2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิด	บริษัท
Agar	Difco
Luria Bertini (LB) broth	Difco
Luria Bertini (LB) agar	Difco
Decarboxylase broth base	Difco
Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar	Difco
Triple sugar iron (TSI) agar	Difco
Peptone	Difco
Motility Test medium	Difco
Urease agar base	BBL

2.1.1.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

ชนิด	บริษัท
Absolute ethanol	Merck
Boric acid	Merck
Chloroform	Merck
EDTA	Merck
Ethidium bromide	Sigma

ชนิด	บริษัท
Phenol	Sigma
Sodium acetate trihydrous	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium dodecyl sulfate	Sigma
Tris base	Promega
Urea	Sigma

2.1.1.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (molecular biology grade)

ชนิด	บริษัท
Agarose	Gibco USA
Pulse field gel certified agarose	BIO-RAD
Low melting agar	BRL USA
dNTPs	Boeheringer Mannheim
Primers	Invitrogen
Restriction enzyme (*Not* I)	MBI Fermentas
Magnesium chloride	Promega
Magnesium chloride free buffer	Promega
Taq DNA polymerase	Promega
Proteinase K	Sigma
RNase	Merck
Ex taq DNApolymerase	Takara Japan
10x *Ex Taq* buffer	Takara Japan

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับงานวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด microcentrifuge (Eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอด PCR ขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)
- ตู้อบร้อน (Hot air oven)(Venticell)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Heraeus, Germany)
- เครื่อง pH meter (Metrohm, Switzerland)
- เครื่อง Ultrasonic cleaner รุ่น 2200 E3 (Branson, Germany)
- เครื่อง Hot plate & Stirrer (Fisher Scientific, USA)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet) รุ่น BVT 125 (ISSCO, USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-1201V (SHIMADZU, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 1235 (Sheldon Manufacturing, Inc USA)
- Microcentrifuge (Eppendorf) รุ่น 5415 C (Brinkman Instrument Inc. Germany)
- Autopipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร (Gilson France)
- 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)
- Contour-clamped homogeneous electric field-DRIII system (BIO-RAD)
- Plug mold (BIO-RAD)
- เครื่อง UV light transilluminator (UVP) (San Gabriel Inc. USA)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR Gene Amp) PCR system 2400 (Perkin Elmer USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง-70 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็นแช่แข็ง-20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์

- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline Instrument Inc. USA)
- Magnetic concentrator (Dynal A.S. Norway)

2.3 เชื้อแบคทีเรีย

2.3.1 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 2019 ซึ่งมียีน *toxR* และ *tdh* และให้ผลGS-PCR เป็นบวก และ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ 2480 ซึ่งมียีน *toxR* และ *trh* และให้ผล GS-PCR เป็นลบ

2.3.2 *V. cholerae* สายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ *V. cholerae* สายพันธุ์ O1 NIH

2.3.3 *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่ ปี พ.ศ. 2543-2544 ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบทางชีวเคมี จำนวน 198 สายพันธุ์

