บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 จุลินทรีย์

ลำดับ	ชนิด	สายพันธุ์
1	*Vibrio harveyi*	NICA1416
2	*Vibrio damsela*	RIMD2222001
3	*Vibrio fluvialis*	RIMD2220002
4	*Vibrio furnisii*	RIMD2223001
5	*Vibrio metschnikovii*	RIMD2208006
6	*Vibrio mimicus*	RIMD2218001
7	*Vibrio vulnificus*	RIMD2219009
8	*Vibrio aestuarianus*	ATCC35048
9	*Vibrio campbellii*	ATCC25920
10	*Vibrio carchariae*	ATCC35084
11	*Vibrio cincinnatiensis*	ATCC35912
12	*Vibrio diazotrophicus*	ATCC33466
13	*Vibrio mytilii*	ATCC51288
14	*Vibrio orientalis*	ATCC33934
15	*Vibrio pelagius*	ATCC25916
16	*Vibrio splendidus*	ATCC33125
17	*Vibrio tubiashii*	ATCC19109
18	*Vibrio ichthyoenteri*	IFO15847

ต่อ

ลำดับ	ชนิด	สายพันธุ์
19	*Vibrio penaeicida*	IFO15640
20	*Vibrio anguillarum*	PT87050
21	*Vibrio alginolyticus*	219
22	*Vibrio cholerae O1*	2126 NIH
23	*Vibrio cholerae O139*	MO45
24	*Vibrio cholerae nonO1*	AM2
25	*Vibrio parahaemolyticus*	2019
26	*Vibrio proteolyticus*	NCMB1326
27	*Aeromonas hydrophila*	KX-A428
28	*Escherichai coli*	MC1016
29	*Shigella flexneri*	KX-H287
30	*Shigella boydii*	KX-H259
31	*Staphylococcus aureus*	ATCC25923

2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัท
Bacto lysine decarboxylase broth	Difco
Bacto peptone	Difco
Beef extract	Difco
Decarboxylase broth base	Difco
L- Arabinose	Sigma
Marine agar	Sigma
Nutrient agar	Difco
Phenol red broth base	Difco
Sucrose	Difco
TSI agar	Difco
TCBS agar	Difco
Luria Bertani agar (LB)	Difco
สารเคมี	**บริษัท**
Ampicillin	Sigma
Ammonium acetate	Merck
Glycerol	Merck
Blue dextran	Sigma
Boric acid	Merck
Calcium chloride	Merck
Chloroform	Merck
EDTA	Merck

สารเคมี	บริษัท
Absolute ethanol	Merck
IPTG (isopropyl β - D-thiogalactoside)	Sigma
Isopropanol	Sigma
Magnesium chloride	Merck
Methyl red	Merck
Phenol	Merck
Sodium citrate	Merck
Sodium chloride	Merck
Tetracycline	Sigma
Tris (hydroxylmethyl) aminomethane	Promega
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β - D-galactoside)	Merck
Tween 20	Merck

2.1.3 เกรดอณูชีววิทยา (molecular biological grade)

สารเคมี	บริษัท
Agarose	Gibco, USA.
QIAGEN II gel extraction kit	QIAGEN
DNA Sequening Kit	Perkin Elmer
เอนไซม์โปรตีนเอส เค (proteinase K)	Sigma
เอนไซม์ไลเกส (lygase)	Sigma
เอนไซม์ตัดดีเอนเอจำเพาะ(restriction endonucleases) *Not* I	Bio-rad
เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme)	Sigma

ต่อ

สารเคมี	บริษัท
พลาสมิด พีเจ็ม ที	Promega
เอนไซม์ อาร์เอนเนส (RNase)	Merck
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer Mannheim
ไพรเมอร์ (primers)	Gibthai
Taq DNA polymerase	Boehringer Mannheim
Ethidium bromide	Sigma
Magnesium chloride buffer	Boehringer Mannheim

2.1.4 อาหารทะเล

กุ้งซื้อจากตลาดสดพลาซ่า ตลาดสดกิมหยง ตลาดสดเก้าเส้ง และเก็บจากบ่อเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรในจังหวัดสงขลา และสตูล ปลา กั้ง หอย ซื้อจากตลาดสดพลาซ่า ตลาดสดกิมหยง และ ตลาดสดเก้าเส้ง จังหวัดสงขลา

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)
- Centrifuge รุ่น H-103N (Kokusan, Japan)
- เครื่องผสม (Touch mixer) รุ่น 232 (Fisher Scientific, USA)

