# บทที่ 2

# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

## 2.1 วัสดุ

### 2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

#### 2.1.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

| อาหารเลี้ยง/เชื้อสารเคมี | บริษัท |
|---|---|
| Bacto peptone | Difco |
| Beef extract | Difco |
| Soytone | Sigma |
| L- Arabinose | Sigma |
| Maltose | Difco |
| Phenol red broth base | Difco |
| LIM medium | Difco |
| Decarboxylase broth base | Difco |
| Bacto lysine decarboxylase broth | Difco |
| Tris(hydroxylmethyl)aminomethane | Promega |
| Tetracycline | Sigma |
| Formamide | Merck |
| Cresol red | Merck |
| EDTA | Merck |
| Sodium citrate | Merck |
| Phenol | Merck |
| Ammonium acetate | Merck |
| Magnesium choride | Merck |
| Tween 20 | Merck |

**2.1.1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (molecular biology grade)**

| อาหารเลี้ยงเชื้อ/สารเคมี | บริษัท |
|---|---|
| Agarose | Gibco, USA |
| Ethidium bromide | Sigma |
| Blocking reagent | Boeheringer Mannheim |
| Anti digoxigenin - AP conjugate | Boeheringer Mannheim |
| NBT/BCTP | Boeheringer Mannheim |
| Hexanucleotide | Boeheringer Mannheim |
| dNTPs | Boeheringer Mannheim |
| Primer | Gibthai |
| *Taq* DNA polymerase | Boeheringer Mannheim |
| Restriction enzyme(*Pst***I,** *EcoR***V)** | Bio-lab |
| Magnesium chloride buffer | Boeheringer Mannheim |

## 2.2 อุปกรณ์เครื่องใช้ในการทดลอง

- เครื่อง pH meter (Metrohm Switzerland)
- เครื่อง Ultrasonic cleaner รุ่น 2200 E3 (Branson Germany)
- เครื่อง Hotplate & Stirrer (Fisher Scientific USA)
- ตู้ Larminar flow รุ่น BVT125 (ISSCO USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer) รุ่นUV-1201V (SHIMADZU Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1235 (Sheldon Manufacturing, Inc USA)
- Microcentrifuge (eppendorf) รุ่น 5415 C (Brinkman Instrument, Inc USA)
- เครื่องปั่น (blender) (National Japan)
- เครื่องผสม (Touch mixer) รุ่น 232 (Fisher Scientific USA)
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument Company USA)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น 200/2.0 (Bio-RAD USA)
- เครื่อง UV light transilluminator (UVP) (San Gabriel, Inc USA)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอนเอ (PCR Gene Amp) PCR system 2400 (Perkin Elmer USA)

.

- ตู้เย็นแช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส ( Sanyo Japan)
- ตู้ Hybridization (Robbins Scientific Corperation USA)
- กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์
- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline instrument, inc USA)

**2.3 เชื้อแบคทีเรีย**

*V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน 11 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์จากผู้ป่วย 10 สายพันธุ์ จากสิ่งแวดล้อม 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.2) *V. parahaemolyticus V. vulnificus V. damsela V. furnissii V. alginolyticus V. mimicus V. metschnikovii V. navarrensis V. cincinatiensis V. cholerae* O1 *V. cholerae* O139 *V. cholerae* non-O1 *V. carchariae V. harveyi V. orientalis V. splendidus V. pelagius V. mytilii V. proteolyticus V. nereis V. mediterranei V. ordalii V. campbellii Staphylococcus aureus Escherichia coli Salmonella enteritidis Shigella dysenteriae* และ *E. coli* HB101 (พลาสมิดมีจีน *tdh*) *E. coli* MC1061 (พลาสมิดมีจีน bacteriophage Vf33)

**2.4 การแยกเชื้อ *V. hollisae***

**2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *V. hollisae***

**2.4.1.1 การศึกษาปริมาณเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญ**

เลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน ใน LB broth (ภาคผนวก 2ก) ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับปริมาณโดยเทียบกับ McFarland หมายเลข 0.5 ซึ่งจะได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5 x $10^8$ CFU/ml นำเชื้อปริมาตร 50 µl มาเลี้ยงใน 1% peptone ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 8% ตามลำดับ บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD 600 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

**2.4.1.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ**

เลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน ใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับปริมาณโดยเทียบกับ McFarland หมายเลข 0.5 นำเชื้อปริมาตร 50 µl

มาเลี้ยงใน 1 % peptone ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และปรับ pH เป็น 7.0 7.4 7.8 8.2 8.6 9.0 และ 9.4 ตามลำดับ บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD 600 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

**2.4.1.3 สารยับยั้งต่างๆที่มีผลต่อการเจริญ**

เลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน ใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง นำเชื้อมาปรับปริมาณโดยเทียบกับ McFarland หมายเลข 0.5 นำเชื้อปริมาตร 50 µl มาเลี้ยงใน 1% peptone ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และเติมสารยับยั้งซึ่งมีรายงานว่าใช้ใน selective medium หลายชนิดได้แก่ taurocholic acid (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5g/l) potassium tellurite (0.005g/l) deoxycholic acid (0.5g/l) lauryl sulfate (0.1g/ml) malachite green (0.03g/l) และ sodium azide (0.4g/l) บ่มไว้ที่ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD 600 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

