2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัท
Agar	Difco
Luria Bertini (LB) broth	Difco
Luria Bertini (LB) agar	Difco
Nutrient broth	Difco
Mueller Hinton agar	Difco
Tryptone	Difco
Urease agar base	BBL

2.1.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

ชนิด	บริษัท
Absolute ethanol	Merck
Isoamyl alcohol	Merck
Boric acid	Merck
Chloroform	Merck
EDTA	Merck
Ethidium bromide	Sigma
Phenol	Sigma
Sodium acetate trihydrous	Merck
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium dodecyl sulfate	Sigma
Sodium citrate dehydrate	Sigma
Sodium hydroxide	Sigma

Tris base	Promega
Maleic acid	Sigma
Tween-20	Sigma

2.1.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

ชนิด	บริษัท
Agarose	Gibco
dNTPs	Boeheringer Mannheim
Primers	Invitrogen
Restriction enzyme (*Hind* III)	BioLabs
Magnesium chloride	Promega
Tag DNA polymerase	Promega
RNase	Merck
Ex taq DNA polymerase	Takara
10x *Ex Taq* buffer	Takara

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด microcentrifuge (Eppendorf) ขนาด 1.5 ml
- เครื่องปั่น (centrifuge Eppendorf) (Centrifuge 5415 C, Germany)
- หลอด PCR ขนาด 0.2 ml
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- ตู้อบร้อน (Hot air oven) (Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- เครื่อง pH meter (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง Ultrasonic cleaner รุ่น 3200 (Branson, Germany)
- เครื่อง Hot plate & Steirrer (Fisher Scientific, USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina airflow cabinet) รุ่น ABS 1200A (ASTEC microflow, UK)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1235 (Sheldon Manufacturing, Inc USA)
- Microcentrifuge (Eppendorf) รุ่น 5415 C (Brinkman Instument Inc. Germany)
- Autopipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 µl (Gilson France)
- เครื่องชั่ง (Denver Instrument Company USA)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น 200/2.0 (BIO-RAD USA)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น PowerPac Basic (BIO-RAD USA)
- เครื่อง UV light transilluminator (UVP) (San Gabriel Inc. USA)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR Gene Amp) PCR system palm-cycler block (Australia)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -70°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -20°C (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็น 4°C (Sanyo, Japan)
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline Instrument Inc. USA)

2.3 แบคทีเรีย

2.3.1 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 2019 ซึ่งมียีน *toxR* และ *tdh* และให้ผล GS-PCR positive และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 2480 ซึ่งมียีน *toxR* และ *trh* และให้ผล GS-PCR negative

2.3.2 *E. coli* สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25923

2.3.3 *S. aureus* สายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 25922

2.3.4 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่โรงพยาบาลหาดใหญ่ ปี พ.ศ. 2543-2548 จำนวน 868 ไอโซเลต

2.4 วิธีการ

2.4.1 การตรวจยืนยัน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR โดยใช้จีน *toxR* เป็นจีนเป้าหมาย (Kim *et al*., 1999)

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมาเลี้ยงใน LB broth เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 16-18 ชม. จากนั้นนำเชื้อไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกจากเซลล์ นำไปแช่ในน้ำแข็งทันที 10 นาที เพื่อป้องกันดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาเข้าคู่กัน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg 5 นาที เพื่อให้เศษเซลล์ตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใสเจือจางอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่นเพื่อลดการรบกวนจากโปรตีนและสิ่งสกัดอื่นๆ จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR หาจีน *toxR* เพื่อยืนยันว่าเป็น *V. parahaemolyticus*

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10x buffer	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 µM primer-T4 Forward	5.0
2 µM primer-T7 Reverse	5.0
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	35
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิตจากการทำ PCR ดังตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำ electrophoresis เพื่อตรวจหาจีน *toxR* โดยใช้ agarose gel 2 % ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก 18 ข) ในการทำ electrophoresis ผสมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR 6 µl กับ loading dye (ภาคผนวก 8 ข) 1 µl หยอดใส่แผ่น gel แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 100 volts ประมาณ 30 นาที เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide (ภาคผนวก 6 ข) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ gel ไปล้าง ethidium bromide ส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุตราไวโอเลต

2.4.2 การตรวจหาจีน *tdh* และ *trh* โดยวิธี PCR (Tada *et al*., 1992)

