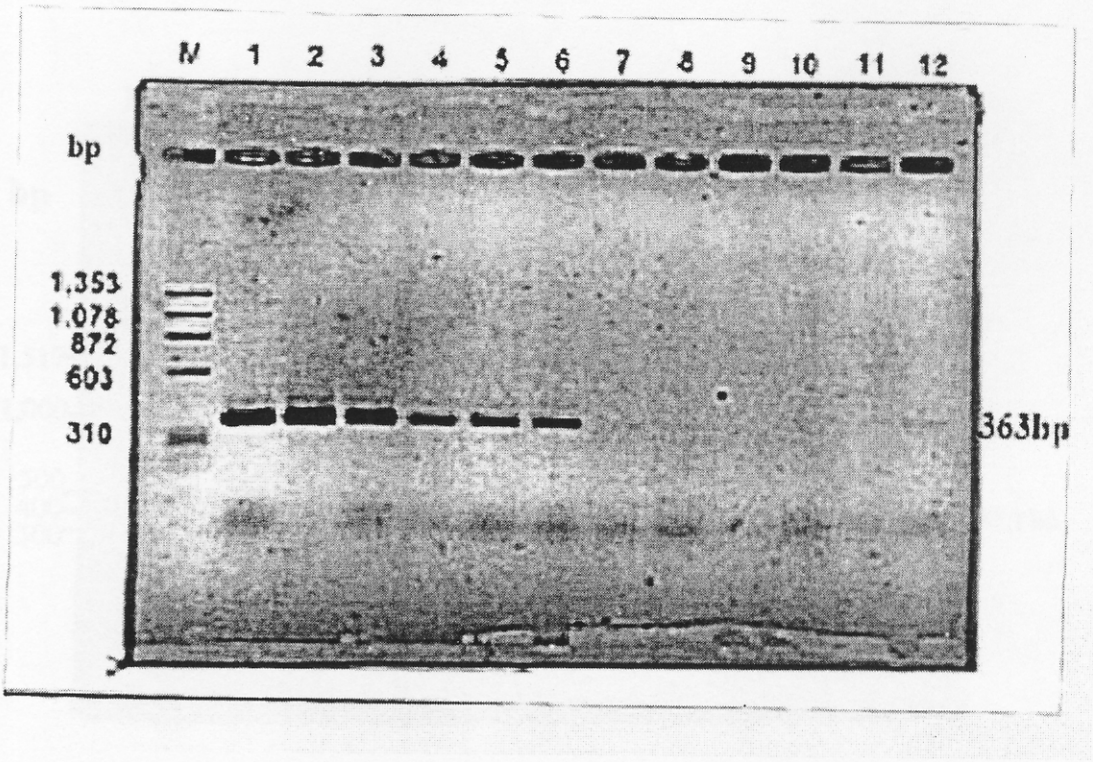
ไพรเมอร์ คู่ที่	ลำดับเบส 5′ ⟶ 3′	ตำแหน่ง	ขนาด (bp)
1) F_1	GGTGTTTCTATCAAGCTGGT	281-300	604
F_2	CTAGTGCGCCTTTACGACGA	865-884	
2) A_2	TCTAACTATCCACCGCGG	79-96	363
B_3	AGCAATGCCATCTTCACGTTC	421-441	
3) A_3	TGATGACGCTCGTGAAGG	625-642	160
F_2	CTAGTGCGCCTTTACGACGA	865-884	
4) A_2	TCTAACTATCCACCGCGG	79-96	806
F_2	CTAGTGCGCCTTTACGACGA	865-884	
5) F_1	GGTGTTTCTATCAAGCTGGT	281-300	502
B_5	GCTTCTGTCGGGTTCTCAATC	772-792	
6) A_1	TTCATACGCAAACTTACCATC	105-125	337
B_3	AGCAATGCCATCTTCACGTTC	421-441	
7) A_2	TCTAACTATCCACCGCGG	79-96	714
B_5	GCTTCTGTCGGGTTCTCAATC	772-792	
8) A_3	TGATGACGCTCGTGAAGG	625-642	168
B_5	GCTTCTGTCGGGTTCTCAATC	772-792	
9) A_4	GACAGAAGCGAAGATGGT	784-801	100
F_2	CTAGTGCGCCTTTACGACGA	865-884	