2.4 แอนติบอดี

V. parahaemolyticus K6 K12 K25 K48 และ K68 antisera ของกระต่าย (Denka Seiken Co. Japan)

2.5 วิธีการ

2.5.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารทะเล

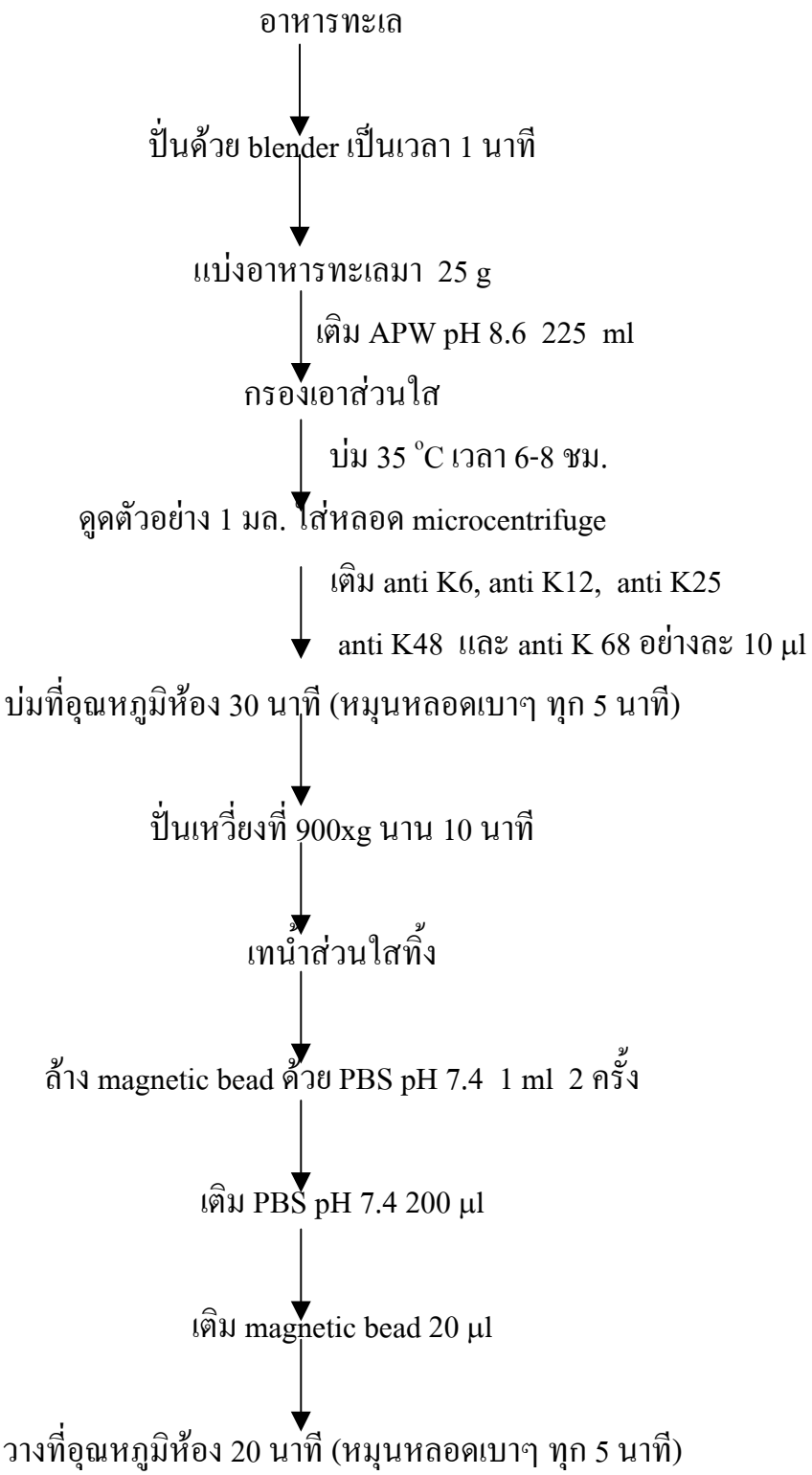
เก็บตัวอย่างอาหารทะเลจาก ตลาดกิมหยง ตลาดพลาซ่า ตลาดคลองเรียน และตลาดเกาะหมี อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา และ ตลาดเก้าเส้ง อ. เมือง จ. สงขลา ตัวอย่างทั้งหมดประกอบด้วยปลา เช่น ปลาจวด ปลาทู ปลาขี้ตัง ปลาแดง ปลาโฮก และปลาแป้น หอย เช่น หอยแครง หอยตลับ หอยแมลงภู่ หอยนางรม และหอยลาย รวมทั้งปูและกุ้ง เตรียมตัวอย่างโดย ปลาใช้น้ำล้างตัวปลา ครีบ และเหงือก หอยแกะเอาเปลือกออก ปูใช้ส่วนของนมปู ส่วนกุ้งจะเอาทั้งตัว จากนั้นปั่นตัวอย่างอาหารทะเลโดยใช้ blender ประมาณ 1 นาที เพื่อทำให้เนื้อตัวอย่างละเอียด แล้วจึงแบ่งตัวอย่างมา 25 กรัม เติม alkaline peptone water (APW) pH 8.6 (ภาคผนวก 1ก) จำนวน 225 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน

