บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุ

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ แผ่นยาต้านจุลชีพ น้ำยาทดสอบ

- Agar	Difco
- Arginine	Merck
- Ornithine	Merck
- Peptone	BBL
- Decarboxylase medium base	Difco
- Luria Bertani (LA) agar	Difco
- Luria Bertani (LB) broth	Difco
- Lysine decarboxylase broth	Difco
- Motility test medium	Difco
- Mueller Hinton agar (MHA)	Difco
- Nutrient broth	Difco
- Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar	Difco
- Triple sugar iron (TSI) agar	Difco
- Tryptic soy broth (TSB)	Difco
- Tryptone	Difco
- Yeast extract	Difco
- Ampicillin (10μg)	BBL
- Chloramphenicol (30μg)	BBL
- Ciprofloxacin (5μg)	Oxoid
- Co-Trimoxazole (25μg)	Oxoid
- Erythromycin (15μg)	Oxoid

- Gentamicin (10μg) BBL
- Norfloxacin (10μg) Oxoid
- Tetracycline (30μg) BBL
- Nalidixic acid (30μg) Oxoid
- Antiserum *V. cholerae* O1 polyvalent Serotest
- Antiserum *V. cholerae* O139 Serotest
- Antiserum *V. cholerae* Ogawa Serotest
- Antiserum V. *cholerae* Inaba Serotest

2.1.2 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

- Boric acid Merck
- Bromphenol blue Merck
- Chloroform Merck
- Ethanol Merck
- Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) Merck
- Phenol Sigma
- Sodium acetate Merck
- Sodium chloride Merck
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) Sigma
- Sodium hydroxide Merck
- Sucrose Merck

2.1.3 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biological grade)

- Agarose Gibco
- 10X buffer Promega
- 10X buffer *Taq* Takara
- dNTPs Boeheringer Mannheim

- Ethidium bromide	Sigma
- Magnesium chloride	Promega
- Primers	Invitrogen
- Primers 2 และ 4	Pharmacia Biotech
- Rnase	Merck
- *Taq* DNA polymerase	Promega
- Ex *Taq* polymerase	Takara
- Tris Base	Promega

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องแก้วสำหรับใช้วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
- หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอด PCR ขนาด 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร
- Automatic pipette ขนาด 1-20, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร, Gilson, France
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave), Tomy Seiko Co. Ltd., Japan
- ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven), Venticell
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator), Bergen, Norway
- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้, Labline instrument Inc., USA.
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge), Kokusan, Japan
- เครื่องหมุนเหวี่ยงหลอด microcentrifuge (Microcentrifuge), Brinkman Instrument Inc., USA.
- เครื่องปั่น (Blender), National, Japan
- เครื่องชั่ง (Balance), Denver Instrument company, USA.
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter), Metrohm, Switzerland
- เครื่องกวนสารละลายพร้อมแผ่นให้ความร้อน (Strirring heating plate), Fisher Scientific, USA.

- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet), ISSCO, USA.
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)Perkin-Elmer, USA.
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath), Sheldon Manufacturing Inc., USA.
- เครื่องเพิ่มปริมาณ ดี เอน เอ PCR system 2400, Perkin-Elmer, USA.
- เครื่องเพิ่มปริมาณ ดี เอน เอ Thermal cycler 480, Perkin-Elmer, USA.
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply), Bio-Rad, USA.
- เครื่องแยกสารละลายโดยใช้ไฟฟ้า (Electrophoresis unit), Bio-Rad, USA.
- เครื่อง Gel document
- ตู้เย็นแช่แข็ง –70 องศาเซลเซียส, Sanyo, Japan
- ตู้เย็นแช่แข็ง –20 องศาเซลเซียส, Sanyo, Japan
- ตู้เย็นแช่แข็ง 4 องศาเซลเซียส, Sanyo, Japan
- Plankton net
- ถังน้ำ
- เชือก

2.3 เชื้อแบคทีเรีย

2.3.1 *Vibrio cholerae* สายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *V. cholerae* O1 biotype Classical NIH, *V. cholerae* O1 biotyper El Tor, *V. cholerae* O139 M045, *V. cholerae* non-O1/non-O139 AM2

