ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB (Luria Bertani) Broth

ส่วนประกอบ

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ แบ่งใส่หลอด นำไป sterile ด้วยการ autoclave

2. LB (Luria Bertani) Agar

ส่วนประกอบ

Yeast extract	10	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ผสมส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นำไป sterile ด้วยการ autoclave เทใส่จานอาหารที่ปราศจากเชื้อ

3. Nutrient agar (NA)

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ชั่งส่วนประกอบทั้งหมดแล้วเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้ผสมเข้ากันดี แบ่งใส่หลอดๆละ 3.5 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ปล่อยให้อุณหภูมิ 45 - 50 องศาเซลเซียส เทใส่จานปราศจากเชื้อ

4. TCBS (Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose agar)

ส่วนประกอบ

Yeast extract	5	กรัม
Proteose peptone No .3	10	กรัม
Oxgall	5	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Saccharose	20	กรัม
Ferric citrate	10	กรัม
Sodium citrate	10	กรัม
Sodium thiosulfate	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ชั่ง TCBS agar 89 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด 1 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทใส่จานอาหารปราศจากเชื้อ

5. TSI (Triple sugar iron agar) + 2 % NaCl

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	15	กรัม
Protease peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Dextose	1	กรัม
Sucrose	10	กรัม
Ferrous sulfate	0.2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium thiosulfate	0.3	กรัม
Agar	12	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

การเตรียม: ชั่งอาหาร TSI 65 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย ใส่หลอดทดลองๆละ 3.5 มิลลิลิตร นำไป sterile ด้วยการ autoclave

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารละลาย

1) 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)

ชั่งผง 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside มา 20 มิลลิกรัม ละลายด้วย dimethylformamide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บในหลอดทึบแสง ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2) Isopropyl - β - D - thiogalactoside (IPTG)

ละลายสาร Isopropyl-β-D-thiogalactoside 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร จนละลายดีปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) สารละลายฟีนอลอิ่มตัว

เตรียมโดยการเอาฟีนอลมาหลอมละลายโดยการแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เติม hydro xy quinolone ซึ่งเป็นสารพวกแอนติออกซิแดนท์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติม Tris-HCl pH 8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตรเท่าตัว กวนอย่างแรงให้เข้ากัน นาน 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดเอาส่วนใสข้างบนทิ้ง แล้วเติม Tris-HCl pH 8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่ง pH ของฟีนอลมากกว่า 7.8 และเติม β-mercaptoethanol ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็น แล้วเติม Tris-HCl pH 8 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทับบนผิวของสารละลาย เก็บสารละลายฟีนอลอิ่มตัวที่ได้ในขวดทึบแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม เตรียมโดยเอาฟีนอลอิ่มตัวมาผสมกับคลอโรฟอร์มในปริมาตรเท่ากัน 1 : 1

4) Phosphate buffer solution

ส่วนประกอบ

$Na_2PO_4H_2O$	0.16	กรัม
$NaHPO_4.12H_2O$	1.98	กรัม
NaCl	8.10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ขั้นตอนการเตรียม :

ชั่งสารตามส่วนประกอบ ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5) Solution I (5 มิลลิลิตร)

ส่วนประกอบ

Lysozyme	10	มิลลิกรัม
0.5 M EDTA (pH 8)	100	ไมโครลิตร
1 M Tris (pH 8)	125	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	4.75	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม :

ชั่งเอนไซม์ lysozyme 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.75 มิลลิลิตร เติม 0.5 EDTA และ 1 M Tris ที่ปราศจากเชื้อละลายให้เข้ากัน
เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

6) Solution II (10 มิลลิลิตร)

ส่วนประกอบ

10 N NaOH	0.2	มิลลิลิตร
20 % SDS	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.3	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม :

เตรียมสารละลายที่เป็นองค์ประกอบแต่ละชนิดให้ปราศจากเชื้อแล้วผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7) Solution III (3M NaOAc)

ส่วนประกอบ

Sodium acetate.$3H_2O$	40.8	กรัม
Glacial acetic acid	-	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ขั้นตอนการเตรียม :

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 40.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 4.8 ด้วย กรดอะซิติกเข้มข้น ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave

8) สารละลาย IV (10 มิลลิลิตร)

ส่วนประกอบ :

3M NaOAc	0.33	มิลลิลิตร
1M Tris (pH 8)	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.2	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม :