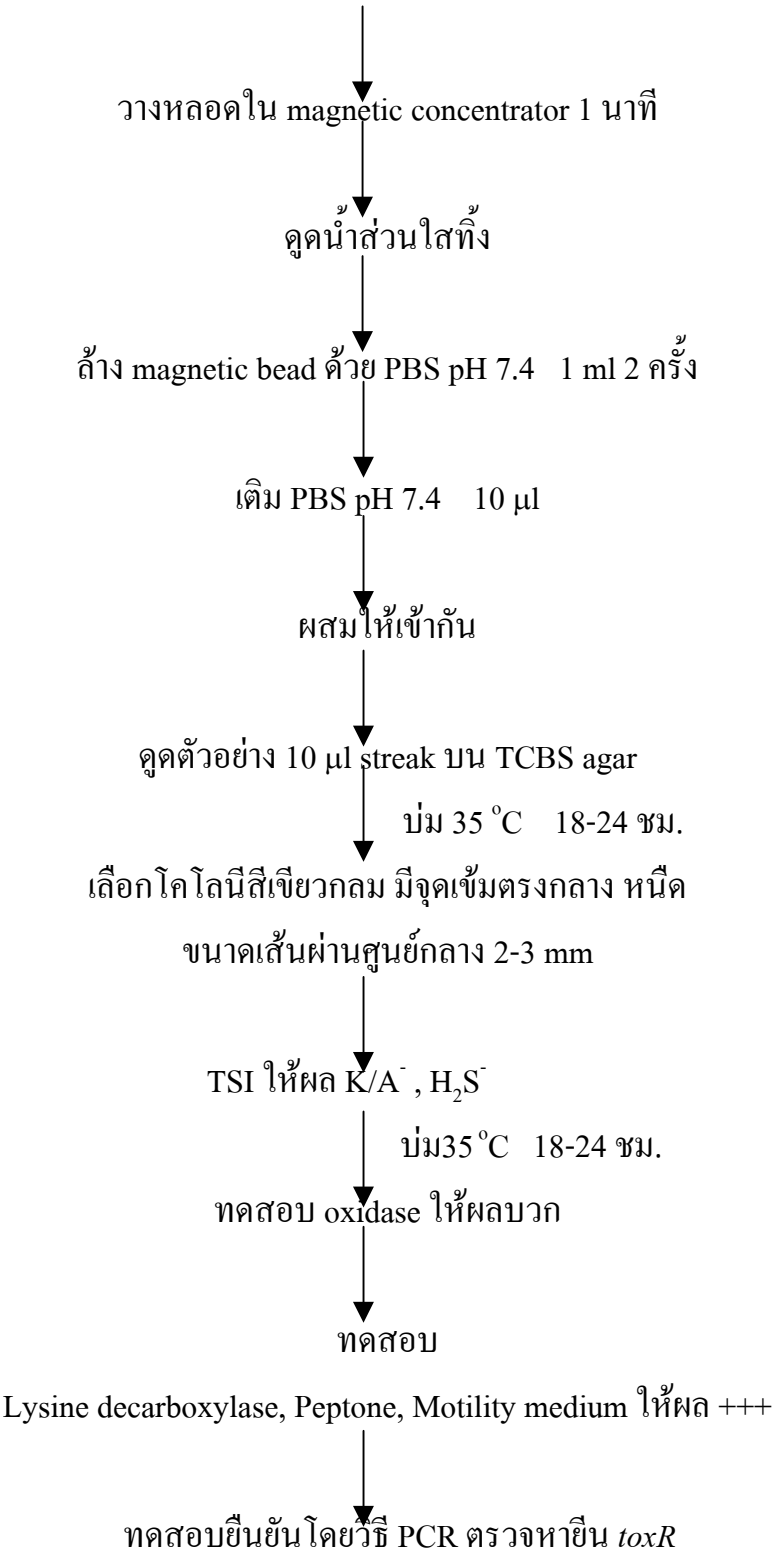
กรองเอาส่วนน้ำโดยใช้ผ้าขาวบางปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 - 8 ชั่วโมง