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 จากนั้นนำมาตรวจหาจีน *tdh* โดยใช้ PCR โดยมีส่วนผสมดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10x buffer	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 µM primer-D1 Forward , R2 Forward	5.0
2 µM primer-D2 Reverse , R6 Reverse	5.0
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	35
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิตจากการทำ PCR ดังตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำการตรวจหาจีน *tdh* และ *trh* โดยการทำ electrophoresis เพื่อตรวจหาผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ agarose 1.5%

2.4.3 การทำ Group Specific-PCR (GS-PCR) (Matsumoto *et al*., 2000)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีจีนสร้างสารพิษ *tdh* และ/หรือ *trh* ใน LB broth เขย่า 150 รอบ/ นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 18 ชม. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 900xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วยน้ำเกลือ 0.85% จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น resuspend เชื้อในน้ำกลั่นแล้วจึงนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที นำไปแช่ในน้ำแข็งทันที 10 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg 6 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเจือจางอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่น จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ GS-PCR

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	9.2
10x buffer	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.2
2.5 mM dNTPs	1.0
2 µM primer-GS-VP1 Forward	2.0
2 µM primer-GS-VP2 Reverse	2.0
5 U/µl *Taq* DNA polymerase	0.1
DNA	2.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	35
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิตจากการทำ PCR ดังตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำ electrophoresis เพื่อตรวจหาผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ agarose 1%

2.4.4 การศึกษาลักษณะของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

2.4.4.1 การทำ serotyping

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน LB agar (ภาคผนวก 1 ก) เป็นเวลา 18-24 ชม. ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆจากนั้นเขี่ยเชื้อใส่ในสารละลาย 3% NaCl (ภาคผนวก 3 ก) แล้วนำไป autoclave อุณหภูมิ 121°C เวลา 30 นาที เพื่อใช้ในการหา O Ag ส่วนการหา K Ag มีขั้นตอนการเตรียมเชื้อเหมือนกับการหา O Ag แต่ไม่ต้องผ่านการ autoclave หลังจากเตรียมเชื้อแล้วจึงนำไปทดสอบ slide agglutination โดยผสมสารละลายเชื้อ 1 หยด กับ O หรือ K antisera ในปริมาณเท่ากัน เอียงสไลด์ไปมาแล้วดูการเกาะกลุ่มของเชื้อเทียบกับเชื้อที่ผสมกับน้ำเกลือ

2.4.4.2 การทดสอบ urease

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้าง urease และการมียีน *trh* ซึ่งเอนไซม์ urease จะสลายยูเรียเป็นแอมโมเนีย การทดสอบทำโดยเลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ trh^+ บน LB agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เขี่ยเชื้อนำมาตรวจการสร้าง urease โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร urea base agar (ภาคผนวก 7 ก) บ่มที่ 37°C 18-24 ชม. ถ้ามีการสร้างเอนไซม์ urease อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู

2.4.4.3 การทดสอบความทนเกลือของเชื้อ (NaCl tolerance)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน LB agar เป็นเวลา 18-24 ชม. ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เขี่ยเชื้อใส่ในสารละลาย LB broth ปริมาตร 3 ml เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C 3 ชม. ปรับปริมาตรเชื้อด้วย 1% NaCl (ภาคผนวก 3 ก) ปริมาตร 2 ml ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 1.5 x 10^8 CFU/ml โดยใช้เทียบความขุ่นกับ McFarland standard No. 0.5 (Densitometer, BIOMERIEUX) จากนั้นดูดเชื้อ 10 µl จากหลอดที่ปรับความขุ่นแล้วใส่ในแต่ละหลอดของ Nutrient broth ปริมาตร 2 ml ที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0%, 0.5%, 1%, 3%, 6%, 8%, 10% ตามลำดับ (ภาคผนวก 4 ก) อบที่ 37°C 18-24 ชม. แล้วดูความขุ่นของเชื้อในแต่ละหลอดโดยเทียบกับหลอดควบคุมที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0% เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ

2.4.4.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อบนสารอาหารกึ่งแข็ง (swarming activity)

