ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบทางชีวเคมี

1.1 Nutrient broth (NB)

ประกอบด้วย

Peptone from meat	5.0	g
Meat extract	3.0	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง nutrient broth จำนวน 8 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอด นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 MacConkey agar (MAC)

ประกอบด้วย

Peptone	17.0	g
Proteose	3.0	g
Lactose	10.0	g
Bile Salt No.3	1.5	g
Neutral Red	0.03	g
Crystal violet	0.001	g
Agar	13.5	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง MacConkey agar จำนวน 50 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1l นำไปต้มจนเดือดเพื่อให้ผสมเข้ากันดี นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

1.3 Eosin methylene blue agar (EMB)

ประกอบด้วย

Peptone	10.0	g
di-potassiumhydrogenphosphate	2.0	g
Lactose	5.0	g
Sucrose	5.0	g
Eosin yellowish	0.4	g
Methylene blue	0.07	g
Agar	13.5	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง eosin methylene blue agar จำนวน 36 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มจนเดือดเพื่อให้ผสมเข้ากันดี นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

2. การทดสอบทางชีวเคมี

2.1 การเตรียม Motility-Indole-Lysine medium (MIL)

ประกอบด้วย

Peptone	10.0	g
Pancreatic digest of casein	10.0	g
Yeast extract	3.0	g
L-Lysine HCL	10.0	g
Dextrose	1.0	g
Ferric Ammonium Citrate	0.5	g
Bromcresol purple	0.02	g
Agar	2.0	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง MIL medium จำนวน 36.5 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวางหลอดที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำเป็น semisolid

วิธีการทดสอบ

inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดยการ stab เชื้อลงไปในอาหารประมาณครึ่งหลอดจากนั้น incubate ต่อที่ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นหยด Kovac's reagent แล้วสังเกตการเกิดวงแหวนสีแดง (red ring) จากนั้นดูว่าเชื้อมีคุณสมบัติในการสร้าง enzyme decarboxylase หรือไม่ และดูความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อที่แพร่กระจายออกจากรอย stab

การแปลผล

เกิดวงแหวนสีแดงแสดงว่าเชื้อมีความสามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole ได้ และหาก medium มีสีม่วงแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง enzyme decarboxylase ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อสังเกตการแพร่กระจายของเชื้อรอบๆ รอย stab หรือสังเกตจาก media ขุ่นแสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่

2.2 การเตรียม Simmon's citrate Agar

ประกอบด้วย

Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	g
Di-potassium phosphate	1.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Magnesium sulphate	0.2	g
Bromothymol blue	0.08	g
Agar	13.0	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง Simmon Citrate Agar จำนวน 22.5 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอด นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเอียงหลอดเพื่อทำ slant ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

วิธีการทดสอบ

inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดยการ streak บนผิว Simmon's citrate agar จากนั้น incubate ต่อที่ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ medium และการเติบโตของแบคทีเรีย

การแปลผล

ผลบวก : มีแบคทีเรียขึ้นบนผิวอาหารและ medium เปลี่ยนสีจากเขียวเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ : ไม่มีแบคทีเรียขึ้นและ medium ไม่เปลี่ยนสี (สีเขียว)

2.3 การเตรียม Triple sugar iron agar (TSI)

ประกอบด้วย

Peptone de casein	15.0	g
Peptone meat	5.0	g
Meat extract	3.0	g
Yeast extract	3.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Lactose	10.0	g
Sucrose	10.0	g
D (+) Glucose	1.0	g
Ammonium iron (III) citrate	0.5	g
Sodiumthiosulphate	0.5	g
Phenol red	0.024	g
Agar	12.0	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง Triple sugar iron agar จำนวน 65 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอด นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเอียงหลอดเพื่อทำ slant ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

วิธีการทดสอบ

inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดยการ streak บนผิว Triple sugar iron agar จากนั้น stab เชื้อลงไปในอาหารประมาณครึ่งหลอด incubate ต่อที่ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารที่บริเวณ slant และ ก้นหลอด (butt)