**2.4.2 อาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อ *V. hollisae***

จากการศึกษาส่วนประกอบของอาหาร Sporosarcina halophilla agar (ภาคผนวก 5ก) ที่มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เลี้ยงเชื้อ *Halomonas elongata Halomonas halmophila Listonella anguillara Salinicoccus roseus Sporosarcina halophila V. fluvialis V. furnissii V. hollisae V. ordalii* และ *V. vulnificus* และอาหาร Mannitol Maltose agar (ภาคผนวก 4ก) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้สำหรับแยกเชื้อ *Vibrio* species และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. hollisae* เทียบกับเชื้อ *Vibrio* species อื่นๆ อีก 11 สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน คือ *V. cholerae V. mimicus V. metschnikovii V. cincinatiensis V. damsela V. fluvialis V. furnissii V. alginolyticus V. parahaemolyticus V. vulnificus* และ *V. carchariae* พบว่ามีความแตกต่างกันในการใช้น้ำตาล arabinose และ maltose โดยสามารถแยกเชื้อเป็น 2 พวกคือ พวกที่สามารถหมักน้ำตาล arabinose ได้แก่ *V. cincinatiensis V. hollisae V. fluvialis V. furnissii V. parahaemolyticus* กับพวกที่เหลืออีก 7 species ที่ไม่สามารถหมักน้ำตาล arabinose สำหรับน้ำตาล maltose พบว่า *V. hollisae* ไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose ขณะที่เชื้อที่เหลืออีก 10 species สามารถหมักน้ำตาล maltose ได้ จึงได้ใช้คุณสมบัตินี้พัฒนาอาหารแยกเชื้อ 2 ชนิด คือ H agar ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่สามารถหมักน้ำ

ตาล arabinose และไม่สามารถหมักน้ำตาล arabinose (differential medium) กับ Maltose agar ที่สามารถแยก *V. hollisae* ซึ่งไม่สามารถหมักน้ำตาล maltose ออกจากเชื้ออื่นๆ สำหรับ H agar มีส่วนผสมประกอบด้วย Peptone Beef extract Yeast extract NaCl $MgCl_2.6H_2O$ Cresol red Sodium pyruvate Agar และ น้ำตาล arabinose (ภาคผนวก 1 ก) ส่วน Maltose agar มีส่วนผสมประกอบด้วย Phenol red broth base น้ำตาล maltose และ Agar (ภาคผนวก 3ก)

**2.4.3 เปรียบเทียบการเจริญของ *V. hollisae* บน H agar กับ Sporosarcina agar และ Mannitol maltose agar**

นำเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์ 1613 มาเลี้ยงบน LB agar (ภาคผนวก 2ก) 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา suspend ใน 1% peptone ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland หมายเลข 0.5 จากนั้นนำเชื้อมา 100 µl ทำการเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหาร H agar Sporosarcina agar และ Mannitol maltose agar บ่มเชื้อที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

**2.4.4 การทดสอบ H agar และ Maltose agar กับเชื้อ *Vibrio* species และเชื้อแบคทีเรียต่างๆ**

นำเชื้อ Vibrio สายพันธุ์มาตรฐาน 39 สายพันธุ์ ได้แก่ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน 11 สายพันธุ์ *V. parahaemolyticus V. vulnificus V. damsela V. furnissii V. alginolyticus V. mimicus V. metschnikovii V. navarrensis V. cincinatiensis V. cholerae* O1 *V. cholerae* O139 *V. cholerae* non-O1 *V. carchariae V. harveyi V. orientalis V. splendidus V. pelagius V. mytilii V. proteolyticus V. nereis V. mediterranei V. ordalii V. campbellii S. aureus E. coli S. enteritidis S. dysenteriae* มาเพาะเลี้ยงบน H agar และ Maltose agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโต สีและลักษณะโคโลนีของเชื้อ *V. hollisae* กับเชื้อ Vibrio และแบคทีเรียอื่นๆ

**2.4.5 การเตรียมตัวอย่างอาหารทะเลและการแยกเชื้อ *V. hollisae***

นำตัวอย่างอาหารทะเลที่ได้จาก ตลาดพลาซ่า ตลาดคลองเรียน ตลาดกิมหยง และตลาดเกาะหมี จาก อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา ตลาดรถไฟ ตลาดทรัพย์สิน และ ตลาดเก้าเส้ง จาก อ. เมือง จ.สงขลา และจากฟาร์มหอยนางรม จ. สุราษฎร์ธานี ตัวอย่างทั้งหมด

ประกอบไปด้วย ปลาน้ำเค็ม เช่น ปลาจวด ปลากระบอก ปลาสำลี ปลาจาระเม็ดขาว ปลาจาระเม็ดดำ ปลาทรายแดง ปลาสุจิน ปลาจวด ปลาโอ หอยทะเล เช่น หอยแครง หอยตลับ หอยแมลงภู่ หอยลาย และหอยนางรม รวมทั้ง ปู กั้ง และกุ้ง ปลาจะใช้ส่วนลำไส้เล็กตอนปลาย ส่วนหอยจะแกะเอาเปลือกออกและผ่าตัดเอาแต่เฉพาะระบบย่อยอาหาร (digestive tract) ปูจะใช้ส่วนของนมปู และกระเพาะอาหาร กุ้งและกั้งจะผ่าเอาเส้นกลางหลังซึ่งเป็นทางขับถ่ายของเสีย จากนั้นนำตัวอย่างอาหารทะเลใส่ถุงพลาสติก เข้าเครื่องตีปั่นผสมตัวอย่าง นำเชื้อมาเพาะบนอาหาร H agar ส่วนตัวอย่างที่เหลือนำไปบ่มใน alkaline peptone water (APW) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ส่วนหนึ่งนำไปทำ PCR เพื่อหาจีน *toxR* อีกส่วนหนึ่งนำมาเพาะบน H agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อจิ้มโคโลนีที่สามารถหมักน้ำตาล arabinose ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีเหลืองใส ขอบเรียบแบน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-0.3 มิลลิเมตร มีรอยบุ๋มตรงกลาง ไปแตะบน Maltose agar บ่มที่ 37 °C ทิ้งไว้ 18-24 ชั่วโมง เชื้อ *V. hollisae* ไม่สามารถหมักน้ำตาล maltoseได้ จึงให้ลักษณะโคโลนีสีชมพู ไปทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ TSI (Triple sugar iron agar) ทดสอบ oxidase การสร้าง indole การเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite การหมักน้ำตาล glucose น้ำตาล galactose น้ำตาล mannitol และน้ำตาล mannose การไม่สร้างเอนไซม์ lysine decarboxylase ornithine decarboxylase arginine dihydrolase และการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (motility) จากนั้นจึงนำเชื้อที่คาดว่าจะเป็น *V. hollisae* ไปตรวจยืนยันโดยการทำ PCR โดยใช้จีน *toxR* เป็นจีนเป้าหมาย (แผนภูมิที่ 1)

