

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกุ้งก้ามกรามที่ทำให้เกิดโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักจากรัฐบาลในเขตพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ อุดรธานี และสุรินทร์ ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 35 สายพันธุ์ ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2547 จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลม ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย มีสีขาวครีม เรืองแสงได้ในที่มืด โดยให้แสงสีเขียวปนเหลือง เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Marine agar ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำมาย้อม Gram stain พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้น มีขนาดเฉลี่ย  $0.5-1.5 \times 2-3.5$  ไมโครเมตร และมีบางเซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูป comma-shaped ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อสกุล *Vibrio* ปะปนอยู่ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามในการแยกเชื้อดังกล่าวมีเชื้อแบคทีเรียอื่นปะปนมาด้วยซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีมีขนาดใหญ่กว่า และมีสีครีมปนเหลืองจำนวน 15 สายพันธุ์ ซึ่งในการทดสอบ O/129 sensitivity test พบว่า ให้ผลเป็นบวกทั้ง 20 สายพันธุ์ oxidase ให้ผลเป็นบวก 25 สายพันธุ์ และ catalase ให้ผลเป็นบวกทุกสายพันธุ์ ดังที่แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกึ่งก้ามกรามป่วยที่เป็นโรค  
เรืองแสงในโรงเพาะฟักด้วย O/129 sensitivity, oxidase test และ catalase test

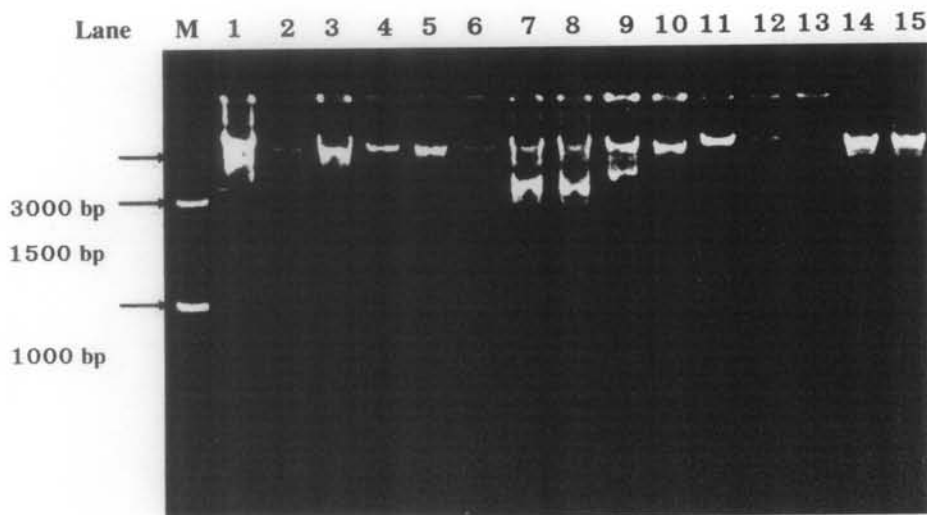
| สายพันธุ์แบคทีเรีย | O/129 sensitivity | oxidase | catalase |
|--------------------|-------------------|---------|----------|
| 46001              | +                 | +       | +        |
| 46002              | +                 | +       | +        |
| 46003              | -                 | +       | +        |
| 46005              | -                 | +       | +        |
| 46006              | -                 | +       | +        |
| 46007              | -                 | +       | +        |
| 46008              | -                 | +       | +        |
| 46009              | -                 | +       | +        |
| 46010              | -                 | -       | +        |
| 47001              | +                 | +       | +        |
| 47002              | -                 | +       | +        |
| 47003              | -                 | +       | +        |
| 47005              | +                 | +       | +        |
| 47006              | +                 | +       | +        |
| 47011              | +                 | +       | +        |
| 47012              | +                 | +       | +        |
| 47014              | +                 | +       | +        |
| 47015              | +                 | +       | +        |
| 47016              | +                 | +       | +        |
| 47017              | +                 | +       | +        |
| 47018              | +                 | +       | +        |
| 47019              | -                 | +       | +        |
| 47020              | +                 | -       | +        |
| 47021              | -                 | -       | +        |
| 47022              | -                 | -       | +        |
| 47023              | +                 | -       | +        |
| 47024              | +                 | +       | +        |

**ตารางที่ 4** ผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ่มก้ามกรามป่วยที่เป็นโรค  
เรืองแสงในโรงเพาะฟักด้วย O/129 sensitivity, oxidase test และ catalase test  
(ต่อ)

| สายพันธุ์แบคทีเรีย | O/129 sensitivity | oxidase | catalase |
|--------------------|-------------------|---------|----------|
| 47025              | +                 | -       | +        |
| 47026              | -                 | -       | +        |
| 47027              | +                 | +       | +        |
| 47028              | +                 | +       | +        |
| 47030              | +                 | +       | +        |
| 47032              | -                 | -       | +        |
| 47033              | -                 | -       | +        |
| 47034              | +                 | -       | +        |

#### 4.2 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ่มก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงรวมทั้ง reference strains โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook *et al.* (1998) เมื่อวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่ 100-530 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHIB ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเมื่อใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจะได้แถบดีเอ็นเอดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ตัวอย่าง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ Lane M : DNA ladder 1 kb; Lane 1 : KKU 46001 (530 ng/ $\mu$ l); Lane 2 : KKU 46002 (160 ng/ $\mu$ l); Lane 3 : KKU 46008 (350 ng/ $\mu$ l); Lane 4 : KKU 47001 (200 ng/ $\mu$ l); Lane 5 : KKU 47014 (230 ng/ $\mu$ l); Lane 6 : KKU 47015 (150 ng/ $\mu$ l); Lane 7 : KKU 47016 (320 ng/ $\mu$ l); Lane 8 : KKU 47018 (300 ng/ $\mu$ l); Lane 9 : KKU 47020 (260 ng/ $\mu$ l); Lane 10 : KKU 47024 (240 ng/ $\mu$ l); Lane 11 : KKU 47025 (250 ng/ $\mu$ l); Lane 12 : KKU 47032 (170 ng/ $\mu$ l); Lane 13 : KKU 47033 (140 ng/ $\mu$ l); Lane 14 : KKU 47034 (340 ng/ $\mu$ l) และ Lane 15 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 (360 ng/ $\mu$ l)