การแปลผล

อ่านผลการทดลองโดยดูการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณ slant ก่อน สีเหลืองแสดงว่าเกิดกรด (acid) สีแดงแสดงว่าเป็นด่าง (alkaline) แล้วจึงอ่านบริเวณก้นหลอด (butt) นอกจากนี้การทดสอบ TSI ยังสามารถบอกความสามารถในการผลิตแก๊สโดยดูจากการมีฟองอากาศในเนื้อวุ้นแสดงว่าเกิดแก๊ส (G) และหากอาหารมีสีดำแสดงว่ามี H_2S

2.4 การเตรียม Urea agar base

ประกอบด้วย

Peptone meat	1.0	g
D (+) Glucose	1.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Potassium dihydrogenphosphate	2.0	g
Phenol red	0.012	g
Agar	12.0	g
40% Urea	400.0	ml
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง Urea agar base 21 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีวางทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิ 50-55 °C จากนั้นเติม 40% urea 400 ml ลงไปผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด จากนั้นเอียงหลอดเพื่อทำ slant ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

วิธีการทดสอบ

โดย inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบโดย streak บน urea agar จากนั้น incubate ที่ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร

การแปลผล

ผลบวก : เชื้อสร้างเอนไซม์ urease ย่อย urea ได้ NH_3 เปลี่ยนสี indicator ในอาหารเป็นสีชมพู

ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี

2.5 การทดสอบ Mannitol, Glucose และ Sucrose fermentation

การเตรียม phenol red broth base

ประกอบด้วย

Peptone	5.0	g
Peptone meat	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Phenol red	0.018	g
Distilled water	1,000.0	ml

ชั่ง phenol red broth base 15 g เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดทดลองที่มีหลอด durham tube นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 °C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาทีลงไป

วิธีการทดสอบ

inoculate เชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน phenol red broth base จากนั้น incubate ต่อที่ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเปลี่ยนสีของ broth และการเกิดแก๊สใน durham tube

การแปลผล

ผลบวก : broth มีสีเหลืองรายงานผลว่า A (acid) ถ้ามี gas ด้วยรายงานว่า AG (acid and gas)

ผลลบ : broth เป็นสีชมพูแดง

Delayed : broth สีออกส้มๆ ควร incubate ต่อ

ภาคผนวก ข

วิธีการทำปฏิกิริยา Multiplex polymerase chain reaction (MP-PCR)

การเตรียม PCR reaction

โดยการเติมสารละลายต่างๆ ดังนี้ (total volume 50 µl)

- 1 µl ของ primer pair 1 คู่ (3 คู่ = 3µl)
- 1 µl ของ *Taq* DNA polymerase (0.5 U/µl)
- 10 µl ของ reaction buffer (2.5 mM $MgCl_2$)
- 5 µl ของ dNTPs solution (2.5 mM/dNTP)
- 30 µl ของ PCR water
- 1 µl ของ DNA template

การเตรียม Agarose gel

เตรียม 1.8% Agarose gel ละลายใน 0.5% TBE buffer ต้มจนกระทั่งวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปเทใส่ถาดเจล (tray) ที่ปิดหัวท้ายของถาดเจลด้วยกระดาษเทป วาง comb ขนาด 18 หลุมลงไปในถาด เกลี่ยฟองอากาศออก ตั้งทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที หลังจากเจลแข็งตัวแล้วดึง comb และเทปที่บริเวณถาดออก วางถาดเจลลงใน electrophoresis chamber ที่มี TBE buffer โดยหันด้านที่มี หลุม (origin) อยู่ทางขั้วลบ

