รายการอ้างอิง

Compact Dry "Nissui" VP For *Viblio parahaemolyticus*. Nissui Pharmaceutical Co.Ltd, Japan.

Adrover, M. et al. 2010a. Characterization of specific cDNA background synthesis introduced by reverse transcription in RT-PCR assays. Biochimie 92: 1839-1846.

Adrover, M. F. et al. 2010b. Characterization of specific cDNA background synthesis introduced by reverse transcription in RT-PCR assays. Biochimie 92: 1839-1846.

Bej, A. K. et al. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh. Journal of microbiological methods: 215-225.

Berger, S. L., and A. R. Kimmel. 1987. Guide to molecular cloning technique. Mehods Enzymol 152: 215-304.

Bhunia, A. K. 2008. Foodborn microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. West Lafayette, Indiana : Springer.

Bio-Rad. The DCode™ Universal Mutation Detection System. In: Bio-Rad (ed.). p 11-28, U.S.

Blanco-Abad, V., J. Ansede-Bermejo, A. Rodriguez-Castro, and J. Martinez-Urtaza. 2009. Evaluation of different procedures for the optimized detection of Vibrio parahaemolyticus in mussels and environmental samples. International journal of food microbiology 129: 229-236.

Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. 2003. Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products. Applied and Environmental Microbiology 69: 4116-4122.

Boer, E. d., and R. Beumer. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. International journal of food microbiology 50: 119-130.

Campos, E. et al. 1996. *Vibrio mimicus* diarrhea following ingestion of raw turtle eggs. Applied and Environmental Microbiology 62: 1141–1144.

Chiang, S.-R., and Y.-C. Chuang. 2003. *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy. Journal of Microbiological Immunology Infection 36: 81-88.

Chrisolite, B. et al. 2008. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. Aquaculture 275: 13-19.

3853500410

Chung, W. H., C. L. Li, and Y. C. Ming. 1994. Survival of Psychrotrophic Vibrio mimicus, Vibrio fluvialis and Vibrio parahaemolyticus in Culture Broth at Low Temperatures. Journal of Food Protection 57: 607-610.

Coutard, F., M. Pommepuy, S. Loaec, and D. Hervio-Heath. 2005. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. Journal of applied microbiology 98: 951-961.

Daavis, L. G., M. D. Dibner, and J. F. Batteyb. 1986. Basic Methods in Molecularbiology. Elsevier Science Pubishing . New York.

Depaola, A., J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, and D. W. Cook. 2003. Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. Applied and Environmental Microbiology 69: 1521-1526.

Eiler, A., and S. Bertilsson. 2006. Detection and quantification of Vibrio populations using denaturant gradient gel electrophoresis. Journal of microbiological methods 67: 339-348.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Gafan, G. P., and D. A. Spratt. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis gel expansion (DGGEGE) An attempt to resolve the limitations of co-migration in the DGGE of complex polymicrobial communities. FEMS Microbiology Letters 253: 303-307.

Hara-Kudo, Y. et al. 2001. Improved method for detection of Vibrio parahaemolyticus in seafood. Applied and Environmental Microbiology 67: 5819-5823.

Hoshino, K. et al. 1998. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. FEMS Immunology & Medical Microbiology 20: 201-207.

Izumiya, H. et al. 2011. Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. Molecular and cellular probes 25: 174-176.

Joshi, M., and D. J. D. 2010. Popymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. International Journal of Biomedical Research 5: 81-97.

Kadkhoda, K., H. Adam, M. W. Gilmour, and G. W. Hammond. 2012. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* Septicemia in an Immunocompromised Patient. Case reports in infectious diseases 2012: 698746.

3853500410

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.

Kodaka, H., H. Teramura, S. Mizuochi, M. Saito, and H. Matsuoka. 2009a. Evaluation of the Compact Dry VP method for screening raw seafood for total *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 72: 169-173.

Kodaka, H., H. Teramura, S. Mizuochi, M. Saito, and H. Matsuoka. 2009b. Evaluation of the Compact Dry VP method for screening raw seafood for total *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 72: 169-173.

