บทที่ 3
การดำเนินการวิจัย

การศึกษาการสร้างเอนไซม์หรือสารพิษที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อกลุ่ม non-O1 ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและผู้ป่วย

3.1 การตรวจหายีน *rtxA* และ *rtxC* ด้วยวิธี duplex PCR

A. การสกัด DNA

วิธีการสกัดเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น กล่าวคือ การเตรียม DNA ของเชื้อ *V.cholerae* โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Puregene DNA Purification System, Genta System, USA) โดยนำ susupensionของเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 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 50 µl / reaction ประกอบด้วย 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5 mM, Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) 200 µM, Primer แต่ละสาย 0.2 µM, Taq DNA polymerase 2.0 U, DNA template 200 ng, Sterile water.

C. *DNA amplification*

1. สภาวะที่เหมาะสมในการทำ duplex PCR เพื่อตรวจหายีน *rtxA* และ *rtxC* โดยใช้ primer sequence และ PCR condition ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดง Primer sequence และ PCR condition ของ duplex-PCR

Gene	Primer sequence (5'->3')	PCR condition	Reference
rtxA	F- AGGGTTAACGGATCCGAAAGT	94°C; 12 min (1 cycle)	In this study
(315 bp.)	R- GTTGACGCTGTTTTGGGTACA	94°C; 1 min	
rtxC	F- CGACGAAGATCATTGACGACCTC	55°C; 1 min	Modified from
(263 bp.)	R- CATCGTCGTTATGTGGTTGC	72°C; 1 min (30 cycle)	Chow,K.H.
		72°C; 10 min (1 cycle)	(2001)

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

3.2 ตรวจการสร้าง Hemolysin ด้วยวิธี Hemolysin assay

A. *สายพันธุ์เชื้อที่ใช้ในการวิจัย:* เชื้อ *V. cholerae* กลุ่ม non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม อย่างละ 30 สายพันธุ์

B. *การเตรียม culture filtrates:*

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *V. cholerae* ลงใน brain heart infusion (BHI) broth บ่มที่ 37°C ประมาณ 16 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองผ่าน 0.45 μm. และเก็บที่ -20°C

C. *วิธีทดสอบ:*

นำ culture filtrate ของเชื้อปริมาตร 0.8 ml. ผสมกับ red blood cell suspension 0.5% ปริมาตร 0.2 ml นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นที่ความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัด OD 450 nm. โดย positive control คือ red blood cell suspension 0.5% ปริมาตร 0.2 ml ผสมกับ sterile water 0.8 ml ส่วน negative control คือ red blood cell suspension 0.5% ปริมาตร 0.2 ml ผสมกับ PBS 0.8 ml

3.3 ตรวจการสร้าง Protease ด้วยวิธี Protease assay

A. *สายพันธุ์เชื้อที่ใช้ในการวิจัย:* เชื้อ *V.cholerae* กลุ่ม non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม อย่างละ 30 สายพันธุ์

B. *การเตรียม culture filtrates:*

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *V. cholerae* ลงใน brain heart infusion (BHI) broth บ่มที่ 37°C ประมาณ 16 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองผ่าน 0.45 µm. และเก็บที่ -20°C

C. วิธีการทดสอบ

culture filtrate ของเชื้อปริมาตร 10 µl. หยดลงบน milk-agar plates จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C ประมาณ 24 ชม. ตรวจผลด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใส (clear zone) รอบบริเวณที่หยดเชื้อ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีการแปลผลดังนี้

clear zone <8 mm. = low activity

clear zone 8-12 mm. = Intermediate activity

clear zone >12 mm. = High activity

โดยมี *V.cholerae* O1 El Tor strain เป็น positive control และ BHI broth เป็น negative control

3.4 การศึกษา Cytotoxic activity ของเชื้อ

A. *สายพันธุ์เชื้อที่ใช้ในการวิจัย:* เชื้อ *V.cholerae* กลุ่ม non-O1 ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม อย่างละ 30 สายพันธุ์

B. *การเตรียม culture filtrates:*

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *V. cholerae* ลงใน T_1N_1 broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชม. แล้วนำ 0.1 ml. ของเชื้อเติมลงใน 10 ml. ของ BHI broth แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ประมาณ 18 ชม. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วน supernatants กรองผ่าน membrane 0.45 µm. เก็บที่ -20 °C

C. วิธีการทดสอบ

ทำได้โดยการเติม CHO cells suspension ปริมาตร 100 µl. ลงใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C; 5% CO_2 ประมาณ 18 ชม. จากนั้นจึงเติม culture filtrates ปริมาตร 100 µl แล้วบ่มอุณหภูมิ 37°C; 5% CO_2 เป็นเวลา 5 ชม. ตรวจดูการเกิด cytotoxicity โดยการตรวจนับและดูลักษณะรูปร่างของเซลล์จะเปลี่ยนเป็นรูปกลม (rounding), การยืดยาวของเซลล์ (elongation) หรือเกิด necrosis โดยมี negative control คือ เชื้อสายพันธุ์ *hlyA-* หรือใช้ BHI broth ส่วน positive control คือ เชื้อ *V. cholera* กลุ่ม O1