- เครื่องชั่ง4 ตำแหน่ง (Denver Instrument Company, USA)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น 200/2.0 (Bio-RAD, USA)
- เครื่อง UV light translluminator (UVP) (San Gabriel, Inc USA)
- เครื่องสังเคราะห์ดีเอนเอ (PCR Gene Amp) PCR system 2400 (Perkin Elmer, USA)
- ตู้เย็นแช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- กล้องถ่ายรูปโพลารอยด์ Spectroline CH-1314 (Spectronics corporation, USA)
- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline instrument, Inc USA)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)
- เครื่องหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอนเอแบบอัตโนมัติ รุ่น 377 (ABI Applied-Biosystem, USA)
- ไมโครปิเปตอัตโนมัติ (Automatic micropipette) (Gilson, Eppendorf)
- ตู้แช่แข็ง –20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส (Bio-RAD, USA)
- เครื่อง Gel Documentation

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi*

2.3.1.1 การเตรียมแบคทีเรีย

เชื้อ *V. harveyi* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์กุ้งสงขลาที่แยกจากตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรคเรืองแสงในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา นำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง TCBS agar (ภาคผนวก 4 ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวจากนั้น นำมาเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ (subculture) ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก 3ก) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ในหลอดฝาเกลียว ทดสอบคุณ

สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเพื่อยืนยันอีกครั้งดัดแปลงตามวิธีของ Baumann and Schubert (1984) และ (Reichelt and Baumann (1973) (ภาคผนวก ค)

2.3.1.2 การสกัด ดีเอนเอดัดแปลงตาม Sambrook และคณะ (1989) ดังนี้

นำเซลล์ *V. harveyi* สายพันธุ์มาตรฐานโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี บนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก 2ก) มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก 1ก) 5 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์โดยถ่ายน้ำเลี้ยงเซลล์ 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร เขย่าเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาทำเป็นสารละลายแขวนลอยโดยเติมสารละลายฟอสเฟส-บัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline) (ภาคผนวก 4ข) จากนั้นถ่ายเชื้อมาใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 x g เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS : EDTA (9 :1) ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย SDS (sodium dodecyl sulfate) ร้อยละ 10 จำนวน 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อย่อยผนังเซลล์และทำให้เซลล์แตก จากนั้นเติมสารละลาย Phenol - Chloroform ที่อิ่มตัว (ภาคผนวก 3ข) (1 : 1 ; ปริมาตรต่อปริมาตร) 450 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยเขย่าอย่างแรง (vortex) เป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 x g นาน 3 นาที เพื่อแยกโปรตีน ดูดเอาเฉพาะส่วนใสตอนบนถ่ายไปใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ใหม่ เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ 40 ไมโครลิตร จากนั้นตกตะกอนดีเอนเอด้วยเอทธานอลร้อยละ 95 จำนวน 1 มิลลิลิตร จะมองเห็นตะกอนสีขาวในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมเอทธานอลร้อยละ 70 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g ดูดส่วนใสทิ้ง เติมเอทธานอลร้อยละ 95 จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ทำให้แห้งโดยการวางไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือวางไว้ในตู้ดูดความชื้นจนตะกอนดีเอนเอแห้งสนิท ละลายตะกอนดีเอนเอด้วยสารละลาย Tris-EDTA (TE) บัฟเฟอร์ (ภาคผนวก 11ข) จากนั้นทำลายอาร์เอนเอด้วยการเติมเอนไซม์อาร์เอนเอส (ภาคผนวก 14ข) (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ใน TE บัฟเฟอร์ พีเอช 8 อัตรา 1 ต่อ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วสกัดดีเอนเอซ้ำอีกครั้งจากขั้นตอนการเติมสารละลาย Phenol -Chloroform ที่อิ่มตัวเป็นต้นมาถึงขั้นตอนทำให้แห้งโดยการวางไว้ที่อุณหภูมิห้องหรือวางไว้ในตู้ดูดความชื้นจนตะกอนดีเอนเอแห้งสนิท จากนั้นละลายดีเอนเอด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ 30 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์อาร์เอนเอส นำไปวัดความเข้มข้นของดีเอนเอที่ได้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.1.3 การวัดหาปริมาตรและคุณภาพของดีเอนเอ ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry)

วิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอโดยนำสารละลายดีเอนเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.1.2 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1:100 แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) คำนวณหาปริมาณดีเอนเอโดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ที่ได้ เทียบกับค่าการหาปริมาณดีเอนเอมาตรฐานของดีเอนเอสายคู่ (ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1 จะมีความเข้มข้นของดีเอนเอสายคู่เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) วิเคราะห์คุณภาพของดีเอนเอโดยนำสารละลายดีเอนเอไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (OD_{260}/OD_{280}) ถ้าค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 1.65-1.85 แสดงว่าดีเอนเอที่สกัดได้บริสุทธิ์

2.3.1.4 การเพิ่มจำนวนจีน *gyrB*

ทำการเพิ่มจำนวนจีน *gyrB* จากโครโมโซมของเชื้อ *V. harveyi* ที่เตรียมได้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ UP-1 และ UP-2r (Yamamoto and Harayama., 1995) มีส่วนประกอบและสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ดังนี้คือ

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. Distilled water (MilliQ) sterile	7	-
2.PCR buffer(10x)	2	1x
3.$MgCl_2$ (25 mM)	2	2.5 mM
4.dNTP (2.5 mM)	2	0.25 mM
5.Taq DNA polymerase (5 U/μl)	1	0.25 U
6.UP-1 10μmol	2	1000 nmol
7.UP-2r 10μmol	2	1000 nmol
8.chlomosomalDNA template	2	50 ng
ปริมาตรทั้งหมด	20	

สภาวะอุณหภูมิและเวลาการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

- แยกสายดีเอนเอครั้งแรก	96 °C 5 นาที	1 รอบ
- แยกสายคู่ของดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว (Denaturation)	94 °C 1นาที	30 รอบ
- ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอนเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (Annealing)	60 °C 1 นาที	
- สร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ (Extension)	72 °C 1 นาที	
- สร้างสายดีเอนเอสายใหม่ขั้นสุดท้ายให้สมบูรณ์	72 °C 7 นาที	1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้มาตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอริซิสในบัฟเฟอร์ 1x Tris borate buffer (TBE) (ภาคผนวก 10ข) หลังจากนั้นตัดเอาเฉพาะแผ่นวุ้นที่มีชิ้นส่วนของจีน *gyrB* มาสกัดดีเอนเอโดยวิธีของ QIAGEN โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ QX_I ต่อปริมาณดีเอนเอ (ในวุ้น) อัตราส่วน 3 : 1 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ของวุ้นที่ชั่งได้แล้วผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 20 วินาที เติม QIAEX II (Q bead reagent exchange) ปริมาณ 30 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 5,000x g นาน 30 วินาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอน 1 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ QX_I แล้วล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PE ทำให้ตะกอนแห้งจากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรง 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วดูดเอาสารละลายดีเอนเอส่วนบนที่ต้องการ แล้วนำมาวัดหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอนเอที่ได้เช่นเดียวกับใน ข้อ 2.3.1.3

2.3.2 การโคลนจีน *gyrB* เข้าสู่ *Escherichia coli* 913

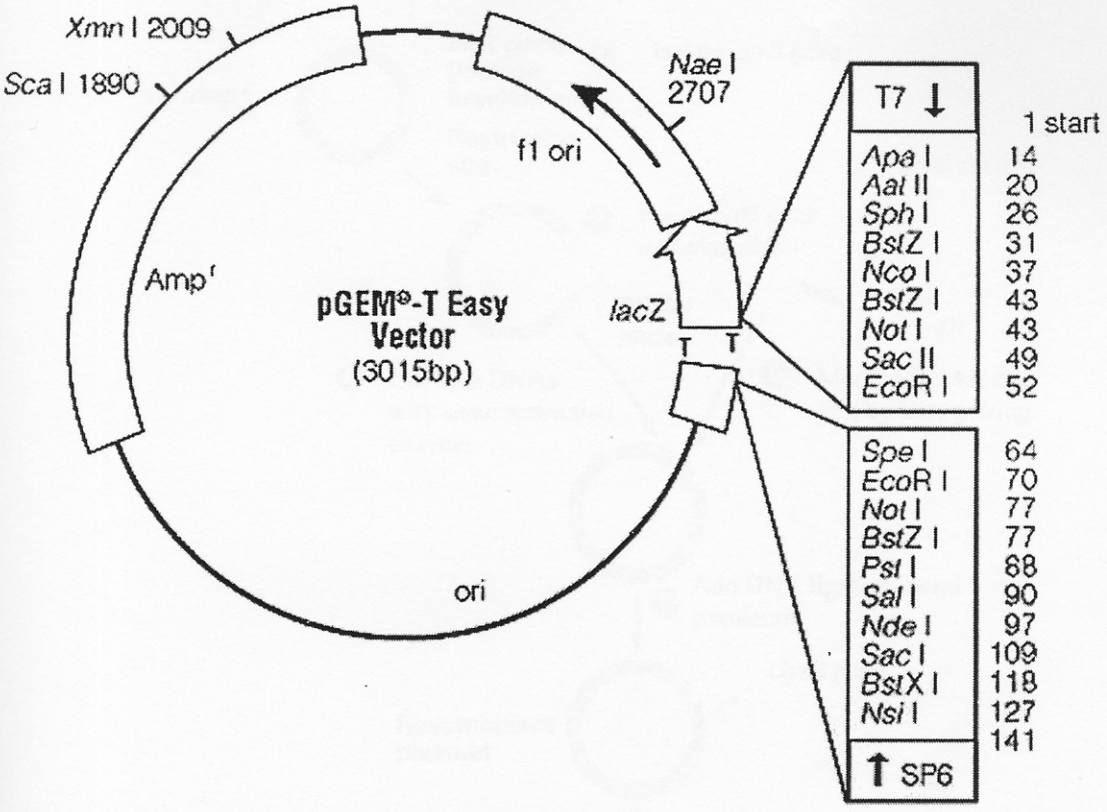
2.3.2.1 การเตรียมเซลล์ *E. coli* 913 ให้อยู่ในสภาพพร้อมที่จะรับดีเอนเอจากภายนอกเซลล์