การทำ Gel electrophoresis

การเตรียมตัวอย่าง : ใช้ 13.5 µl PCR product ผสมกับ 3.5 µl ของ loading buffer

การเตรียม ladder : ใช้ 1.5 µl marker ผสมกับ 3.5 µl loading buffer

ขั้นตอนการ run gel : ทำการ load PCR product ที่ผสมใน loading dye ลงในแต่ละ well โดย well แรกจะ load marker ลงไปก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบจากนั้นจึง load PCR product ตามลงไปใน well อื่นๆ จากนั้นจึงทำการ run gel (ใน TBE buffer) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 mV เมื่อ run gel เสร็จโดยสังเกตได้จากสีของ bromphenol blue ที่เคลื่อนที่ไปใกล้ขอบ gel ด้านล่าง ค่อยๆ นำถาดที่มีเจลขึ้นจาก buffer ซับ buffer ที่ไหล่ด้วยกระดาษทิชชู นำไปย้อมด้วย ethidium

bromide (ความเข้มข้นสุดท้าย $2.0x10^{-5}$ mg/ml) เป็นเวลา 15 นาที และแช่ในน้ำกลั่นอีก 10 นาที จากนั้นนำไปส่อง UV ด้วยเครื่อง UV light transilluminator ดูแถบที่เกิดบนวุ้นเปรียบเทียบกับเชื้อ positive control ในการทดสอบนี้ใช้เชื้อ *E. coli* AC4/3 เป็นเชื้อควบคุมบวกซึ่งมี gene *IntI*1, *Sul*1 และ *qacE*Δ1 (ได้ทำการตรวจสอบโดยเทียบกับ *Salmonella* serovar Typhimurium DT 104 มาแล้ว)

การเตรียม 2 YT

ประกอบด้วย

Bacto tryptone (tryptone peptone)	19.0	g
Yeast extract	10.0	g
NaCl	5.0	g
เติม deionized water ให้ครบ	1000.0	ml

ชั่งอาหารตามสูตรข้างต้น เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 l นำไปต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอด นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม 0.2% triton X-100

ประกอบด้วย

Triton X-100	0.2	ml
deionized water	100.0	ml

ชั่ง Triton X-100 จำนวน 0.2 g จากนั้นเติม deionized water ให้ครบ 500 ml

การเตรียม 1 M Tris HCL

ประกอบด้วย

Tris HCL	15.76	g
deionized water	100.0	ml

ชั่ง Tris HCL 15.76 g ละลายใน deionized water 100 ml

การเตรียม 20 mM Tris HCL

ประกอบด้วย

1 M Tris HCL	10.0	ml
deionized water	500.0	ml

ชั่ง 1M Tris HCL จำนวน 10 g จากนั้นเติม deionized water ให้ครบ 500 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย 6 M NaOH

การเตรียม 0.5 M EDTA pH 8

ประกอบด้วย

Disodium EDTA (FW372.24)	18.61	g
deionized water	500.0	ml

ชั่ง Disodium EDTA จำนวน 18.61 g จากนั้นเติม deionized water ให้ครบ 500 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย 6 M NaOH อุ่นเล็กน้อย และคนจนละลายหมด

การเตรียม 2 mM EDTA

ประกอบด้วย

0.5 M EDTA pH 8	0.8	ml
deionized water	200.0	ml

ชั่ง 0.5 M EDTA pH 8จำนวน 0.8 g จากนั้นเติม deionized water ให้ครบ 200 ml

การเตรียม TE buffer

ประกอบด้วย

20 mM Tris HCL	50.0	ml
2 mM EDTA	50.0	ml

การเตรียม Tris-borate buffer (TBE)

ประกอบด้วย

Tris base	54.0	g
Boric acid	27.5	g

EDTA 0.5M pH 8.0	20.0	ml
เติม deionized water ให้ครบ	500.0	ml

ชั่ง Tris base 54 g ผสมกับ Boric acid 27.5 g จากนั้นเติม EDTA 0.5M pH 8.0 จำนวน 20 ml ลงไป แล้วเติม deionized water ให้ครบ 500 ml