2.3.2 Vibrio spp. สายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *V. alginolyticus* 219, *V. mimicus* RIMD 22180002, *V. vulnificus* RIMD 2219022, *V. fluvialis* RIMD 2220002, *V. furnisii* RIMD 2223001, *V. metchnikovii* RIMD 2208006, *V. campbellii* ATCC 25920, *V. splendidus* ATCC 33125, V. *aestuarianus* ATCC 35048, *V. proteolyticus* NCMB 1326, *V. cincinnatiensis* ATCC 35912, *V. mytili* ATCC 51288, *V. ichthyoenteri* IFO 15847, *V. penaeicidal* IFO 15640, *V. anguillarum* PF 87050, *V. damsela* RIMD 2222001, *V. carchariae* ATCC 35084, *V. harveyi* ATCC 14126, *V. diazotrophicus* ATCC 33466, *V.*

hollisae, *V. parahaemolyticus*, *V. orientalis*, *Escherichia.coli* O157:H7 253, *Shigella flexneri* KX-H287, *S. boydii* KX-H259 และ *Aeromonas hydrophila* KX-A428

2.3.3 *V. cholerae* non-O1/non-O139 12 isolates ที่แยกได้จากน้ำ 30 ตัวอย่างในคลองอู่ตะเภา โดยนักศึกษาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

2.4 วิธีการ

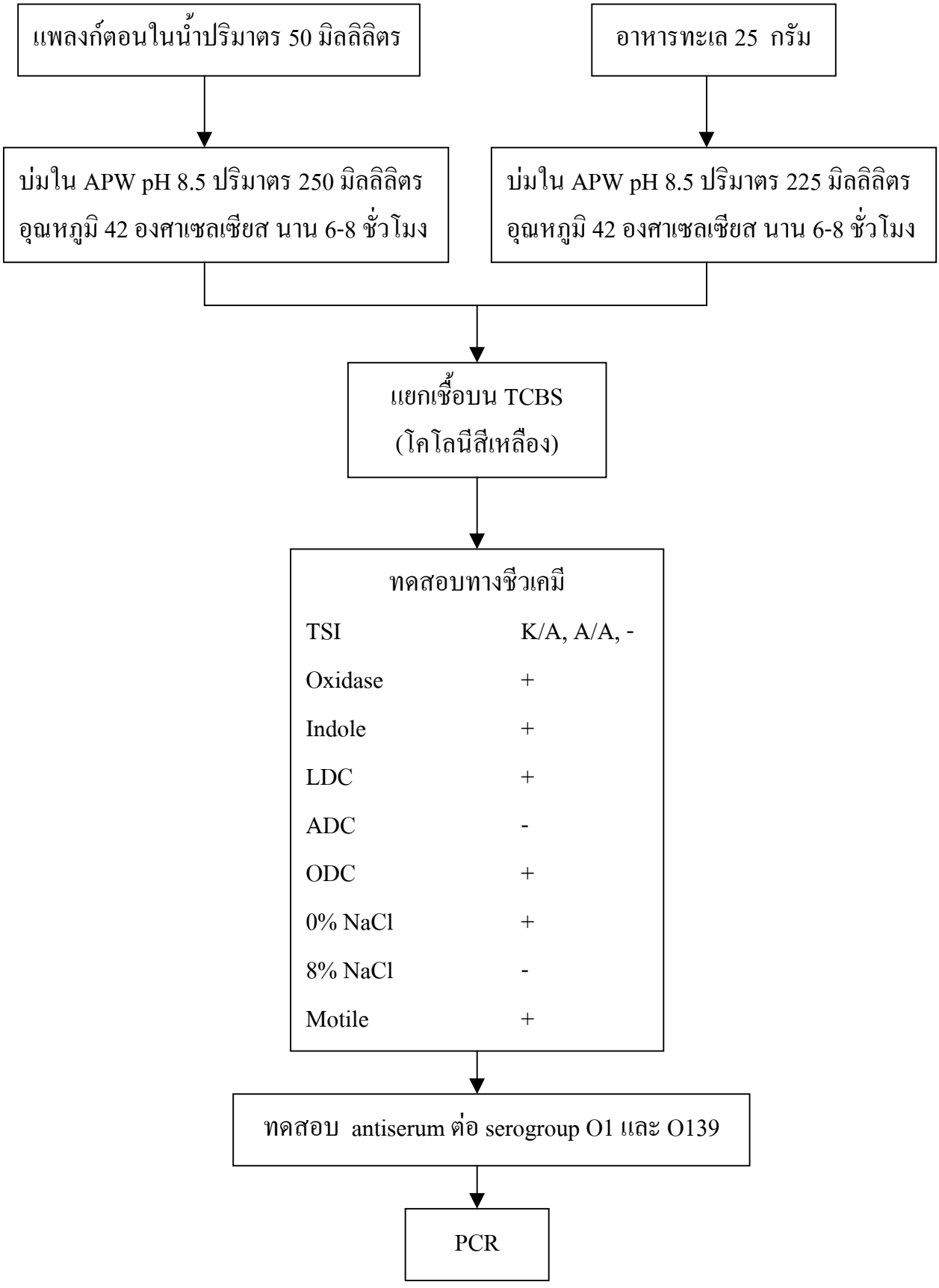
2.4.1 การแยกเชื้อ *V. cholerae* (แผนภูมิ 2.1)

