การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

นางสาวกาญจนา ชาหอม

3853500410

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5471914023

DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS

Miss Kanchana Chahorm

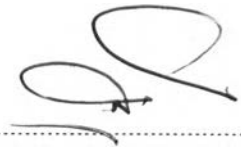
3853500410

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
โดย	นางสาวกาญจนา ชาหอม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต



.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.วรรนิภา เพี้ยนภักตร์)

กาญจนา ชาหอม : การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. (DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา , 98 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE สำหรับตรวจสอบแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอในระบบนิเวศอาหาร โดยเริ่มจากประเมินการใช้ไพรเมอร์ GC567F และ 680R ในการเพิ่ม DNA และ cDNA ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอทั้งหมด 10 สปีชีส์ด้วยวิธีพีซีอาร์ และแยกความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค DGGE โดยใช้โพลีอะคลิลาไมด์เจลเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ที่มีเกรเดียนต์ของสารดีเนเจอร์แรนคือยูเรียและฟอร์มาไมด์เข้มข้นร้อยละ 45-70 พบว่าเทคนิคดีจีจีอีสามารถแยกแถบ DNA และ cDNA ของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ได้ไม่แตกต่างกัน โดยพบ DNA และ cDNA ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้จำนวน 2 คู่ คือ *Vibrio fluvialis* กับ *Vibrio furnissii* และ *Vibrio parahaemolyticus* กับ *Vibrio harveyi* เมื่อประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธีในการตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากัน พบว่าเทคนิค PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้เพียง 3 สปีชีส์คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* และ *Vibrio alginolyticus* ในขณะที่เทคนิค RT-PCR-DGGE ตรวจพบเชื้อวิบริโอได้ถึง 5 สปีชีส์ คือ *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio fluvialis* และเมื่อตรวจสอบชุมชนของเชื้อวิบริโอที่มีชนิดและความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกัน (แปรค่าตั้งแต่ 10^2-10^5 CFU/ml) พบว่า PCR-DGGE ตรวจพบแถบ DNA ของวิบริโอสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดสองลำดับแรกในกลุ่ม ในขณะที่ RT-PCR-DGGE ตรวจพบแถบ cDNA ของวิบริโอสปีชีส์ที่มีความเข้มข้นเซลล์แตกต่างกันได้ถึงห้าลำดับแรกในกลุ่ม ดังนั้นจึงเลือกเทคนิค RT-PCR-DGGE สำหรับประเมินการใช้งานต่อไป เมื่อประเมินผลของสภาวะเซลล์ต่อการตรวจพบวิบริโอด้วยเทคนิคดังกล่าว ได้แก่ สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) เซลล์บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง (IVC) และเซลล์บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งที่ผ่านการ pre-enrichment (PIVC) พบว่าตรวจพบแถบ cDNA ของเซลล์จากทุกสภาวะได้ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเซลล์ของ *Plesiomonas shigelloides* ภายใต้ สภาวะ IVC และ PIVC ปรากฏแถบ cDNA มากกว่า 1 แถบ เมื่อประเมินการใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE สำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยเติมเซลล์ *Vibrio parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างอาหารที่ปราศจากเชื้อ พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารได้ตั้งแต่ 10^2 CFU/g และให้ผลที่เป็นไปในแนวทางเดียวกับวิธีมาตรฐาน (FDA-BAM, 2004) และเมื่อประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบเชื้อวิบริโอในอาหาร จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ารูปแบบของวิบริโอที่ตรวจพบด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานร้อยละ 100 จำนวน 3 ตัวอย่าง ร้อยละ 75 จำนวน 1 ตัวอย่าง ร้อยละ 50 จำนวน 6 ตัวอย่าง และให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน จำนวน 4 ตัวอย่าง

3853500410

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต กาญจนา ชาหอม

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

5471914023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS: RT-PCR-DGGE / VIBRIO SPP.

KANCHANA CHAHORM: DETECTION OF *Vibrio* spp. IN FOOD USING RT-PCR AND PCR-DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS. ADVISOR: ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 98 pp.