#### 4.3 ผลการออกแบบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาได้ออกแบบจากข้อมูลใน NCBI Homepage (GENBANK) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งใช้ข้อมูลจากลำดับเบสส่วน 16s rDNA จากแบคทีเรียทั้งหมด 100 accession numbers (ตารางที่ 5) โดยเป็นสกุล *Vibrio* ทั้งหมด 60 accession numbers เป็นชนิด *V. harveyi* 7 accession numbers ส่วนอีก 40 accession numbers เป็นแบคทีเรียในสกุล *Mucis* และสกุล *Photobacterium* ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่สร้างขึ้นนี้มีความยาว 21 คู่เบสทั้ง 2 สาย ซึ่งทำการสร้างจากลำดับเบสของ *V. harveyi* และเป็นลำดับเบสที่ไม่เหมือนกับ *Vibrio* ชนิดอื่นหรือแบคทีเรียสกุลอื่น ๆ (ภาพที่ 7)

ตารางที่ 5 Accession number ของลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิด

| Accession number | ชนิดของแบคทีเรีย                         |
|------------------|------------------------------------------|
| AY750578         | <i>Vibrio harveyi</i> strain S35         |
| AY750577         | <i>V. harveyi</i> strain S20             |
| AF319768         | <i>Vibrio</i> sp. BB4                    |
| AJ312382         | <i>V. trachuristrain</i> LMG 19643       |
| X74693           | <i>V. carchariae</i> (ATCC 35084T)       |
| AY750575         | <i>V. harveyi</i> strain NCIMB1280T      |
| AY750576         | <i>V. harveyi</i> strain LMG4404T        |
| AY046956         | <i>V. harveyi</i> strain M4              |
| X74723           | <i>V. proteolyticus</i> (ATCC 15338T)    |
| AF134581         | <i>V. carchariae</i>                     |
| AJ293802         | <i>V. Pelagius</i> strain CECT 4202T     |
| AB000393         | <i>V. haliotocoli</i> strain IAM14599    |
| AY332565         | <i>V. harveyi</i> strain EcGS020802      |
| AY332564         | <i>V. harveyi</i> strain EcGY020401      |
| AB000392         | <i>V. haliotocoli</i> strain IAM14598    |
| AY217772         | <i>Vibrio</i> sp. BLI-41                 |
| X74717           | <i>V. nigripulchritudo</i> (ATCC 27043T) |
| AB000391         | <i>V. haliotocoli</i> strain IAM14597    |
| AY155584         | <i>V. supersteus</i> strain G3-15        |
| AF519806         | <i>V. supersteus</i>                     |
| AY155583         | <i>V. supersteus</i> strain G3-11        |
| AY292927         | <i>V. lentus</i> strain SI01             |
| AY155585         | <i>V. supersteus</i> strain G3-29        |
| AY155582         | <i>V. supersteus</i> strain B2-3         |
| AJ421444         | <i>V. penaeicida</i> strain DSM 14398T   |
| AJ437191         | <i>V. penaeicida</i> strain LMG 19663T   |
| AF199438         | <i>Vibrio</i> sp. DS40M5                 |
| AY245188         | <i>V. parahaemolyticus</i> isolate L21   |
| AY292917         | <i>Photobacterium leiognathi</i>         |

ตารางที่ 5 Accession number ของลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (ต่อ)

| Accession number | ชนิดของแบคทีเรีย                          |
|------------------|-------------------------------------------|
| AY654751         | Mucus bacterium 13                        |
| AY654742         | Mucus bacterium 19                        |
| AY245189         | <i>V. vulnificus</i> isolate 9            |
| AB095447         | <i>Photobacterium</i> sp. YS27-3          |
| AY654822         | Mucus bacterium 8                         |
| AY654796         | Mucus bacterium 7                         |
| AY654792         | Mucus bacterium 54                        |
| AY455872         | <i>P. mandapamensis</i> seafl.1.3         |
| AY455870         | <i>P. leiognathi</i> ATCC 25587           |
| AY341442         | <i>P. mandapamensis</i> strain ATCC 33981 |
| AY257971         | <i>V. gallicus</i> strain CIP 107864      |
| AY654827         | Mucus bacterium 98                        |
| AY455873         | <i>P. mandapamensis</i> seafl.1.4         |
| AY257975         | <i>V. gallicus</i> strain CIP 107867      |
| AY257974         | <i>V. gallicus</i> strain CIP 107866      |
| AY257973         | <i>V. gallicus</i> strain CIP 107865      |
| AY257972         | <i>V. gallicus</i> strain CIP 107863      |
| AY341441         | <i>P. mandapamensis</i> strain ATCC 27561 |
| AY341440         | <i>P. mandapamensis</i> strain PL-721     |
| AY292941         | <i>V. fischeri</i> isolate EH701          |
| AY204499         | <i>P. leiognathi</i> strain lster1.1      |
| AY204490         | <i>P. leiognathi</i> strain lbind1.1      |
| AY204494         | <i>P. leiognathi</i> strain ljone1.1      |
| AY292929         | <i>V. logei</i> strain Sron101401         |
| AY204501         | <i>P. leiognathi</i> strain smega1.1      |
| AY204496         | <i>P. leiognathi</i> strain lnuch1.1      |
| AY204495         | <i>P. leiognathi</i> strain lleuc1.1      |
| AY455871         | <i>P. mandapamensis</i> seafl.1.1         |
| AY654784         | Mucus bacterium 45                        |

ตารางที่ 5 Accession number ของลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (ต่อ)

| Accession number | ชนิดของแบคทีเรีย                     |
|------------------|--------------------------------------|
| AY204498         | <i>P. leiognathi</i> strain lrivu1.1 |
| AY204497         | <i>P. leiognathi</i> strain lphil1.1 |
| AY204493         | <i>P. leiognathi</i> strain lfasc1.1 |
| AY204492         | <i>P. leiognathi</i> strain lequu1.1 |
| AY204491         | <i>P. leiognathi</i> strain lelou1.1 |
| AY204488         | <i>P. leiognathi</i> strain gach1.1  |
| X74686           | <i>P. leiognathi</i> (ATCC 25521T)   |
| AY204500         | <i>P. leiognathi</i> strain sensi1.2 |
| AY292923         | <i>V. fischeri</i> strain ET101      |
| AY204489         | <i>P. leiognathi</i> strain gminu1.1 |
| AY292946         | <i>V. fischeri</i> strain MJ101      |
| AY292945         | <i>V. fischeri</i> strain MDR7       |
| AY292919         | <i>V. fischeri</i>                   |
| AY654780         | Mucus bacterium 47                   |
| AY292948         | <i>V. fischeri</i> strain SI1D       |
| AY292943         | <i>V. fischeri</i> strain ET401      |
| AY292942         | <i>V. fischeri</i> strain ET301      |
| AY292939         | <i>V. fischeri</i> strain CG101      |
| AY292930         | <i>V. fischeri</i> strain WH1        |
| AY292924         | <i>V. fischeri</i> strain SA1G       |
| AY245195         | <i>V. vulnificus</i> isolate 7       |
| AY245180         | <i>V. vulnificus</i> isolate 4       |
| AY292921         | <i>V. fischeri</i> isolate EB12      |
| AY292928         | <i>V. logei</i> strain SL101         |
| AY292925         | <i>V. logei</i> strain SA112         |
| AY292950         | <i>V. fischeri</i> strain SL518      |
| D25309           | <i>P. leiognathi</i>                 |
| AB055784         | <i>Photobacterium</i> sp. Asur-1     |
| AY292951         | <i>P. leiognathi</i> strain SN2B     |