เตรียมสารที่เป็นส่วนประกอบให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำส่วนประกอบแต่ละชนิดผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9) Transformation buffer pH 6.5

ส่วนประกอบ :

10 mM MOPS	0.209	กรัม
7.5 mM $CaCl_2$	0.823	กรัม
0.5 % glucose	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม :

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันดี ปรับ pH เท่ากับ 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

10) Tris borate buffer 10 x ; TBE

ชั่ง Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA pH 8.0 ลงไป 40 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เมื่อเวลาจะใช้ให้เจือจางในระดับความเข้มข้น 1 : 10

11) Tris EDTA (TE)

ผสมสารละลาย 10 mM Tris-HCl และสารละลาย 1 mM EDTA โดยการละลาย Tris-HCl จำนวน 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น และเติมสารละลาย 0.5 M EDTA ลงไป 1 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร sterile ด้วยการนึ่งด้วยหม้อความดันไอ

การเตรียมเอนไซม์

12) เอนไซม์ lysozyme (10 mg/ml)

ละลายผง lysozyme ในสารละลาย 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 10 mM โซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 mg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

13) เอนไซม์ Proteinase K (20 mg/ml)

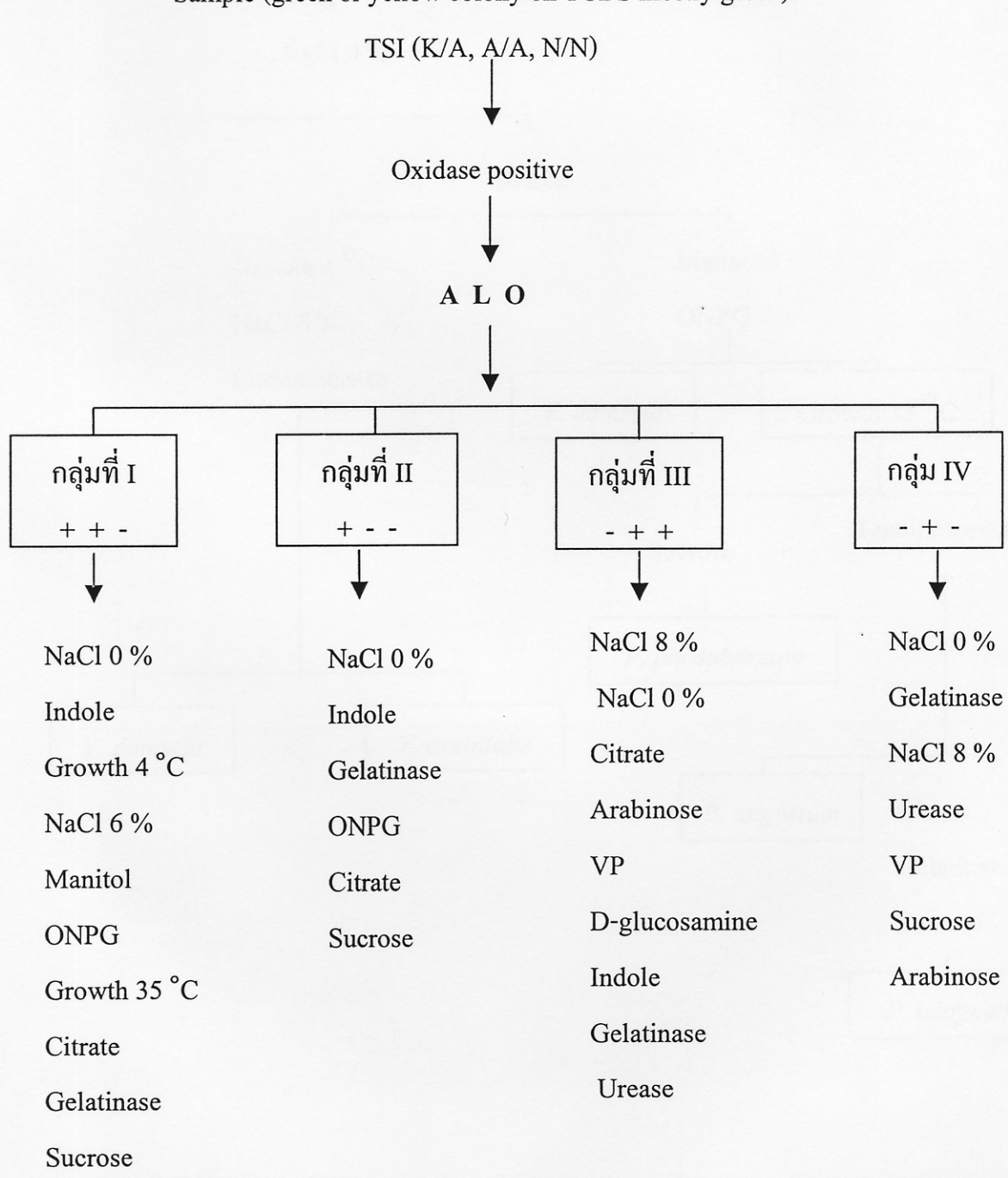
ละลายผง Proteinase K ในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 10 mM โซเดียมคลอไรด์ ให้ได้ความเข้มข้น 20 mg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

