สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
คำอุทิศ		ค
กิตติกรรมประกาศ		ง
สารบัญตาราง		ช
สารบัญภาพ		ฌ
บทที่ 1 บทนำ		1
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3	ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4	สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย	3
1.5	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		5
2.1	ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม	5
2.2	โรคเรืองแสง (Luminescent Disease)	8
2.3	เชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae	11
2.4	เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย		19
3.1	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	19
3.2	การสกัดดีเอ็นเอ	21
3.3	การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้	22
3.4	การสร้างไพรเมอร์ (primers)	24
3.5	การทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	26
3.6	การหา PCR conditions สำหรับไพรเมอร์	28

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
3.7	การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง	31
3.8	การตรวจสอบลำดับเบสในส่วนของยีน 16s rRNA	31
3.9	การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกราม	32
บทที่ 4 ผลการวิจัย		33
4.1	เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง	33
4.2	ผลการสกัดดีเอ็นเอ	35
4.3	ผลการออกแบบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	36
4.4	ผลการทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	44
4.5	ผลการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	45
4.6	การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	46
4.7	การหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	47
4.8	ผลของจำนวนรอบ (PCR cycle) ต่อการเกิดผลผลิตในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	49
4.9	ผลของอุณหภูมิ (annealing temperature) ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	50
4.10	การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง	51
4.11	ผลการหาลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอของยีน 16s rRNA ที่คัดแยกได้จากแบคทีเรียตัวอย่าง	55
4.12	ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอของกุ้งก้ามกราม	56

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย		57
บรรณานุกรม		62
ภาคผนวก		70
ภาคผนวก ก	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	71
ภาคผนวก ข	การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	72
ภาคผนวก ค	สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสและเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส	76
ภาคผนวก ง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรและปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้	79
ประวัติผู้เขียน		81

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ลักษณะของแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae, Vibrionaceae และ Pseudomonadaceae	12
ตารางที่ 2	คุณสมบัติของสกุลต่าง ๆ ในวงศ์ Vibrionaceae	12
ตารางที่ 3	สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงและแหล่งที่มา	20
ตารางที่ 4	ผลการตรวจสอบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามป่วยที่เป็นโรคเรืองแสงในโรงเพาะฟักด้วย 0/129 sensitivity, oxidase test และ catalase test	34
ตารางที่ 5	Accession number ของลำดับเบสส่วน 16s rDNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิด	37

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กุ้งก้ามกราม (*Macrobranchium rosenbergii* de Man)	6
ภาพที่ 2	ตัวกุ้งเรืองแสงในเวลากลางคืน	10
ภาพที่ 3	แถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ของ DNA ladder 1 kb ของ BIORON	24
ภาพที่ 4	การคำนวนค่า Melting Temperature ด้วยโปรแกรม Oligo calculator จาก http://mbcf.dfci.harvard.edu/docs/oligocalc.html	26
ภาพที่ 5	แถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ของ DNA ladder 100 bp (BIORON)	27
ภาพที่ 6	ตัวอย่าง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสงด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้	36
ภาพที่ 7	ตำแหน่งที่สร้างไพรเมอร์ fVH-1 (7A) และ rVH-2 (7B) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW (1.83) multiple sequence alignment (http://www.ebi.ac.uk/clustalW/)	43
ภาพที่ 8	การทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	45
ภาพที่ 9	ผลของความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	46
ภาพที่ 10	ผลของความเข้มข้นไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่ระดับต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	47
ภาพที่ 11	ผลของความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่ระดับต่างๆ ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	48
ภาพที่ 12	ผลของจำนวนรอบ (PCR cycle) ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	49
ภาพที่ 13	ผลความแตกต่างของอุณหภูมิ (annealing temperature) ต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 14	ผลจากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ต่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง	52
ภาพที่ 15	ลำดับเบสจากแถบดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16s rRNA ที่สังเคราะห์ได้จากตัวอย่างแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ ATCC 14126 และตำแหน่งเข้าเกาะของไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2	55
ภาพที่ 16	ผลจากการทดสอบไพรเมอร์ fVH-1 และ rVH-2 ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16s rRNA ของเชื้อ *V. harveyi* ต่อดีเอ็นเอต้นแบบของกุ้งก้ามกรามในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	56