เลี้ยงเชื้อเหมือนหัวข้อ 2.4.4.3 ดูดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว 2 µl มาหยดบนจานอาหารทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อซึ่งเป็นสารอาหารกึ่งแข็ง (swarming plate) (ภาคผนวก 6 ก) นำไปบ่มที่ 37°C วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเคลื่อนที่เวลา 4 และ 6 ชม. ตามลำดับ โดยใช้ venier caliper บันทึกผลของแต่ละสายพันธุ์

2.4.4.5 การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลินทรีย์ (Drug susceptibility pattern) โดยวิธี disk diffusion (NCCLS, 1997)

- การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* บน LB agar ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม. ใช้ loop แตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวจำนวน 3-5 โคโลนี ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี LB broth (ภาคผนวก 2 ก) ปริมาตร 3 ml เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3-5 ชม. เพื่อให้ได้เชื้อที่กำลังเจริญในระยะ log phase ปรับปริมาตรเชื้อด้วย 1% NaCl ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 1.5 x 10^8 CFU/ml โดยใช้เทียบความขุ่นกับ McFarland standard No. 0.5

- การทดสอบกับแผ่นยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อจากข้างต้นมาพอหมาดๆ นำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าgelอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) (ภาคผนวก 5 ก) เป็นแนว 3 แนว ทำมุม 60 องศา ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ปากคีบจุ่ม 95% alcohol ผ่านไฟ ปล่อยให้เย็น คีบแผ่นยามาตรฐานทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ ampicillin, azithromycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, tetracycline,

norfloxacin และ sulfamethoxazole วางบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ห่างกันพอสมควรและห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 mm เมื่อวางยาแล้วห้ามเคลื่อนย้าย ใช้ปากคีบกดแผ่นยาเบาๆ เพื่อให้แผ่นยาติดแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 16-18 ชม.

- การอ่านผล

สังเกตวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสด้วย venier caliper นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐานสำหรับแปลผลความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆของ NCCLS (2004) ซึ่งแสดงผลได้ 3 ลักษณะ คือ susceptible (S) เมื่อเชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพ intermediate (I) เมื่อเชื้อมีความไวปานกลาง และ resistant (R) เมื่อเชื้อดื้อต่อยาที่ใช้ทดสอบ

2.4.5 การศึกษาความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ในระดับโมเลกุล

2.4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี phenol-chloroform extraction (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al*., 1989)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* บน LB agar ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เขี่ยเชื้อใส่ในสารละลาย LB broth ปริมาตร 5 ml เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 6-8 ชม. ดูดเชื้อ 10 µl ใส่ในสารละลาย LB broth ปริมาตร 5 ml หลอดใหม่ เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 16-18 ชม. แล้วดูดเชื้อ 1.5 ml ใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500xg นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงเติม PBS pH 8.0 (ภาคผนวก 13 ข) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500xg นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วจึงเติม PBS-EDTA (PBS 240 µl ผสมกับ 0.5 M EDTA 60 µl) 300 µl ผสมให้เข้ากันดีจากนั้นจึงเติม 10% SDS 150 µl (ภาคผนวก 15 ข) ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกฮอล์ (phenol-chloroform-isoamyl alcohol ; 25:24:1; ปริมาตร : ปริมาตร : ปริมาตร) (ภาคผนวก 12 ข) 450 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixture) แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 25,000xg 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ เติมสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกฮอล์ 450 µl และทำซ้ำเหมือนข้างต้นอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท (3 M NaOAc) (ภาคผนวก 16 ข) 40 µl และ 95% เอทานอลสมบรูณ์ (absolute ethanol) ที่เย็นจัด 1 ml ผสมให้เข้ากันโดยวิธีการกลับหลอดไปมา

(invert technique) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 25,000xg 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล ที่เย็นจัด 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 25,000xg 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 300 µl ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงเติม RNase (ความเข้มข้น 50 µg/ml) (ภาคผนวก 21 ข) 60 µl นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสกัดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกฮอล์ 300 µl ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ ทำซ้ำขั้นตอนเดิมจนสิ้นสุดขั้นตอนล้างตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCL EDTA) (ภาคผนวก 19 ข) ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm เพื่อหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

การคำนวณหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm ($OD_{260\ nm}$) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานซึ่งมีค่า $OD_{260\ nm}$ เท่ากับ 1 จะมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 µg/ml และคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้โดยการหาอัตราส่วนของ $OD_{260\ nm}$/ $OD_{280\ nm}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แต่หากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ ถ้าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