2.5.2 การแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Immunomagnetic technique (ดัดแปลงวิธีจาก Tomoyasu, 1992)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 6-8 ชั่วโมง ใส่ในหลอด microcentrifuge tube (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม anti K6 anti K12 anti K25 anti K48 และanti K68 อย่างละ 10 ไมโครลิตร ลงในหลอด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยหมุนหลอดเบาๆ ทุก 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 900xg นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 (ภาคผนวก 5ข) 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนเซลล์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 900xg นาน 10 นาที ทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นจึงเติม PBS 200 ไมโครลิตร และ magnetic bead ที่เคลือบด้วย sheep anti rabbit IgG (Dynal A.S. Norway) (ภาคผนวก 1ข) 20 ไมโครลิตร อบหลอดที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที หมุนหลอดเบาๆ ทุก 5 นาที จากนั้นนำหลอดวางใน magnetic concentrator ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง สุดท้ายจึงเติม PBS 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดมา 10 ไมโครลิตร นำไป streak บน TCBS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนี *V. parahaemolyticus* ที่มีลักษณะสีเขียวกลม มีจุดเข้มตรงกลาง หนืด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตรไปทดสอบ TSI หลอดที่ให้ผล K/A^- ไม่มี H_2S นำไปทดสอบ oxidase ถ้าได้ผลบวก จะนำไปทดสอบ lysine decarboxylase 1%peptone และ motility medium เชื้อที่ให้ผลบวกกับการทดสอบทั้งหมด คาดว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* ทำการตรวจยืนยันโดยการทำ PCR โดยใช้ *tox R* gene เป็นยีนเป้าหมาย (แผนภูมิที่ 2.1)

แผนภูมิที่ 2.1 ขั้นตอนการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี immunomagnetic technique




วางหลอดใน magnetic concentrator 1 นาที
ดูดน้ำส่วนใสทิ้ง
ล้าง magnetic bead ด้วย PBS pH 7.4 1 ml 2 ครั้ง
เติม PBS pH 7.4 10 µl
ผสมให้เข้ากัน
ดูดตัวอย่าง 10 µl streak บน TCBS agar
บ่ม 35 °C 18-24 ชม.
เลือกโคโลนีสีเขียวกลม มีจุดเข้มตรงกลาง หนืด
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 mm
TSI ให้ผล K/A⁻ , H2S⁻
บ่ม35 °C 18-24 ชม.
ทดสอบ oxidase ให้ผลบวก
ทดสอบ
Lysine decarboxylase, Peptone, Motility medium ให้ผล +++
ทดสอบยืนยันโดยวิธี PCR ตรวจหายีน toxR

2.5.3 การตรวจยืนยัน *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR โดยใช้ยีน *toxR* เป็นยีนเป้าหมาย (Kim *et al.*, 1999)

นำเชื้อที่ให้ผลทดสอบทางชีวเคมีที่คาดว่าเป็น *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยมาเลี้ยงใน LB broth เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C ประมาณ 18 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C นาน 10 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตกและดีเอ็นเอหลุดออกจากเซลล์ เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg 6 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเจือจางอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่น จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR หายีน *toxR* เพื่อยืนยันว่าเป็น *V. parahaemolyticus*

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

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

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	35
3. Annealing	63	1.5	
4. Extension	72	1.5	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิตจากการทำ PCR ดังตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำ electrophoresis เพื่อตรวจหายีน *toxR* โดยใช้วุ้น agarose 2% ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก 8ข) ในการทำ electrophoresis ผสมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR 8 ไมโครลิตร กับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดใส่แผ่นวุ้น แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลท

2.5.4 การตรวจหายีน *tdh* โดยวิธี PCR (Tada *et al.*, 1992)

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ เช่นเดียวกับข้อ 2.5.3 จากนั้นนำมาตรวจหายีน *tdh* โดยใช้ PCR โดยมีส่วนผสมดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10xbuffer	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 μM primer -D1 Forward	2.0
2 μM primer -D2 Reverse	2.0
5 U/μl *Taq* DNApolymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}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 ทำการตรวจหายีน *tdh* โดยการทำ electrophoresis เช่นเดียวกับในข้อ 2.5.3

2.5.5 การตรวจหายีน *trh* โดยวิธี PCR (Tada *et. al.*, 1992)

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ เช่นเดียวกับข้อ 2.5.3 จากนั้นนำมาตรวจหายีน *trh* โดยใช้ PCR โดยมีส่วนผสมดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	3.2
10xbuffer	2.0
25 mM $MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.6
2 μM primer -R2 Forward	2.0
2 μM primer -R6 Reverse	2.0
5 U/μl *Taq* DNApolymerase	0.1
DNA	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR คือ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (^{o}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 ทำการตรวจหายีน *trh* โดยการทำelectrophoresis เช่นเดียวกับข้อ 2.5.3

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

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มียีนสร้างสารพิษ *tdh* และ/หรือ *trh* ใน LB broth เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C ประมาณ 18 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 900xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำเกลือ 0.85 % จำนวน 2

ครั้ง แล้วจึงนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที เมื่อครบกำหนดนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg 6 นาที ดูดสารละลายส่วนใสเจือจางอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่น จะได้ดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ GS-PCR

ส่วนผสมในการทำ PCR ได้แก่

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่ปลอดนิวคลีเอส	9.2
10xbuffer	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* DNApolymerase	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	25
3. Annealing	45	2	
4. Extension	72	3	
5. Final extension	72	7	1

หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer และขนาดของผลผลิตจากการทำ PCR ดังตารางที่ 2.1

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำ electrophoresis เพื่อตรวจหาผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ agarose 1%

2.5.7 การทดสอบ urease

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบหายีน *trh* นำมาตรวจการสร้าง urease เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้าง urease และการมียีน *trh* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร urea base agar (ภาคผนวก 9ก) อบที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

2.5.8 การทำ serotyping

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน LB agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อใส่ในสารละลาย NaCl 3% แล้นำไป autoclave อุณหภูมิ 121 ^{o}C เวลา 30 นาที เพื่อใช้ในการหา O Ag การหา K Ag มีขั้นตอนการเตรียมเชื้อเหมือนกับการหา O Ag แต่ไม่ต้องผ่านการ autoclave หลังจากเตรียมเชื้อแล้ว จึงนำไปทดสอบ slide agglitination โดยใช้ O และ K antisera

2.5.7 การศึกษาความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* แต่ละสายพันธุ์

คัดเลือก *V. parahaemolyticus* มาศึกษาความแตกต่างโดยวิธีการสุ่ม มีทั้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารทะเลและผู้ป่วยซึ่งมาจากระยะเวลาการแยกเชื้อที่ใกล้เคียงกันและเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผล GS-PCR เป็นบวก ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ให้ผล GS-PCR เป็นลบใช้เป็นตัวควบคุมลบ จากนั้นจึงนำไปศึกษาความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์

2.5.9.1 การสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซมจากโครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี phenol-chloroform extraction (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.*, 1989)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน LB broth 5 มิลลิลิตร เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 ^{o}C ประมาณ 18 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000xg เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม PBS 1 มิลลิลิตร แล้วดูดเชื้อใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วจึงเติม PBS-EDTA (PBS 270 µl ผสมกับ 1 M EDTA 30 µl) 300 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้น