Lake, R., A. Hudson, and P. Cressey. 2003. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood Christchurch: Institute of Environmental Science & Research Limited.

Lee, J.-S. et al. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. International journal of food microbiology 102: 143-150.

Madden, J. M., B. A. McCardell, and J. G. Morris. 1989. *Vibrio cholerae*. Foodborne Bacterial Pathogens. p 525-542. Marcel Dekker, New York.

Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. International Journal Food Microbiology 31: 45-58.

Messelhäusser, U. et al. 2010. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. International journal of food microbiology 142: 360-364.

Mills, D. A., E. A. Johannsen, and L. Cocolin. 2002. Yeast Diversity and Persistence in Botrytis Affected Wine Fermentations. Applied and Environmental Microbiology 68: 4884-4893.

Muyzer, G., and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek 73: 127-141.

Nakashima, Y. et al. 2007. A Chromogenic Substrate Culture Plate for Early Identification of *Vibrio vulnificus* and Isolation of Other Marine *Vibrios*. Annals of Clinical & Laboratory Science 37: 330-334.

Odumeru, J. A., and C. G. León-Velarde. 2012. Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen. InTech China, China.

Oliver, J. D. 1989. *Vibrio vulnificus*. Foodborne Bacterial Pathogens. p 569-600. Marcel Dekker, New York.

Oliver, J. D., and J. B. Kaper. 1997. *Vibrio* species. Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers. p 228-264, USA.

3853500410

Ortiz, E., G. Estrada, and P. M. Lizandi. 1998. PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. Molecular and Cellular Probe 12: 219-226.

Park, T. et al. 2003. Misidentification of Aeromonas veronii biovar sobria as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. Lett Appl Microbiol 37: 349-353.

Pincus, D. H. Microbial Ientification using the BoMérieux VTEK® 2 System, bioMérieux, Inc. USA.

Pizzutto, M., and R. G. Hirst. 1995. Classification of isolates of *Vibrio harveyi* virulent to Penaeus monodon larvae by protein profile analysis and M13 DNA fingerprinting. Diaeases of Aquatic Organiams 21: 61-68.

Prakitchaiwattana, C. J., G. H. Fleet, and G. M. Heard. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS yeast research 4: 865-877.

Raghunath, P., S. Acharya, A. Bhanumathi, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2008. Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. Food microbiology 25: 824-830.

Robertsona, P. A. W., H. S. Xub, and B. Austin. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Vibrio harveyi* in penaeid shrimp and water. Journal of microbiological methods 34: 31-39.

Romestand, B., A. Dragesco, G. Breuil, F. Coste, and G. Bouix. 1993. An ELISA technique for rapid diagnosis of *vibriosis* in sea bass Dicentrarchus labrax. Diseases of Aquatic Organisms 15: 137-143.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Saulnier, D., S. D. Decker, and P. Haffner. 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. Journal of microbiological methods 77: 191-197.

Shi, X.-M., F. Long, and B. Suo. 2010. Molecular methods for the detection and characterization of foodborne pathogens. Pure and Applied Chemistry 82: 69-79.

Somma, M., and M. Querci. 2006. Session 6: The Polymerase Chain Reaction (PCR) The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms.

Su, Y. C., and C. Liu. 2007. Vibrio parahaemolyticus: a concern of seafood safety. Food microbiology 24: 549-558.

Szaboa, E. A., and B. M. Mackey. 1999. Detection of *Salmonella enteritidis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). International journal of food microbiology 51: 113-122.

3853500410

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Thompson, C. C., F. L. Thompson, A. C. P. Vicente, and J. Swings. 2007a. Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atpA* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 2480-2484.

Thompson, F. L., I. Cleenwerck, J. Swings, J. Matsuyama, and T. Iida. 2007b. Genomic diversity and homologous recombination in *Vibrio parahaemolyticus* as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and multilocus sequence analysis (MLSA). Microbes and Environments 22: 373-379

Thompson, J. R. et al. 2004. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. Applied and Environmental Microbiology 70: 4103-4110.

