ชื่อวิทยานิพนธ์	การบ่งชี้เชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี PCR โดยใช้จีน *gyrB* เป็นจีนเป้าหมาย
ผู้เขียน	นาย อรุณรัตน์ เพิ่ม
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2545

บทคัดย่อ

เชื้อ *Vibrio harveyi* เป็นแบคทีเรียใน family Vibrionaceae ติดสีแกรมลบรูปแท่ง เคลื่อนที่ได้ ต้องการเกลือในการเจริญ เป็นเชื้อชนิดหนึ่งในกลุ่ม luminous bacteria สามารถเรืองแสงหรือไม่เรืองแสงบนอาหาร nutrient agar ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (*Peaneus monodon*) ทำให้เกิดโรคเรืองแสง (luminous disease) และทำให้กุ้งตายภายใน 1-2 วัน ซึ่งเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคใช้วิธีเลี้ยงเชื้อแล้วทดสอบทางชีวเคมีซึ่งต้องใช้เวลานาน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์จะพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรค โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ซึ่งให้ผลรวดเร็วและแม่นยำกว่า โดยสกัดโครโมโซมจากเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์มาตรฐานแล้วใช้ UP-1 และ UP-2r ซึ่งเป็น universal primer เพิ่มชิ้นส่วนของจีน *gyrB* จากนั้นทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGem -T easy จะได้ recombinant DNA แล้วโคลนเข้าสู่ *Escherichia coli* 913 ที่เป็น competent cell บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เลือกโคโลนีที่มี recombinant DNA จากนั้นสกัดพลาสมิดทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 9 คู่ แต่ที่สามารถให้ผลในการตรวจที่จำเพาะดีที่สุด คือ A_2B_3 มีลำดับเบส forward เป็น 5′ TCTAACTATCCACCGCGG 3′ และ reverse เป็น 5′ AGCAATGCCATCTTCACGTTC 3′ เมื่อใช้ไพรเมอร์บ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่ามีความไวเท่ากับ 2 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้บ่งชี้เชื้อเรืองแสงที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารทะเลจำนวน 81 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่ให้ผล

ทดสอบชีวเคมีที่คาดว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* จำนวน 24 สายพันธุ์ ให้ผลบวก 22 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่แยกจากหอย 4 สายพันธุ์ ปลา 1 สายพันธุ์ และในกุ้ง 17 สายพันธุ์

Thesis Title	Identification of *Vibrio harveyi* by Polymerase Chain Reaction (PCR) Targets to the *gyrB* Gene
Author	Mr. Aroonrat Perm
Major Program	Microbiology
Academic Year	2002

Abstract

Vibrio harveyi is Gram negative bacteria belongs to family Vibrionaceae and require salt for growth. It is one of luminous bacteria. some strains exhibit luminescence on nutrient agar. *V. harveyi* is a causative agent of luminous disease in black tiger shrimps(*Penaus monodon*) which lead to death of shrimp within 1-2 days and cause disaster in shrimp cultivation industries. Nowadays identification of *V. harveyi* bases on biochemical test but it takes 2-3 days. Therefore, in this study, the rapid identification of *V. harveyi* was developed using PCR technique. Chromosomal DNA of standard strain of *V. harveyi* was extracted and *gyrB* gene was amplified by universal primers UP-1 and UP-2r. This gene was linked to pGem –T easy vector and cloned to *E. coli* 913. Recombinant *E. coli* were selected, their plasmid were purified and *gyrB* gene was sequenced. Nine pairs primers specific to *gyrB* gene were designed and evaluated. It was found that A_2B_3 primers which forward base sequence was 5'-TCTAACTATCCACCGCGG-3' and reverse base sequence was 5'-AGCAATGCCATCTTCACGTTC-3' was the most specific to *V. harveyi gyrB* gene. Sensitivity of this primers was 2×10^7 cells/ml. Identification of 81 strains luminous bacteria from seafood found that 24 strains gave positive to *V. harveyi* by biochemical test. However when confirmed by PCR technique, there was only 22 strains positive. They were from shell 4 strains, fish 1 strain and shrimp 17 strains.