14) เอนไซม์ RNase (10 mg/ml)

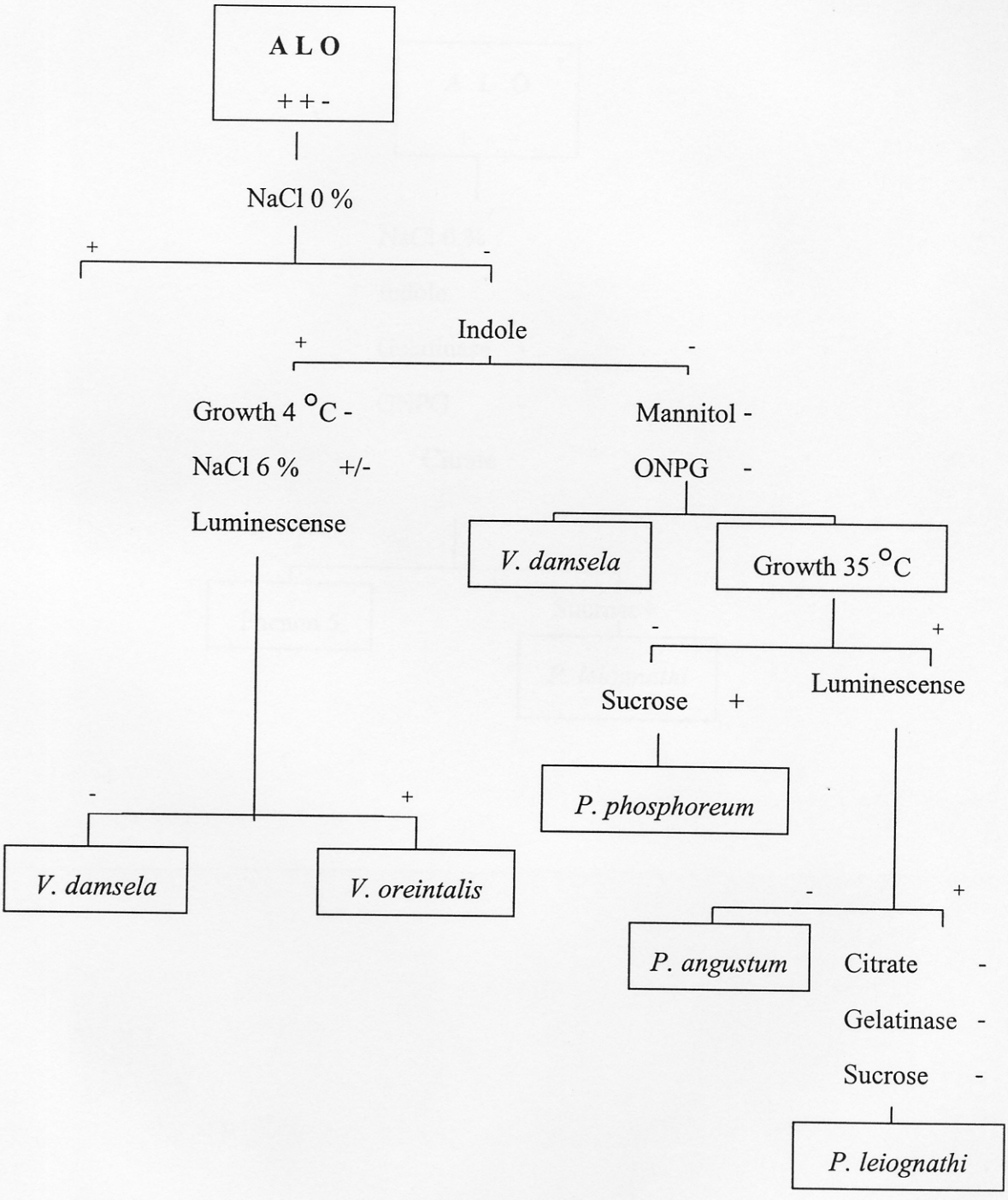
ชั่งเอนไซม์ RNase 100 mg มาละลายในสารละลายที่มี 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 15 mM โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 ml ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค.

