บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ เครื่องมือ/อุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. Microcentrifuge 1.5 ml, Hygon, USA
2. PCR tube 0.2 ml, M
3. Pipette tip 0.01 ml, Corning Incorporated, USA
4. Pipette tip 0.2 ml, Corning Incorporated, USA
5. Pipette tip 1 ml, Corning Incorporated, USA
6. 15x90 mm. plastic petri dish, Eurotubo® Deltalab, Spain
7. VITEK®2 GN cards, BIOMERIEUX, France

3853500410

3.1.2 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. Autoclave, SS320 Tomy, USA
2. Balance, AB 204 Mettler Todledo, Switzerland
3. Balance, RP 310S Satorious, Germany
4. Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
5. Colony counter, Gallenkamp, Germany
6. Cryo box, SPL Life Sciences, Korea
7. DGGE with Dcode ™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA
8. Freezer, SF-C95, Sanyo, Japan
9. Gel documentation, Model InGenious L, Synegne, United Kingdom

10. Hot-air oven, Binder, Germany
11. Laminar flow hood, BVT 123 Issco, USA
12. Microwave, R-246 Sharp, Japan
13. Microwave, MS2127CW LG, Korea
14. Micropipette P10, Gilson, France
15. Micropipette P200, Gilson, France
16. Micropipette P200, Gilson, France
17. Micropipette P1000, Gilson, France
18. PCR rank, SPL Life Sciences, Korea
19. pH meter, Cyberscan 1000, USA
20. Power supply, Model EPS 301, GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, USA
21. Refrigerator, MR-F33X-DS Mitsubishi, Japan
22. Spectrophotometer, V-530, Jasco, USA
23. Vortex mixer, Lab-line Instrument Inc., USA
24. VITEK® 2 system, BIOMERIEUX, France

3853500410

3.1.3 สารเคมี

1. ชุดน้ำยาสำหรับทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR), Fermentas, USA
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit), HyYield TM Genomic DNA Mini Kit, YBG100, RBC, Taiwan
3. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction kit), Thermo Scientific, GeneJET RNA Purification Kit, USA
4. ชุดสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis kit), Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, USA
5. ไพรเมอร์ (primer), 1st Base, Singapore
6. Agarose powder, Axygen, USA

7. Disodium ethylenediaminetetra acetate (EDTA), Anala® , England
8. DNA Ladder, GenRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas, USA
9. Ethanol, analytical grad, Mallinckrodt Chemicals, Netherlands
10. Ethidium bromide, Bio basic Inc., Canada
11. Glacial acetic acidTris base, Ultra pure, Molecular biology grade, Research Organics, Inc., USA
12. Urea, Bio basic Inc., Canada
13. Formamide, Bio basic Inc., Canada
14. TEMED, Bio basic Inc., Canada
15. Ammonium persulfate, Bio basic Inc., Canada
16. TAE buffer
17. 40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1), Bio basic Inc., Canada
18. Loading dye, Bio basic Inc., Canada

3853500410

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. CHOMagar Vibrio (CV), Merck, Germany
2. Peptone Bacteriological, Himedia, India
3. Tryptic soy agar, Merck, Germany
4. Tryptic soy broth, Merck, Germany
5. Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS agar), Merck, Germany
6. Sodium choride

3.1.5 สายพันธุ์จุลินทรีย์

1. *Vibrio cholerae* DMST 15778 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
2. *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
3. *Vibrio fluvialis* ATCC 33809 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
4. *Vibrio mimicus* ATCC 33653 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
5. *Vibrio alginolyticus* DMST 1480 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
6. *Vibrio harveyi* 639 (ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย)
7. *Vibrio furnissii* ATCC 35016 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
8. *Vibrio vulnificus* ATCC 27562 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
9. *Plesiomonas shigeloides* ATCC 14029 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
10. *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
11. *Escherichia coli* ATCC 25922 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
12. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
13. *Bacillus cereus* ATCC 6633 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
14. *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)
15. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)

3853500410

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ศึกษาสภาวะของ PCR-DGGE ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

3.2.1.1 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน

นำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่มอื่นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อTryptic soy broth จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (US Food and Drug Administration, 2004)

3853500410

3.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ (DNA/RNA extraction)

- การสกัดดีเอ็นเอ

ดูดเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR-DGGE โดยใช้ชุดสกัด HyYield ™ Genomic DNA Mini Kit ตามวิธีใช้ที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข.1) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปด้วยเทคนิค PCR-DGGE

- การสกัดอาร์เอ็นเอ

ดูดเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ตามวิธีใช้ที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ข.2) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

อ้างอิงจากรายงานของ Thompson et al. (2004) และ Eiler and Bertilsson (2006) ปฏิกิริยาจะประกอบด้วยรีเอเจนท์ดังนี้