2.4.1.1 ตัวอย่างแพลงก์ตอนจากแหล่งน้ำ

เก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนจากแหล่งน้ำบริเวณคลองอู่ตะเภา เขตอ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ได้แก่ จุดวัดระดับน้ำสถานีสำรวจอุทกวิทยา ท่าน้ำวัดหาดใหญ่ในสะพานแขวนวัดท่าแซ สะพานบ้านคตยาง วัดคูเต่า และสะพานชุมชนคูเต่า บริเวณรอบเกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา ได้แก่ ท่าน้ำวัดแหลมพ้อ ท่าน้ำวัดท้ายยอ ชุมชนบ้านสวนใหม่ ชุมชนบ้านอ่าวทรายจุดที่ 1 ชุมชนบ้านอ่าวทรายจุดที่ 2 และชุมชนบ้านนอก เก็บโดยใช้ plankton net ขนาดตาความถี่ 60 ไมครอน บริเวณน้ำลึกใช้วิธีเหวี่ยงไปในระยะไกล และลากเข้าสู่ฝั่ง บริเวณน้ำตื้นใช้ถังตักน้ำ กรองผ่าน plankton net ทุกตัวอย่างเก็บซ้ำ 5 ครั้ง นำมากรองให้ได้แพลงก์ตอนในปริมาตรน้ำสุดท้าย 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งจนกระทั่งถึงห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำตัวอย่างกรองผ่านผ้าขาวบางไร้เชื้อ เพื่อขจัดเศษขยะที่ไม่ต้องการ แล้วนำแพลงก์ตอนในน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร เทลงในขวดซึ่งมี Alkaline peptone water (APW) pH 8.5 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6-8 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ใช้ loop ถ่ายเชื้อลงบน Thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar (ภาคผนวก ก) ให้ได้โคโลนี เดี่ยวๆ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีขนาดโตปานกลาง สีเหลือง กลม ขอบเรียบ ตรงกลางทึบส่วนรอบนอกใส มาทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ TSI ทดสอบ oxidase การสร้าง Indole การสร้างเอนไซม์ Lysine decarboxylase, Arginine dihydrolase และ Ornithine decarboxylase การเจริญใน 0% NaCl และ 8% NaCl (ภาคผนวก ก) และการเคลื่อนที่ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (motility medium) จากนั้นนำไป

ทดสอบหา serogroup กับ antiserum *V. cholerae* O1 และ O139 และนำเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้ มาสกัดดีเอนเอ สำหรับ PCR

แผนภูมิ 2.1 ขั้นตอนการแยกเชื้อ *V. cholerae* จากแพลงก์ตอน และอาหารทะเล



2.4.1.2 ตัวอย่างอาหารทะเล

นำตัวอย่างอาหารทะเลที่ได้จาก ตลาดคลองเรียน ตลาดพลาซ่า ตลาดกิมหยง และตลาดเกาะหมี ในเขต อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ตลาดเก้าเส้ง อ.เมือง จ.สงขลา ตัวอย่างทั้งหมด ประกอบด้วย หอย เช่น หอยแครง หอยแมลงภู่ หอยตลับ และ หอยลาย รวมทั้ง ปลา ปู และกุ้ง หอยจะแกะเปลือกออก เอาส่วนเนื้อ ปลาใช้ส่วนเหงือก ครีบ และน้ำล้างปลา ปูใช้ส่วนของนมปู และกุ้งใช้ทั้งตัว ชั่งวอย่างอาหารทะเล 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติก เข้าเครื่องตีปั่นผสมตัวอย่าง จากนั้นนำไปใส่ใน APW เขย่าให้เข้ากัน กรองผ่านผ้าขาวบางไร้เชื้อ เพื่อนำส่วนน้ำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำมาแยกเชื้อบน TCBS และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนี และทดสอบทางชีวเคมี ตามข้อ 2.4.1.1