ตารางที่ 5 Accession number ของลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิด (ต่อ)

| Accession number | ชนิดของแบคทีเรีย                      |
|------------------|---------------------------------------|
| AB038031         | <i>Photobacterium</i> sp. HAR23       |
| AJ132227         | <i>V. wodanis</i>                     |
| AY341436         | <i>V. fischeri</i> strain ATCC 7744   |
| AY292944         | <i>P. leiognathi</i> strain LN101     |
| AY292934         | <i>V. logei</i> strain SR181          |
| AF497998         | <i>Photobacterium</i> sp. D151        |
| AY292949         | <i>V. fischeri</i> strain SI1E        |
| AY292932         | <i>V. logei</i> strain 15382          |
| D25307           | <i>P. angustum</i>                    |
| X74702           | <i>V. fischeri</i> (ATCC 7744T)       |
| X74685           | <i>P. angustum</i> (ATCC 25915T)      |
| AY292933         | <i>V. logei</i> strain 35077          |
| AY245187         | <i>V. parahaemolyticus</i> isolate 18 |



(7A)

fvh-1 5' AAACGAGTTATCTGAACCTTC 3'

|          |                       |                         |                     |       |
|----------|-----------------------|-------------------------|---------------------|-------|
| AY750575 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 62    |
| AY750576 | --ACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 57    |
| AY750577 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 88    |
| AY750578 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 88    |
| AF319768 | -AACACATGCAAGTCGAGGGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 80    |
| AJ312382 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 80    |
| AY046956 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGGGAACGATAACGGCG  | 81    |
| AY332565 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 72    |
| AY332564 | -AACACAT-CAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 71    |
| AY245180 | -----                 | -----CTTC               | -----CCGATAACGGGG   | 12    |
| AY245187 | -----                 | -----                   | GTTA-GAAGATAACGGCG  | 21    |
| AY245195 | -----                 | -----                   | -----               | ----- |
| AY245188 | -----                 | -----                   | -----               | ----- |
| AY245189 | -----                 | -----                   | -----               | ----- |
| AF134581 | -----CGAGC            | GGAAACGAGTTATCTGAACCTTC | TCGGGGAACGATAACGGCG | 44    |
| X74693   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 99    |
| AY292941 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 101   |
| X74723   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATATCGGCG  | 99    |
| X74717   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 104   |
| AJ293802 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-GACGATAACGGCG  | 101   |
| AY217772 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGT-GACGATAACGGCG  | 59    |
| AF199438 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTAGTCTGAACCTTC  | GGGG-AACGATAACGGCG  | 73    |
| AB000393 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGANTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 88    |
| AB000391 | --ACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTATCTGAACCTTC   | GGGG-AACGATAACGGCG  | 57    |
| AB000392 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGAGTTTCTGAACCTTC    | GGGG-AACGATAACGGCG  | 71    |
| AY155583 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGATGATTCTGAACCTTC   | GGGG-AACGAATTAGGCG  | 72    |
| AY155585 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGATGATTCTGAACCTTC   | GGGG-AACGAATTAGGCG  | 71    |
| AF519806 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGATGATTCTGAACCTTC   | GGGG-AACGAATTAGGCG  | 70    |
| AY155582 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGATGATTCTGAACCTTC   | GGGG-AACGAATTAGGCG  | 70    |
| AY155584 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGATGATTCTGAACCTTC   | GGGG-AACGAATTAGGCG  | 75    |
| AY654751 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 79    |
| AY654780 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 79    |
| AY654796 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 79    |
| AY654792 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 78    |
| AY654742 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 78    |
| AY654827 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 79    |
| AY654784 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 48    |
| AY257971 | -----AGTCGAGCGG       | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 70    |
| AY257972 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 90    |
| AY257975 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 89    |
| AY257974 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | GGGT-GATTGTGGGCG    | 85    |
| AY257973 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACAACATTGACCCTTC   | TATT-C-----GGCG     | 78    |
| AJ421444 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGA---GAAT-AGCTTGC   | TATT-C-----GGCG     | 68    |
| AJ437191 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGA---GAAT-AGCTTGC   | GGGT-T-TGCTGA-GGCG  | 97    |
| AY292927 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGG---AAATTAGCTTGC   | TAAT-T-TGCTGA----   | 92    |
| AY292929 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---AAATTAGCTTGC   | TAAT-T-TGCTGA----   | 92    |
| AY292925 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---AAATTAGCTTGC   | TAAT-T-TGCTGA----   | 92    |
| AY292928 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---AAATTAGCTTGC   | TAAT-T-TGCTGA----   | 92    |
| AY292934 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---AAATTAGCTTGC   | TAAT-T-TGCTGA----   | 66    |
| AY292949 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---AAAGTAGCTTGC   | TACT-T-TGCTGA----   | 92    |
| AY292933 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---GAATTAGCTTGC   | TAAT-T-CGCTGA----   | 92    |
| AY292932 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---GAATTAGCTTGC   | TAAT-T-CGCTGA----   | 107   |
| AJ132227 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAG---GAATTAGCTTGC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292923 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 105   |
| X74702   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 102   |
| AY292919 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292930 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 102   |
| AY292921 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292943 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292942 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292946 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292945 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292948 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292939 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 80    |
| AY341436 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292950 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 101   |
| AY292924 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | AAACGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 80    |
| AY204491 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 80    |
| AY204488 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 80    |
| AY204492 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC   | GGGG-AACGTTAAGGGCG  | 80    |

|          |                       |                       |                    |     |
|----------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----|
| AY204493 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204497 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204489 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204500 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204495 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY341441 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204496 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY455871 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204494 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204501 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY455873 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204499 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY204498 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY341440 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY455870 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AB095447 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY341442 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY455872 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 78  |
| AY204490 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| D25309   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 80  |
| AY292917 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGG-CG | 78  |
| X74686   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 102 |
| AB055784 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | CAGCGACTTAACTGAACCTTC | GGGG-AACGTTAAGGGCG | 105 |
| AF497998 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAGATTGAT--AGCTTGC | TATC-AATGCTGA----- | 90  |
| AY292951 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAGATTGAT--AGCTTGC | TATC-AATGCTGA----- | 74  |
| AB038031 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAGATTGAT--AGCTTGC | TATC-AATGCTGA----- | 95  |
| AY292944 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAGATTGAT--AGCTTGC | TATC-A-TGCTGA----- | 92  |
| D25307   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAGATTGAT--AGCTTGC | TATC-AATGCTGA----- | 94  |
| X74685   | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAACAGATTGAT--AGCTTGC | TATC-A-TGCTGA----- | 71  |
| AY654822 | -AACACATGCAAGTCGAGCGG | TAGCAGATTGAT--AGCTTGC | TNNN-NTTGCTGA----- | 95  |
|          | CAGCCCACTCCCATGGTGTGA | CGGGCGGTGTGTACAAGGCC  | GGGAACGTATTACCGTG  | 100 |