1. 1x taq buffer with KCl
2. 0.2 mM dNTPs
3. 1 µM GC567F (forward primer) (5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGC CCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGCGTAAAGCGCATGCAGGT3')
4. 1 µM 680R (reverse primer) (5'GAATTCTACCCCCCTCTACA G3')
5. 2 mM MgCl2
6. 1.25 U taq DNA polymerase
7. DNA template 20 ng
8. Water, nuclease-free

3853500410

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ

1. Initial denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	8	นาที
2. Denaturation	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	1	นาที
3. Annealing	อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส	3	นาที
4. Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1	นาที
5. Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	4	นาที

ทำข้อ 2) ถึงข้อ 4) ซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ

3.2.1.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (agarose gel electrophoresis)

เตรียมแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 (W/V) (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก.) แยกผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis (Sci-plas, Model HU13L, United Kingdom) โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสวางใน electrophoresis tank ที่บรรจุ 1XTAE buffer (pH 8.0) นำผลิตผล PCR ซึ่งผสมกับสารละลายสี (loading dye) ในอัตราส่วนผลิตภัณฑ์ PCR 2 ไมโครลิตรต่อ loading dye 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม แล้วแยกด้วย

กระแสไฟฟ้าภายใต้สภาวะความต่างศักดิ์ไฟฟ้าคงที่ 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่นเจลอะกาโรสไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation เปรียบเทียบกับ DNA marker

3.2.1.5 การแยกความแตกต่างของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

เตรียมพอลีอะคริลาไมด์เจลโดยแปรความเข้มข้นของเจลเป็นร้อยละ 6.5, 8 และ 10 โดยใช้เกรเดียนต์ (gradient) ของยูเรียและฟอร์มาไมด์ที่ความเข้มข้นจากร้อยละ 45–70 ตามรายงานของThompson et al. (2004) และ Eiler and Bertilsson (2006) ผสมสารเคมีสำหรับใช้ทำ DGGE และบรรจุในกระจกตามวิธีการบรรจุเจลสำหรับการทำ DGGE (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก. และ ค.) วิเคราะห์โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แยกแถบดีเอ็นเอบนเจลภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมแปร์ อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงด้วยเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System นำแผ่นเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation เปรียบเทียบรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานบนอะคริลาไมด์เจลที่แปรความเข้มข้นเป็นร้อยละ 6.5, 8 และ 10 คัดเลือกความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ทำให้เห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐานที่ชัดเจนที่สุดและนำมาใช้ตลอดการทดลอง

3.2.2 ประเมินค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (detection limit) ของวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจ *Vibrio* spp.

3.2.2.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 1

ชุมชนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 1 คือชุมชนที่มีชนิดของ *Vibrio* spp. แตกต่างกันแต่มีจำนวนเซลล์เท่ากัน โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอ จำนวน 10 สปีชีส์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ

3853500410

35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water ร้อยละ 1(W/V) จนได้จำนวนเชื้ออยู่ในระดับ 10^1-10^5 CFU/ml ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer โดยทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างอาหารโดยการ Spread plate โดยใช้อาหารวุ้น Tryptic soy agar ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาทั้งในระบบที่ใช้ดีเอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE) และอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

- การสกัดดีเอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE)

สร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยดูดเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น (มีจำนวนเชื้อเท่ากัน) ผสมตามคอลัมน์ A-E ตามตารางที่ 3.1 ทำการเตรียมชุมชนของเชื้อที่มีความเข้มข้นเชื้อละ 10^1 CFU/ml (ตามคอลัมน์ A) โดยดูดเชื้อกลุ่มวิบริโอลำดับที่ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้ง จากนั้นดูดเชื้อกลุ่มวิบริโอลำดับที่ 2 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge เดิมนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้ง ทำเช่นเดิมโดยดูดเชื้อกลุ่มวิบริโอลำดับที่ 3-10 เมื่อครบทั้ง 10 ลำดับแล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัด DNA เพื่อใช้ในการทำ PCR-DGGE โดยใช้ชุดสกัด HyYield ™ Genomic DNA Mini Kit โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปด้วยเทคนิค PCR-DGGE จากนั้นทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้นแต่เตรียมเชื้อที่มีความเข้มข้นเชื้อละ 10^2 ถึง10^5 CFU/ml (ตามคอลัมน์ B-E) ตามตารางที่ 3.1

- การสกัดอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE)

สร้างชุมชนของเชื้อกลุ่มวิบริโอเช่นเดี่ยวกับการเตรียม สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE โดยผสมเชื้อกลุ่มวิบริโอตามคอลัมน์ A-E ตามตารางที่ 3.1 แต่เปลี่ยนจากการสกัดดีเอ็นเอเป็นการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดThermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บ complementary DNA (cDNA) ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไปด้วยเทคนิค PCR-DGGE

