บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษารวบรวมจากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักกุ้งทั้งจากภาครัฐและเอกชน โดยนำกุ้งที่ตรวจพบการเรืองแสงมาล้างด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากผิวตัวกุ้งหรือจากน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง เช็ดเปลือกกุ้งบริเวณส่วนหัวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตัดเปิดเอาส่วนของเปลือกที่บริเวณหัวออกอย่างระมัดระวังด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่น เขี่ยเชื้อจากตับและตับอ่อนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Marine Agar (MA) นอกจากตับและตับอ่อนเขี่ยเชื้อส่วนอื่นที่พบการเรืองแสงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการทำ single colony (ชนกันต์ จิตมนัส, 2547) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MA เพื่อนำมาใช้ในการศึกษา การเก็บรักษาเชื้อจะเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion broth (BHIB) ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ตารางที่ 3 แสดงที่มาของสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงและแหล่งที่มา

สายพันธุ์แบคทีเรีย	อวัยวะที่แยกเชื้อได้	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เดือน/ปี ที่แยกเชื้อ
KKU 46001	ตับ-ตับอ่อน	ศพจ.อุดรธานี*	10/2546
KKU 46002	ระยางค์	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46003	ตา	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46005	ตับ-ตับอ่อน	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46006	ระยางค์	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46007	กล้ามเนื้อ	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46008	ลูกกุ้ง	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46009	ลูกกุ้ง	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 46010	ตับ-ตับอ่อน	ศพจ.อุดรธานี	10/2546
KKU 47001	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์**	3/2547
KKU 47002	ระยางค์	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47003	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47005	กล้ามเนื้อ	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47006	ระยางค์	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47011	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47012	ระยางค์	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47014	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47015	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47016	กล้ามเนื้อ	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47017	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47018	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47019	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	3/2547
KKU 47020	กล้ามเนื้อ	สปจ.กาฬสินธุ์	5/2547
KKU 47021	ระยางค์	สปจ.กาฬสินธุ์	5/2547
KKU 47022	ตับ-ตับอ่อน	สปจ.กาฬสินธุ์	5/2547
KKU 47023	กล้ามเนื้อ	สปจ.กาฬสินธุ์	5/2547
KKU 47024	ตับ-ตับอ่อน	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47025	ตับ-ตับอ่อน	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47026	ระยางค์	สพจ.สุรินทร์	5/2547

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงและแหล่งที่มา (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรีย	อวัยวะที่แยกเชื้อได้	สถานที่เก็บตัวอย่าง	เดือน/ปี ที่แยกเชื้อ
KKU 47027	ระยางค์	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47028	ตับ-ตับอ่อน	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47030	ตับ-ตับอ่อน	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47032	กล้ามเนื้อ	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47033	กล้ามเนื้อ	สพจ.สุรินทร์	5/2547
KKU 47034	ตับ-ตับอ่อน	สพจ.สุรินทร์	5/2547

หมายเหตุ * ศพจ. คือ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด
** สปจ. คือ สถานีประมงน้ำจืด

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

การสกัด genomic DNA ของแบคทีเรียใช้ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม และเอธิลอัลกอฮอล์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook *et al.* (1998) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามมาเลี้ยงในอาหารเหลว BHIB ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มในเครื่อง Incubator shaker (Innova 4230, NEW BRUNSWITK SCIENTIFIC, USA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 130 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีและแยกเอาเฉพาะเซลล์แบคทีเรีย เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TEN ลงไป 500 ไมโครลิตร แล้วย้ายลงหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมฟีนอลและคลอโรฟอร์มอย่างละ 250 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเป็นเวลาประมาณ 4-10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม RNaseA ปริมาตร 2 ไมโครลิตรเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมฟีนอลลงไป 250 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ใน 2 ของปริมาตรที่มีอยู่) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตตลงไป 50 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรที่มีอยู่) และไอโซโพรพานอลลงไป 300 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ใน 6 ของปริมาตรที่มีอยู่) คว่ำหลอดไปมาเบาๆ หลายๆ ครั้ง จะเห็นการตกตะกอนของดีเอ็นเอเป็น

เส้นสีขาวๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-10 นาที เท สารละลายออกเบาๆ อย่าให้ตะกอนสีขาวที่ติดก้นหลอดหลุดออก เติมเอธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ลงไป 200 ไมโครลิตร ใช้นิ้วดีดเบาๆ หลายๆ ครั้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-10 นาที เทเอธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ออกอย่างระมัดระวัง ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มและเจาะรูประมาณ 2-3 รู ปล่อยทิ้งไว้ข้ามคืนให้แห้ง หลังจากตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ลงไป 20 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากกุ้งก้ามกราม