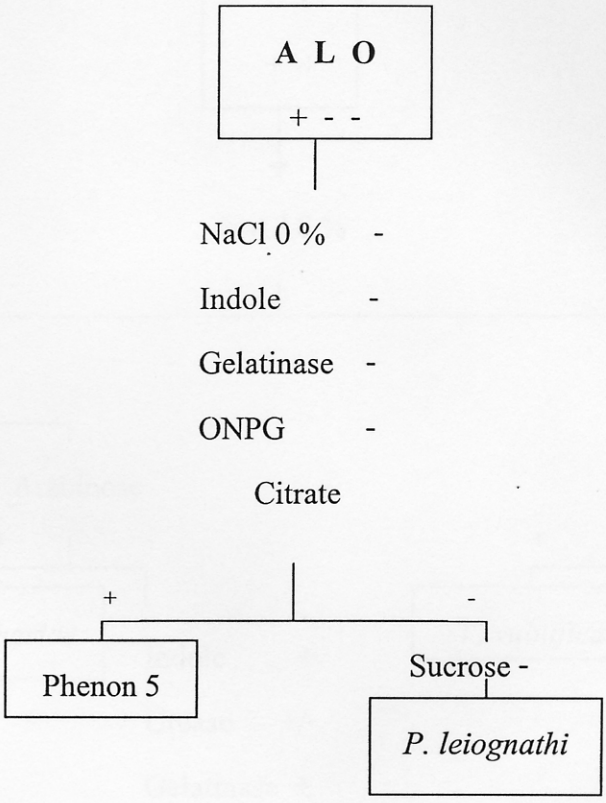
1) แผนผังการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* ดัดแปลงตามวิธีของ Baumann and Schubert (1984)