**2.4.6 การตรวจยืนยัน *V. hollisae* ด้วยวิธี PCR โดยใช้จีน *toxR* เป็นจีนเป้าหมาย**

นำเชื้อที่ให้ผลทดสอบทางชีวเคมีว่าเป็น *V. hollisae* มาเลี้ยงใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก ทำการแยกดีเอนเอโดยปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 4000 x g เป็นเวลา 6 นาที ดูดสารละลายส่วนบนมาเจือจาง 1:10 ด้วยน้ำกลั่นจะได้ดีเอนเอต้นแบบเพื่อนำไปทำ PCR หาจีน *toxR* เพื่อยืนยันว่าเป็น *V. hollisae* (รูปที่ 2.1)

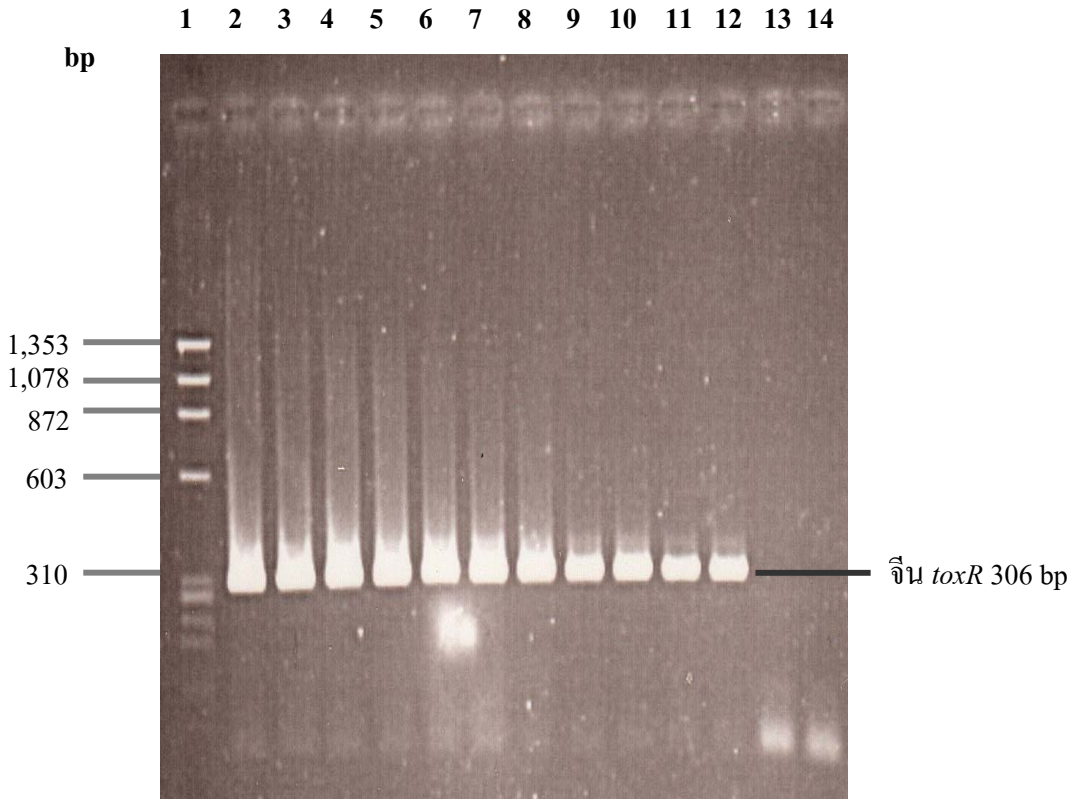
ในการทำ PCR มีส่วนผสมดังต่อไปนี้

| ส่วนผสม | ปริมาตร (µl) |
|---|---|
| น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส | 2.7 |
| 10 x Buffer Ampli Taq | 2 |
| 25 mM $MgCl_2$ | 1.6 |
| 2.5µM dNTP | 1.6 |
| 2 µM primer 1-(vh-F3) | 4 |
| 2 µM primer 2-(vh-R2) | 4 |
| เอนไซม์ *Taq* polymerase | 0.1 |
| ดีเอนเอ | 4 |
| **ปริมาตรรวม** | **20** |

สภาวะที่ทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่

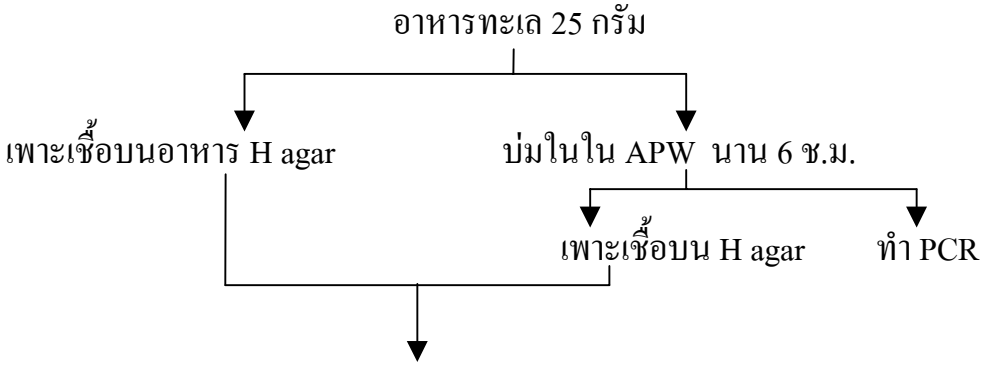
| ขั้นตอน | อุณหภูมิ(°C) | เวลา (นาที) | จำนวนรอบ |
|---|---|---|---|
| 1. Hot start | 96 | 5 | 1 |
| 2. Denature | 95 | 1 | 35 |
| 3. Annealing | 62 | 1.5 | |
| 4. Extension | 72 | 1.5 | |
| 5. Final extension | 72 | 7 | 1 |