การสกัด genomic DNA จากกุ้งก้ามกรามดัดแปลงจากวิธีการของ Hillis *et al.* (1990) โดยนำเนื้อเยื่อกุ้งประมาณ 0.15 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้เป็นผงละเอียดและถ่ายลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ STE ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ STE) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ SDS 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมฟีนอล : คลอโรฟอร์มอย่างละ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตต 50 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ใน 10 เท่าของปริมาตรที่มีอยู่) และไอโซโพรพานอลลงไป 300 ไมโครลิตร (ประมาณ 1 ใน 6 ของปริมาตรที่มีอยู่) คว่ำหลอดไปมาเบาๆ หลายๆ ครั้ง จะเห็นการตกตะกอนของดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทเอธิลอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ออกอย่างระมัดระวังแล้วปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์ม เจาะรูประมาณ 2-3 รู ปล่อยทิ้งไว้ข้ามคืนให้แห้งหลังจากตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้ว เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

วิธีการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (รุ่น SPECTRONIC 1001 PLUS, MILTON ROY, USA) และวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยก

ขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะใช้ทั้ง 2 วิธีเพื่อให้การวัดปริมาณดีเอ็นเอออกมาถูกต้องที่สุด

3.3.1 วิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จะใช้ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด (ซึ่งต่างจากโปรตีนที่ดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร) ก่อนที่จะนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จะใช้น้ำกลั่น (blank) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน cuvette และปรับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร ของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ให้เป็นศูนย์ จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ใส่ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 398 ไมโครลิตร ในหลอด microtube 1.5 มิลลิลิตร (เจือจางลง 200 เท่า) แล้ววัดค่าที่ได้จากเครื่อง

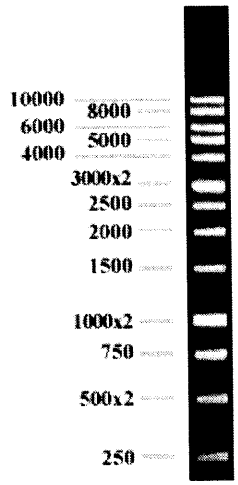
ค่าที่ได้จากการวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จะนำไปเปรียบเทียบกับค่า OD เท่ากับ 1 ของดีเอ็นเอเกลียวคู่ จะมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปคูณด้วยจำนวนเท่าของดีเอ็นเอที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น ซึ่งสามารถสรุปการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ = ค่าที่วัดได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ x 50 x 200
นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl)

3.3.2 วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

การวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งอะกาโรสเจล 1 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่าปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายอะกาโรสเจลในไมโครเวฟจนกระทั่งเป็นสารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอให้เจลอุ่นก่อนเทลงในถาดที่เตรียมไว้ จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 1-2 ชั่วโมงแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลพร้อมถาดรองใส่ลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส (GelMate, TOYOBO, Japan) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่าลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสให้ท่วมแผ่นเจล จากนั้นดูด loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดมาได้ 3 ไมโครลิตร ลงบนพาราฟิล์ม แล้วจึงดูดสารละลายทั้งหมดลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ (เว้นช่องที่ 1 ไว้สำหรับ DNA ladder) จนครบทุกตัวอย่าง สำหรับช่องที่ 1 ของแผ่นเจลที่เว้นไว้สำหรับ DNA ladder (DNA ladder 1 kb ของ BIORON) (ภาพที่ 3) จะผสม loading buffer 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 4 ไมโครลิตร และ DNA ladder 1 ไมโครลิตร บนพาราฟิล์มผสมให้เข้ากันก่อนใส่ลงไปในช่องที่ 1 ของแผ่นเจล จากนั้นใส่เอธิเดียมโบรไมด์ 0.5-1 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลาย

บัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 0.5 เท่าที่อยู่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใส่ให้ทั่วทั้งด้านบนและด้านล่างของช่องเจล แล้วใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลาประมาณ 90 นาที ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปโดยสังเกตจากสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer โดยทั่วๆ ไปแล้ว loading buffer มี 2 สี คือ สีฟ้า (bromophenol blue) และสีม่วง (xylene cyanole FF) โดยให้สีฟ้าที่อยู่ด้านล่างสุดห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 2 เซนติเมตรแล้วจึงปิดเครื่อง หากใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อเซนติเมตร จะใช้เวลาประมาณ 50 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วตรวจสอบดูว่ามีปริมาณดีเอ็นเอหรือไม่ก่อนถ่ายภาพเก็บเอาไว้