2.4.5.2 การทำ AP-PCR (ดัดแปลงวิธีจาก William *et al*., 1990)

เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl ด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AP-PCR ต่อไป โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ primer 2 และ primer 4 (ตารางที่ 2.1) ซึ่งการทำ AP-PCR มีส่วนผสมดังต่อไปนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	15.0
10x *Ex Taq* buffer	3.0
2.5 mM dNTPs	4.0
5 mM primer 2 หรือ primer 4	5.0
Ex Taq DNA polymerase	0.5
DNA	2.5
ปริมาตรรวม	30.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	95	4	1
2. Denature	95	1	45
3. Annealing	36	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer ดังตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมดทำการตรวจหา PCR product โดยการทำ electrophoresis โดยใช้ agarose 1.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ในการทำ electrophoresis ผสมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR 15 µl กับ loading dye 2 µl หยอดใส่แผ่น gel แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับ คือ 100 volts 5-7 นาที และ 15 mA ประมาณ 10 ชม. เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุตราไวโอเลต

2.4.6 การตรวจ subgroup ของจีน *trh* โดยการถ่ายโอนดีเอ็นเอด้วยวิธีเซาเทอร์นบลอตติง และการทำ Hybridization

2.4.6.1 การเตรียมตัวตรวจจับ *trh1*, *trh2* (*trh1*, *trh2* probes) (Kishishita *et al*., 1992)

นำ recombinant plasmid ซึ่งมีจีน *trh1* และ *trh2* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco*RI แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดย agarose gel electrophoresis สกัดดีเอ็นเอจาก gel ด้วย DNA extraction kit (QIAGEN, Germany) จากนั้นนำดีเอ็นเอไปติดสลากแบบสุ่ม (random primed labeling) ด้วย digoxigenin (DIG) dUTP โดยนำดีเอ็นเอตรวจจับจีน *trh1*, *trh2* ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันทีหลังจากนั้นเติม dNTP labeling (DIG High Prime, Roche) ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชม.

2.4.6.2 การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

นำดีเอ็นเอที่ได้จาก *V. parahaemolyticus* (ข้อ 2.5.5.1) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2 µg ด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วจึงตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 Unit/µl การทำมีส่วนผสมดังต่อไปนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร (µl)
10x NE buffer2	3.0
*Hin*d III (20 U/µl)	1.25
DW + DNA (2 µg)	25.75
ปริมาตรรวม	30.0

นำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C 12-18 ชม. ดูดส่วนผสม 5 µl รวมกับ loading dye 1 µl นำไป electrophoresis โดยหยอดใส่แผ่น gel ที่มีความเข้มข้น 1% gel (ขนาด 6 x 10 cm) ใน 1x Tris-borate Buffer (TBE) ผ่านกระแสไปใน gel ประมาณ 100 volts นาน 1 ชม. นำแผ่น gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 20 นาที ดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใต้แสงอุตราไวโอเลต ถ้าการตัดสมบรูณ์ก็นำส่วนผสมที่เหลือประมาณ 25 µl รวมกับ loading dye 5 µl นำไปทำ electrophoresis อีกครั้ง ใช้ความเข้มข้น 1% gel (ขนาด 10 x 15 cm) เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มี

ความต่างศักดิ์ 50 volts 12-14 ชม. นำแผ่น gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 นาที นำมาดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอพร้อมถ่ายรูปใต้แสงอุตราไวโอเลต หลังจากนั้นนำแผ่น gel ไปแช่น้ำต่อประมาณ 30 นาที เพื่อเอา ethidium bromide ส่วนเกินออก เพราะอาจมีผลรบกวนต่อการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.4.6.3 การทดสอบเซาเทอร์น บลอตติง และการทำ Hybridization