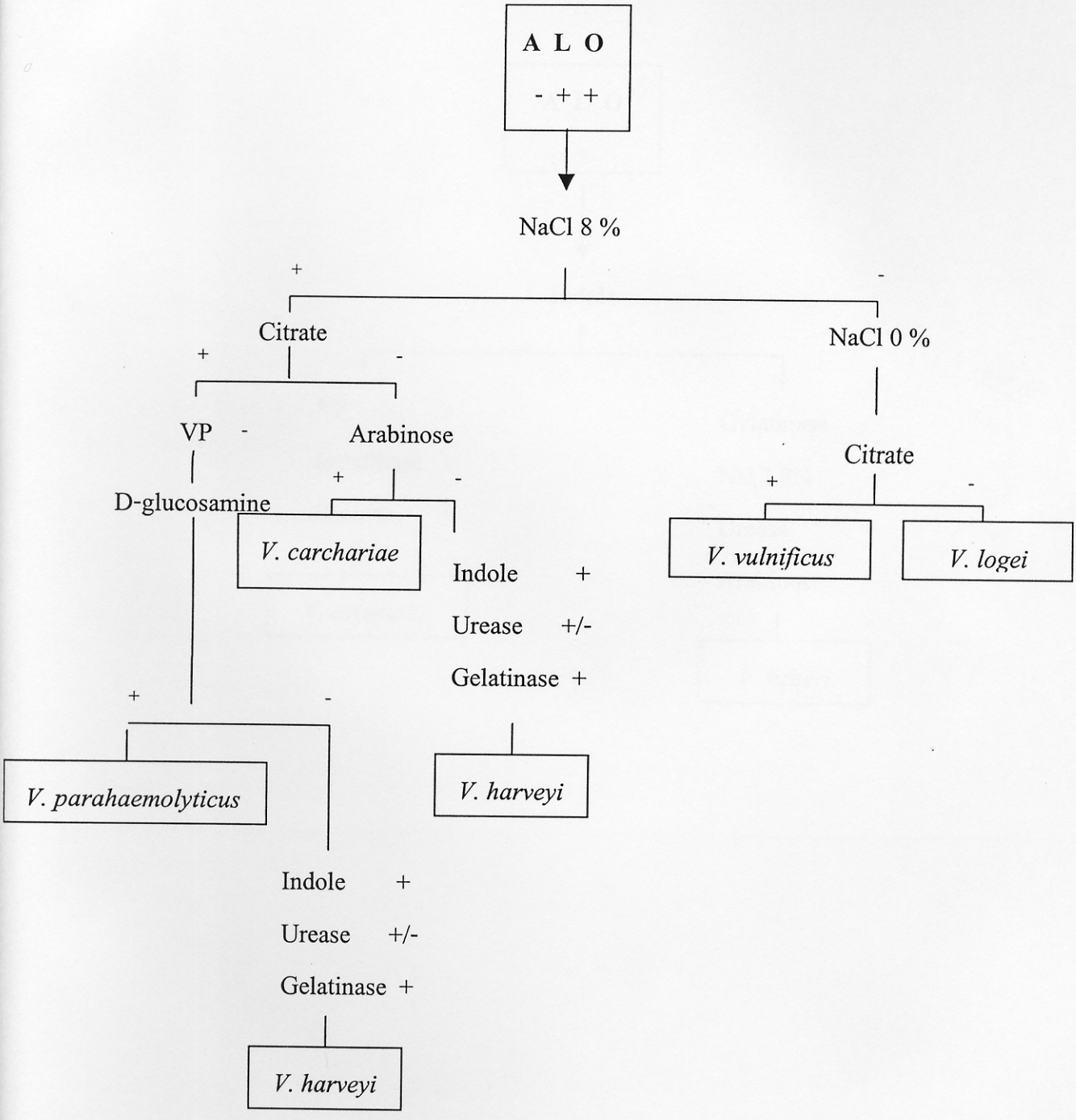
กลุ่มที่ I


A L O
+ + -
NaCl 0 %
+
-
Indole
+
-
Growth 4 °C -
NaCl 6 % +/-
Luminescense
Mannitol -
ONPG -
V. damsela
Growth 35 °C
-
+
Sucrose +
Luminescense
P. phosphoreum
-
+
V. damsela
V. oreintalis
-
+
P. angustum
Citrate -
Gelatinase -
Sucrose -
P. leiognathi

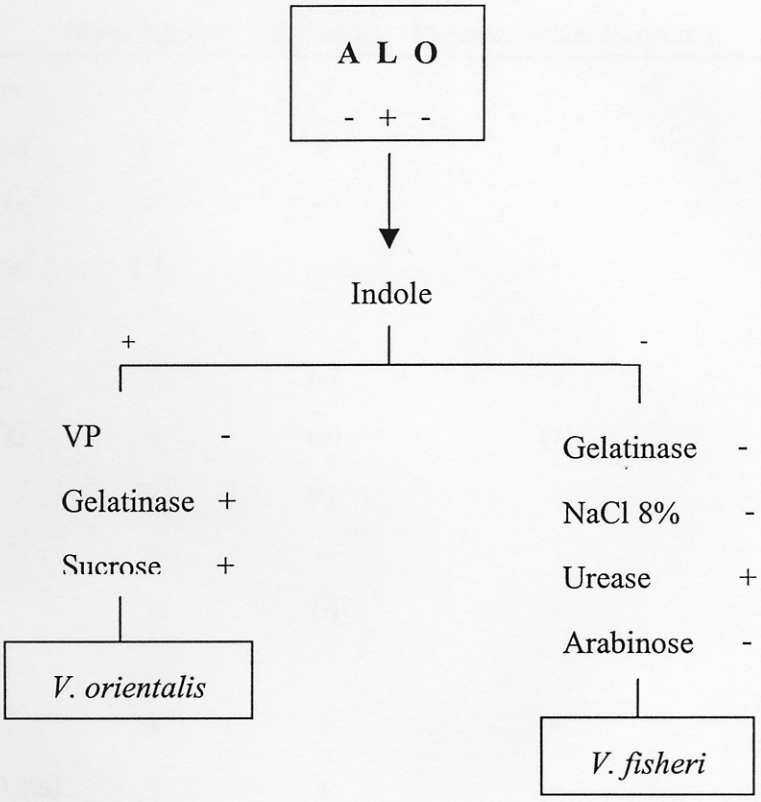
กลุ่มที่ II


A L O
+ - -
NaCl 0 %
-
Indole
-
Gelatinase
-
ONPG
-
Citrate
+
-
Phenon 5
Sucrose -
P. leiognathi