Thongchankeaw, U. et al. 2011. Diversity of *Vibrio* spp. at the Andaman Tarytao Island Thailand. Asian Journal of Biotechnology 3: 530-539.

Tuteja, U., S. Kumar, J. Shukla, J. Kingston, and H. V. Batra. 2007. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. Journal of medical microbiology 56: 1340-1345.

Twedt, R. M. 1989. *Vibrio parahaemolyticus*. Foodborne Bacterial Pathogens. p 543-568. Marcel Dekker, New York.

US Food and Drug Administration. 2004. Bacteriological Analytical Manual. http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm Accessed 10 March 2012.

Wang, S., and R. E. Levin. 2006. Rapid quantification of *Vibrio vulnificus* in clams (Protochaca staminea) using real-time PCR. Food microbiology 23: 757-761.

Westermeier, R. et al. 2001. Electrophoresis in Practice. WILEY-VCH, Germany.

Yang, Z. Q. et al. 2008 Isolation and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fresh, low-temperature preserved, dried, and salted seafood products in two coastal areas of eastern China. International journal of food microbiology 125: 279-285.

Zhaoa, F., D. q. Zhoua, H. h. Caoa, L. p. Maa, and Y. h. Jiang. 2011. Distribution, serological and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in the eastern coast of China. Food Control 22: 1095-1100.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.กระทรวงสาธารณสุข. 2548. โรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ คู่มือการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. http://webdb.dmsc.moph.go.th/ Accessed 17 เมษายน 2555.

3853500410

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.กรมประมง.กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. 2554. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางจุลชีววิทยา. www.fisheries.go.th/quality/Std%20micro.html Accessed 20 มกราคม 2555.

กระทรวงพาณิชย์. 2555. สินค้าส่งออกสำคัญ 10 อันดับแรก : สินค้าหมวดเกษตรกรรม. http://www2.ops3.moc.go.th Accessed 30 มกราคม 2556.

กระทรวงสาธารณสุข, ศ. ก. 2550. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. http://webdb.dmsc.moph.go.th Accessed 17 เมษายน 2555.

กระทรวงสาธารณสุข.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร.

ทัศวรรณ ขาวสีจาน, สุวรรณา ภาณุตระกูล, and ศิริโฉม ทุ่งเก้า. 2550. การประเมินความเสี่ยงในการได้รับเชื้อกลุ่มวิบริโอจากการบริโภคหอยนางรม จากแหล่งเลี้ยงหอยนางรม ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. In: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. p 263-270.

บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ, องุ่น เกียรติวุฒิ, and ศุภกิจ อังคศุภากร. 2527. โรคติดต่อระหว่างคนและสัตว์. บัณฑิตการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร.

วราภา มหากาญจนกุล, ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, and วชิราภรณ์ เทียมพันธ์. 2544. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในผักใบ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. p 410-416. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, and มนตรี อัตถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. โรงพิมพ์เรือนแก้ว, กรุงเทพมหานคร.

ศรีวรรณา หัทยานานนท์, กฤษณา ภูริกิตติชัย, กรองแก้ว ศุภวัฒน์, and ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ. 2549. มหันตภัยจากเชื้อ *Vibrio vulnificus*. http://www.dmsc.moph.go.th Accessed 17 เมษายน 2555.

สุชาดา จัมทสิริยากร. 2553. อหิวาตกโรค (Cholera). สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2552. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. p 114-116. โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึกในพระบรมราชูอุปถัมภ์, นนทบุรี.

สุดสาย ตรีวานิช, and สายพิณ ทานัชฌาสัย. 2546. การประยุกต์ใช้ PCR และ Biosensor สำหรับการตรวจสอบอันตรายในอาหาร. โรงพิมพ์สุทธิสารการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. โรงพิมพ์ตระกูลไทย, พิษณุโลก.

