5. วิธีดำเนินการทดลอง

จากการศึกษาในปีที่ผ่านมาได้ศึกษาถึงการระบาดวิทยา ความไวต่อยาต้านจุลชีพ และการสร้างเอนไซม์เบต้า-แลคตาเมสของ *S. aureus* ซึ่งประกอบด้วย Methicillin - susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) และ Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) จำนวน 400 ไอโซเลต จาก 3 โรงพยาบาล คือ โรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี และโรงพยาบาลฉะเชิงเทรา จังหวัดฉะเชิงเทรา สำหรับในปีที่ 2 ของการวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาต่อจากปีที่ผ่านมา โดยทำการตรวจหายีน *mec*A ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์จำนวน 12 ชนิด ต่อแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อ Methicillin ที่แยกได้จากโรงพยาบาลในจังหวัดชลบุรีและฉะเชิงเทรา โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

5.1 การตรวจหายีน *mec*A โดยวิธี PCR

5.1.1 การสกัด DNA (ดัดแปลงจาก Fusun et al., 2007)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Tryticase Soy agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว 5-6 โคโลนี ไปปั่นที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง ปริมาตร 100 µl หลังจากนั้นเติม Lysis solution (1 %TritonX-100, 10 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วดูด Supernatant ปริมาตร 80 µl จากนั้นเติม 3 M Sodium acetate pH 8 ปริมาตร 8 µl (1:10 volume), Ice-cold absolute ethanol ปริมาตร 48 µl (6:10 volume) เพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Ice-cold ethanol 70 % ปริมาตร 300 µl แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นผึ่งให้แห้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20 µl ใช้ 2 µl สำหรับเป็น template ในการทำ PCR หรือเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.1.2 Oligonucleotides (Ryffela et al., 1990)

ในการตรวจหายีน *mec*A โดยวิธี PCR จะใช้ Primer *mec*A1(5'- TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG-3' *mec*A2(5'- CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG - 3')

5.1.3 Polymerase Chain Reaction (PCR; Fusun et al., 2007)

นำ DNA ของแบคทีเรียที่ทำการสกัดเรียบร้อยแล้วเตรียมสารละลายซึ่งส่วนผสมทั้งหมด 50 µl ประกอบด้วย 10x buffer 5 µl (500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl pH 9.0) dNTP mix (10 mM) 1.25 µl, Forward primer (10 µM) 1 µl, Reverse primer (10 µM) 1 µl, Template 2 µl และ *Taq* DNA polymerase (5000 U/ml) 0.5 µl และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 35.5 µl ซึ่งความเข้มข้นทั้งหมดรวมกันจะได้ 50 µl ผสมส่วนต่าง ๆ ให้เข้ากัน ปิดหลอดปฏิกิริยาให้สนิท นำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Initiation denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	15 นาที

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตามขั้นตอนต่อไปนี้ จำนวน 35 รอบ

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 วินาที
Annealing	50 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 วินาที
Elongation	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Final extention	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	10 นาที

5.1.4 Visualization

นำสารละสายจากปฏิกิริยา10 µl ผสมกับ Bromophenol blue (0.25% Bromophenolblue, 30% glycerol) ปริมาตร 2 µl จากนั้นนำ Load บน 2 % Agarose gel ใน TAE buffer (0.04 M Tris-Acetate, 0.01 M EDTA) ซึ่งมี Ethidium bromide (10 mg/ml) ผสมอยู่ 10 µl run gel เป็นเวลา 60 นาที ที่กำลังไฟฟ้า 80 V จากนั้นตรวจสอบโดยใช้ UV-transilluminator พร้อมบันทึกภาพ

5.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสังเคราะห์จำนวน 12 ชนิด ต่อแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* และ MRSA

5.2.1 การทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสังเคราะห์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disk diffusion (NCCLS, 2004)

5.2.1.1 การเตรียมดิสก์ทดสอบของสารสังเคราะห์

คำนวณความเข้มข้นของสารสังเคราะห์ที่ต้องการทดสอบและชั่งสารสังเคราะห์ให้ได้น้ำหนักที่คำนวณไว้ นำมาละลายด้วย 95% Ethanol ให้ได้ปริมาตรตามที่คำนวณไว้ หยดสารสังเคราะห์ลงบน Disk ไร้เชื้อแผ่นละ 20 ไมโครลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บใส่ใน Desiccator ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.2.1.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Disk Diffusion (Collins et al., 2004)

ใช้ไม้พันสำลีจุ่มใน Suspension ของเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ และนำมาป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar เติม NaCl 4% ให้ทั่วจานอาหาร โดยป้าย 3 ระนาบแต่ละระนาบทำมุม 60 องศา ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที แต่ไม่เกิน 15 นาที ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟทิ้งไว้สักครู่ให้เย็นหยิบแผ่นดิสก์วางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่แบคทีเรียทดสอบถูกยับยั้ง (Inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตรและบันทึกผลการทดสอบ โดยเลือกสารสังเคราะห์ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญที่ดีที่สุดนำมาศึกษาต่อ