กลุ่มที่ III


A L O
- + +
NaCl 8 %
+
-
Citrate
NaCl 0 %
+
-
VP -
Arabinose
+
-
D-glucosamine
V. carchariae
Indole +
Urease +/-
Gelatinase +
Citrate
+
-
V. vulnificus
V. logei
+
-
V. parahaemolyticus
V. harveyi
Indole +
Urease +/-
Gelatinase +
V. harveyi

กลุ่มที่ IV


A L O
- + -
Indole
+
-
VP -
Gelatinase +
Sucrose +
V. orientalis
Gelatinase -
NaCl 8% -
Urease +
Arabinose -
V. fisheri

ตาราง ค.1 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* ดัดแปลงตามวิธีของ Reichelt and Baumann (1973)

Test[a]	*Vibrio harveyi*	*V. fischeri*	*Photobacterium leiognathi*	*P.phosphoreum*
Preliminary tests:				
Salt requirement[b]	+	+	+	+
Acid on Glucose[c]	+	+	+	+
Acid on Lactose[d]	(-)[e]	-	-	-
Diagnostic tests:				
Growth at 4 °C	-	(-)[f]	-	+
Growth at 35 °C	+	(+)	(+)	-
Amylase	+	(-)	-	-
Lipase	+	-	-	-
Gelatinase	+	(-)	-	-
Growth on:[g]				
Maltose (0.2%)	+	+	-	+
Cellubiose (0.2%)	+	+	-	-
Gluconate (0.1%)	+	(-)	+	+
Glucuronate (0.1%)	+	-	-	(-)
Mannitol (0.1%)	+	+	-	-
Proline (0.1%)	+	+	+	(-)
Lactate (0.2%)	+	-	+	(-)
Pyruvate (0.1%)	+	(+)	+	-
Acetate (0.05%)	+	(+)	+	-
Propionate (0.05%)	+	-	-	-
Heptanoate (0.05%)	+	-	-	-
L-tyrosine (0.4%)	+	-	-	-
Flagellation type[h]	SP Pr	SP	P	P
Polar flagella	1	2-8	1-3	1-3

ตาราง ค.1 (ต่อ)

Test[a]	*Vibrio harveyi*	*V.fischeri*	*Photobacterium leiognathi*	*P.phosphoreum*
PHB accumulated[i]	-	-	+	+
Gas from glucose	-	-	(-)	+

[a]Tests adapted from Reichelt and Baumann (1973).

[b]Absence of a salt requirement indicates a nonmarine form.

[c]Inability to ferment glucose suggests *Alteromonas* spp.

[d]Ability to ferment glucose suggests *V. vulnificus.*

[e]Some *V. harveyi* strains ferment lactose (Yang *et al.*,1983).

[f]Parentheses indicate that trait exhibits some variability.

[g]Numbers indicate amount of carbon source used.

[h]S, sheated flagella; P, polar flagella; Pr, peritrichous flagella; SP Pr, either type possible.

[i]PHB = poly-beta-hydroxybutyric acid formed when grown on glucose.

ตาราง ค.2 ผลการบ่งชี้เชื้อ*V. harveyi* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยอาศัยไพรเมอร์ A_2B_3 และสภาวะที่เหมาะสม

สายพันธุ์	oxidase	L-tyrosine	Arginine	Lysine dec	Ornithin	NaCl 8%	NaCl 0%	Citrate	Vp	Arabinose	Indole	Urea	Gelatinese	Sucrose	Manitol	Mannose	Sorbitol	inositol	PCR
A10	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
A12	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
A27	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
A29	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
A31	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
A32	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
A21	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
B11	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
B16	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
C3702	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C4101	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C4203	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C4302	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C4401	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C4502	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C4902	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C5105	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C5206	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C5401	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C5505	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-

ตาราง ค.2 (ต่อ)

สายพันธุ์	oxidase	Ltyrosin	Arginine	Lysine	Ornithin	NaCl 8%	NaCl 0%	Citrate	Vp	Arabinos	Indole	Urea	Gelatines	Sucrose	Manitol	Mannose	Sorbitol	inositol	PCR
C5702	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C6002	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C6504	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C6900	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C7003	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C7101	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C7205	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C7306	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C7403	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C1.01	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C2.02	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C3.02	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C4.03	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C9.02	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C10.07	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C11.02	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
C14.00	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C15.03	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C17.01	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C19.02	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C20.04	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-

A = ตัวอย่างหอย B = ตัวอย่างปลา C = ตัวอย่างกุ้ง