เมื่อครบกำหนดทำการตรวจหาจีน *toxR* โดยการทำ electrophoresis โดยใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก 1.1ข)




**รูปที่ 2.1** จีน *toxR* ของเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน 11 สายพันธุ์ เทียบกับ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*

**แผนภูมิที่1** แสดงขั้นตอนการแยกเชื้อ *V. hollisae* จากอาหารทะเล




arabinose fermenter colony (โคโลนีสีเหลือง)

เพาะเชื้อบน Maltose agar

maltose non-fermenter colony (โคโลนีสีชมพู)

ทดสอบทางชีวเคมี

| | | | |
|---|---|---|---|
| TSI | K/A | oxidase | + |
| indole | + | nitrite | + |
| glucose | + | galactose | + |
| mannitol | - | mannose | + |
| LDC | - | ODC | - |
| ADC | - | motile | - |

ทำ PCR

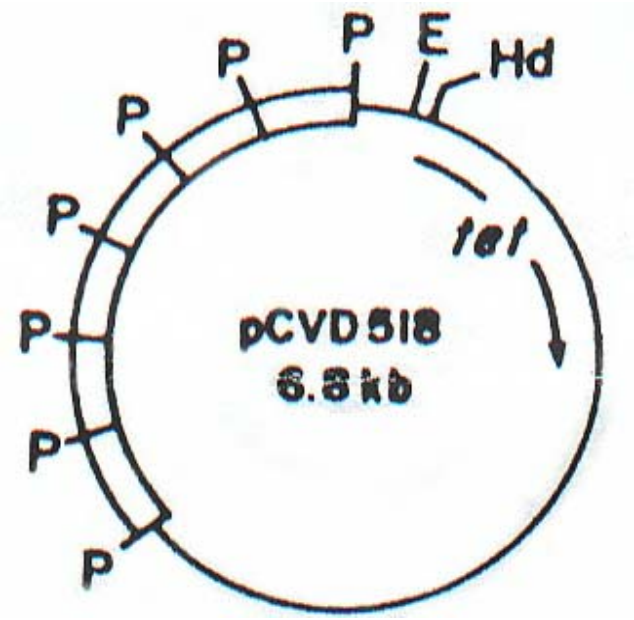
**2.5 การตรวจหายีน *tdh* บนโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของ *V. hollisae***

**2.5.1 การเตรียม tdh probe** (โดยวิธี ของ QIAGEN, Germany)

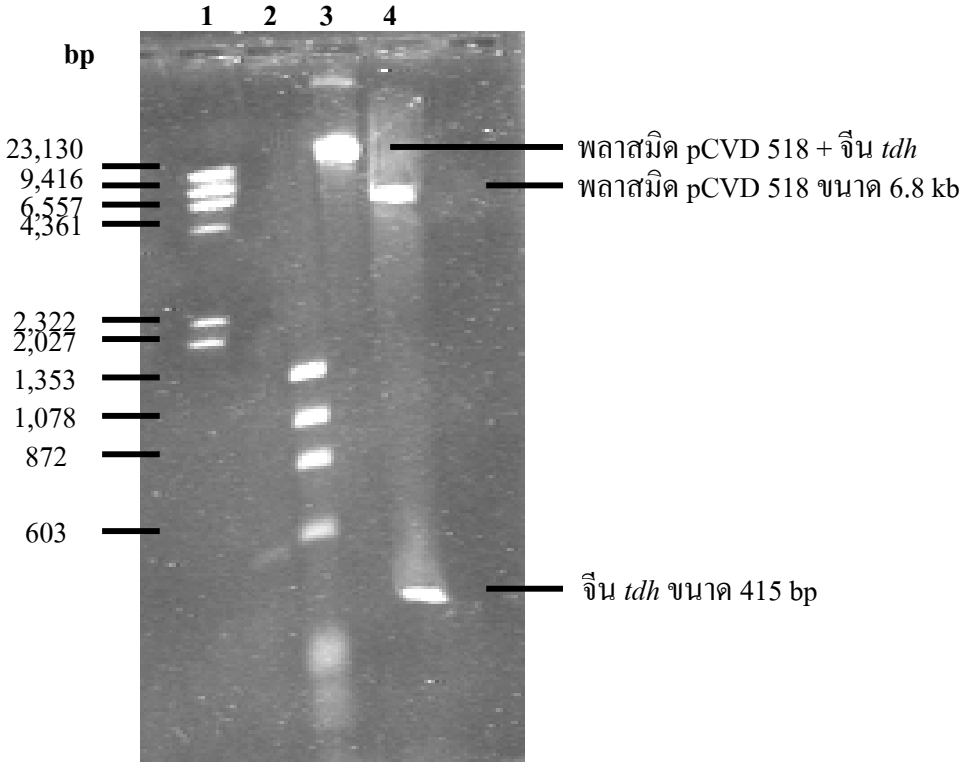
เลี้ยงเชื้อ *E.coli* HB101 ที่มีพลาสมิด pCVD 518 (รูปที่ 2.2) ซึ่งมียีน *tdh* สอดแทรกอยู่ บนอาหาร LB agar (ภาคผนวก 2ก) ที่ผสมยา tetracycline 0.01 g/ml บ่มเชื้อที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อบน LB agar ลงใน LB broth ที่ผสมยา tetracycline 0.01 g/ml นำไปเขย่าที่ 37 °C 24 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 x g 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง นำเซลล์มาเติมสารละลาย P1 ที่เติมเอนไซม์ RNase ไว้แล้ว 250 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการดูดขึ้นดูดลง เติมสารละลาย P2 (lysis buffer) ลงไป 250 µl ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ เติมสารละลาย N3 (neutralization buffer) 350 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยง 10 นาที พลาสมิดจะอยู่ในส่วนใส นำส่วนใสไปผ่านคอลัมน์ เพื่อดูดจับพลาสมิด นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 30-60 วินาที เทสารละลายที่ก้นหลอดทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย buffer PB 500 µl นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 30-60 วินาที เทสารละลายที่ก้นหลอดทิ้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ลงไป 750 µl ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 30-60 วินาที เทสารละลายก้นหลอดทิ้ง นำคอลัมน์ไปวางบนหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 µl ลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็วสูงสุด 1 นาที จะได้พลาสมิดซึ่งมีลักษณะของเหลวใสที่ก้นหลอด นำพลาสมิดมาตรวจสอบว่าบริสุทธิ์โดยการทำ electrophoresis และนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ระดับ 260 nm จากนั้นนำพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1 unit ต่อ 1 µg ของพลาสมิด บ่มที่ 37 °C 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำมาทำ electrophoresis โดยใช้วุ้นที่มี ความเข้มข้น 1% จากนั้นตัดวุ้นตรงตำแหน่งของแถบดีเอนเอที่มีลำดับเบส 415 คู่สม (รูปที่ 2.3) จะได้ยีน *tdh* สะกัดยีน *tdh* จากวุ้นโดยการบีบเนื้อวุ้น จะได้สารละลาย tdh probe นำไปวัดปริมาณความเข้มข้น แล้วนำมาติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG)