The aim of this research was to evaluate the feasibility of an application of PCR-DGGE and RT-PCR-DGGE techniques for detection of *Vibrio* species in the ecosystem of foods. Primers GC567F and 680R were initially evaluated for amplification of DNA and cDNA of ten references *Vibrio* species by PCR method. The GC-clamp PCR amplicons were separated according to their sequences by the DGGE using 10% (w/v) polyacrylamide gel with a denaturing gradient from 45 to 70% of urea and formamide. The results showed that DNA and cDNA band of *Vibrio* species could be separated by DGGE technique. Two pair of *Vibrio* species, which could not be differentiated on gel were *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* and *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*. Apparently, DNA and cDNA amplicons of all ten *Vibrio* species separated by PCR-DGGE and RT-PCR-DGGE method gave the same migratory patterns on DGGE gel. For the detection limit evaluation, in the community of 10 reference strains containing the same viable population, distinct DNA bands of 3 species; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio alginolyticus* were consistently observed by PCR-DGGE technique. Furthermore, 5 species; *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio fluvialis* consistently observed by RT-PCR-DGGE technique. In the community containing different viable population decreasing from 10^2 to 10^5 CFU/ ml. PCR-DGGE analysis only detected the two most prevalent species, while RT-PCR-DGGE detected the five most prevalent species. Therefore, RT-PCR-DGGE technique was selected for further evaluation. RT-PCR-DGGE technique were evaluated in detection of various *Vibrio* cell conditions such as viable cell (VC), injured cells from frozen (IVC) and injured cells from frozen with pre-enrichment (PIVC). It was found that cDNA band of all cell conditions gave the same migratory patterns excepted that multiple cDNA bands of *Plesiomonas shigelloides* under IVC and PIVC conditions were found. When RT-PCR-DGGE was evaluated in detection of *Vibrio parahaemolyticus* spiked food samples, it could detect *Vibrio parahaemolyticus* in food containing at least 10^2 CFU/g. The results obtained also corresponded to standard method (FDA-BAM, 2004). When RT-PCR-DGGE was applied in detection of *Vibrios* in fourteen food samples, the vibrio profiles were detected, which were 100 % similar to the standard method (observed in 3 samples), 75% and 50% observed in 1 and 6 samples, respectively and totally different (0%) observed in 4 samples.

3853500410

Department: Food Technology
Field of Study: Food Technology
Academic Year: 2013

Student's Signature Kanchana chahorm
Advisor's Signature Cheunjit

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงความกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง และ ดร.วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัย, โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา รหัสโครงการ FW1015B ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง DGGE with Dcode Universal Mutation Detection System และศูนย์ฉายรังสี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง VITEK 2 System สำหรับตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ น้องและเพื่อนๆปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวชาหอมทุกท่านที่ได้สั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน ให้กำลังใจ และห่วงใยพร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

3853500410

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 4

2.1 *Vibrio* spp. 4

2.2 ลักษณะทั่วไปและการก่อโรคของ *Vibrio* spp. 5

2.2.1 *Vibrio parohaemolytucus* 5

2.2.2 *Vibrio cholerae* 5

2.2.3 *Vibrio vulnificus* 6

2.2.4 *Vibrio* spp. สายพันธุ์อื่นๆ 6

2.3 วิธีการจำแนกเชื้อ *Vibrio* spp. 7

2.3.1 วิธีมาตรฐาน 7

2.3.1.1 Selective plating 7

2.3.1.2 Most probable number (MPN) 8

2.3.2 วิธีทางเลือก 10

2.3.2.1 Biochemical identification test kit 10

2.3.2.2 Dry rehydratable film method 11

2.3.2.3 Chromogenic medium 14

2.3.2.4 Immunoassay 14

2.3.2.5 Nucleic acid hybridization 15

2.4 Polymerase chain reaction (PCR) 19

2.4.1 Nested PCR 20

2.4.2 Multiplex PCR 20

3853500410

หน้า

2.5 การตรวจวิเคราะห์ผลิตผล PCR 23
2.5.1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Agarose Gel Electrophoresis) 23
2.5.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 25
2.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตผลพีซีอาร์ 26
2.6.1 Sequencing analysis 26
2.6.2 DNA banding pattern 26
2.7 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 27
2.7.1 หลักการของ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 27
2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค DGGE ในการตรวจสอบจุลินทรีย์ในระบบนิเวศอาหาร 28
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย 30
3.1 วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 30
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ 30
3.1.2 เครื่องมือ/อุปกรณ์ 30
3.1.3 สารเคมี 31
3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 32
3.1.5 สายพันธุ์จุลินทรีย์ 33
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 34
3.2.1 ศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp. 34
3.2.1.1 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน 34
3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ (DNA/RNA extraction) 34
3.2.1.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) 35
3.2.1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (agarose gel electrophoresis) 35
3.2.1.5 การแยกความแตกต่างของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 36
3.2.2 ประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp. 36

3853500410

หน้า

3.2.2.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 36
3.2.2.2 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 2..... 38
3.2.3 ศึกษาผลของสภาวะของเซลล์ของเชื้อวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE39
3.2.4 ประเมินวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร..... 40
3.2.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร 42
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 44
4.1 การศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp..... 44
4.2 การประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp..... 50
4.3 การประเมินผลของสภาวะของเซลล์ของวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE..... 55
4.4 การประเมินวิธี RT-PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร..... 58
4.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร..... 60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 71
5.1 สรุปผลการทดลอง..... 71
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 72
รายการอ้างอิง 74
ภาคผนวก..... 80
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี..... 81
ภาคผนวก ข การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA and RNA extraction)..... 84
ภาคผนวก ค การประกอบเจลพอลิอะคลิลาไมด์..... 89
ภาคผนวก ง วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5)..... 93
ภาคผนวก จ วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อวิบริโอด้วยเครื่อง VITEK ®2 system..... 94
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา 95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 98