ตาราง 3.4 ผลการบ่งชี้เชื้อ Vibrio ชนิดต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi*

ลำดับ	ชนิด	F_1F_2	A_3F_2	A_1B_3	F_1B_5	A_2F_2	A_4F_2	A_3B_5	A_2B_5	A_2B_3
1	*Vibrio harveyi*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	*Vibrio damsela*	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	*Vibrio fluvialis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	*Vibrio furnisii*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	*Vibrio metschnikovii*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	*Vibrio mimicus*	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	*Vibrio hollisae*	+	-	+	+	-	-	-	-	-
8	*Vibrio vulnificus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	*Vibrio aestuarianus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	*Vibrio campbellii*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	*Vibrio carchariae*	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	*Vibrio cincinnatiensis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	*Vibrio diazotrophicus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	*Vibrio mytilii*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	*Vibrio orientalis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	*Vibrio pelagicus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	*Vibrio splendidus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	*Vibrio tubiashii*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	*Vibrio ichthyoenteri*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	*Vibrio penaeicida*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	*Vibrio anguillarum*	-	-	-		-	-	-	-	-
22	*Vibrio alginolyticus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 3.4 (ต่อ)

ลำดับ	ชนิด	F_1F_2	A_3F_2	A_1B_3	F_1B_5	A_2F_2	A_4F_2	A_3B_5	A_2B_5	A_2B_3
23	*Vibrio cholerae* O1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	*Vibrio cholerae* O139	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	*Vibrio cholerae* nonO1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
26	*Vibrio parahaemolyticus*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
27	*Vibrio proteolyticus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	*Aeromonas hydrophila*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	*Escherichai coli*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	*Shigella flexneri*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	*Shigella boydii*	-	-	-		-	-	-	-	-
32	*Staphylococcus aureus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-



ภาพประกอบ 3.4 ความจำเพาะของไพรเมอร์ A_2B_3 เมื่อทดสอบกับ *V. harveyi* และ *Vibrio* spp.

M เป็น molecular weight marker (ϕX 174 ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III)