**2.5.2 การติดฉลาก probe ด้วย digoxigenin (DIG)**

นำยีน *tdh* ที่สกัดได้ปริมาณ 10 ng-3 µg ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ต้มที่ 100 °C นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นจัดทันที เติมสารละลาย




**รูปที่ 2.2** พลาสมิด pCVD 518 ที่ใช้ในการโคลนจีน *tdh* เพื่อใช้เป็น probe ในการทำ hybridization




**รูปที่ 2.3** การตัดพลาสมิด pCVD 518 ที่มีจีน *tdh* ด้วยเอนไซม์ *Pst*I

แถวที่ 1 Marker (λ *Hind*III)

แถวที่ 2 Marker (ϕ x *Hae*III)

แถวที่ 3 พลาสมิด pCVD 518 + จีน *tdh* ก่อนตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I

แถวที่ 4 พลาสมิด pCVD 518 และจีน *tdh* ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I

hexanucleotide 2µl เอนไซม์ Klenow polymerase (2unit/µl) 1µl dNTP labelling mixture (ประกอบด้วย 1 mM dATP 1 mM dCTP 1 mM dGTP 1 mM dTTP และ 0.35 mM DIG - dUTP pH 7.5) 2 µl ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงเบาๆจากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมงนำมาหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M EDTA pH 8.0 จำนวน 2 µl ทำการตกตะกอนดีเอนเอโดยเติม 4M LiCl 2.5 µl และ 95% ethanol (-20 °C) ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่ -70 °C นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 x g 15นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างดีเอ็นเอที่ติดฉลากแล้วด้วย 70% ethanol (-20 °C) 50 µl นำไปปั่นที่ระดับความเร็วสูงสุด 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นทำตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris EDTA (TE) (ภาคผนวก 1.2 ข) 50 µl

**2.5.3 การสกัดโครโมโซมอลดีเอนเอ ของ *V. hollisae*** โดยวิธี phenol-chloroform extraction (Birnboim, 1979)

เลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน 11 สายพันธุ์ ใน LB broth 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากอาหารโดยปั่นเหวี่ยงที่ระดับ 300 g 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PBS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดใส่ microcentrifuge tube (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ความเร็วสูงสุด 3 นาทีเทส่วนใสทิ้ง ผสมตะกอนเซลล์กับ 300 µl PBS-EDTA (PBS 270 µl ผสมกับ 1M EDTA 30 µl) จากนั้นเติม 10% SDS 150 µl ผสมให้เข้ากันอีกครั้งแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา เติมสารละลาย phenol–chloroform (1:1) 450 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (mixer) และนำไปปั่นเหวี่ยง 2 นาทีดูดส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 40 µl และ 95% ethanol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อสกัดดีเอนเอ จากนั้นนำไปปั่นแล้วเทส่วนใสทิ้ง ล้างดีเอนเอด้วย 70% ethanol และ 95% ethanol ตามลำดับ จากนั้นจึงทำให้ดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอนเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อประมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RNase (ความเข้มข้น 10 ng/µl) 5 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสะกัดดีเอนเอซ้ำอีกครั้งด้วย phenol–chloroform แล้วละลายดีเอนเอ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE วัดปริมาณดีเอนเอด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ระดับ 260 nm

.