2.4.1.3 เชื้อ *V. cholerae* จากตัวอย่างผู้ป่วย

นำเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกโดยห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลได้แก่ หาดใหญ่ วชิระภูเก็ต มหาราชนครศรีธรรมราช ปัตตานี สุรินทร์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สมุทรสาคร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ มาทดสอบทางชีวเคมีและทดสอบหา serogroup ตามข้อ 2.4.1.1

2.4.2 การบ่งชี้ *V. cholerae* โดยวิธี PCR

2.4.2.1 การสกัดดีเอนเอโดยวิธีต้มทำลายผนังเซลล์

เลี้ยงเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากอาหารทะเล แพลงก์ตอน น้ำ และจากผู้ป่วย รวมทั้ง *Vibrio* สายพันธุ์มาตรฐานอื่นๆในหลอด microcentrifuge ซึ่งมี LB broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง นำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อทำลายผนังเซลล์ แยกดีเอนเอ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg เป็นเวลา 6 นาที ดูดสารละลายส่วนบนมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จะได้ดีเอนเอต้นแบบสำหรับทำ PCR

2.4.2.2 การบ่งชี้ *V. cholerae* ด้วยวิธี PCR โดยใช้จีน *ompW* เป็นจีนเป้าหมาย (ดัดแปลงจากวิธีของ Nandi *et al*., 2000)

นำเชื้อที่สกัดดีเอนเอ มาตรวจหาจีน *ompW* โดยมีส่วนผสม ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	5.5
10X buffer	2.0
25 mM$MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	1.0
1.2 μM primer *ompW* forward และ reverse	8.3
Taq polymerase	0.1
ดีเอนเอ	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	30
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

ตรวจสอบผลผลิต PCR ของจีน *ompW* ขนาด 588 bp โดยการทำ electrophoresis ด้วยวุ้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris Borate EDTA (TBE) (ภาคผนวก ข) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที นำไปย้อมด้วย ethidium bromide (ภาคผนวก ข) และดูลักษณะของแถบดีเอนเอภายใต้แสงยูวี เทียบกับเชื้อมาตรฐาน

2.4.3 การทดสอบหาจีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

2.4.3.1 การตรวจหาจีน *tcpA-C, tcpA-E* และ *ctxA* โดยวิธี multiplex PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Keasler *et al*., 1993)

ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	11.4
10X buffer	2.5
25 mM$MgCl_2$	3.0
2.5 mM dNTPs	1.25
2.0 μM primer *tcpA-C* forward และ reverse	1.88
2.0 μM primer *tcpA-E* forward และ reverse	1.88
2.5 μM primer *ctxA* forward และ reverse	1.5
Taq polymerase	0.05
ดีเอนเอ	1.5
ปริมาตรรวม	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	96	5	1
2. Denature	94	1	30
3. Annealing	60	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	7	1

ตรวจสอบผลผลิต PCR ของจีน *tcpA-C* *tcpA-E* และ *ctxA* ขนาด 617 471 และ 301 bp ตามลำดับ โดยการทำ electrophoresis ในวุ้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ เหมือนข้อ 2.4.2.2

2.4.3.2 การตรวจหาจีน *toxR* และ *zot* โดยวิธี multiplex PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Singh *et al*., 2001)

ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	12.9
10X buffer	2.5
25 mM$MgCl_2$	2.5
2.5 mM dNTPs	0.5
2.0 μM primer *toxR* forward และ reverse	2.5
2.0 μM primer *zot* forward และ reverse	2.5
Taq polymerase	0.1
ดีเอนเอ	1.5
ปริมาตรรวม	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	95	5	1
2. Denature	94	2	30
3. Annealing	60	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	10	1

ตรวจสอบผลผลิต PCR ของจีน *toxR* และ *zot* ขนาด 779 และ 947 bp ตามลำดับ โดยการทำ electrophoresis ในวุ้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ เหมือนข้อ 2.4.2.2

2.4.3.3 การตรวจหาจีน *ace* โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Singh *et al*., 2001)

ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	12.4
10X buffer	2.0
25 mM$MgCl_2$	1.6
2.5 mM dNTPs	0.4
2.0 μM primer *ace* forward และ reverse	2.0
Taq polymerase	0.1
ดีเอนเอ	1.5
ปริมาตรรวม	20.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	95	5	1
2. Denature	94	0.5	30
3. Annealing	60	0.5	
4. Extension	72	0.5	
5. Final extension	72	7	1