นำ *E. coli* สายพันธุ์ 913 จากโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี บนอาหารแข็ง LB ที่เลี้ยงไว้ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถ่ายลงเลี้ยงในอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร เขย่าเซลล์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ (subculture) โดยถ่ายน้ำเลี้ยงเซลล์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว LB 10 มิลลิลิตร เขย่าเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที นำน้ำเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาทำเป็นสารละลายแขวนลอยใน transformation buffer (ภาคผนวก 9ข) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 20 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนเซลล์มาละลายด้วย transformation buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส ในอัตราส่วน 1:20 ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ *E. coli* ที่พร้อมจะรับดีเอนเอจากภายนอกเซลล์ (competent *E. coli*)

2.3.2.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนจีน *gyrB* กับเวคเตอร์

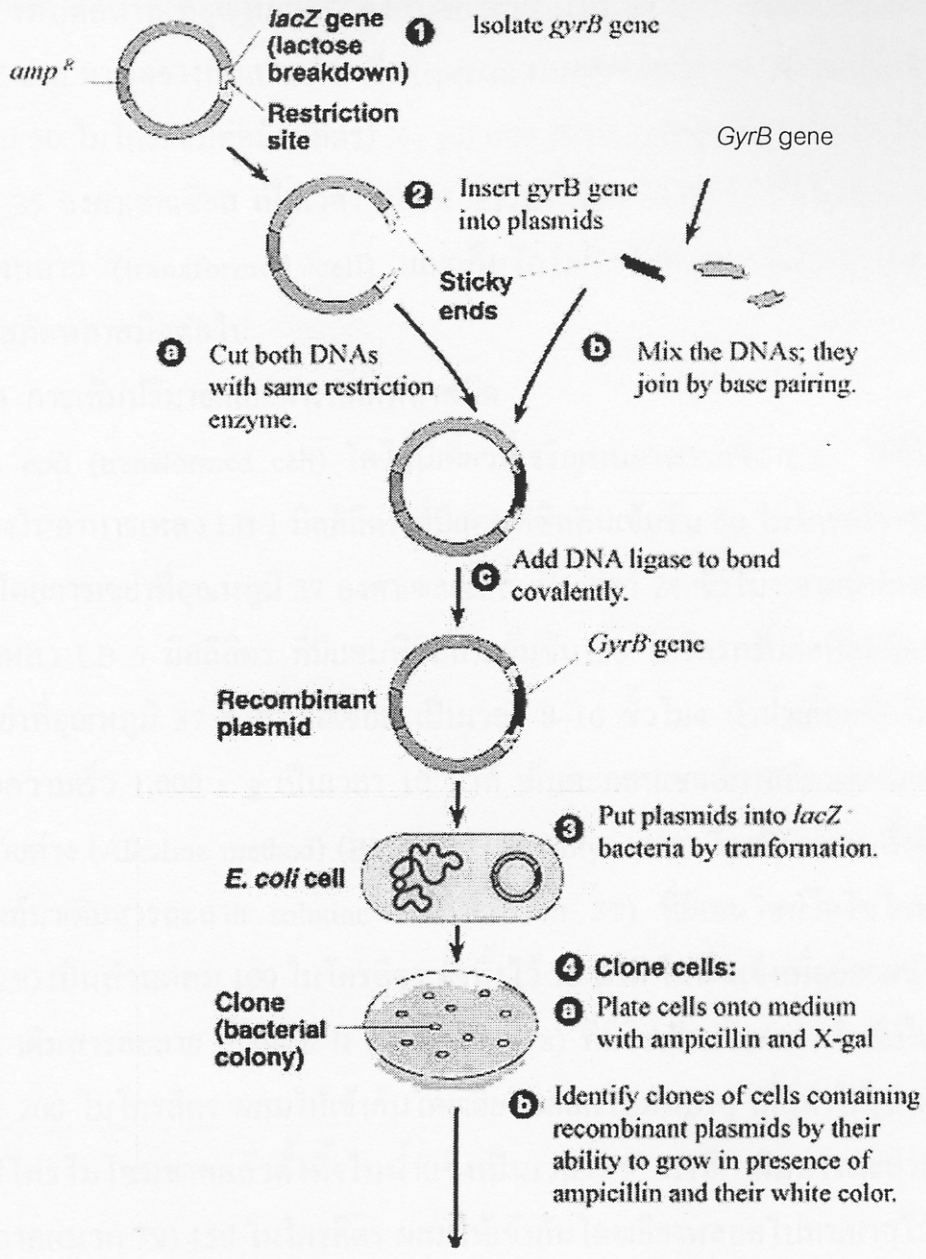
นำเวคเตอร์ พี เจ็ม ที อีซี (pGEM® -T easy) ที่เป็นพลาสมิดขนาด 3 กิโลเบส (Kb) (ภาพประกอบ2.1) ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มา 1 ไมโครลิตร เติม 10x บัพเฟอร์ 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ ไลเกส (ligase) 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมจีน *gyrB* ความเข้มข้น 0.9 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 7 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จีน *gyrB* จะเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ เรียกว่า รีคอมบิแนนท์ ดีเอนเอ (recombinant DNA) (ภาพประกอบ 2.2) เนื่องจากพลาสมิด พี เจ็ม ที อีซี (pGEM®-T easy) มีโปรโมเตอร์ของ T7 และ SP6 ขนาบข้างด้วย multiple cloning site ซึ่งมีจีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ β- galactosidase (*lacZ*) เมื่อมีการสอดแทรกดีเอนเอเข้าไปทำให้ส่วนของจีน *lacZ* ถูกแยกออกจากกัน เกิด insertional inactivation ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมกับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเดิมออกจากกันได้ โดยตรวจสอบจากกิจกรรมของเอนไซม์ β - galactosidase เมื่อนำ พลาสมิดถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับแล้วนำเซลล์นั้นมาเลี้ยงในอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและเติมสาร IPTG (isopropyl β - D-thiogalactoside) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ β– galactosidase (inducer) พร้อมกับเติมสาร X- gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β - D-galactoside) ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์นี้ลงไปด้วย เซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญขึ้นได้ ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเดิมจะเจริญขึ้นได้ และผลิตเอนไซม์ β- galactosidase ที่มีกิจกรรมได้ จะทำให้มีกิจกรรมการย่อยสาร X-gal เกิดเป็นสารสีฟ้า จึงทำให้โคโลนีมีสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มีจีน *gyrB* แทรกอยู่จะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ไม่สามารถจะย่อยสาร X- gal ได้โคโลนีจึงไม่เกิดสี



ภาพประกอบ 2.1 พลาสมิดดีเอนเอ พี เจ็ม ที อีซี (pGem®-T easy)
ที่มา : (http://.www.promega.com)

2.3.2.3 การถ่ายโอนพลาสมิดดีเอนเอ (recombinant plasmid DNA) เข้าสู่ competent cell *E. coli* 913

นำ competent cell *E. coli* 200 ไมโครลิตร จากข้อ 2.3.2.1 มาผสมกับรีคอมบิแนนท์ (recombinant plasmid DNA) ในข้อ 2.3.2.2 ประมาณ 10 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปเพิ่มอุณหภูมิเป็นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส อย่างรวดเร็ว (heat shock) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงทันทีโดยวางในน้ำแข็ง 5–10 นาที เติมอาหารเหลว LB 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มโดยการเขย่า



ภาพประกอบ 2.2 ขั้นตอนการโคลนดีเอนเอ *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi*

ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำเชื้อ *E. coli* มาเจือจางสิบเท่าแล้วเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็ง LB ที่ผสมแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) X– gal และ IPTG (ภาคผนวก 1ข และ 2ข) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12–24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีไม่มีสีที่เจริญบนอาหารแข็งดังกล่าว (transformed cell) และเก็บโคโลนีไว้เพื่อทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดแล้วสกัดพลาสมิดต่อไป

2.3.2.4 การเพิ่มปริมาณและการสกัดพลาสมิด

นำ *E. coli* (transformed cell) โคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ในข้อ 2.3.2.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB 1 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8–16 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดโดยวิธีสกัดด้วยด่าง (Alkaline method) (Birnboim and Doly, 1979) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำตะกอนเซลล์มาเติมสารละลาย solution I (ภาคผนวก 5ข) ที่มีเอนไซม์ไลโซไซม์ (ภาคผนวก 12ข) เป็นส่วนผสม 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ในน้ำแข็งเพื่อย่อยผนังเซลล์ จากนั้น เติมสารละลาย solution II (ภาคผนวก 6ข) ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นส่วนประกอบ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเอียงหลอดไปมาเบาๆ เพื่อทำให้เซลล์แตกแต่ไม่ให้โครโมโซมขาดแล้วตั้งทิ้งในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย solution III (ภาคผนวก 7ข) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเอียงหลอดไปมาเบาๆให้โครโมโซมดีเอนเอจับตัวเป็นก้อนตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเวลา 15-60 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยไมโครเซนติฟิวจ์ความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ (ได้ประมาณ 400 ไมโครลิตร) เติมเอทธานอลร้อยละ 95 เพื่อตกตะกอนดีเอนเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมสารละลาย solution IV (ภาคผนวก 8ข) 100 ไมโครลิตร และเติมเอทธานอลร้อยละ 70 เพื่อตะกอนดีเอนเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเติมสารละลายเอทธานอลร้อยละ 95 เพื่อตกตะกอน และล้างตะกอนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้หมดแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งสนิท จากนั้นละลายตะกอนดีเอนเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8 เติมเอนไซม์อาร์เอนเอสความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อย่อยอาร์เอนเอ จากนั้นนำพลาสมิดดีเอนเอที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในที่นี้ใช้เอนไซม์ *Not* I ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส เพื่อยืนยันว่าจีน *gyrB* สามารถเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ได้จริง

2.3.3 การหาลำดับดีเอนเอของจีน *gyrB* (DNA sequencing)

2.3.3.1 การทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิดดีเอนเอที่สกัดได้จากข้อ 2.3.2.4 ที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาจำนวน 20 ไมโครลิตร เติม 1 ไมโครลิตร ของเอนไซม์อาร์เอนเอสความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เติมสารละลาย 2.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ กับ 20 เปอร์เซ็นต์ polyethylene glycol ในปริมาตรจำนวน 0.6 เท่าของสารละลายดีเอนเอ ผสมเบาๆ ให้เข้ากันดี บ่มในน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้งจากนั้นละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์

2.3.3.2 การหาลำดับนิวคลิโอไทด์

นำพลาสมิดดีเอนเอที่ตกตะกอนได้ในข้อ 2.3.3.1 มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส กับไพรเมอร์ T7 หรือ SP6 โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (µl)
BigDye terminator ready reaction mix	4
DNA template	5
T7 primer หรือ SP6 primer*	1
ปริมาตรทั้งหมด	10

* ทำแยกหลอดกัน

สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดได้แก่

- แยกสายดีเอนเอครั้งแรก 96°C 1 นาที 1 รอบ
- แยกสายคู่ของดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว (Denaturation) 96°C 30 วินาที
- ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอนเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (Annealing) 50°C 15 วินาที
- สร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ (Extension) 60°C 4 นาที

(- แยกสายดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว ... - สร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′) 25 รอบ

- สร้างสายดีเอนเอสายใหม่ขั้นสุดท้ายให้สมบูรณ์ 72°C 7 นาที 1 รอบ

ตกตะกอนพลาสมิดด้วยไอโซโพรพานอลที่เย็น (isopropanol) ร้อยละ 70 ทิ้งให้แห้ง เติม loading buffer (deionized formamide: blue dextran; 5 : 1) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้ว

จุ่มหลอดในน้ำแข็งทันที จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์บนแผ่น polyacrylamide gel ที่มียูเรียผสมอยู่ โดยใช้เครื่อง Applied Biosystems 377 DNA Automatic Sequencer ทำหน้าที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ นำลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ในครั้งแรกมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อที่จะใช้ในการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของจีน *gyrB* ตลอดทั้งจีน โดยใช้ซอฟแวร์ DNAsis และ โปรแกรม Oligo primer 4.0