**2.5.4 การสกัดพลาสมิดของ *V. hollisae*** (โดยวิธีของ QIAGEN, Germany)

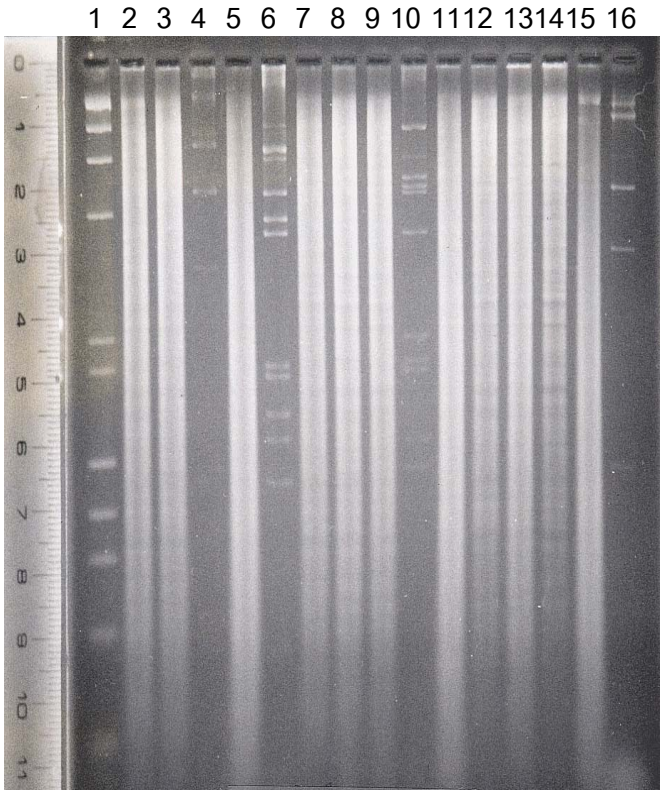
เลี้ยงเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 4 สายพันธุ์ บนอาหาร LB agar บ่มเชื้อที่ 37 °C 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อบน LB agar มาลงใน LB broth นำมาเขย่าที่ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิด โดยวิธีของ QIAGEN (เหมือนข้อ 2.5.1) วัดปริมาณพลาสมิดที่ได้ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ระดับ 260 nm

**2.5.5 Southern blot hybridization ด้วย tdh probe**

นำดีเอนเอและพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐานที่สกัดได้จากข้อ 2.5.3 และ 2.5.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RV (สำหรับดีเอนเอจะบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ส่วนพลาสมิดจะบ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ใช้เวลา 2 ชั่วโมง) จากนั้นนำดีเอนเอที่ได้มาทำ electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น บันทึกแผนภาพดีเอนเอไว้ (รูปที่ 2.4) จากนั้นทำการถ่ายโอนดีเอนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยแช่แผ่น gel ในสารละลาย denaturation (ภาคผนวก 1.3ข) เพื่อให้ดีเอนเอคลายเกลียวเป็นสายเดี่ยว นาน 25 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและแช่แผ่น gel ในสารละลาย neutralization (ภาคผนวก 1.4ข) นาน 25 นาที จากนั้นทำการถ่ายดีเอนเอจาก gel ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (Sambrook, 1989) โดยวางแผ่น gel ลงบนกระดาษ Whatman 3M ที่ชุ่มด้วยสารละลาย 20 x SSC (ภาคผนวก 1.5ข) เป็นสะพานเชื่อมไอออน จากนั้นวางแผ่นไนโตรเซลลูโลสลงบนแผ่น gel แล้ววางแผ่นกระดาษ Whatman 3M ซึ่งชุ่มด้วยสารละลาย 20 x SSC วางทิชชูลงบนกระดาษ Whatman 3M สูงประมาณ 10 เซนติเมตร ตามลำดับ วางของหนักทับบนกระดาษทิชชูอีกครั้ง ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโล ด้วยสารละลาย 2 x SSC นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 2 ชั่วโมง และนำไปทำ hybridization กับ tdh probe ที่ติดฉลากด้วย DIG

**2.5.6 การทำ hybridization โครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของ *V. hollisae* ด้วย tdh probe** (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany)

นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปบ่มในสารละลาย hybridization (ภาคผนวก 1.8ข) ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา เทสารละลาย hybridization ทิ้งไปแล้วเติมสารละลาย hybridization ที่มี tdh probe ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้ probe เข้าไปจับคู่กับดีเอนเอเป้าหมาย เมื่อครบเวลา




**รูปที่ 2.4** การตัดดีเอนเอและพลาสมิดของเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน

นำแผ่นไนโตรเซลูโลสมาล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 2 x SSC กับ 0.1% (w/v) SDS ที่อุณหภูมิห้อง และล้างอีก 2 ครั้งด้วย 0.1 x SSC กับ 0.1% (w/v) ที่อุณหภูมิ 68 °C จากนั้นนำไปตรวจสอบผลการ hybridization หรือนำไปอบให้แห้ง เก็บไว้เพื่อทำการตรวจสอบผลการ hybridization ในภายหลัง

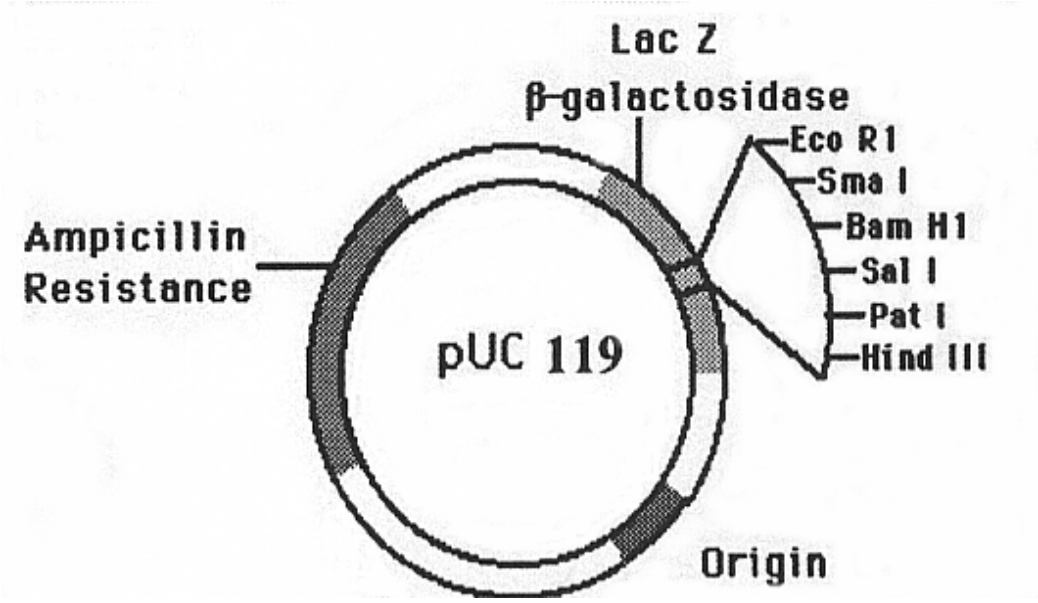
**2.5.7 การตรวจสอบผล hybridized ด้วย antibody ต่อ digoxigenin (DIG)** (ตามวิธีของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany)