(7B)

reverse rVH-2 5' TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT 3'

|          |                |                         |                          |     |
|----------|----------------|-------------------------|--------------------------|-----|
| AY750575 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 461 |
| AY750576 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 456 |
| AY750577 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 487 |
| AY750578 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 487 |
| AF319768 | AGTCGTGAGGAAGG | TRGTRKW-GTTAATAGCWSYAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 479 |
| AJ312382 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTAGA-GTTAATAGCTCTAT  | C-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 479 |
| AY046956 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 471 |
| AY332565 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 470 |
| AY332564 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 413 |
| AY245180 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | TTATTTGACGT-TAGCGACAGAA  | 423 |
| AY245187 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 391 |
| AY245195 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 396 |
| AY245188 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 382 |
| AY245189 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 444 |
| AF134581 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 498 |
| X74693   | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 500 |
| AY292941 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 498 |
| X74723   | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | A-NTTTGACGT-TAGCT-GCAGAA | 503 |
| X74717   | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-TTTAATAGATGCAC  | T-TCTTGACGT-TAGCT-GCAGAA | 500 |
| AJ293802 | AGTCGTGAGGAAGG | GGGTGTC-GTTAATAGCGGCAT  | T-ATTTGACGT-TAGCT-GCAGAA | 458 |
| AY217772 | AGTCGTGAGGAAGG | TAGTAGT-GTTAATAGCNCCTAT | C-ATTTGACGT-TAGCT-GCAGAA | 470 |
| AF199438 | AGTCGTGAGGAAGG | TGGTGTC-CCTAATACGCACAT  | N-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 487 |
| AB000393 | AGTCGTGAGGAAGG | CNNTATA-GTTAATAGCTTTAT  | N-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 456 |
| AB000391 | AGTCGTGAGGAAGG | CNNTANA-GTTAATAGCTTNGT  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 470 |
| AB000392 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTAAA-GTTAATAGCTTTAT  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 471 |
| AY155583 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGAA-GTTAATAGCTTCAG  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 470 |
| AY155585 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGAA-GTTAATAGCTTCAG  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 469 |
| AF519806 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGAA-GTTAATAGCTTCAG  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 469 |
| AY155582 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGAA-GTTAATAGCTTCAG  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 474 |
| AY155584 | AGTCGTGAGGAAGG | CNTTGAA-GTTAATAGCTTCAT  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 478 |
| AY654751 | AGTCGTGAGGAAGG | CNTTNAA-GTTAATAGCTTNAT  | N-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 478 |
| AY654780 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGNA-GTTAATAGCTTCAT  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 478 |
| AY654796 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGAA-GTTAATAGCTTCAT  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 477 |
| AY654792 | AGTCGTGAGGAAGG | CNTTNAA-GTTAATAGCTTTAN  | N-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 477 |
| AY654742 | AGTCGTGAGGAAGG | CNTTNAA-GTTAATAGCTTTAN  | N-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 477 |
| AY654827 | AGTCGTGAGGAAGG | CATTNGA-GTTAATAGCTTTAT  | N-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 478 |
| AY654784 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGTA-GTTAATAGCTGCAT  | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 447 |
| AY257971 | AGTCGTGAGGAAGG |                         |                          |     |

|          |                |                        |                          |     |
|----------|----------------|------------------------|--------------------------|-----|
| AY257972 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGTA-GTTAATAGCTGCAT | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 469 |
| AY257975 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGTA-GTTAATAGCTGCAT | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 489 |
| AY257974 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGTA-GTTAATAGCTGCAT | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 488 |
| AY257973 | AGTCGTGAGGAAGG | CGTTGTA-GTTAATAGCTGCAT | C-GTTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 484 |
| AJ421444 | AGCAGTGAGGAAGG | GTGTGAA-GTTAATAGCTTCAT | A-TCTTGACGT-TAGCT-GCAGAA | 477 |
| AJ437191 | AGCAGTGAGGAAGG | GTGTGAA-GTTAATAGCTTCAT | A-YCTTGACGT-TAGCT-GCAGAA | 467 |
| AY292927 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 496 |
| AY292929 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 490 |
| AY292925 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 490 |
| AY292928 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 490 |
| AY292934 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 490 |
| AY292949 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 464 |
| AY292933 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 489 |
| AY292932 | AGTCGTGAGGAAGG | GTGTGTA-GTTAATAGCTGCAT | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 490 |
| AJ132227 | AGTCGTGAGGAAGG | GTATGTA-GTTAATAGCTGCAC | A-TCTTGACGT-TAGCG-ACAGAA | 505 |
| AY292923 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| X74702   | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 504 |
| AY292919 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 501 |
| AY292930 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292921 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 501 |
| AY292943 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292942 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292946 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292945 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTTGTA-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292948 | AGTAGGGAGGAAGG | TGCAGTA-GTTAATAGCTGCTG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292939 | AGTAGGGAGGAAGG | TGCAGTA-GTTAATAGCTGCTG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY341436 | AGTAGGGAGGAAGG | TKYWKKM-GTTAATAGCKKMTG | S-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY292950 | AGTAGGGAGGAAGG | TGCAGTA-GTTAATAGCGTCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY292924 | AGTAGGGAGGAAGG | TGTAGTC-GTTAATAGCTGCAG | C-ATTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 500 |
| AY204491 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204488 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204492 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204493 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204497 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204489 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204500 | AGTAGGGAGGAAGG | CARTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204495 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY341441 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204496 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY455871 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204494 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204501 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY455873 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204499 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204498 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY341440 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY455870 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AB095447 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY341442 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 477 |
| AY455872 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| AY204490 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 479 |
| D25309   | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 477 |
| AY292917 | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 501 |
| X74686   | AGTAGGGAGGAAGG | CAGTGTC-GTTAATAGCGGCAT | T-GTTTGACGT-TACCT-ACAGAA | 504 |
| AB055784 | AGTTGTGAGGAAGG | CAGTAAA-GTTAATAGCTTTAT | T-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 488 |
| AF497998 | AGTTGTGAGGAAGG | CAGTAAA-GTTAATAGCTTTAT | T-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 472 |
| AY292951 | AGTTGTGAGGAAGG | CGTTGAA-GTTAATAGCTTCAG | C-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 493 |
| AB038031 | AGTTGTGAGGAAGG | CGTTGGA-GTTAATAGCTTCAG | C-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 490 |
| AY292944 | AGTTGTGAGGAAGG | CAGTAAA-GTTAATAGCTTTGC | T-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 492 |
| D25307   | AGTTGTGAGGAAGG | CAGTGAA-GTTAATAGCTTCAC | T-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 469 |
| X74685   | AGTTGTGAGGAAGG | CAGTGNA-GTTAATAGCTTCAC | N-GTTTGACGT-TAGCA-ACAGAA | 493 |
| AY654822 | ATCTCTGGAATAAT | CTCTGGATGTCAGAGTAGGTA  | AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATT | 510 |
|          | * * *          | * * *                  | * * *                    |     |

