บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

3.1 แบบแผนการวิจัย (Research Design)

- ค้นคว้าวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- ออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *V. cholerae* และสารพิษโดยตรวจ *ctx A, tcpA, ompW , Rfb*
- สกัดดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอ
- ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR
- ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของวิธี multiplex PCR
- สกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) ของเชื้อตามขั้นตอนการเตรียมอาเอ็นเอ
- ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของวิธี RT-multiplex PCR
- ทดสอบการทำ DFA
- เก็บตัวอย่างน้ำและเติมเชื้อลงไป ทดสอบการตรวจพบเชื้อโดยวิธีต่างๆ
- เก็บตัวอย่างน้ำตามแหล่งต่างๆในจังหวัดขอนแก่น
- ตรวจหาเชื้อและจีนต่างๆ โดยวิธี multiplex PCR, RT-PCR, DFA และการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบวิธีมาตรฐาน
- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปและรายงานผล

3.2 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง:

3.2.1 `สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำ และระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำ

สถานที่เก็บตัวอย่างน้ำ จำนวน 11 แหล่ง ประกอบด้วย

- สะพานท่าพระ
- บ้านศิลา
- บ้านหนองหิน
- วัดท่าสองคร
- บ้านโนนชัย
- บ้านดอนยาง
- บ้านสำราญ
- คุ้มเทพารักษ์
- กรมชลประทาน
- บึงทุ่งสร้าง

- บ้านโกทา

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมดครอบคลุมทั้ง 3 ฤดูกาล ระยะเวลาประมาณ 9 เดือน สามารถเก็บตัวอย่างน้ำรวมทั้งหมด 55 ตัวอย่าง

3.2.2. การเก็บตัวอย่าง

ก. เก็บตัวอย่างน้ำจากแต่ละแหล่ง แหล่งละประมาณ 450 ml.ใส่ในขวดแก้วปราศจากเชื้อที่มี10× APW (Difco) pH 8.4 ปริมาตร 50 ml. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ข. กรองตัวอย่างน้ำ 400 ml. ผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 µm.

ค. นำกระดาษกรองใส่ใน alkaline peptone water (APW) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0 ชม.และ 6 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างน้ำไปทำการวิเคราะห์ดังนี้

a. การเพาะเลี้ยงเชื้อ : นำ suspension ของเชื้อในข้อ ค. มา streak บน TCBS บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 วัน ถ้าเป็นเชื้อ *V. cholerae* โคโลนีจะเป็นสีเหลือง แล้วนำไปจำแนกเชื้อทางชีวเคมีต่อไป

b. PCR : นำ 1.5 ml. จากข้อ ค. มาสกัด DNA และ RNA

c. DFA : นำ 3 ml. จากข้อ ค. มาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี DFA ต่อไป

ง. น้ำที่เหลือในส่วน ก.ให้นำไปศึกษาเช่นเดียวกับข้อ ค. (a, b และ c)

3.3. การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากแหล่งน้ำโดยวิธี multiplex PCR, culture และ DFA

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture)

นำตัวอย่างน้ำใน APW ปริมาตร 5 µl ทำการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate-citrate-bile-salt-sucrose (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. จากนั้นนำลักษณะโคโลนีสีเหลืองของเชื้อไปทดสอบชีวเคมีต่อไป หลังจากนั้นนำเชื้อ *V.cholerae* มาทดสอบทาง serological test เพื่อหา serogroup ของเชื้อด้วยวิธี slide agglutination ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยากับ polyvalent *V.cholerae* O1 antiserum โดยเชื้อกลุ่มที่ให้ผลลบ แสดงว่าเป็น *V. cholerae* กลุ่ม non - O1 ในขณะที่เชื้อกลุ่มที่ให้ผลบวก แสดงว่าเป็น *V. cholerae* กลุ่ม O1 ซึ่งต้องนำไปทดสอบหา serotype ต่อไปด้วยการทำปฏิกิริยากับ monovalent antisera ที่จำเพาะต่อ serotype Inaba และ Ogawa