จึงเติม 10 % SDS 150 µl ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย phenol-chloroform (1:1; ปริมาตร:ปริมาตร) (ภาคผนวก 4ข) 450 µl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 M NaOAc (ภาคผนวก 7ข) 40 µl และ 95 % ethanol ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol และ 95 % ethanol ที่เย็นจัด ตามลำดับ จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 500 µl จากนั้นจึงเติม RNase (ความเข้มข้น 10 ng/µl) (ภาคผนวก 12ข) 5 µl นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการสกัดดีเอ็นเอ ซ้ำอีกครั้งด้วย phenol-chloroform แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

2.5.9.2 การคำนวณหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

คำนวณปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ($OD_{260\ nm}$) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งมีค่า $OD_{260\ nm}$ เท่ากับ 1 จะมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้โดยการหาอัตราส่วนของ $OD_{260\ nm}$ /$OD_{280\ nm}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ แต่หากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของอาร์เอนเอ ถ้าน้อยกว่า1.85 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

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

เมื่อได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอแล้วจึงเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl ด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ AP-PCR ต่อไปโดยใช้ primer 2 ชนิด คือ primer 2 และ primer 4 ซึ่งการทำ AP-PCR มีส่วนผสมดังต่อไปนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
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 DNApolymerase	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

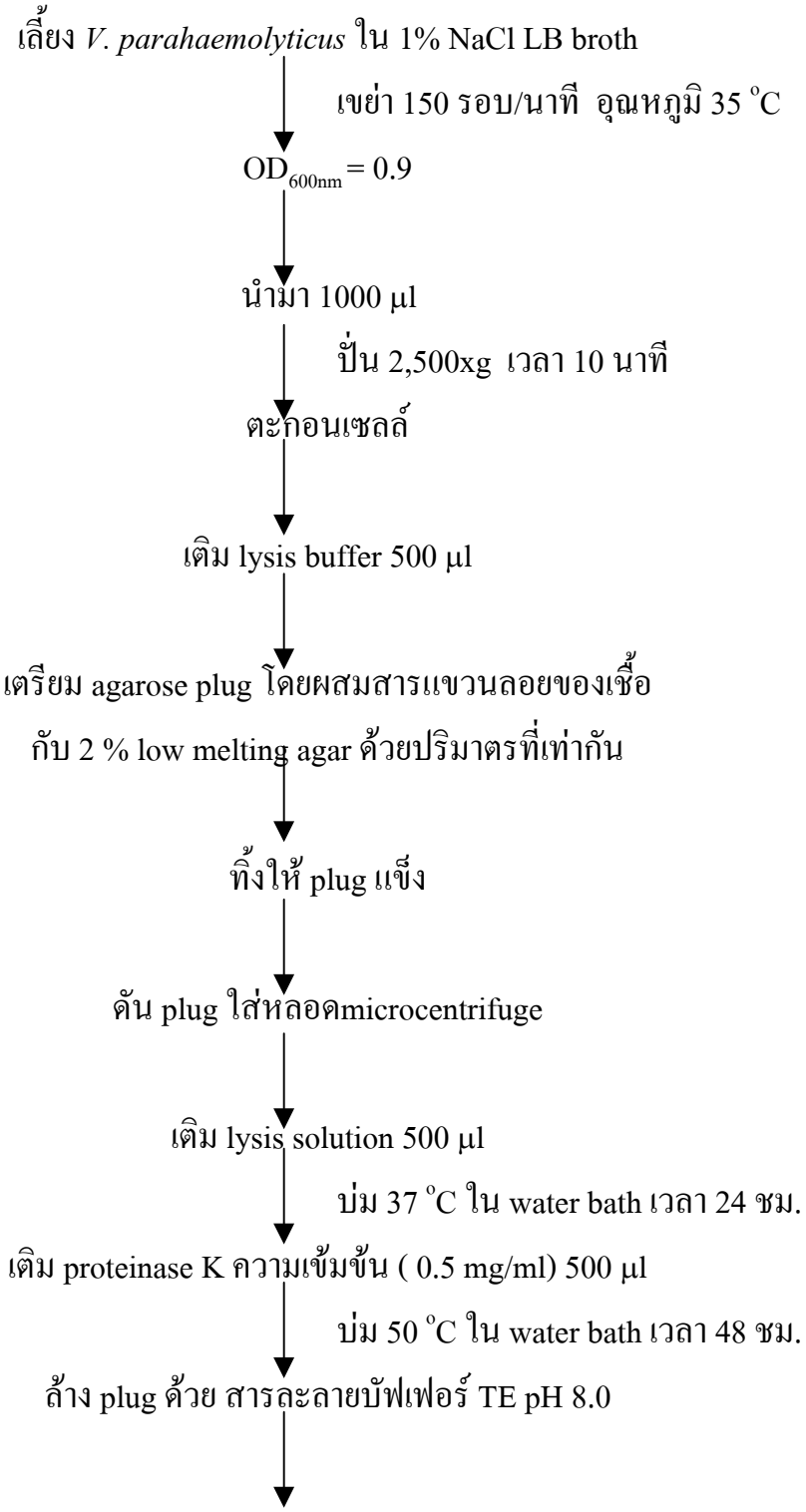
หมายเหตุ ลำดับเบสของ primer ดังตารางที่ 2.1