ภาพที่ 7 ตำแหน่งที่สร้างไพรเมอร์ fVH-1 (7A) และ rVH-2 (7B) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW (1.83) multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>)

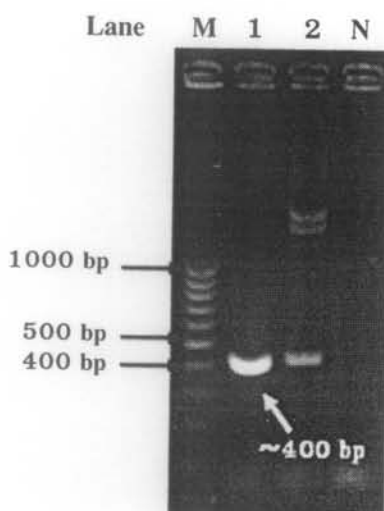
ลำดับเบสของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่สร้างขึ้น และ Melting Temperature ของไพรเมอร์แต่ละสาย สามารถสรุปได้ ดังนี้

fVH-1 5' AAA CGA GTT ATC TGA ACC TTC 3' ( $T_m = 49^\circ\text{C}$ )

rVH-2 5' ATG CAG CTA TTA ACT ACA CTA 3' ( $T_m = 47^\circ\text{C}$ )

#### 4.4 ผลการทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

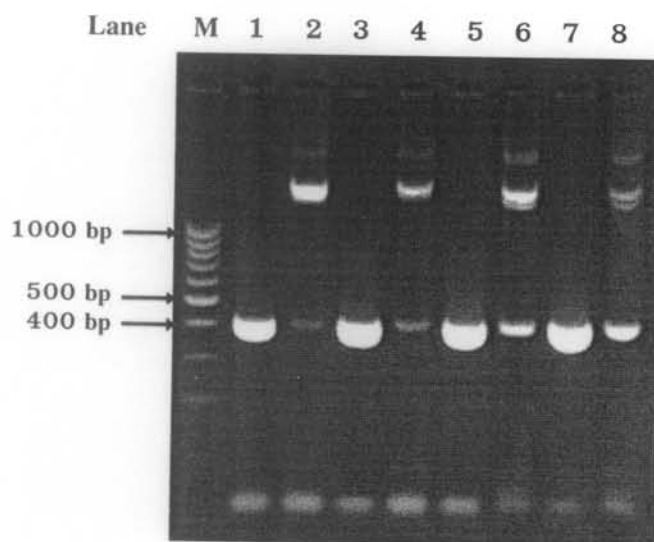
ผลการศึกษาการทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ว่ามีความจำเพาะในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของ 16s rDNA หรือไม่ การทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 เป็น positive control และแบคทีเรียชนิด *A. hydrophila* เป็น negative control พบว่า ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 และ *A. hydrophila* ได้ทั้งคู่ โดยที่ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอของ 100 bp DNA ladder ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับจำนวนเบสที่อยู่ระหว่างไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในยีน 16s rRNA และเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบของ *A. hydrophila* พบว่า ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ โดยดีเอ็นเอ 1 แถบมีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีน้อยกว่า โดยสังเกตจากความหนาและความสว่างของแถบดีเอ็นเอดังกล่าวบนเจล (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126; Lane 2 : *A. hydrophila* และ Lane N : negative control

#### 4.5 ผลการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน of 16s rDNA โดยทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 2.5, 5.0, 10.0 และ 15.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมที่สุด คือ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 น้อยที่สุดในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสมีความชัดเจน และเมื่อนำดีเอ็นเอต้นแบบ ของ *A. hydrophila* ที่ใช้เป็น negative control ความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสได้ แต่ปริมาณแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นั้นมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบของ *A. hydrophila* เป็น 5.0, 10.0 และ 15.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทำให้การสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสของ *A. hydrophila* มีความชัดเจนมากขึ้นตามลำดับ ซึ่งมีผลทำให้ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อ *V. harveyi* ลดน้อยลง ดังภาพที่ 9

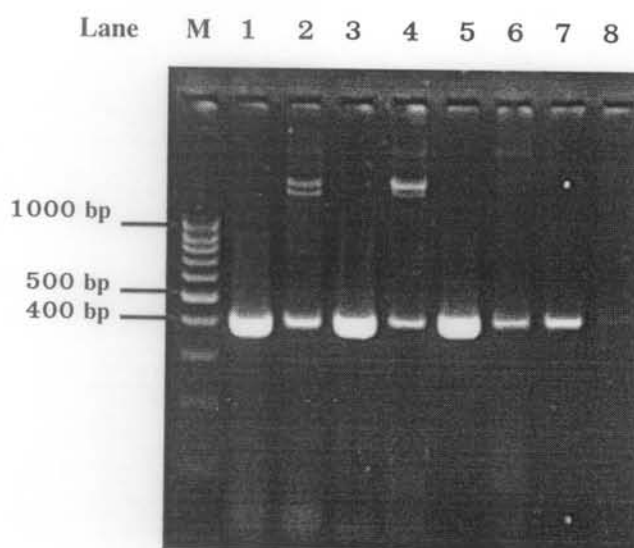


ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่าง ๆ ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1, 3, 5, 7 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5, 5.0, 10.0 และ 15.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และ Lane 2, 4, 6, 8 : *A. hydrophila* ที่ใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5, 5.0, 10.0 และ 15.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

#### 4.6 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ผลการตรวจหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน of 16s rDNA ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่นำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 5, 1, 0.5, และ 0.1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร จากผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 10 พบว่า ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์น้อยที่สุดในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่สามารถสังเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีขนาดประมาณ 400 คู่เบสจากดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจน และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ซึ่งทำให้ได้แถบดีเอ็นเอชัดเจนน้อยกว่า อีกทั้งความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร จะถูกใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้พอดีขณะที่เมื่อใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 และ 1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