นำแผ่นไนโตรเซลูโลส มาล้างในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 (ภาคผนวก 1.6ข) นาน 1 นาที จากนั้นนำมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 (ภาคผนวก 1.9ข) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ที่เติม anti-DIG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลา นำแผ่นไนโตรเซลูโลสมาล้างแอนติบอดีที่ไม่เกาะติดออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 1 สองครั้ง ครั้งละ 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน สารละลายบัฟเฟอร์ 3 (ภาคผนวก 1.10ข) นาน 2 นาที เมื่อครบกำหนดนำแผ่นไนโตรเซลูโลส มาแช่ในสารละลาย nitroblue tetrazolium salt กับ 5-bromo-4 chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) วางทิ้งไว้ในที่มืด ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นภายในไม่กี่นาที และปฏิกิริยาจะเกิดสมบูรณ์ภายหลังจาก 18 ชั่วโมง เมื่อเกิดสีชัดเจนแล้วให้หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่นไนโตรเซลูโลส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 4 (ภาคผนวก 1.11ข)

## 2.6 การตรวจหาจีนของ bacteriophage (Vf33) บนโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิดของ *V. hollisae*

### 2.6.1 การเตรียม probe จาก bacteriophage (Vf33)

เชื้อ *E. coli* ซึ่งมี recombinant plasmid pUC119 (รูปที่ 2.5) และจีนของ bacteriophage Vf33 ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1,103-3,737 ให้ชื่อว่า Vf1 ซึ่งเป็นบริเวณ conserve region ขนาด 2,634 คู่สม และ *E. coli* ซึ่งมี recombinant plasmid pUC119 และจีนของ bacteriophage Vf33 ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5,762-6,281 ใช้ชื่อว่า Vf2 ซึ่งเป็นตำแหน่ง distinctive region ขนาด 579 คู่สม (Chang 1998) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ Bin Chang (ภาควิชาจุลชีววิทยา University of occupational and environmental of health Kitatyushu ประเทศญี่ปุ่น) นำเชื้อ *E. coli* ทั้งสองชนิดมาเลี้ยงให้ได้ปริมาณมาก จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิด ตามวิธีในข้อ 2.5.1 จาก

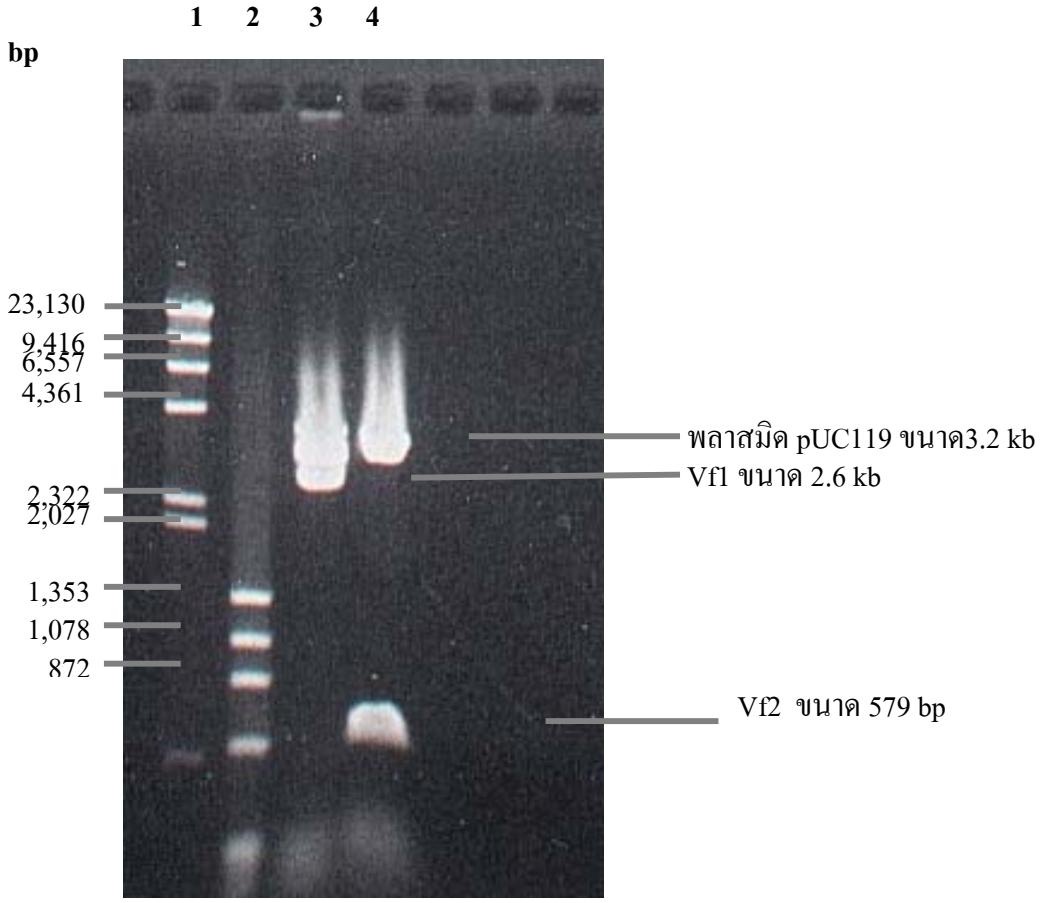



**รูปที่ 2.5** พลาสมิด pUC 119

นั้นนำ recombinant plasmid pUC119-Vf1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH*I และ *Pst*I และ recombinant plasmid pUC119-Vf2 ตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I และ *Sma*I ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำ electrophoresis (รูปที่ 2.6 2.7 และ 2.8) ตัดวุ้นส่วนที่มี conserve region Vf1 และ distinctive region Vf2 ขนาด 2,634 คู่สม และ 579 คู่สม และทำการสกัดดีเอนเอออกจากวุ้น โดยการบีบจากนั้นนำไปติดฉลากด้วย DIG

