วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อ *K. pneumoniae*

เชื้อดื้อยา *K. pneumoniae* แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ช่วงระหว่างเดือนมกราคม 2535 ถึงเดือนมีนาคม 2536 แยกและบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อดื้อยา *K. pneumoniae* โดยวิธีการทดสอบทางชีวเคมีและการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 21 สายพันธุ์ และเชื้อ *K. pneumoniae* strain ATCC 10031 สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

ตรวจหายีนดื้อยาบนพลาสมิดจากเชื้อดื้อยา *K. pneumoniae*

ยีนดื้อยาบนพลาสมิดถูกสกัดจากเชื้อดื้อยา *K. pneumoniae* โดยวิธี alkaline-SDS[2] มีวิธีการดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อดื้อยา *K. pneumoniae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% bactotryptone) ปริมาตร 2 ml อบที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นำไปปั่นจนได้ตะกอนแบคทีเรีย ละลายตะกอนด้วยสารละลาย A (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 200 ul เติมสารละลาย 4 mg/ml lysozyme ปริมาตร 10 ul เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลาย B (0.2 N NaOH,1% SDS) ปริมาตร 200 ul เขย่าเบา ๆ โดยการเอียงหลอดไปมาจนเป็นเนื้อเดียวกัน แช่น้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 3 M Na-acetate pH 5.0 ปริมาตร 150 ul ผสมให้เข้ากันแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นแล้วใช้ไม้จิ้มพันปราศจากเชื้อ เขี่ยตะกอนทิ้ง ทำการสกัดโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอ โดยการเติมสารละลายฟีนอล ปริมาตร 200 ul และสารละลายคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 200 ul เขย่าแรง ๆ ให้เข้ากัน นำไปปั่นดูดเอาส่วนล่างทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมสารละลาย 4 M NaCl และ cold absolute ethanol ปริมาตร 1/10 เท่าและ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ (ตามลำดับ) เก็บที่ -20°C นาน 30 นาที นำไปปั่นแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นจนได้ตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ดีเอ็นเอบัฟเฟอร์ (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mg/ml RNase) ปริมาตร 20 ul อบที่ 37°C นาน 30 นาที นำไปเก็บที่ -20°C จนถ่าจะนำมาใช้

ตรวจสอบยีนดื้อยาบนพลาสมิดโดยทำการแยกด้วย agarose gel ภายใต้กระแสไฟฟ้า

ยีนดื้อยาบนพลาสมิดที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจสอบโดยผสมกับ gel loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 15% ficoll type 400, 5 mM EDTA pH 8.01) และแยกด้วย 0.8% (agarose gel (agarose gel 0.8 กรัม ละลายใน TAE บัฟเฟอร์ (40 mM Tris-acetate pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ในแนวนอนที่จมอยู่ใต้ TAE บัฟเฟอร์ ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์นาน 45 นาที ดีเอ็นเอจะวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก แยกตามขนาดของดีเอ็นเอ จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมสี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.3% นาน 10 นาที ล้างเอาสีส่วนเกินออก (destaining) โดยการแช่น้ำกลั่นนาน 30 นาที นำ agarose gel มาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง transluminator ถ่ายรูป gel ด้วยกล้อง poraloid

ทดสอบว่ายีนดื้อยาบนพลาสมิดของเชื้อดื้อยา *K. pneumoniae* มีความสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธี Conjugation

วิธีการถ่ายโอนสารพันธุกรรมโดยวิธี Conjugation ดัดแปลงตามวิธีของ Courtney M.[3] ซึ่งเป็นวิธี broth mating โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ผู้ให้ (เชื้อดื้อยา *K. pneumoniae*) และเซลล์ผู้รับ (*E. coli* HB 101 ที่ทำให้กลายพันธุ์ดื้อเฉพาะยา imipenem) ในแต่ละหลอดของอาหารเหลว LB ปริมาตร 2 ml อบที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์ผู้ให้และเซลล์ผู้รับผสมกันในอัตราส่วน 1:2 (200 ul : 400 ul) เขย่าให้เข้ากัน นำไปอบที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง ห้ามเขย่าโดยเด็ดขาด จากนั้นดูดเซลล์ผสมมา 200 ul เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแข็ง MacConkey ที่มียาปฏิชีวนะ (20 ug ampicillin,20 ug/ml streptomycin และ 10 ug/ml imipenem) อบที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจหาเชื้อที่ขึ้นบนอาหารแข็งว่าเป็น *E. coli* transconjugant โดยการทดสอบทางชีวเคมี ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ และสกัดยีนดื้อยาบนพลาสมิด