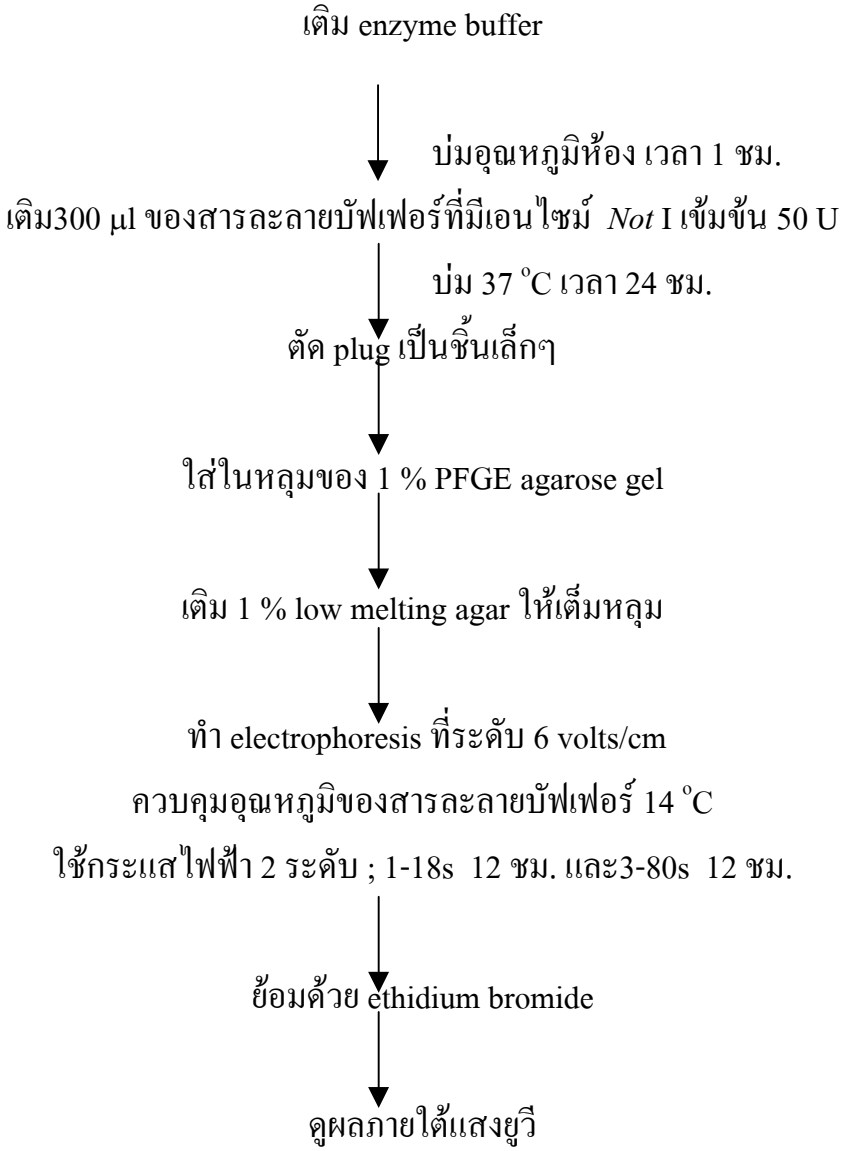
เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนทั้งหมด ทำการตรวจหา PCR product โดยการทำ electrophoresis โดยใช้ agarose 1.5% ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ในการทำ electrophoresis ผสมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR 15 ไมโครลิตร กับ loading dye 2 ไมโครลิตร หยอดใส่แผ่นวุ้น แล้วจึงเปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 16โวลต์ เมื่อสิ้นสุดการทำ electrophoresis นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วดูลักษณะการเกิดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