ตรวจสอบผลผลิต PCR ของจีน *ace* ขนาด 289 bp โดยการทำ electrophoresis ในวุ้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ เหมือนข้อ 2.4.2.2

2.4.3.4 การตรวจหาจีน *stn/sto* โดยวิธี PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Rivera *et al*., 1993)

ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
น้ำกลั่น	10.0
10X buffer	2.5
25 mM$MgCl_2$	1.5
2.5 μM dNTPs	0.5
2.0 μM primer forward และ reverse	9.4
Taq polymerase	0.1
ดีเอนเอ	1.0
ปริมาตรรวม	25.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Hot start	94	5	1
2. Denature	94	2	30
3. Annealing	55	1	
4. Extension	72	1	
5. Final extension	72	10	1

ตรวจสอบผลผลิต PCR ของจีน *stn/sto* ขนาด 172 bp โดยการทำ electrophoresis ในวุ้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ เหมือนข้อ 2.2.4.2

2.4.4 การศึกษาความแตกต่างของ *V. cholerae* ในระดับโมเลกุล

2.4.4.1 การสกัดดีเอนเอ โดยวิธี phenol-chloroform extraction (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al*., 1989)

ได้ทำการสุ่มตัวอย่าง *V. cholerae* non-O1/non-O139 จากผู้ป่วย 6 isolates แพลงก์ตอน 7 isolates อาหารทะเล 3 isolates และจากน้ำ 2 isolates รวมทั้ง *V. cholerae* O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยในพื้นที่ต่างๆ จำนวน 58 isolates (ตารางที่ 2.1) เลี้ยงเชื้อ *V. cholerae* ใน LB broth 5 มิลลิลิตร เขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000xg นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม phosphate buffer solution (PBS) (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg นาน 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PBS-EDTA (PBS 270 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 M EDTA 30 ไมโครลิตร) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 10 % SDS (ภาคผนวก ข) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เขย่าเบาๆ ทุก 2 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย phenol-chloroform (1:1) (ภาคผนวก ข) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg 3 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบน ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ หลังจากนั้นเติม 3 M sodium acetate (ภาคผนวก ข) 40 ไมโครลิตร และ 95 % ethanol ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 70% ethanol และ 95 % ethanol ที่เย็นจัด ตามลำดับ จากนั้นทำให้ดีเอนเอแห้ง แล้วละลายดีเอนเอด้วยน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร เติม RNase (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร) (ภาคผนวก ข) 5 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สกัดดีเอนเอซ้ำอีกครั้งด้วย phenol-chloroform แล้วละลายดีเอนเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (ภาคผนวก ข) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณและตรวจสอบคุณภาพดีเอนเอ

ตารางที่ 2.1 *V. cholerae* O1 ที่สุ่มเลือกศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยวิธี AP-PCR จากแต่ละจังหวัดในภูมิภาคของประเทศไทย

ภาค/จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ
ใต้	
- ภูเก็ต	4
- ปัตตานี	1
- นครศรีธรรมราช	4
- สงขลา (จะนะ (6) หาดใหญ่ (5) นาทวี(5) สะบ้าย้อย (1) เทพา (10))	27
กลาง	
- กาญจนบุรี	2
- ราชบุรี	1
- สมุทรสงคราม	7
ตะวันออกเฉียงเหนือ	
- สุรินทร์	3
เหนือ	
- เชียงใหม่	9
รวม	58

2.4.4.2 การคำนวณหาปริมาณ และตรวจสอบคุณภาพของ ดีเอนเอ

คำนวณหาปริมาณดีเอนเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอนเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ($OD_{260\ nm}$) เปรียบเทียบกับดีเอนเอมาตรฐาน ถ้ามีค่า $OD_{260\ nm}$ เท่ากับ 1.0 จะมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอนเอ 50ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคุณภาพของดีเอนเอสามารถตรวจสอบได้โดยการหาอัตราส่วนของ $OD_{260\ nm}$ /$OD_{280\ nm}$ ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าได้ดีเอนเอที่บริสุทธิ์ ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าใน

การเตรียมดีเอนเอมีอาร์เอนเอปนเปื้อน และถ้าน้อยกว่า1.85 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปะปน

2.4.4.3 การศึกษาความแตกต่างในระดับโมเลกุลของ *V. cholerae* โดยวิธี AP-PCR (ดัดแปลงจากวิธีของ Williams *et al*., 1990)