จำนวนทั้งสิ้น 40 รอบ พบว่า ไพโรมอร์ไม่ได้ถูกใช้ในปฏิกิริยาจนหมด ซึ่งสังเกตได้จากบริเวณด้านล่างของแผ่นเจลยังมีแถบดีเอ็นเอจางๆ เหลืออยู่ นอกจากนั้นเมื่อใช้ไพโรมอร์ที่ความเข้มข้น 5, 1, 0.5 และ 0.1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร กับดีเอ็นเอต้นแบบของ *A. hydrophila* ที่ใช้เป็น negative control ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสได้ แต่ปริมาณแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นั้นมีความชัดเจนและปริมาณลดลงเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของไพโรมอร์ที่ลดลงตามลำดับ



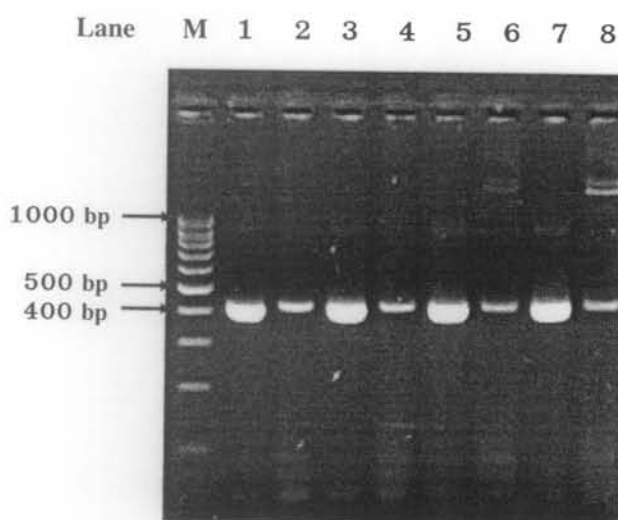
ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นไพโรมอร์ rVH-1 และ rVH-2 ที่ระดับต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1, 3, 5, 7 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่ใช้ไพโรมอร์ความเข้มข้น 5, 1, 0.5 และ 0.1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และ Lane 2, 4, 6, 8 : *A. hydrophila* ที่ใช้ไพโรมอร์ความเข้มข้น 5, 1, 0.5 และ 0.1 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ตามลำดับ

#### 4.7 การหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ผลการตรวจหาความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วน of 16s rDNA ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่นำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทดสอบความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสกับดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 40 รอบ



จากผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่า  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากแถบของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 400 คู่เบส จากดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 มีความชัดเจนอยู่และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ  $MgCl_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ จะพบแถบดีเอ็นเอจางๆ ขนาดประมาณ 800-1,000 คู่เบส ซึ่งไพรเมอร์สามารถเข้าจับได้ในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก annealing temperature ที่ 44 องศาเซลเซียส ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่ำเกินไป ไพรเมอร์จึงสามารถเข้ากับดีเอ็นเอต้นแบบที่ตำแหน่งอื่นๆ ได้ด้วย นอกจากนั้นเมื่อใช้  $MgCl_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ กับดีเอ็นเอต้นแบบของ *A. hydrophila* ที่ใช้เป็น negative control พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสได้ทั้ง 4 ระดับ แต่ปริมาณแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นั้นมีความชัดเจนน้อยกว่าดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126

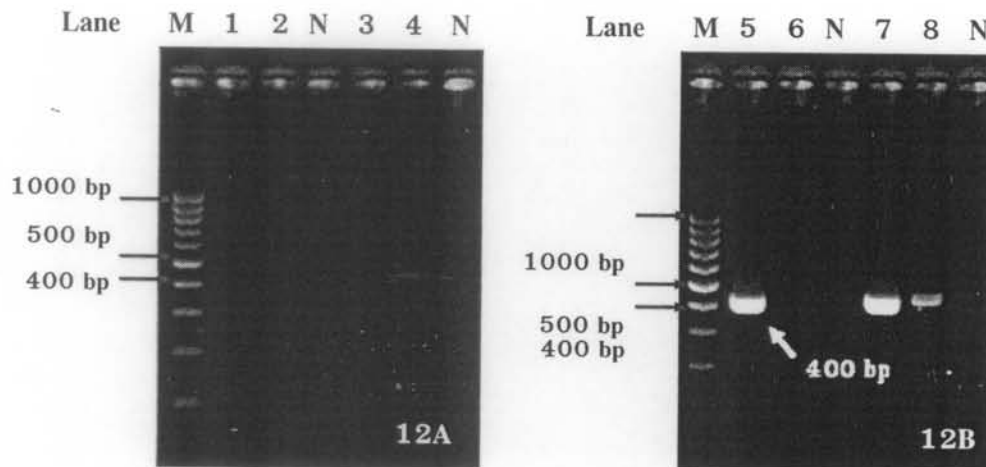


ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้น  $MgCl_2$  ที่ระดับต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1, 3, 5, 7 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่ใช้  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และ Lane 2, 4, 6, 8 : *A. hydrophila* ที่ใช้  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



#### 4.8 ผลของจำนวนรอบ (PCR cycle) ต่อการเกิดผลผลิตในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

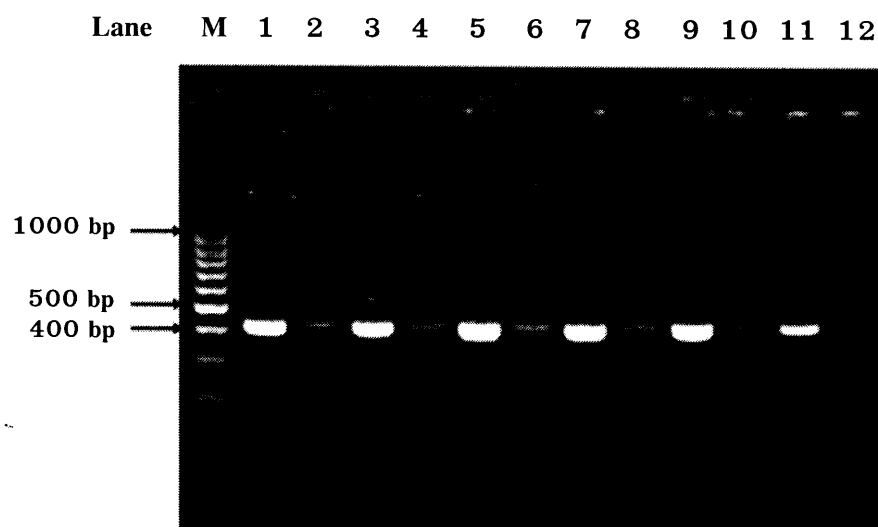
ผลการตรวจหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ 16s rDNA ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่นำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่า เมื่อใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ 29 รอบ สามารถตรวจสอบผลผลิตบนอะกาโรสเจลได้ ส่วนจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ 21 และ 25 รอบ เป็นจำนวนรอบที่น้อยเกินไปเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงไม่สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาบนอะกาโรสเจลได้ ส่วนจำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ 33 รอบและมากกว่านั้นไม่นำมาใช้ เพราะจะทำให้เสียเวลาในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมากขึ้น ถึงแม้ว่าการใช้จำนวนรอบดังกล่าวจะสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ต้องการได้ในปริมาณที่มากขึ้นก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคต้องการความรวดเร็วเพื่อที่จะได้หาวิธีและรักษาโรคได้ทันเวลา นอกจากนี้เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ของ *A. hydrophila* ที่ใช้เป็น negative control มีแนวโน้มว่า จำนวนรอบที่มากกว่า 29 รอบจะทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้นด้วย (ภาพที่ 12A และ 12B) ซึ่งจะทำให้การหาสภาวะสำหรับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ไม่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อ *V. harveyi* มากขึ้น