แถวที่ 1. *V. harveyi* NICA 1416

แถวที่ 2. *V. harveyi* PSU 32

แถวที่ 3. *V. harveyi* PSU 42

แถวที่ 4. *V. harveyi* PSU 43

แถวที่ 5. *V. harveyi* PSU 44

แถวที่ 6. *V. harveyi* PSU 45

แถวที่ 7. *V. damsela* RIMD2222001

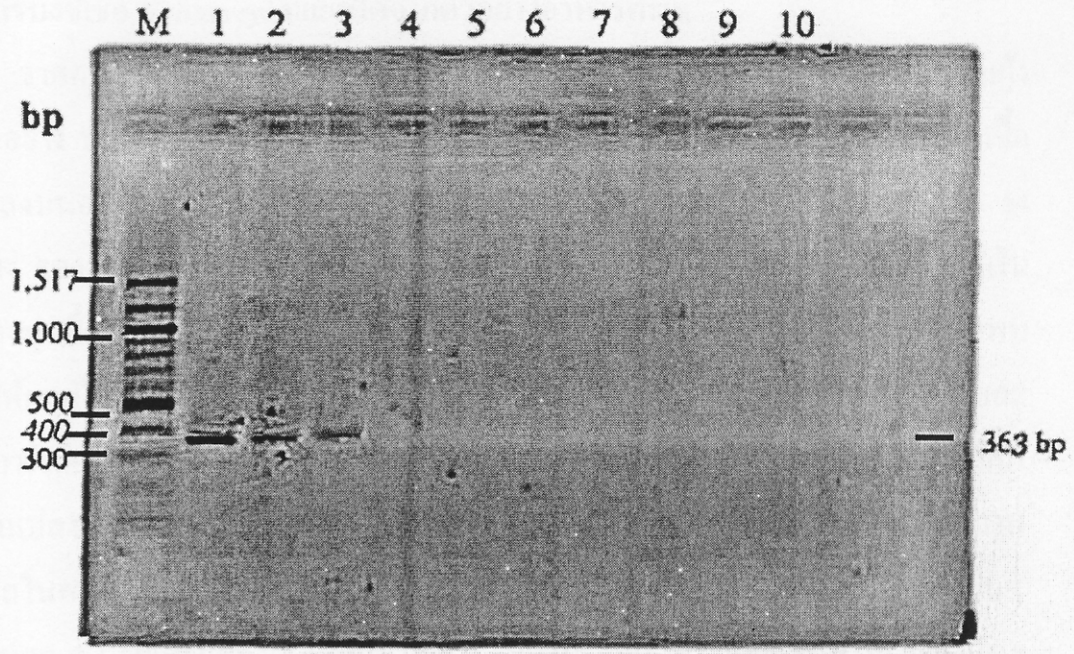
แถวที่ 8. *V. holllisae* E

แถวที่ 9. *V. alginolyticus* 219

แถวที่ 10. *V. vulnificus* RIMD2219009

แถวที่ 11. *V. carchariae* ATCC35084

แถวที่ 12. *V. parahaemolyticus* 2019



ภาพประกอบ 3.5 ความไวของไพรเมอร์ A_2B_3 ในการบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi*

M เป็น molecular weight marker (100 bp DNA ladder)

แถวที่ 1. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^9 cells/ml

แถวที่ 2. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^8 cells/ml

แถวที่ 3. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^7 cells/ml

แถวที่ 4. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^6 cells/ml

แถวที่ 5. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^5 cells/ml

แถวที่ 6. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^4 cells/ml

แถวที่ 7. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^3 cells/ml

แถวที่ 8. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10^2 cells/ml

แถวที่ 9. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00×10 cells/ml

แถวที่ 10. *V. harveyi* ความเข้มข้น = 2.00 cells/ml

3.6 การบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารทะเล

จากการแยกเชื้อเรืองแสงจากตัวอย่างอาหารทะเล ทั้งหมด 120 ตัวอย่าง เป็นกุ้ง 74 ตัวอย่าง ปลา 22 ตัวอย่าง หอย 20 ตัวอย่าง กั้ง 2 ตัวอย่าง และปู 2 ตัวอย่าง พบเชื้อเรืองแสงบนอาหาร LB agar ทั้งหมดจำนวน 81 ตัวอย่าง โดยพบในกุ้งมากที่สุด คือ 54 ตัวอย่าง รองลงมาคือปลา 17 ตัวอย่าง หอย 9 ตัวอย่าง กั้ง 1 ตัวอย่าง และไม่พบในตัวอย่างปู เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อ ตัวอย่างละ 1 สายพันธุ์ มาทำการบ่งชี้ทางชีวเคมี พบเชื้อที่ให้ผลเป็นแบบ alkaline slant acid butt (K/A) หรือ acid slant acid butt(A/A) และให้ผลการทดสอบออกซิเดสบวก เป็นจำนวน 81 สายพันธุ์ เมื่อทำการบ่งชี้ทางชีวเคมีโดยดัดแปลงตามการจำแนกของ Baumann and Schubert (1984) โดยการทดสอบความสามารถในการย่อย อาร์จินิน ไลซีน และออร์นิทิน รวมทั้งการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ (ภาคผนวก ค.) จะแบ่งเชื้อได้ 4 กลุ่ม คือ I II III และ IV โดยกลุ่ม I สามารถย่อยอาร์จินิน และไลซีน แต่ ไม่สามารถย่อย ออร์นิทินได้ (A L O = + + -) กลุ่ม II สามารถย่อย อาร์จินิน แต่ไม่สามารถย่อยไลซีน และออร์นิทิน (A L O = + - -) กลุ่ม III ไม่สามารถย่อย อาร์จินิน แต่ย่อยไลซีน และ ออร์นิทิน (A L O = - + +) ส่วนกลุ่ม IV ไม่สามารถย่อยอาร์จินิน ย่อยไลซีน และไม่ย่อยออนิทิน (A L O = - + -) จากการศึกษาพบเชื้อในกลุ่ม I 3 สายพันธุ์ คือพบในกุ้ง 1 สายพันธุ์ และในปลา 2 สายพันธุ์ (ตาราง3.5) กลุ่ม II พบเชื้อ 7 สายพันธุ์ แยกเป็นในกุ้ง 2 สายพันธุ์ และในปลา 5 สายพันธุ์ กลุ่ม III พบเชื้อมากที่สุดเป็นจำนวน 68 สายพันธุ์ โดยพบในกุ้ง 50 สายพันธุ์ ปลา 9 สายพันธุ์ หอย 8 สายพันธุ์ และในกั้ง 1 สายพันธุ์ โดยพบเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. harveyi* จำนวน 41 สายพันธุ์ (ตาราง 3.6) เป็นเชื้อที่แยกจาก หอย 7 สายพันธุ์ ปลา 2 สายพันธุ์ และกุ้ง 31 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเชื้อที่แยกได้ในกลุ่ม IV แต่พบเชื้อที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (กลุ่ม N) เป็นจำนวน 3 สายพันธุ์ จากนั้นนำเชื้อในกลุ่ม III ที่คาดว่าจะเป็น *V. harveyi* จำนวน 41 สายพันธุ์ มาทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดัดแปลงจาก Reichelt and Baumann (1973) (ตาราง ค.1, ภาคผนวก ค) แล้วทำการยืนยันโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ A_2B_3 พ บว่าเชื้อที่ให้ผล L-tyrosin e บวกทั้งหมด 24 สายพันธุ์ จะให้ผลบวกเมื่อใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ A_2B_3 จำนวน 22 สายพันธุ์ ให้ผลลบเพียง 2 สายพันธุ์ ส่วนที่ให้ผล L-tyrosine ลบ