2.5.9.4 การทำ Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) (ดัดแปลงวิธีจาก Bag *et al*, 1999)

เลี้ยงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใน 1% NaCl LB broth เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 °C ประมาณ 18 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงใน LB broth หลอดใหม่ เขย่า 150 รอบ/นาทีที่อุณหภูมิ 35 °C จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ 0.9 จึงดูดเชื้อ 1,000 ไมโครลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม lysis buffer (ภาคผนวก 2ข) 500 ไมโครลิตร จากนั้นเตรียม agarose plug โดยผสมเชื้อกับ 2% low melting agarในน้ำกลั่น ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นเติม lysis solution (ภาคผนวก 10ข) เพื่อย่อยเซลล์ใน plug โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาเติม proteinase K 500 ไมโครลิตร(ความเข้มข้น 0.5 mg/ml) (ภาคผนวก 11ข) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 °Cในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้าง plug ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (pH 8.0) แล้วปรับสมดุลของ plug โดยเติมสารละลาย enzyme buffer วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม 300 ไมโครลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์ *Not* I เข้มข้น 50 U จำนวน 300ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °Cในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาตัด plug เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ใน 1 % PFGE agarose gel (ภาคผนวก 3ข) เติมส่วนที่เป็นช่องอากาศในหลุม gel ให้เต็มด้วย 1% low melting agar แล้วจึงทำ electrophoresis ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5xTBE ที่ระดับ 6 โวลต์ /เซนติเมตร และควบคุมอุณหภูมิ ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ 14 °C ใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับคือ กระแสไฟฟ้าสลับ 1-18วินาที 12 ชั่วโมง และ กระแสไฟฟ้าสลับ 3-80วินาที 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide และดูลักษณะของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี (แผนภูมิที่ 2.2)

แผนภูมิที่ 2.2 การศึกษาความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)




เติม enzyme buffer
บ่มอุณหภูมิห้อง เวลา 1 ชม.
เติม300 µl ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์ *Not* I เข้มข้น 50 U
บ่ม 37 °C เวลา 24 ชม.
ตัด plug เป็นชิ้นเล็กๆ
ใส่ในหลุมของ 1 % PFGE agarose gel
เติม 1 % low melting agar ให้เต็มหลุม
ทำ electrophoresis ที่ระดับ 6 volts/cm
ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายบัฟเฟอร์ 14 °C
ใช้กระแสไฟฟ้า 2 ระดับ ; 1-18s 12 ชม. และ3-80s 12 ชม.
ย้อมด้วย ethidium bromide
ดูผลภายใต้แสงยูวี

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสและขนาดผลผลิต PCR ของ primer

Gene(s)	Primers and seqences(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'	-	Pharmacia Biotech
Primer 4	'AAG AGC CCG T'	-	Pharmacia Biotech