385350041O

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่ม Vibrionaceae ที่พบการปนเปื้อนในอาหารทะเล 12

ตารางที่ 2. 2 สรุปวิธีการตรวจเชื้อวิบริโอ 16

ตารางที่ 2.3 ช่วงการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยการใช้อะกาโรสเจลที่มีปริมาณอะกาโรสต่างๆกัน 24

ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของพอลิอะคลิลาไมด์เจลในการแยกดีเอ็นเอ 26

ตารางที่ 3.1 การสร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยการผสมเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แบบที่ 1 เพื่อประเมิน detection limit ของวิธี PCR-DGGE 38

ตารางที่ 3.2 การสร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอโดยการผสมเชื้อที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แบบที่ 2 เพื่อประเมิน detection limit ของวิธี PCR-DGGE 39

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างอาหารและแหล่งที่ซื้อ 43

ตารางที่ 4.1 การเตรียมเซลล์สร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1 และ 2 สำหรับใช้ในการประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของเทคนิค PCR-DGGE และ RT-PCR-DGGE 51

ตารางที่ 4.2 การตรวจพบแถบดีเอ็นเอของชุมชนวิบริโอแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR-DGGE 53

ตารางที่ 4.3 การตรวจพบแถบอาร์เอ็นเอของชุมชนวิบริโอแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ที่ตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE 54

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบผลการตรวจ เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่เติมในตัวอย่างปลาหมึกปลอดเชื้อโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน 60

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธี RT-PCR-DGGE กับวิธีมาตรฐาน 64

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ % homology ของวิบริโอทั้ง 10 สปีชีส์ที่ใช้เป็นเชื้อมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE และวิบริโอที่ตรวจพบด้วยวิธีมาตรฐาน 69

ตารางที่ ก.1 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 6.5 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 82

ตารางที่ ก.2 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 8 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 82

3853500410

ตาราง หน้า

ตารางที่ ก.3 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 10 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 83
ตารางที่ ฉ.1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลาหมึกแช่แข็งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ 95
ตารางที่ ฉ.2 ผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐาน 96

3853500410

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

ภาพที่ 2.1 วิธีการตรวจสอบ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างอาหารด้วยวิธีมาตรฐาน MPN9

ภาพที่ 2.2 เครื่อง VITEK ®2 system 11

ภาพที่ 2.3 ขั้นตอนในการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR 22

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของอะกาโรสเจล 24

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของพอลิอะคลิลาไมด์เจล 25

ภาพที่ 4.1 แสดงผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนอะกาโรสเจล ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 45

ภาพที่ 4.2 แถบดีเอ็นเอบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 8 46

ภาพที่ 4.3 แถบดีเอ็นเอบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 46

ภาพที่ 4.4 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอและเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้เกิดโรค บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 48

ภาพที่ 4.5 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (PCR-DGGE) 49

ภาพที่ 4.6 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอที่สภาวะเซลล์สมบูรณ์ (VC) บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE) 56

ภาพที่ 4.7 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เซลล์ที่อยู่ในสภาวะบาดเจ็บ (IVC) บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE) 57

ภาพที่ 4.8 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อมาตรฐานกลุ่มวิบริโอ ที่เซลล์ที่อยู่ในสภาวะเซลล์บาดเจ็บแต่ผ่านขั้นตอนการทำ pre-enrichment (PIVC) บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (RT-PCR-DGGE) 57

ภาพที่ 4.9 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่เติมลงในตัวอย่าอาหารในจำนวนเชื้อแตกต่างกัน บนอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.8 59

ภาพที่ 4.10 ผลิตผลพีซีอาร์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* (VP) ที่เติมลงในตัวอย่างอาหารในจำนวนเชื้อแตกต่างกันบนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 59

ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 1 บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE) 62

ภาพที่ 4.12 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหารชุดที่ 2 บนพอลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 (ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE) 63

385350041O

ภาพ หน้า

ภาพที่ 4.13 ไฟโลจีเนติกทรี (phylogenetic tree) ของเชื้อกลุ่มวิบริโอ 68
ภาพที่ ค.1 Spacer และ plate clamps 89
ภาพที่ ค.2 การประกอบกระจก 89
ภาพที่ ค.3 การประกอบกระจกเข้ากับฐานของ casting stand 90
ภาพที่ ค.4 การสร้างเจลพอลีอะคลิลาไมด์ (casing gel) 90
ภาพที่ ค.5 การประกอบเจลเข้ากับ sandwich core 91
ภาพที่ ค.6 แสดงการประกอบครื่อง Dcode ™ ที่พร้อมใช้งาน 91
ภาพที่ ง.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5) 93
ภาพที่ จ.1 เครื่อง VITEK 2 ® system 94
ภาพที่ จ.2 การ์ดสำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ (GN card) 94

3853500410