3.3.2 การตรวจหายีน *ompW, ctxA , tcpA ,rfb*O1, *rfb*O139 โดยวิธี multiplex PCR

A. *การสกัด DNA*

การเตรียม DNA ของเชื้อ *V. cholerae* โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Puregene DNA Purification System, Genta System, USA) ตัวอย่างน้ำใน APW ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 0 หรือ 6 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 3 นาที ล้างส่วนตะกอนด้วย PBS แล้วละลายตะกอนใน cell lysis solution ปริมาตร 300 µl นำไปบ่มที่ 80°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม RNase A solution (4 mg/ ml) ปริมาตร 1.5 µl บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วเติม protein precipitation solution 300 µl. ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที ทำการเก็บส่วนใสและเติม 100% Isopropanol ปริมาตร 300 µl. ปั่นด้วยความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 5 นาที ค่อย ๆ ดูดส่วนใสออก เติม70% ethanol ปริมาตร 300 µl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ดูด ethanol ออก ผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 2 ชม. เติม DNA Hydration solution ปริมาตร 50 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง นำดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้ในการทำ PCR amplification

B. *PCR mixture*:

ปริมาตร 30 µl / reaction ประกอบด้วย 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5 mM, Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) 300 µM, Primer *ctxA* 0.15 µM, *tcpA* 0.3 µM, *ompW*,*rfb*O1 and *rfb*O139 0.35 µM *ctxA* 0.2 µM Taq DNA polymerase 2.0 U, DNA template 500 ng, Sterile water.

C. *DNA amplification*

1. สภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR เพื่อตรวจหายีน *ctxA* , *tcpA* , *ompW*, *rfbO1, rfbO139* โดยใช้ primer sequence และ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 3.1 แสดง Primer sequence และ PCR condition ของ multiplex PCR

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Gene	Primer sequence (5'->3')	PCR condition	Reference
ctxA	F - TGGTCTTATGCCAAGAGGACA	94°C; 10 min (1 cycle)	Wongboot (72)
(517 bp.)	R - ATCTTGGAGCATTCCCACAAC	94°C; 1 min	
tcpA	F- CAATACTGGGAGGTGGAGCCTA	59°C; 1 min	In this study
(335 bp.)	R-GCAAACTGGAGCTTATTCTGGTCG	72°C; 2 min (35 cycle)	
ompW	F- GTACTTGCAGCCCTAAGCTC	72°C; 10 min (1 cycle)	Wongboot (72)
(307 bp.)	R- GGACCATAAAGGTAGGTGGC		
rfbO1	F- TCTATGTGCTGCGATTGGTG		Modified from Goel ,
(639 bp.)	R- ACCCCGAAAACCTAATGTGAG		A. K. (2007)
rfbO139	F- AGCCTCTTTATTACGGGTGG		Alam, M.
(449 bp.)	R- GTCAAACCCGATCGTAAAGG		(2006)

2. Amplification product ที่ได้นำไปทำ gel electrophoresis บน 2% agarose gel แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นส่องดูภายใต้เครื่อง UV light transilluminator เพื่อตรวจดูแถบ DNA ที่ปรากฏเทียบกับ standard marker

3.3.3 ตรวจหาเชื้อกลุ่ม *V. cholerae* O1 โดยวิธี Direct fluorescent antibody (DFA)

นำตัวอย่างน้ำในข้อ ค.(c) มาทำการเตรียมตัวอย่างตามชุด DFA สำเร็จรูปบริษัท New Horizon Diagnostic Corp. (Columbia , Md.) โดยการเติม 0.025% yeast extract (Difco) ปริมาตร 36 µl และ 0.002% nalidixic acid (Sigma) ปริมาตร 30 µl. จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลาข้ามคืน แล้วเติม formalin ปริมาตร 112 µl. นำ 10 ul ของตัวอย่างน้ำดังกล่าวหยดลงบนสไลด์ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นเติม 5 µl. methanol ลงแต่ละหลุม ทิ้งให้แห้ง เติม 10 µl. DFA reagent แล้วนำสไลด์วางใน moist chamber นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วย PBS แล้วเติม 10 µl fluorescent mounting fluid แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำตัวอย่างไปตรวจดูภายใต้กล้อง epifluorescence microscope (Olympus BX51) ที่เชื่อมกับกล้องดิจิตอล (Olympus DP20)

3.4 การตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตด้วยการตรวจยีน *ompW, ctxA และ tcpA* โดยวิธี Multiplex RT-PCR