นำแผ่น gel ไปแช่ใน denaturation solution (ภาคผนวก 2 ข) เขย่าเบาๆ 40 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วแช่ใน neutralization solution (ภาคผนวก 10 ข) เขย่าเบาๆ 30 นาที แล้วนำแผ่น gel โดยคว่ำด้านหน้าแผ่น gel วางบนแผ่นกระจกที่มีกระดาษกรอง Whatman 3 M วางเป็นสะพาน โดยมีปลายทั้งสองข้างจุ่มอยู่ในสารละลาย SSC ความเข้มข้น 10 เท่า (10x SSC) (ภาคผนวก 17 ข) นำแผ่นไนลอนที่มีขนาดเล็กกว่าแผ่น gel เล็กน้อยแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที วางทับแผ่น gel ด้านหลัง วางกระดาษกรอง Whatman 3 M ทับบนแผ่นไนลอน 4 ชั้น โดยวางกระดาษกรองครั้งละแผ่น สองแผ่นแรกให้หยดบัฟเฟอร์ 10x SSC เล็กน้อยแล้วคลึงให้ทั่ว เพื่อให้แผ่นกระดาษกรองแนบกับแผ่น gel ให้สนิทอย่าให้มีฟองอากาศแล้ววางกระดาษกรองที่เหลืออีกสองแผ่น จากนั้นวางกระดาษซับให้มีความสูงประมาณ 4-6 cm วางแผ่นกระจกทับ จากนั้นวางของหนักประมาณ 500 กรัม ทับบนกระจกตั้งทิ้งไว้ 12 ชม. หรือข้ามคืน ดีเอ็นเอจะถูกถ่ายลงแผ่นไนลอน จากนั้นนำแผ่นไนลอนไปผ่านแสงอุตราไวโอเลต 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอยึดติดกับแผ่นไนลอน นำแผ่นไนลอนไปแช่ในน้ำกลั่นเขย่าเบาๆ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง สามารถนำไปทำ hybridization ต่อได้ทันทีหรืออาจเก็บไว้ในที่แห้งได้นานเป็นปีแต่ก่อนนำไปใช้ต้องแช่ในน้ำกลั่นอีกครั้ง การทำ hybridization ทุกขั้นตอนต้องมีการเคลื่อนที่ของสารละลายเสมอ เติมสารละลาย prehybridization (ภาคผนวก 14 ข) ซึ่ง pre-heat ที่อุณหภูมิ 30^{o}C ประมาณ 1 ชม. ลงในขวดที่มีแผ่นไนลอน (ให้ปริมาตรของสารละลายต่อขนาดพื้นที่ของแผ่นไนลอนเท่ากับ 15 mm ต่อ 100 cm^{2}) นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30^{o}C นาน 30 นาที อย่าให้มีฟองอากาศระหว่างสารละลายและแผ่นไนลอน เมื่อครบเวลาแทนที่สารละลาย prehybridization ด้วย hybridization solution (ภาคผนวก 7 ข) ที่มีตัวตรวจจับ *trh1* หรือ *trh2* ซึ่งติดฉลากด้วย DIG (ในสัดส่วน 3.5 ml ต่อ แผ่นไนลอน 100 cm^{2}) อย่าให้มีฟองอากาศนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 4-16 ชม. เมื่อครบเวลานำแผ่นไนลอนมาล้างด้วย 0.1% SDS ใน 2x SSC ที่อุณหภูมิห้องสองครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วล้างด้วย 0.1% SDS ใน 0.5x SSC ที่อุณหภูมิ 65-68 ^{o}C สองครั้ง ครั้งละ 15 นาที