จะให้ผลลบ เมื่อใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับไพรเมอร์ A_2B_3 และมีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่ให้ผลบวก (ตาราง 3.7)

ตาราง 3.5 การบ่งชี้เชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่แยกจากอาหารทะเลและกุ้งจากบ่อเลี้ยง

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนทั้งหมด (ตัวอย่าง)	จำนวนแบคทีเรียเรืองแสงที่พบ (สายพันธุ์)	จำนวนสายพันธุ์ที่พบ กลุ่มที่*			
			I	II	III	N
กุ้ง	74	54	1	2	50	1
ปลา	22	17	2	5	9	1
หอย	20	9	0	0	8	1
กั้ง	2	1	0	0	1	0
ปู	2	0	0	0	0	0
รวม	120	81	3	7	68	3

* ภาคผนวก ค แผนผังการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง

กลุ่ม I ได้แก่ เชื้อ *V. damsela, V. oreintalis, P. phosphoreum, P. angustum* และ *P. leiognathi*

กลุ่ม II ได้แก่ เชื้อ *P. leiognathi*

กลุ่ม III ได้แก่ เชื้อ *V. parahaemolyticus, V. harvryi, V. carchariae V. vulnificus* และ *V. logei*

กลุ่ม N ได้แก่ เชื้อที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้

ตาราง 3.6 ผลการบ่งชี้เชื้อในกลุ่ม III ที่คาดว่าจะเป็น*V. harveyi*

ทดสอบชีวเคมี / จำนวนสายพันธุ์	Arginine	Lysine	Ornithin	Citrate	Arabinose	Urease
3	-	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	-	+
1	-	+	+	-	-	+
17	-	+	+	+	-	+
1	-	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	+	+
1	-	+	+	+	-	+
1	-	+	+	+	-	+
1	-	+	+	+	-	+
รวม 41						

ตาราง 3.7 เปรียบเทียบผลการยืนยันเชื้อ *V. harveyi* ทางชีวเคมี* กับวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ A_2B_3

ทดสอบทางชีวเคมี จำนวนสายพันธุ์	L- tyrosine	PCR
16	-	-
22	+	+
2	+	-
1	-	+

*ทดสอบตามวิธีของ Reichelt and Baumann,1973 (ตาราง ค.1, ภาคผนวก ค)