3853500410

3853500410

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

ก. 1 การเตรียม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ละลาย Disodium ethylenediaminetetra acetate (EDTA) 46.5 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า pH 8.0 ด้วย Sodium hydroxide (pellet) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ก. 2 การเตรียม 50X TAE buffer (pH 8.3) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ละลาย Tris base 60.5 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน (deionize water) 100 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid ปริมาตร 14.275 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า pH 8.3 ด้วย 1M Sodium hydroxide (NaOH) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3853500410

ก. 3 การเตรียม 1 X TAE buffer (pH 8.3) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ปิเปต 50 X TAE buffer (pH 8.3) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ก. 4 10% (w/v) Ammonium persulphate solutions

ชั่ง Ammonium persulphate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

ก. 5 อะกาโรสเจล (Agarose gel) ร้อยละ 1.8 (w/v)

ละลายผงอะกาโรส (agarose powder) 1.8 กรัม ต่อ 1 X TAE buffer (pH8.3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจนผงอะกาโรสละลายหมด สังเกตสารละลายที่ได้จะใส รอจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทใส่พิมพ์ที่เตรียมไว้ และทิ้งไว้ให้เย็น

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

สารเคมี	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 70
40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1)	16.25 ml	16.25 ml
50XTAE buffer	2.00 ml	2.00 ml
Formamide	18.00 ml	28.00 ml
Urea	18.90 ml	29.40 ml
Distilled water	too 100.00 ml	too 100 ml

3853500410

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

สารเคมี	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 70
40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1)	20.00 ml	20.00 ml
50XTAE buffer	2.00 ml	2.00ml
Formamide	18.00 ml	28.00 ml
Urea	18.90 ml	29.40 ml
Distilled water	too 100 ml	too 100 ml

ตารางที่ ก.3 พอลิอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) ร้อยละ 10 (w/v) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70

สารเคมี	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45	ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 70
40% acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1)	25.00 ml	25.00 ml
50XTAE buffer	2.00 ml	2.00 ml
Formamide	18.00 ml	28.00 ml
Urea	18.90 ml	29.40 ml
Distilled water	too 100 ml	too 100 ml

3853500410

ภาคผนวก ข

การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA and RNA extraction)

ข. 1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ตามวิธีของ HyYield ™ Genomic DNA Mini kit protocol book, RBC, Taiwan

วัสดุอุปกรณ์

1. Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
2. Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร, RBC, Taiwan
3. GB Column, RBC, Taiwan
4. Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Hygon, USA
5. Micropipette P1000, Gilson, France
6. Pipette tip ขนาด 1 มิลลิลิตร, Corning, USA
7. Water bath, GFL, Germany

สารเคมี

1. Elution buffer, RBC, Taiwan
2. Ethanol ร้อยละ 99 (W/V)
3. GB buffer, RBC, Taiwan
4. GT buffer, RBC, Taiwan
5. Wash buffer, RBC, Taiwan
6. W1 buffer, RBC, Taiwan

ขั้นตอนการสกัด

1. เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB) ที่ผสมเกลือ (NaCl) ร้อยละ 1 (W/V) เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
2. ปิเปตสารละลายของเชื้อ (suspension) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3853500410

3. นำตะกอนที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด HyYield ™ Genomic DNA Mini kit (YBG100, RBC, Taiwan) โดยเติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ Vortex mixer เพื่อละลายตะกอน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
4. เติม GB buffer อีก 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าทุก 3 นาที พร้อมกับนำ Elution buffer ไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการชะดีเอ็นเอ (DNA elution)
5. เติม Ethanol ร้อยละ 96-100 (w/v) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างและผสมให้เข้ากันทันที ด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที ในกรณีที่มีตะกอนเกิดขึ้น Micropipette เพื่อทำให้ตะกอนแตกตัว
6. นำ GB column เข้าประกอบกับ Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายผสมทั้งหมดในข้างต้นใส่ลงใน GB Column ปิดฝา GB Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
7. เปลี่ยน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร อันใหม่ แล้วเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน GB Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
8. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม Wash buffer (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน GB Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
9. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ Column matrix แห้ง
10. นำ GB Column ประกอบเข้ากับ Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เติม Elution buffer ที่ให้ความร้อนแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปิเปตให้โดนตรงกลางของ Column matrix บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อให้ Column matrix ดูดซับ Elution buffer
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อเป็นการชะดีเอ็นเอที่ติดอยู่บน Column matrix ให้ลงมาอยู่ในหลอด MicroCentrifuge
12. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3853500410