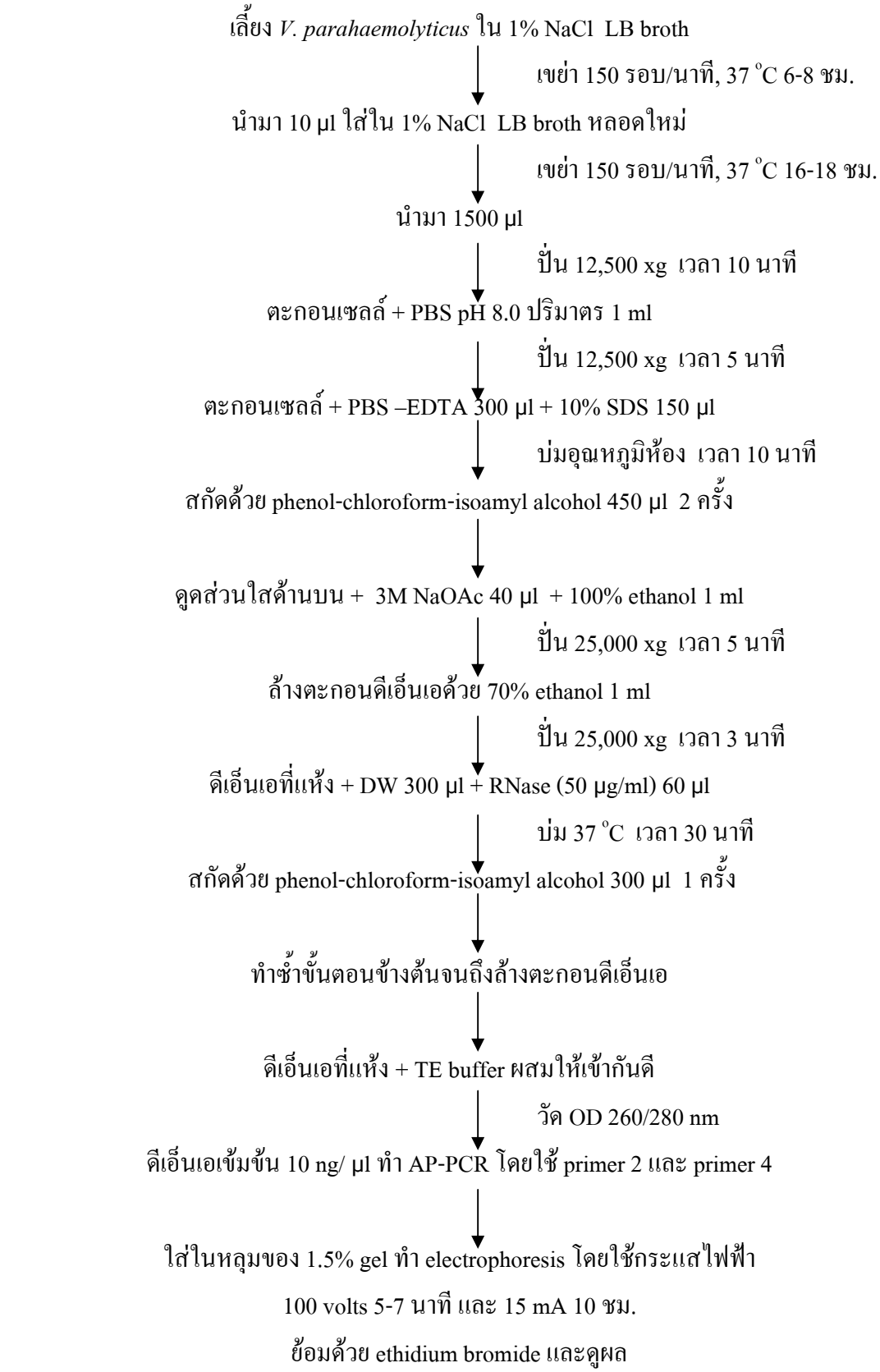
2.4.6.4 การตรวจสอบผลของ Hybridization กับแอนติบอดีต่อ DIG

ล้างแผ่นไนลอนใน washing buffer (ภาคผนวก 20 ข) ประมาณ 1-5 นาที แล้วแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก 1 ข) 100 ml นาน 30 นาที เตรียมสารละลายแอนติบอดีต่อ DIG (ภาคผนวก 3 ข) ที่จับกับ alkaline phosphatase โดยเจือจางในสัดส่วน 1: 5,000 (150 mU/ml) ในสารละลาย blocking solution บ่มแผ่นไนลอนในสารละลายแอนติบอดี 20 ml นาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วย Washing buffer 100 ml นาน 15 นาที 2 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน detection buffer (ภาคผนวก 4 ข) นาน 2-5 นาที เททิ้ง แล้วแช่แผ่นไนลอนใน NBT/BCIP color solution (ภาคผนวก 11 ข) 10 ml ทำในที่มืดปฏิกิริยาจะเกิดเห็นสีภายใน 2-3 นาที และจะสิ้นสุดภายใน 16 ชม. หยุดปฏิกิริยาโดยล้างในน้ำกลั่นหรือ TE-buffer 50 ml นาน 5 นาที หลังจากนั้นวางแผ่นไนลอนที่อุณหภูมิห้องให้แห้งสามารถเก็บแผ่นไนลอนที่เห็นผลได้เป็นระยะเวลานาน