ภาพที่ 12A และ 12B ผลของจำนวนรอบ (PCR cycle) ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1, 3, 5, 7 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่ใช้จำนวนรอบ (PCR cycle) 21, 25, 29 และ 33 รอบ ตามลำดับ; Lane 2, 4, 6, 8 : *A. hydrophila* ที่ใช้จำนวนรอบ (PCR cycle) 21, 25, 29 และ 33 รอบ ตามลำดับ และ Lane N : negative control

#### 4.9 ผลของอุณหภูมิ (annealing temperature) ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ผลการตรวจหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในส่วนของ 16s rDNA ของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่นำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากการใช้ annealing temperature ที่แตกต่างกันเริ่มจาก 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ rVH-1 และ rVH-2 ในการเข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส จากดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ได้และไม่มีแถบดีเอ็นเออื่นที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น นอกจากนั้นเมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจาก *A. hydrophila* ที่เป็น negative control ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสได้ ดังแสดงในภาพที่ 13

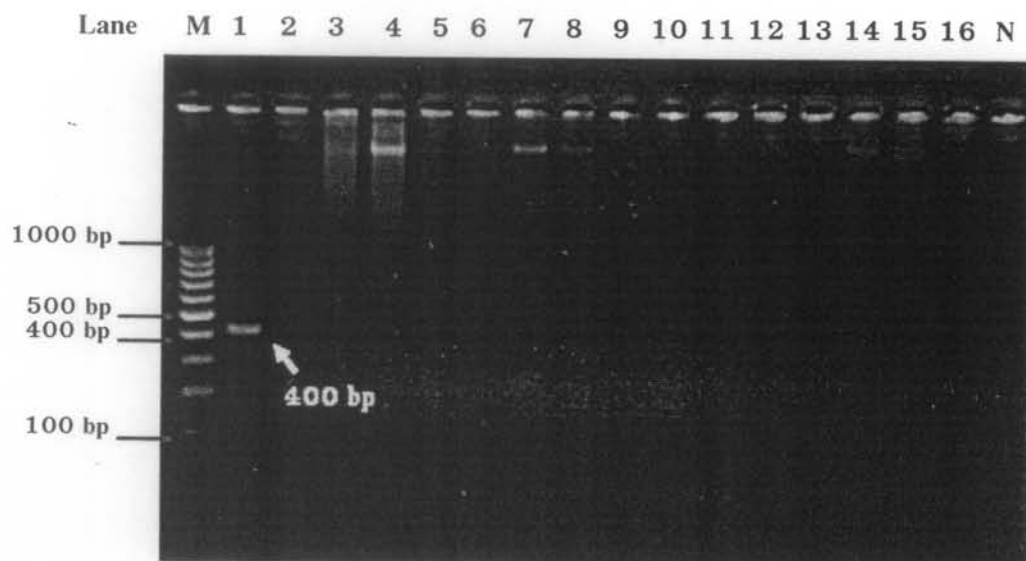


ภาพที่ 13 ผลความแตกต่างของอุณหภูมิ (annealing temperature) ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 ที่ใช้อุณหภูมิ (annealing temperature) 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ และ Lane 2, 4, 6, 8, 10, 12 : *A. hydrophila* ที่ใช้อุณหภูมิ (annealing temperature) 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ

จากผลการศึกษาที่ผ่านมา สามารถสรุปสภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่ออกแบบขึ้นจากส่วนของ 16s rRNA ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ดังนี้ สารที่ใช้ในปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 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/ $\mu$ l) 0.15 ไมโครลิตร กำหนดโปรแกรมเครื่อง Thermocycler ดังต่อไปนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 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 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที

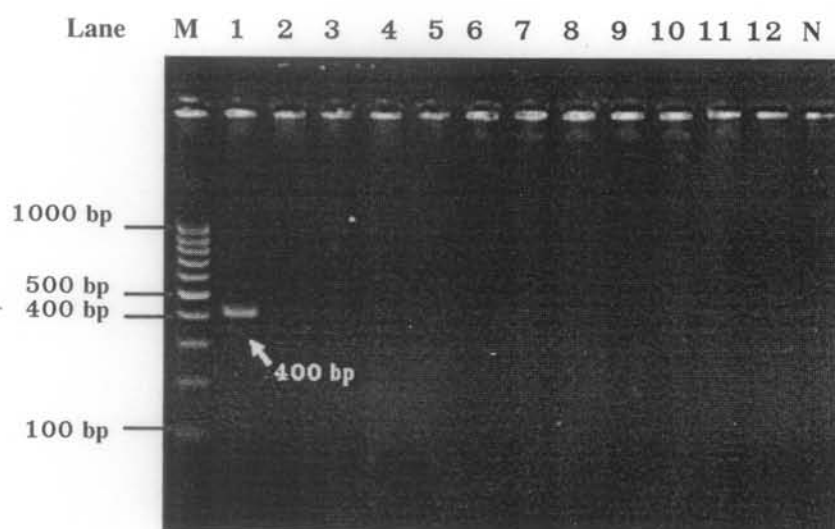
#### 4.10 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง

หลังจากได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่ออกแบบมาจากส่วนของ 16s rDNA ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้ว เมื่อนำสภาวะดังกล่าวไปใช้กับดีเอ็นเอต้นแบบจากแบคทีเรียแยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงจำนวน 35 สายพันธุ์ ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอต้นแบบจากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 35 สายพันธุ์ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ต้องการขนาดประมาณ 400 คู่เบสในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ (ภาพที่ 14) นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ KKU 46003, KKU 46007 และ KKU 46008 ที่นำมาศึกษามีแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น ซึ่งไม่ใช่แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสที่ต้องการ