A. *การสกัด RNA*

การสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด RNeasy Mini Kit (Qiagen) โดยปั่นตกตะกอนตัวอย่างน้ำที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 100 µl lysozyme-containing TE buffer บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม buffer RLT และ ethanol จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดใส่ใน RNeasy mini column นำไปปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วย buffer RPE แล้วเติม RNase-free water จากนั้นเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่-70°C

B. *Reverse transcription and PCR*

1. สภาวะที่เหมาะสมในการทำ Reverse Transcription เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้ cDNA mixture ดังแสดงในตารางที่ 3.2

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246172
เลขเรียกหนังสือ

ตารางที่ 3.2 แสดง cDNA reaction component

Reaction component	
1. 5×RT-buffer	2. RNase inhibitors (40U/µl)
3. 250 ng Random hexamers	4. 10 mM dNTP
5. RNase-free water	6. 1 µg Total RNA
7. SuperScript RNase H- reverse transcriptase(250U/µl)	

2. สภาวะที่เหมาะสมในการทำ Reverse Transcription-PCR เพื่อตรวจหายีน *ompW, ctxA* และ *tcpA* โดยใช้ primer sequence และ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดง Primer sequence และ PCR condition ของ multiplex RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'->3')	PCR condition	Reference
ctxA	F - TGGTCTTATGCCAAGAGGACA	94°C; 10 min (1 cycle)	Wongboot (72)
(517 bp.)	R - ATCTTGGAGCATTCCCACAAC	94°C; 1 min	
tcpA	F- CAATACTGGGAGGTGGAGCCTA	59°C; 1 min	In this study
(335 bp.)	R-GCAAACTGGAGCTTATTCTGGTCG	72°C; 2 min (35 cycle)	
ompW	F- GTACTTGCAGCCCTAAGCTC	72°C; 10 min (1 cycle)	Wongboot (72)
(307 bp.)	R- GGACCATAAAGGTAGGTGGC		

3. Amplification product ที่ได้นำไปทำ gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นส่องดูภายใต้เครื่อง UV light transilluminator เพื่อตรวจดูแถบ DNA ที่ปรากฏเทียบกับ standard marker

3.5 การทดสอบ specificity และ sensitivity ของ multiplex PCR และ multiplex RT-PCR

3.5.1 การทดสอบ specificity ของ multiplex PCR

โดยใช้ DNA ของเชื้อ *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* non-O1, *V.mimicus, V. vulnificus, V. fluvialis, V. alginolyticus, V. parahaemolyticus, Salmonella sp.*,

Aeromonas hydrophila, Pseudomonas aeruginosa และเชื้อ *Escherichia coli* มาเป็น template ในการทำ multiplex PCR เพื่อทดสอบ specificity

3.5.2 การทดสอบ sensitivity ของ multiplex PCR

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *V. cholerae* ไปเพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่ 37°C; shaking เป็นเวลา 18 ชม.จากนั้นนำมาปรับ OD_{600} = 0.1 และใช้ 1% inoculums นำไปบ่มที่ 37°C จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ log phase หลังจากนั้นใช้เชื้อดังกล่าว 1 ml มาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Puregene DNA Purification System, Genta System, USA) แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometry หลังจากนั้นทำการ dilute DNA template ให้มีความเข้มข้น 100 ng- 10 fg เพื่อนำไปเป็น template ในการทดสอบ sensitivity ของ multiplex PCR ต่อไป

3.5.3 การทดสอบ sensitivity ของ multiplex RT-PCR

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *V. cholera* ไปเพาะเลี้ยงใน BHI broth ที่ 37°C; shaking เป็นเวลา 18 ชม.จากนั้นนำมาปรับ OD_{600} = 0.1 และใช้ 1% inoculums นำไปบ่มที่ 37°C จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ log phase หลังจากนั้นใช้เชื้อดังกล่าว 1 ml มาทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัด RNeasy Mini Kit (Qiagen) จากนั้นทำการสร้าง cDNA แล้วนำ cDNA ที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่อง spectrophotometry แล้วทำการ dilute cDNA template ให้มีความเข้มข้น 100 ng- 10 fg เพื่อนำไปเป็น template ในการทดสอบ sensitivity ของ multiplex RT-PCR ต่อไป