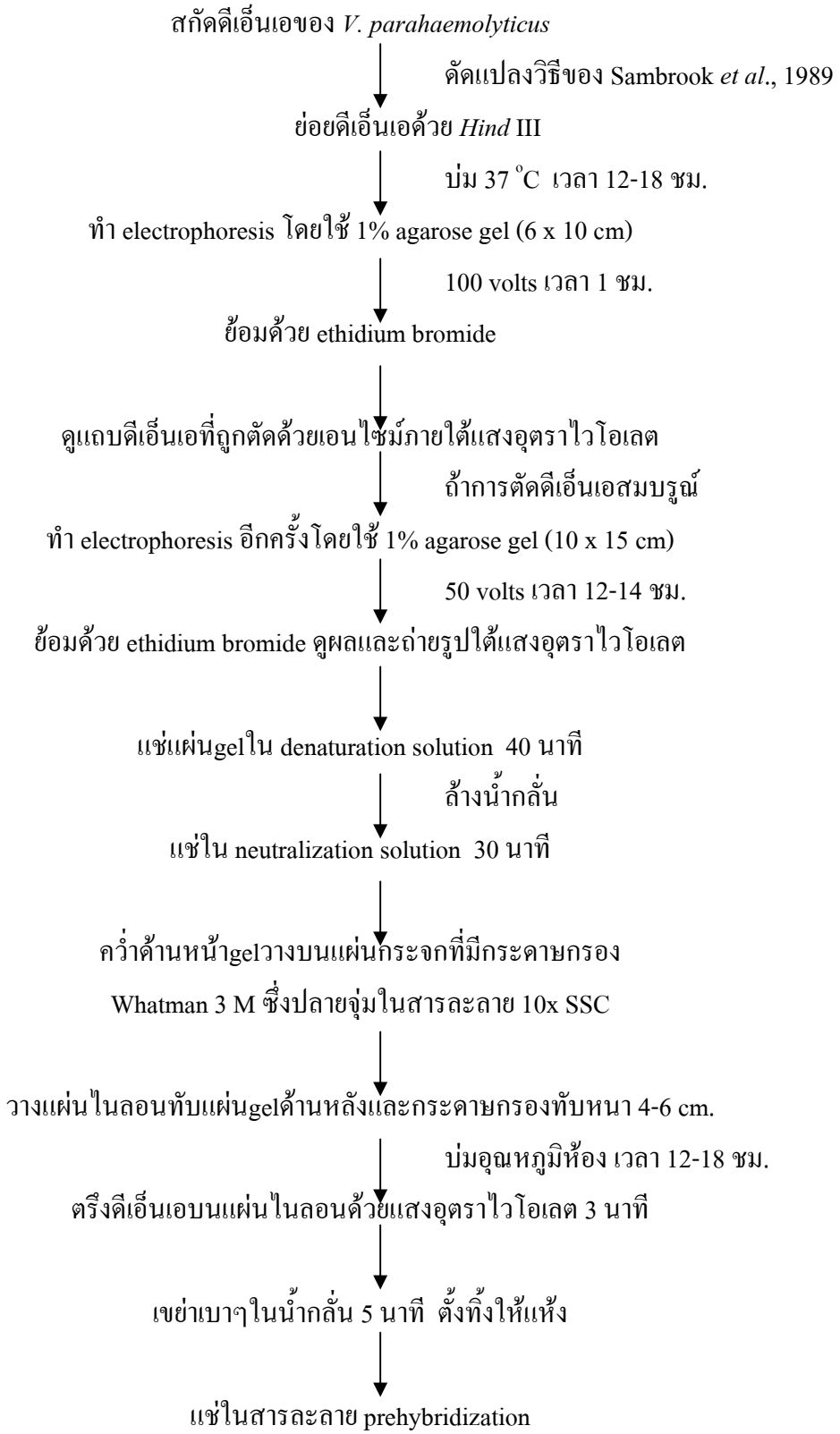
ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของ primers และขนาดผลผลิต PCR