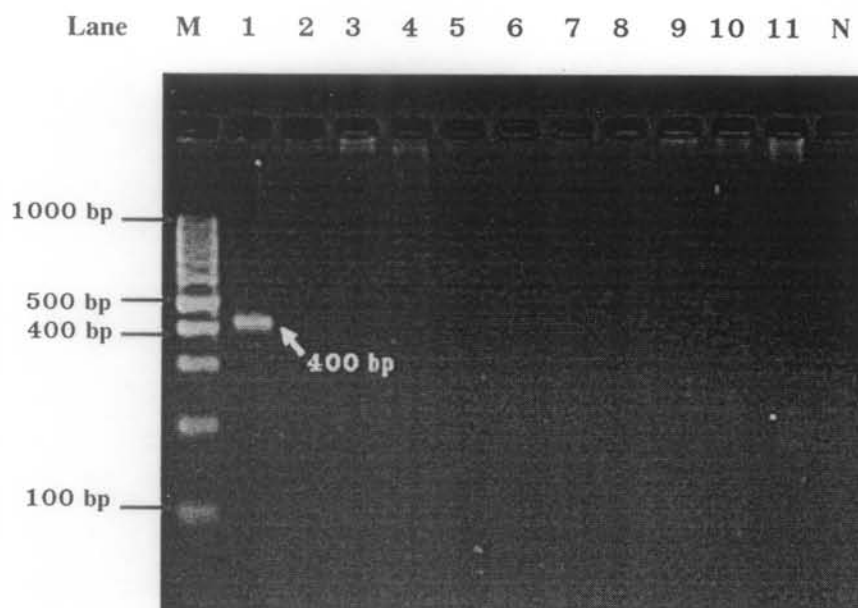
ภาพที่ 14 ผลจากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง

Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126; Lane 2 : KKU 46001; Lane 3 : KKU 46002; Lane 4 : KKU 46003; Lane 5 : KKU 46005; Lane 6 : KKU 46006; Lane 7 : KKU 46007; Lane 8 : KKU 46008; Lane 9 : KKU 47001; Lane 10 : KKU 47002; Lane 11 : KKU 47003; Lane 12 : KKU 47011; Lane 13 : KKU 47012; Lane 14 : KKU 47014; Lane 15 : KKU 47015; Lane 16 : KKU 47016 และ Lane N : negative control



ภาพที่ 14 ผลจากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง (ต่อ)

Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126; Lane 2 : KKU 47017; Lane 3 : KKU 47018; Lane 4 : KKU 47019; Lane 5 : KKU 47020; Lane 6 : KKU 447022; Lane 7 : KKU 47023; Lane 8 : KKU 47025; Lane 9 : KKU 47026; Lane 10 : KKU 47027; Lane 11 : KKU 47028; Lane 12 : KKU 47030 และ Lane N : negative control



ภาพที่ 14 ผลจากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง (ต่อ)

Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1 : *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126; Lane 2 : KKU 46009; Lane 3 : KKU 46010; Lane 4 : KKU 47005; Lane 5 : KKU 47006; Lane 6 : KKU 47021; Lane 7 : KKU 47024; Lane 8 : KKU 47032; Lane 9 : KKU 47033; Lane 10 : KKU 47034; Lane 11 : *A. hydrophila* และ Lane N : negative control

#### 4.11 ผลการหาลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอของยีน 16s rRNA ที่คัดแยกได้จากแบคทีเรียตัวอย่าง

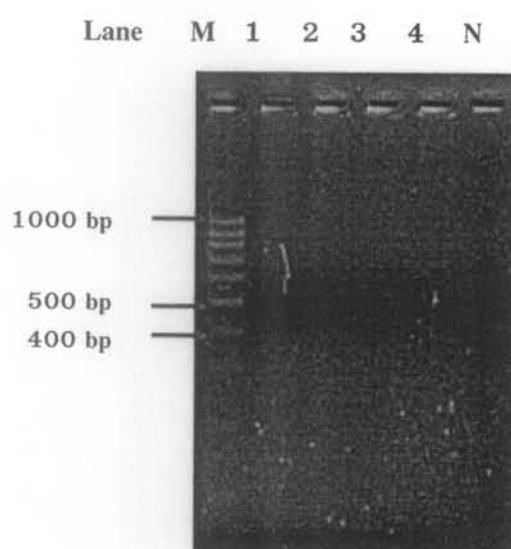
การหาลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16s rRNA ที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่างแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า มีลำดับเบสจำนวนทั้งหมด 417 คู่เบส โดยนับจากตำแหน่งการเข้าเกาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 (ภาพที่ 15) เมื่อนำลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบสนี้ไปใส่ในโปรแกรม blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI Homepage (GENBANK) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า ลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบสมีความเหมือนกับลำดับเบสส่วนของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียชนิด *V. harveyi* ซึ่งแสดงว่า ไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากส่วนของ 16s rDNA ของดีเอ็นเอต้นแบบได้ถูกต้องตามตำแหน่งที่ได้ออกแบบไว้ และการหาลำดับเบสนี้ยังช่วยในการยืนยันผลการศึกษาว่า ไพรเมอร์ไม่ได้เข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบของ *V. harveyi* ที่ตำแหน่งอื่นแล้วสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสขนาดเดียวกันขึ้นมา

|                                                                |                                          |
|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| AAACGAGTTATCTGAACCTTC                                          | (fVH-1)                                  |
| AAACGAGTTATCTGAACCTTC                                          | GGGCGGCCATAACGGCGTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA |
| TGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAA |                                          |
| TACCTTCGGGTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGAT |                                          |
| TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGA |                                          |
| TCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT |                                          |
| TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT |                                          |
| AAAGCACTTTTCAGTCGTGAGGAAGG                                     |                                          |
| TAGTGTAGTTAATAGCTGCAT                                          |                                          |
| TAGTGTAGTTAATAGCTGCAT                                          | (rVH-2)                                  |

ภาพที่ 15 ลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16s rRNA ที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่างแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 และตำแหน่งเข้าเกาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2

#### 4.12 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของกึ่งก้ามกราม

ผลการทดสอบนำดีเอ็นเอต้นแบบของกึ่งก้ามกรามมาใช้ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่ออกแบบมาจากส่วนของ 16s rDNA ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *V. harveyi* ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ผลการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 16 พบว่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของกึ่งก้ามกราม 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส หรือแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะตำแหน่งอื่นได้ ทำให้ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นนี้มีความจำเพาะมากขึ้นเมื่อนำตัวอย่างกึ่งมาตรวจหาเชื้อ *V. harveyi*



ภาพที่ 16 ผลจากการทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16s rRNA ของเชื้อ *V. harveyi* ต่อดีเอ็นเอต้นแบบของกึ่งก้ามกรามในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Lane M : DNA ladder 100 bp; Lane 1 : MR1; Lane 2 : MR2; Lane 3 : MR3; Lane 4 : MR4 และ Lane N : negative control