3853500410

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

ลำดับที่	*Vibrio* species	Population mixtures (CFU/ml)				
		A	B	C	D	E
1	*Vibrio cholelae*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
2	*Vibrio parahaemolyticus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
3	*Vibrio fluvialis*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
4	*Vibrio mimicus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
5	*Vibrio alginolyticus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
6	*Vibrio harveyi*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
7	*Vibrio furnissii*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
8	*Vibrio vulnificus*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
9	*Plesiomonas shigelloides*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
10	*Aeromonas hydrophila*	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5

3853500410

นำดีเอ็นเอ และ cDNA ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวน ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามข้อ 3.2.1.3 และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (electrophoresis) จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.1.5

3.2.2.2 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของวิบริโอแบบที่ 2

ชุมขนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 2 คือชุมชนที่มีทั้งชนิดของ *Vibrio* spp. และจำนวนเซลล์แตกต่างกัน โดยผสมเชื้อกลุ่มวิบริโอที่ตรวจพบจากการสร้างชุมชน*ของ* Vibrio spp. แบบที่ 1 ตามคอลัมน์ F-J ตามตารางที่ 3.2 โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอที่ตรวจพบจากการสร้างชุมชนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water

ร้อยละ 1(W/V) จนได้จำนวนเชื้ออยู่ในระดับ 10^2-10^5 CFU/ml ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer โดยทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างอาหารโดยการเกลี่ยสารละลายเชื้อ (Spread plate) โดยใช้อาหารวุ้น Tryptic soy agar ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยทำการศึกษาทั้งในระบบที่ใช้ดีเอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE) และอาร์เอ็นเอ (สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE) และทำการสกัดดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และ cDNA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้ และแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้เหมือนกับการเตรียมเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างชุมชนของ *Vibrio* spp. แบบที่ 1

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

ลำดับที่	*Vibrio* species	Population mixtures (CFU/ml)				
		F	G	H	I	J
1	ชนิดที่ 1 ที่พบ	10^5	10^5	10^4	10^5	10^3
2	ชนิดที่ 2 ที่พบ	10^4	10^5	10^4	10^4	10^3
3	ชนิดที่ 3 ที่พบ	10^3	10^4	10^3	10^4	10^3
4	ชนิดที่ 4 ที่พบ	10^2	10^4	10^3	10^3	10^2
5	ชนิดที่ 5 ที่พบ	10^2	10^3	10^2	10^3	10^2

3.2.3 ศึกษาผลของสภาวะของเซลล์ของเชื้อวิบริโอต่อการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR-DGGE

3.2.3.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานกลุ่มวิบริโอ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpmเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแปรสภาวะของเชื้อเป็น 3 สภาวะทำการทดลอง 3 ซ้ำ คือ

1. เซลล์สมบูรณ์ (Viable cell (VC)) : เก็บเซลล์โดยดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปสกัดอาร์เอ็นเอทันที

2. เซลล์บาดเจ็บ (Injured cell (IVC)) : เก็บเซลล์โดยดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

3. เซลล์บาดเจ็บที่ผ่านการ pre-enrichment (Injured, cell + pre-enrichment (PIVC)) : เก็บเซลล์โดยดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpmเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดูดคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอทันที

3.2.3.2 สกัดอาร์เอ็นเอและทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น complementary DNA (cDNA) ตามข้อ 3.2.1.2 นำcomplementary DNA (cDNA) ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวน complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามข้อ 3.2.1.3

3.2.3.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยเจลอิเล็คโตโฟริซีส (electrophoresis) ข้อ 3.2.1.4 จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีอาร์ (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ตามสภาวะที่เลือกจากข้อ 3.2.1.5

3853500410

3.2.4 ประเมินวิธี PCR-DGGE ที่พัฒนาสำหรับการตรวจสอบวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

3.2.4.1 เตรียมเซลล์จุลินทรีย์

เตรียม *Vibrio parahaemolyticus* ลงในตัวอย่างอาหารโดยเลี้ยงเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* มาเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water ร้อยละ 1(W/V) จนได้จำนวนเชื้ออยู่ในระดับ 10^2-10^9 CFU/ml ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer โดยทำการตรวจสอบจำนวนเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างอาหารโดยการเกลี่ย(Spread plate) สารละลายเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ผสมเกลือ (NaCl) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 1 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส

3.2.4.2 การเตรียมตัวอย่างอาหารที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์