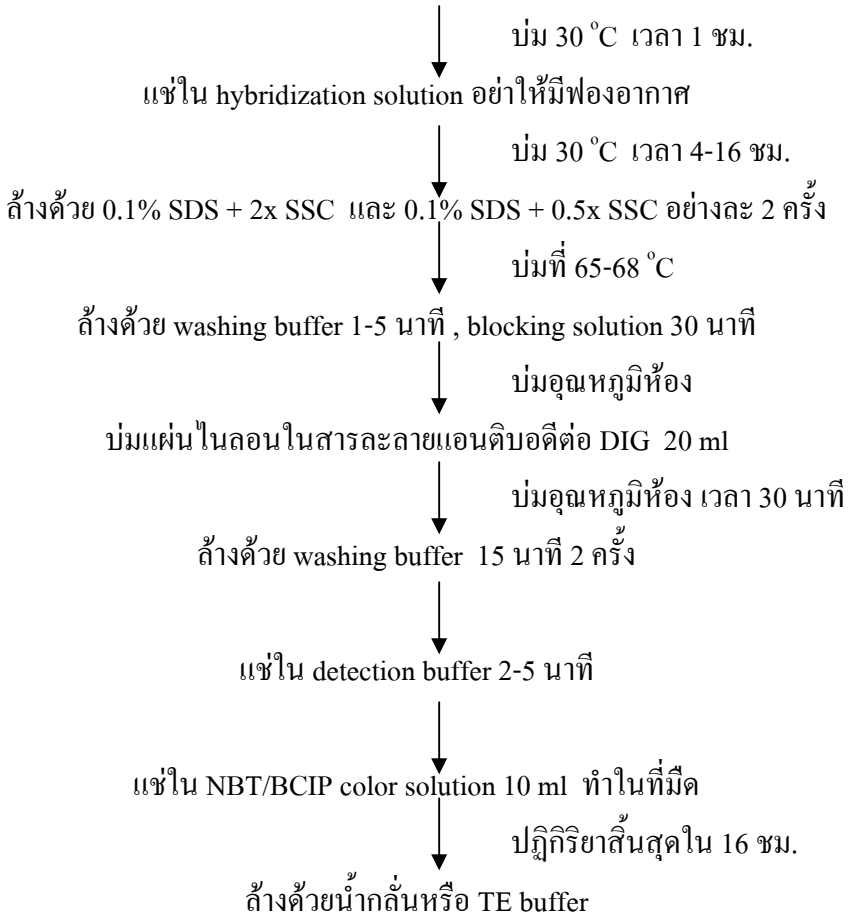
Gene	Primers and sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)	References
toxR	T4 'GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG' T7 'ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG'	367	Kim *et al*., 1999
tdh	D1 'GGT ACT AAA TGG CTG ACA TC' D2 'CCA CTA CCA CTC TCA TAT GC'	251	Tada *et al*., 1992
trh	R2 'GGC TCA AAA TGG TTA AGC G' R6 'CAT TTC CGC TCT TCA TAT GC'	250	Tada *et al*., 1992
GS-VP	GS-VP1 'TAA TGA GGT AGA AAC A' GS-VP2 'ACG TAA CGG GCC TAC A'	651	Matsumoto *et al*., 2000
Primer 2	'GTT TCG CTC C'	-	Okuda *et al*., 1997b
Primer 4	'AAG AGC CCG T'	-	Okuda *et al*., 1997b

แผนภูมิที่ 2.1 ขั้นตอนการทดสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AP-PCR



แผนภูมิที่ 2.2 ขั้นตอนการตรวจสอบ subgroup ของ *trh*




บ่ม 30 °C เวลา 1 ชม.
แช่ใน hybridization solution อย่าให้มีฟองอากาศ
บ่ม 30 °C เวลา 4-16 ชม.
ล้างด้วย 0.1% SDS + 2x SSC และ 0.1% SDS + 0.5x SSC อย่างละ 2 ครั้ง
บ่มที่ 65-68 °C
ล้างด้วย washing buffer 1-5 นาที , blocking solution 30 นาที
บ่มอุณหภูมิห้อง
บ่มแผ่นไนลอนในสารละลายแอนติบอดีต่อ DIG 20 ml
บ่มอุณหภูมิห้อง เวลา 30 นาที
ล้างด้วย washing buffer 15 นาที 2 ครั้ง
แช่ใน detection buffer 2-5 นาที
แช่ใน NBT/BCIP color solution 10 ml ทำในที่มืด
ปฏิกิริยาสิ้นสุดใน 16 ชม.
ล้างด้วยน้ำกลั่นหรือ TE buffer