**2.6.2 Southern blot hybridization ด้วย Vf1 และ Vf2 probe**

นำเชื้อ *V. hollisae* สายพันธุ์มาตรฐาน 11 สายพันธุ์ มาตรวจหาจีนของ bacteriophage ส่วนที่เป็น conserve region (Vf1) และ distinctive region (Vf2) บนโครโมโซมอลดีเอนเอและพลาสมิด ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 2.5.5 2.5.6 และ 2.5.7 แต่ probe ที่ใช้คือ Vf1 และ Vf2 ที่ติดฉลากด้วย DIG



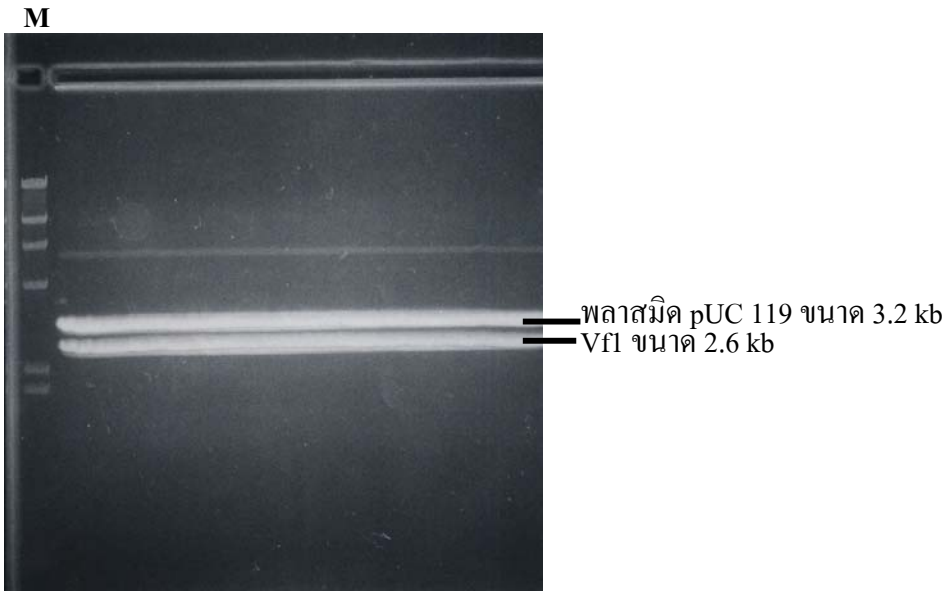

**รูปที่ 2.6** การตัดพลาสมิด pUC 119 ที่มีจีนของ phage Vf1 และ Vf2

แถวที่ 1 Marker (λ *Hind*III)

แถวที่ 2 Marker (ϕ X *Hae*III)

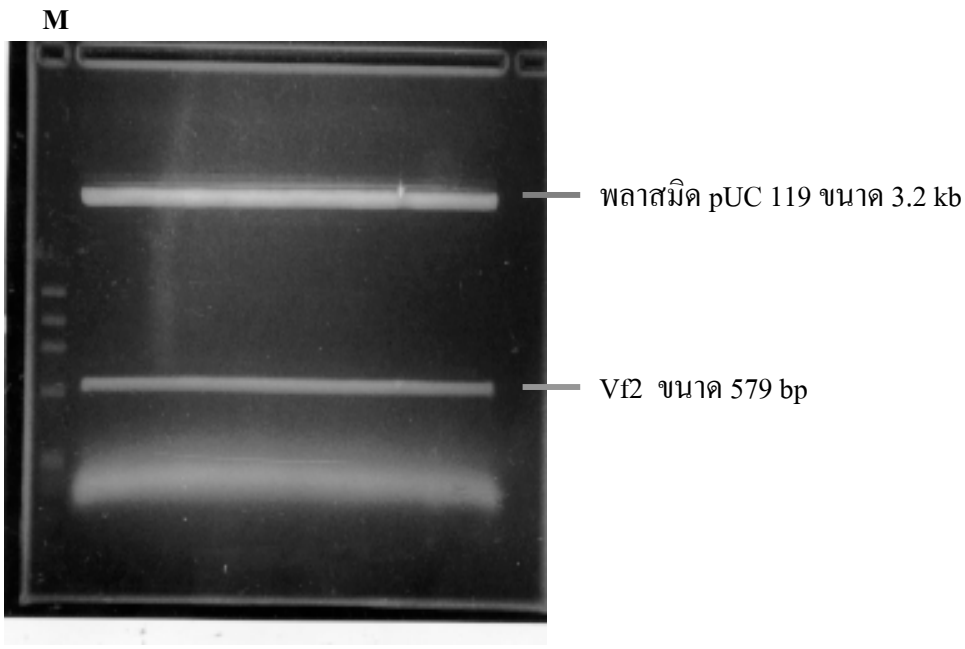
แถวที่ 3 พลาสมิด pUC 119 + จีน Vf1

แถวที่ 4 พลาสมิด pUC 119 + จีน Vf2




**รูปที่ 2.7** การเตรียม Vf1 probe

M = λ *Hind*III




**รูปที่ 2.8** การเตรียม Vf2 probe

M = ϕ x *Hae*III

**แผนภูมิที่ 2** แสดงขั้นตอนการตรวจหา จีน *tdh* และจีนของ bacteriophage บนโครโมโซมและพลาสมิดของ *V. hollisae* 11 สายพันธุ์