2.3.4 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi*

นำลำดับนิวคลิโอไทด์ทั้งหมดของจีน *gyrB* ของเชื้อ *V. harveyi* มาเปรียบเทียบกับจีน *gyrB* ของเชื้อ Vibrio ชนิดอื่นๆ ในธนาคารจีน (Gene Bank) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้ซอฟแวร์ DNAsis ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้กับ เชื้อ *V. harveyi* *Vibrio* spp. และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบในอาหารเหลว LB ที่เติมเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดดีเอนเอ โดยวิธีการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ความเร็ว 5,000 x g นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสมาเจือจาง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นทำการตรวจสอบโดยเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยมีส่วนประกอบและสภาวะของการทำปฏิกิริยาดังนี้

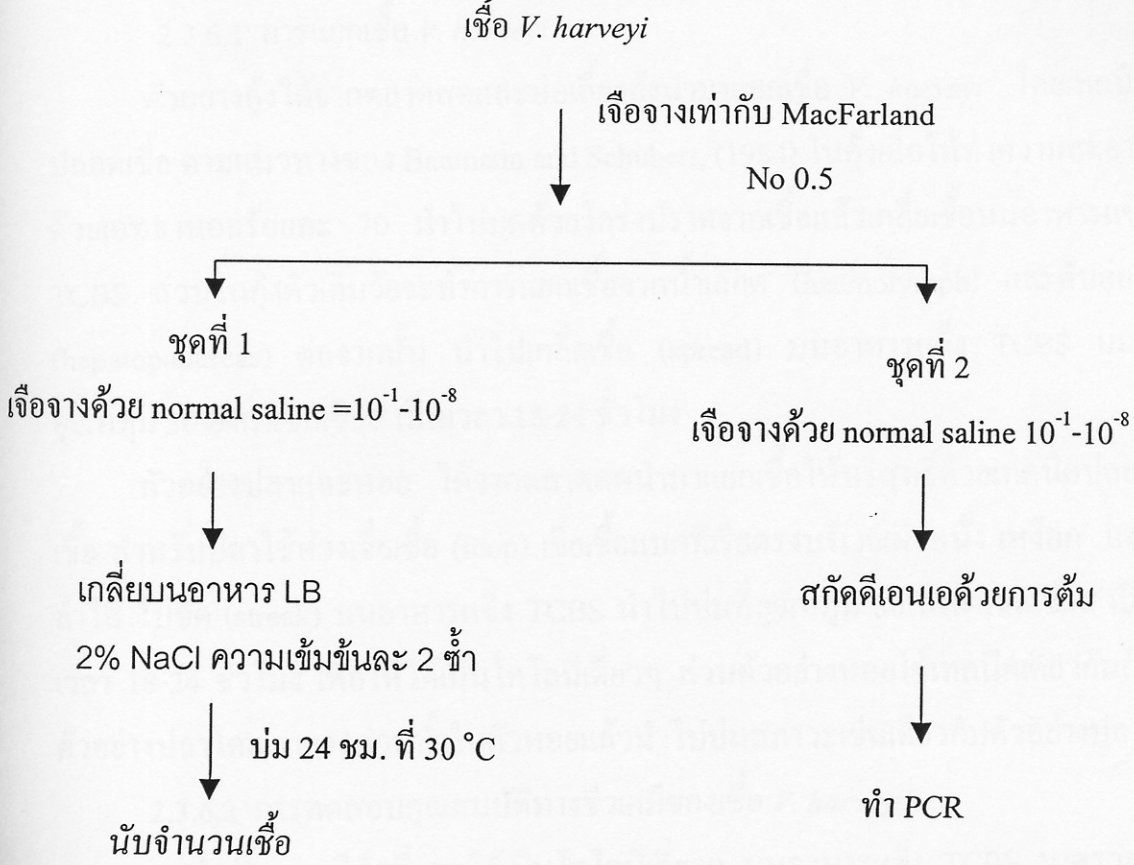
ส่วนประกอบ	*ปริมาตร (µl)*	*ความเข้มข้นสุดท้าย*
1.Milli Q water	8.2	-
2. 10X PCR buffer	2	1x
3.$MgCl_2$ (25 mM)	1.6	2 mM
4.dNTP (2.5 mM)	1.6	0.2 mM
5.Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0.1	0.025 U
6. 2 µmol primer (forward)	2.5	250 nmol
7. 2 µmol primer (reverse)	2.5	250 nmol
8. DNA	1.5	-
ปริมาตรทั้งหมด	20	

สภาวะอุณหภูมิและเวลาการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

- แยกสายดีเอนเอครั้งแรก	96 °C 5 นาที 1 รอบ	
- แยกสายคู่ของดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว (Denaturation)	94 °C 1 นาที	30 รอบ
- ลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอนเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม (Annealing)	63 °C 1 นาที	
- สร้างดีเอนเอสายใหม่ต่อออกจากไพรเมอร์ในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ (Extension)	72 °C 1 นาที	
- สร้างสายดีเอนเอสายใหม่ขั้นสุดท้ายให้สมบูรณ์	72 °C 7 นาที 1 รอบ	

2.3.5 การทดสอบความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในการบ่งชี้ *V. harveyi*

เลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์มาตรฐานบนอาหารแข็ง LB agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อครั้งแรกด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (normal saline) ให้มีค่าความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับสารละลาย MacFarland เบอร์ 0.5 (1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางเชื้อเป็นสิบเท่า (ten fold dilution) ต่อไปอีกเป็น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ10^{-8} โดยทำ 2 ชุด (ภาพปะกอบ 2.3) ชุดที่ 1 ดูดสารละลายที่ความเข้มข้น 10^{-4} ถึง 10^{-8} มาความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง LB agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี (30-300 โคโลนี) คำนวณหาปริมาณของเซลล์แบคทีเรีย ชุดที่ 2 นำเชื้อที่เจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} มาสกัดดีเอนเอโดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่น ดูดสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นดีเอนเอมาเจือจาง เป็นสิบเท่า แล้วนำไปตรวจหา *V. harveyi* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเหมือนใน ข้อ 2.3.4



ภาพประกอบ 2.3 ขั้นตอนการศึกษาความไวของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในการชี้บ่งเชื้อ *V. harveyi*

2.3.6 การบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* ที่แยกจากอาหารทะเลโดยการเพิ่มจำนวนดีเอนเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้จากอาหารทะเลและกุ้งบ่อเลี้ยง

2.3.6.1 การแยกเชื้อ *V. harveyi*

ตัวอย่างกุ้งได้จากตลาดสดและบ่อเลี้ยงกุ้งนำมาแยกเชื้อ *V. harveyi* โดยเทคนิคปลอดเชื้อ ตามแนวทางของ Baumann and Schubert, (1984) ในกุ้งเล็กให้ทำความสะอาดด้วยเอทธานอลร้อยละ 70 นำไปบดด้วยโกร่งปราศจากเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง TCBS ส่วนในกุ้งตัวเต็มวัยจะทำการแยกเชื้อจากน้ำเลือด (haemolymph) และตับอ่อน (hepatopancreas) ต่อจากนั้น นำไปเกลี่ยเชื้อ (spread) บนอาหารแข็ง TCBS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ตัวอย่างปลาและหอย ได้จากตลาดสดนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ สำหรับปลาใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียตรงบริเวณผิวหนัง เหงือก และลำไส้ ไปขีด (streak) บนอาหารแข็ง TCBS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ส่วนตัวอย่างหอยใช้เทคนิคเดียวกันกับตัวอย่างปลาโดยเอาตรงส่วนน้ำในตัวหอยแล้วนำไปบ่มสภาวะเช่นเดียวกับตัวอย่างปลา

2.3.6.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi*

นำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ บนอาหารแข็ง TCBS มาตรวจดูการเรืองแสงและมาลงใน TSI (Triple Sugar Iron agar) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงเชื้อที่ให้ผล TSI เป็นแบบ K/A (Alkaline/Acid) A/A (Acid/Acid) หรือ N/N (ไม่มีการเปลี่ยนแปลง) นำไปทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. harveyi* ดัดแปลงตามแนวทางของ Baumann and Schubert, (1984) และ Reichelt and Baumann (1973) ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

2.3.6.3 การบ่งชี้เชื้อ *V. harveyi* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำตัวอย่างเชื้อที่ผ่านการทดสอบทางชีวเคมีและคาดว่าจะเป็น *V. harveyi* นำมาสกัดดีเอนเอ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกแล้วปลดปล่อยดีเอนเอหลุดออกจากเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 x g เป็นเวลา 5 นาที เจือจางดีเอนเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 10 นำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยมีส่วนประกอบและสภาวะเหมือนข้อ 2.3.4