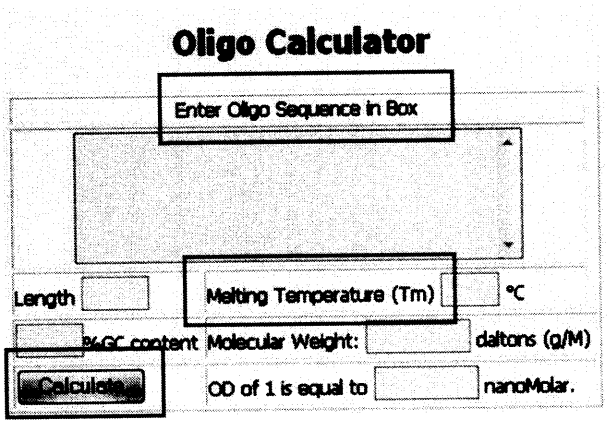


ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ของ DNA ladder 1 kb ของ BIORON
ที่มา : http://www.bioron.net/

3.4 การสร้างไพรเมอร์ (primers)

การสร้างไพรเมอร์จะสืบค้นข้อมูลบนอินเตอร์เน็ตเพื่อดูฐานข้อมูล (database) เกี่ยวกับดีเอ็นเอที่มีใน NCBI Homepage (GENBANK) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ใส่ข้อมูลของ *V. harveyi* และ 16s rDNA ลงไป เลือกข้อมูลที่เป็นลำดับเบสของ 16s rDNA ของ *V. harveyi* ออกมาและคัดลอกลำดับเบสลงในโปรมแกรม Microsoft word (หรือ Notepad) นำลำดับเบสที่ได้ไปใส่ในโปรแกรม blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) เพื่อเอาลำดับเบส 16s rDNA ของ *V. harveyi* ไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูลทั้งหมดที่มีใน GENBANK โปรแกรมนี้จะเลือกเอาลำดับเบสที่มีความเหมือนหรือใกล้เคียงกับลำดับเบส 16s rDNA ของ *V.*

harveyi ออกมา ให้เลือกเอาลำดับเบสที่ได้จากโปรแกรม blastn ที่พบใน *V. harveyi* และเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่นๆ ออกมา รวมทั้งแบคทีเรียสกุลอื่นๆ ที่มีอยู่ คัดลอกลำดับเบสทั้งหมดลงในโปรแกรม Microsoft word ลำดับเบสของแต่ละสิ่งมีชีวิตจะมี accession number ดังนั้นในการสืบค้นข้อมูลสามารถใช้ accession number แทนลำดับเบสนั้นๆ ได้ นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาจากโปรแกรม blastn ทั้งหมดใส่ในโปรแกรม clustalW ของ EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/clustalW/) เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างกันของเบสในแต่ละตำแหน่ง โปรแกรมนี้จะจัดข้อมูลเปรียบเทียบให้ทั้งหมดจากลำดับเบสของแบคทีเรียแต่ละ accession number ด้านล่างของ accession number ตัวสุดท้ายจะมีเครื่องหมายดอกจันอยู่ที่เบสบางตัว หมายความว่า ตำแหน่งนั้นๆ มีเบสเหมือนกันในทุก accession number ส่วนเบสที่ไม่มีดอกจันหมายความว่า ตำแหน่งนั้นๆ มีเบสแตกต่างกัน ไม่เหมือนกันในทุก accession number ดังนั้นการสร้างไพรเมอร์ที่จำเพาะ (specific primers) สำหรับ *V. harveyi* จะเลือกบริเวณลำดับเบสของ *V. haveyi* ทุก accession number ที่มีตำแหน่งเบสเหมือนกัน และเป็นตำแหน่งที่เชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่นรวมทั้งแบคทีเรียสกุลอื่นมีเบสแตกต่างกับ *V. harveyi* ขนาดความยาวของไพรเมอร์ที่สร้างส่วนใหญ่มีความยาวตั้งแต่ 15-22 เบส เมื่อเลือกตำแหน่งที่สร้างไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ได้ทั้ง 2 สายแล้ว เฉพาะสายไพรเมอร์ rVH-2 จะต้องเปลี่ยนลำดับเบสใหม่ให้มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมและมีทิศทางตรงกันข้ามกับที่ออกแบบ เพื่อทำให้สายไพรเมอร์ rVH-2 มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับอีกสายหนึ่ง เนื่องลำดับเบสของ 16s rDNA ที่ได้จาก GENBANK มีเพียงสายเดียวทิศทางจาก 5' ไป 3' ซึ่งผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะเกิดขึ้นเมื่อมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในทิศทางที่สวนเข้าหากันทั้ง 2 สายของดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อได้ลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้ง 2 สายแล้ว นำลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละสายไปใส่ในโปรแกรม Oligo calculator เพื่อคำนวณค่า Melting Temperature จาก http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html โดยนำลำดับเบสของไพรเมอร์ใส่ในช่อง Enter Oligo Sequence in Box กดปุ่ม calculate แล้วดูค่า Tm ที่ Melting Temperature (ภาพที่ 4) หรือสามารถที่จะคำนวณได้เองจากสูตร Tm = 4 (G+C) + 2 (T+A)