นำดีเอนเอจากข้อ 2.4.4.1 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้เป็นดีเอนเอต้นแบบในการทำ AP-PCR ซึ่งมีส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา ดังนี้

ส่วนผสม	ปริมาตร(ไมโครลิตร)
ดีเอนเอ	2.5
10X buffer *Taq*	3.0
2.5 μM dNTPs	4.0
5.0 μM primer 2 (หรือ primer 4)	5.0
Ex Taq polymerase	0.5
น้ำกลั่น เติมให้ครบปริมาตร	30.0

สภาวะสำหรับปฏิกิริยา PCR

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

ตรวจสอบรูปแบบดีเอนเอ โดยนำผลผลิต PCR มาทำ electrophoresis ด้วยวุ้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมป์ นาน 15 ชั่วโมง นำไปย้อมด้วย ethidium bromide และดูลักษณะของแถบดีเอนเอภายใต้แสงยูวี การศึกษาความแตกต่างและเปรียบเทียบเชื้อในแต่ละการทดสอบต้องทำในสภาวะเดียวกันทุกครั้ง

2.4.5 การทดสอบความไวของ *V. cholerae* ต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี disc diffusion (NCCLS, 1997)

2.4.5.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยง *V. cholerae* บนอาหาร Luria Bertani (LA) agar (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ใช้ loop แตะเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว จำนวน 3-5 โคโลนี นำมาใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี Mueller Hinton broth (MHB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อที่กำลังเจริญในระยะ log phase ปรับปริมาตรเชื้อด้วย 0.85 % NaCl ที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ 1.5×10^8 CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ McFarland standard No. 0.5 (ภาคผนวก ข)

2.4.5.2 วิธีการทดสอบ

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อจากข้อ 2.4.5.1 มาพอหมาดๆ streak ให้ทั่วผิวหน้า Mueller Hinton agar (MHA) ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ forcep ลนไฟปล่อยให้เย็น คีบแผ่นยามาตรฐาน ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol ciprofloxacin, co-trimoxazole, erythromycin, gentamicin, norfloxacin, tetracycline และ nalidixic acid วางบนผิวหน้าอาหาร โดยที่แต่ละแผ่นวางห่างกันประมาณ 15-20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 15 มิลลิเมตร นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

2.4.5.3 การอ่านผล

สังเกตวงใสรอบแผ่นยา (clear zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วย vernier caliper นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (Lorian, 1996) ซึ่งแสดงผลได้ 3 ลักษณะ คือ susceptible (S) เมื่อเชื้อมีความไวต่อยาต้านจุลชีพ intermediate (I) เมื่อเชื้อมีความไวปานกลาง และ resistant (R) เมื่อเชื้อดื้อต่อยาที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 2.2 ลำดับเบสและขนาดผลผลิต PCR ของ primer

Gene(s)	Primers and sequences (5’ to 3’)	Amplicon size(bp)	reference
ompW	1 ‘CAC CAA GAA GGT GAC TTT ATT GTG’ 2 ‘GAA CTT ATA ACC ACC CGC G’	588	Nandi *et al*., 2000
tcpA-C	1 ‘CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG’ 2 ‘ACC AAA TGC AAC GCC GAA TGG AGC’	617	Keasler *et al*., 1993
tcpA-E	1 ‘GAA GAA GTT TGT AAA AGA AGA ACA C’ 2 ‘GAA AGG ACC TTC TTT CAC GTT G’	471	Keasler *et al*., 1993
ctxA	1 ‘CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG’ 2 ‘TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG’	301	Keasler *et al*., 1993
toxR	1 ‘CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C’ 2 ‘AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G’	779	Singh *et al*., 2001
zot	1 ‘TCG CTT AAC GAT GGC GCG TTT T’ 2 ‘AAC CCC GTT TCA CTT CTA CCC A’	947	Singh *et al*., 2001
ace	1 ‘TAA GGA TGT GCT TAT GAT GGA CAC CC’ 2 ‘CGT GAT GAA TAA AGA TAC TCA TAG G’	289	Singh *et al*., 2001
stn/sto	1 ‘TCG CAT TTA GCC AAA CAG TAG AAA’ 2 ‘GCT GGA TTG CAA CAT ATT TCG C’	172	Rivera *et al*., 1993
primer 2	‘GTT TCG CTC C’	-	Pharmacia Biotech
primer 4	‘AAG AGC CCG T’	-	Pharmacia Biotech