นำปลาหมึกแช่แข็งซื้อจากซุปเปอร์มาเก็ต จำนวน 1,000 กรัม ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 200 ppm เป็นเวลา 15 นาที สะเด็ดน้ำออกให้หมด แช่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2,000 มิลลิลิตรนาน 5 นาที สะเด็ดน้ำออกให้หมด (วราภา มหากาญจนกุล et al., 2544) จากนั้นตรวจสอบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดย แบ่งมาทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยชั่งตัวอย่าง 50±1 กรัม เติม Peptone water ร้อยละ1 (W/V) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตีตัวอย่างด้วยเครื่องตบอาหาร (Stomacher) ที่ 200 rpm 1 นาที และเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า ด้วย Peptone water ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อแต่ละ dilution ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารวุ้น Tryptic soy agar เกลี่ยสารละลายของตัวอย่าง (Spread plate) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3853500410

3.2.4.3 การเตรียมตัวอย่างอาหารปนเปื้อนเชื้อที่ระดับต่างๆ

ชั่งตัวอย่างปลาหมึกที่เตรียมจากข้อ 3.2.4.2 จำนวน 25±1 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จากที่เตรียมในข้อ 3.2.4.1 แต่ละระดับความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ให้มีระดับความเข้มข้นของเชื้อสุดท้าย 10^1-10^5 CFU/ กรัม ทิ้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที (วราภา มหากาญจนกุล et al., 2544) จากนั้นเติม Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีตัวตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher ที่ 200 rpm 1 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- การตรวจโดยวิธี RT-PCR-DGGE

นำตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.2.4.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอสกัดอาร์เอ็นเอและทำการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็น cDNA ตามข้อ 3.2.1.2 นำ cDNA ที่เตรียมได้มาเพิ่มจำนวนดี cDNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ตามข้อ 3.2.1.3 และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR-DGGE

- การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน Bacteriological analytical manual Chapter 5 (BAM; USFDA, 2004: online)

นำตัวอย่างอาหารใน Alkaline peptone water (APW) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปนำตัวอย่างที่บ่มไว้มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

agar บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นลักษณะของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และรายงานผลเป็นพบ/ไม่พบ ในตัวอย่าง 25 กรัม

3.2.5 การประยุกต์ใช้ RT-PCR-DGGE ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อวิบริโอในตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารจำนวน 14 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆตามรายละเอียดดังตารางที่ 3.3 ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 25±1 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เติม Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher ที่ 200 rpm 1 นาที

- การตรวจโดยวิธี RT-PCR-DGGE

นำตัวอย่างหลังตบด้วยเครื่องตบอาหาร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บในหลอด Microcentrifuge สกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA ตามข้อ 3.2.1.2 เพิ่มจำนวน cDNA ตามข้อ 3.2.1.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซีส (electrophoresis) ข้อ 3.2.1.4 จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ตามข้อ 3.2.1.5

- การตรวจโดยวิธีมาตรฐาน Bacteriological analytical manual Chapter 5 (BAM; USFDA, 2004: online)

นำตัวอย่างอาหารใน Alkaline peptone water (APW) บ่มต่อที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปนำเชื้อที่บ่มไว้มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ตรวจสอบผลโดยดูลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและสุ่มโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันแล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CHOMagar Vibrio (CV) จากนั้นสุ่มโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemistry) โดยใช้ระบบ VITEK®2 system ซึ่งประกอบด้วยการย้อมแกรมเพื่อเลือกการ์ดที่เหมาะสม และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีด้วยการ์ดสำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (GN card) แล้ววิเคราะห์ผลด้วยใช้เครื่อง VITEK®2 system (วิธีการตามภาคผนวก จ.) และรายงานผลเป็นพบ/ไม่พบ ในตัวอย่าง 25 กรัม

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างอาหารและแหล่งที่ซื้อ

ตัวอย่างอาหาร	แหล่งที่ซื้อ
1. ปลาหมึก (สด)	ซุปเปอร์มาเก็ต
2. เนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง)	ซุปเปอร์มาเก็ต
3. เนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง)	ซุปเปอร์มาเก็ต
4. ปลาหมึก (แช่แข็ง)	ซุปเปอร์มาเก็ต
5. หนวดปลาหมึก (สด)	ตลาดสด
6. ปลาหมึกกล้วย (สด)	ตลาดสด
7. กุ้งขาว (สด)	ตลาดสด
8. ปลาทู (สด)	ตลาดสด
9. กุ้งแม่น้ำ (สด)	ตลาดสด
10. เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง)	ตลาดสด
11. หอยแครง (สด)	ตลาดสด
12. หอยนางรม (สด)	ตลาดสด
13. ปลาแซลมอนแล่ (สด)	ตลาดสด
14. ปลาอินทรีย์แล่ (สด)	ตลาดสด

3853500410