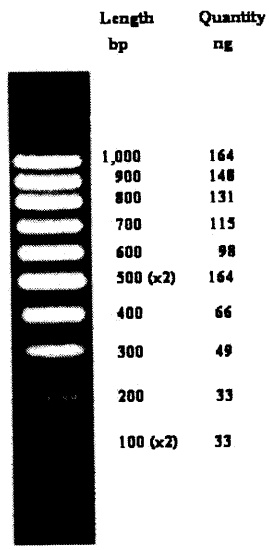


ภาพที่ 4 การคำนวนค่า Melting Temperature ด้วยโปรแกรม Oligo calculator จาก http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html

3.5 การทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Genomic DNA ที่สกัดได้ในหัวข้อ 3.2.1 ของแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 แยกได้จาก luminescing amphipod (*Talorchestia* sp.), Woods Hole, MA (http://www.atcc.org/common/catalog/bacteria/bacteriaIndex.cfm) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Kishio Hatai จาก Nippon Veterinary and Animal Science University ประเทศญี่ปุ่น และเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สายพันธุ์ KU 44001 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. นนทวิทย์ อารีย์ชน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ใช้เป็น reference strains นำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจากไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 สารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 3.34 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) (Promega) 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ (Bioron), 10x PCR buffer (Promega) 2.0 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (Fermentas, 500U/μl) 0.15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler (PCR HYBAID, HB-TD-CM-05A, UK) โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 40 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

จำนวน 1 รอบ เพื่อให้เกิด pimer extension ที่สมบูรณ์ จากนั้นผ่านอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ เพื่อให้หลอดเย็นลง หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) (ภาพที่ 5) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT (Serial Number : V02 6063, FRANCE) แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ของ DNA ladder 100 bp (BIORON)
ที่มา : http://www.bioron.net/

3.6 การหา PCR condition สำหรับไพรเมอร์

3.6.1 การตรวจสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แตกต่างกัน คือ 2.5, 5.0, 10.0 และ 15.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 3.34 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, Taq polymerase (500U/μl) 0.15 ไมโครลิตร และทำให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 40 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล

3.6.2 การตรวจสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่แตกต่างกัน คือ 5, 1, 0.5, และ 0.1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, Taq polymerase (500U/μl) 0.15 ไมโครลิตร และทำให้ให้ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 40 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล

3.6.3 การตรวจสอบหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้ความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่แตกต่างกัน คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, Taq polymerase (500U/µl) 0.15 ไมโครลิตร และทำให้ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 40 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล

3.6.4 การตรวจสอบหาจำนวนรอบ (PCR cycle) ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโม

ลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, Taq polymerase (500U/µl) 0.15 ไมโครลิตร และทำให้ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension เริ่มจาก 21, 25, 29 และ 33 รอบตามลำดับ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล

3.6.5 การตรวจสอบหาอุณหภูมิ (annealing temperature) ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, Taq polymerase (500U/µl) 0.15 ไมโครลิตร และทำให้ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 29 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล

3.7 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง

เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากวิธีการในหัวข้อ 3.6 นำสภาวะนั้นมาใช้สำหรับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 สารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (500U/µl) 0.15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 29 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล

3.8 การตรวจสอบลำดับเบสในส่วนของยีน 16s rRNA

ผลผลิตที่คัดแยกได้จากการใช้ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จะนำไปหาลำดับเบสเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ 3.7 ว่า ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นลำดับเบสจากส่วนของยีน 16s rRNA และไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่ได้ออกแบบไว้ ทั้งนี้ได้ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่คัดแยกได้ในหลอด microcentrifuge ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT) อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (ศวทช.) ถนนพระราม 60 ทุ่งพญาไท ราชเทวี กรุงเทพมหานคร

3.9 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกราม

นำ genomic DNA ของกุ้งก้ามกรามที่สกัดได้ในหัวข้อ 3.2.2 มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อเช็คดูว่า ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 มีความจำเพาะต่อเชื้อ

V. harveyi และไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกรามหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกัน เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ได้จากวิธีการในหัวข้อ 3.6 สารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (500U/μl) 0.15 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Thermocycler โดยกำหนดโปรแกรมดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ Denaturation ถึง Extension ทั้งหมด 29 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้และบันทึกภาพถ่ายดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT แล้วเก็บข้อมูลหรือนำผลผลิตของปฏิกิริยาไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ผล