บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง (จากกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข)
   - 1.1 *Vibrio parahaemolyticus* DMST 15285
   - 1.2 *Vibrio vulnificus* DMST 19346
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)
   - 2.1 Alkaline peptone water (APW)
   - 2.2 Cystine Tryptone Agar (CTA)
   - 2.3 Thiosulfate citrate bile salt agar (TCBS)
   - 2.4 T_1N_4 medium
   - *2.5* CHROMagar™ *Vibrio* (CHROMagar)
3. สารเคมี รีเอเจนต์ และบัฟเฟอร์ (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ข)
   - 3.1 Agarose (SeaKem® LE Agarose)
   - 3.2 Ethidium bromide
   - 3.3 Gel-loading buffer (6X)
   - 3.4 70 % ethanol
   - 3.5 Isopropanol
   - 3.6 SDS-Proteinase K lysis solution
   - 3.7 Tris-acetate-electrophoresis (TAE) buffer
   - 3.8 dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP : 100 mM each)
   - 3.9 10X PCR buffer
   - 2.10 50 mM $MgCl_2$
4. Standard molecular weight marker (100 bp sharp DNA Marker, Vivantis)
5. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase recombinant (Vivantis)

6. ไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ประกอบด้วยคู่ไพร์เมอร์ 2 คู่ ซึ่งจำเพาะต่อยีน *tl* และ *tdh* ส่วนไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ *V. vulnificus* มี 1 คู่ ซึ่งจำเพาะต่อยีน *vvh* แสดงดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพร์เมอร์	เชื้อที่ศึกษา	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ยีนเป้าหมาย	ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
L-tl1 *R-tl2*	*V. parahaemolyticus*	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	*tl*	450
L-tdh *R-tdh*	*V. parahaemolyticus*	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	*tdh*	269
vvh-F *vvh-R*	*V. vulnificus*	TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG	*vvh*	205

7. อุปกรณ์และเครื่องมือ

7.1 Gel chamber (BID-RAD, WIDE MINI SUB™ CELL)

7.2 Power supply (HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENT, PS 500XT)

7.3 Waterbath (SHELLAB, Model 1265)

7.4 UV transilluminator (SPECTROLINE® Model TVC-312A)

7.5 Refrigerated high speed centrifuge (Sorvall®, RC 26 plus)

7.6 DNA thermal cycler (Biometra®, TGradient)

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

เก็บตัวอย่างหอยนางรมสดแกะเปลือกจากร้านค้าปลีก บริเวณชายฝั่งทะเล เทศบาลตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 ร้านค้า (จากจำนวนร้านค้าทั้งหมดประมาณ 38 ร้านค้า) โดยมีช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง 6 เดือน (มกราคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2553) โดยเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ เก็บตัวอย่างเดือนละ 40 ตัวอย่าง ส่วนเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน เก็บตัวอย่างเดือนละ 20 ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 160 ตัวอย่าง นำตัวอย่างใส่ในกล่องน้ำแข็ง นำมาห้องปฏิบัติการเพื่อทำการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างและการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552)

2.1 ชั่งตัวอย่างหอยนางรม 50 กรัม จากนั้นตัดเป็นชิ้นใส่ใน Alkaline Peptone Water (APW) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร จำนวน 1 ขวดต่อหนึ่งตัวอย่าง

2.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

2.3 เก็บตัวอย่างหอยนางรมที่บ่มแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จำนวน 3 หลอด (ส่วนที่เหลือให้บ่มต่อที่สภาวะเดิมจนครบ 24 ชั่วโมง และนำไปแยกเชื้อตามวิธีในข้อ 3)

2.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

2.5 นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปทำการสกัดดีเอ็นเอ (ตามข้อ 4)

3. การแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* จาก enrichment culture

3.1 นำ enrichment broth ที่บ่มครบ 24 ชั่วโมงจากข้อ 2.3 นำไปขีดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จำนวน 3 จาน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 คัดเลือกโคโลนีสีเขียว จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จำนวน 3-5 โคโลนี นำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ T_1N_4 มาตรวจสอบยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* บนอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 เลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* (โคโลนีบนอาหาร

CHROMagar™ *Vibrio* มีสีม่วงอมเทา) และ *V. vulnificus* (โคโลนีบนอาหาร CHROMagar™ *Vibrio* มีสีเขียวอมน้ำเงิน) เก็บใส่ในอาหาร Cystine Tryptone Agar (CTA) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง)

หมายเหตุ สุ่มตัวอย่างไอโซเลทที่เก็บในอาหาร Cystine Tryptone Agar (CTA) ที่คาดว่าจะเป็น *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* มาทำการยืนยันผลอีกครั้งโดยเทคนิคพีซีอาร์

4. **การสกัดดีเอ็นเอ** (สุดารัตน์ สวนจิตร และคณะ, 2552)

4.1 นำตะกอนเซลล์ที่ได้ (ข้อ 2) เติม SDS-Proteinase K lysis solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ (ประมาณ 300 ไมโครลิตร)

4.4 เติม Isopropanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่ได้ (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) ทำการผสมโดยการกลับหลอดไปมา และบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.5 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง

4.6 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

4.7 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง

4.8 ทำให้ดีเอ็นเอแห้ง โดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.9 ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 15 ไมโครลิตร

4.10 นำดีเอ็นเอที่ได้ (5 ไมโครลิตร) มาใช้เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

5. ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

5.1 นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทำการผสมองค์ประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบของปฏิกิริยามัลติเพล็กซ์พีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *tl*, *tdh* และ *vvh*

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	21.0	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	2.5	2.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพรเมอร์		
10 µM *L-tl*	2.5	0.5 ไมโครโมลาร์ (แต่ละไพร์เมอร์)
10 µM *R-tl*	2.5	
10 µM *L-tdh*	2.5	
10 µM *R-tdh*	2.5	
10 µM *L-vvh*	2.5	
10 µM *R-vvh*	2.5	
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5.0	
Taq DNA polymerase *	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	**50.0**	

* เติมเอนไซม์หลังขั้นตอน Initial Denaturation

5.2 ชุดควบคุมเชิงบวก ใช้ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* DMST 15285 และ *V. vulnificus* DMST 19346 เป็นแม่แบบ ส่วนชุดควบคุมเชิงลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอแม่แบบ

5.3 นำหลอดปฏิกิริยาที่มีส่วนผสมข้างต้นไปเข้าเครื่อง thermal cycler ภายใต้สภาวะดังนี้

- Initial Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ
- Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที
- Annealing อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที } จำนวน 35 รอบ
- Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

- Final Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ

5.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้โดยการทำอิเลคโตโฟริซิสในอะกาโรสเจล (1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมเอทธิเดียมโบรไมด์) ใช้ Tris-acetate EDTA (TAE) เป็นบัฟเฟอร์ จากนั้นตรวจผลโดยใช้เครื่อง UV transilluminator