ข. 2 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) ตามวิธีของ Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit, USA และ สังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis kit) ตามวิธีของ Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

วัสดุอุปกรณ์

1. Centrifuge, Micro22R Hettich, Germany
2. Collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร,
3. Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร,
4. RNA Purification Column,
5. Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Hygon, USA
6. Micropipette P1000, Gilson, France
7. Pipette tip ขนาด 1 มิลลิลิตร, Corning, USA
8. Water bath, GFL, Germany

3853500410

สารเคมี

1. Lysis buffer, GeneJet, USA
2. Proteinase K, GeneJet, USA
3. Wash buffer 1, GeneJet, USA
4. Wash buffer 2, GeneJet, USA
5. Water, nuclease-free, GeneJet, USA

ขั้นตอนการสกัด

1. เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Nutrient broth (NB) ที่ผสมเกลือ (NaCl) ร้อยละ 1 (W/V) เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าแบบ orbital shaking ที่ 200 rpm เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
2. ปิเปตสารละลายของเชื้อ (suspension) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
3. นำตะกอนที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด GeneJET RNA Purification Kit (YBG100 RBC Taiwan) โดยเติม TE buffer (เติม lysozyme ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 mg/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ vortex mixer เพื่อผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. เติม Lysis buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (เติม DTT) ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วย Votex mixer เป็นเวลา 15 วินาที
5. เติม Ethanol ร้อยละ 96-100 (w/v) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างและผสมให้เข้ากันทันที ด้วย Micropipette
6. นำสารละลายผสมทั้งหมดในข้างต้นใส่ลงใน GeneJET RNA Purification Column ที่ใส่อยู่ใน Collection tube นำ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpmเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารออกและนำ Purification Column ใส่กลับไปใน Collection tube อันเดิม ทำซ้ำอีกครั้ง
7. ย้าย GeneJET RNA Purification Column ใส่ลงใน Collection tube อันใหม่ปริมาตร 2 แล้วเติม Wash buffer 1 (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1นาที
8. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง แล้วเติม Wash buffer 2 (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง แล้วเติม Wash buffer 2 (ที่เติม Ethanol ร้อยละ 99 (w/v) แล้ว) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
10. เทสารที่อยู่ใน Collection tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้ง นำ GeneJET RNA Purification Column ประกอบเข้ากับ Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เติม Water, nuclease-free ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปิเปตให้โดนตรงกลางของ GeneJET RNA Purification Column
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpmเป็นเวลา 1 นาที เพื่อเป็นการชะอาร์เอ็นเอที่ติดอยู่บน Column ให้ลงมาอยู่ในหลอด MicroCentrifuge
12. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การกำจัดดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอ

1. เติม อาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร (1ไมโครกรัม), 10x reaction buffer with $MgCl_2$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, DNase I (RNase-free) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated Water ปริมาตร 7 ไมโครลิตร
2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
3. เติม EDTA เข้มข้น 50 มิลลิโมแลล ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
4. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3853500410

5. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

ข. 3 การสังเคราะห์ cDNA สำหรับ RT-PCR

1. ละลายสารละลายต่างๆและเก็บไว้ในน้ำแข็ง
2. เติมสารละลายต่อไปนี้ลงในหลอดทดลอง (MicroCentrifuge) total RNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (0.1 ng-5µg), random hexamer primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ water (nucleases-free) ปริมาตร 9 ไมโครลิตร
3. ควรทำ Positive control cDNA โดยเติม Control GAPDH RNA (50 ng/µl) ปริมาตร 2 µl แทน Total RNA
4. ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นลงทันทีโดยวางในน้ำแข็ง
5. จากนั้นเติมสารต่อไปนี้
6. 5 x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
7. RiboLock RNase Inhibitor (20u/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
8. 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
9. RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
10. ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
11. บ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 5 นาที
12. เก็บจีโนมิก (genomics) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 สัปดาห์ หรือเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 เดือน

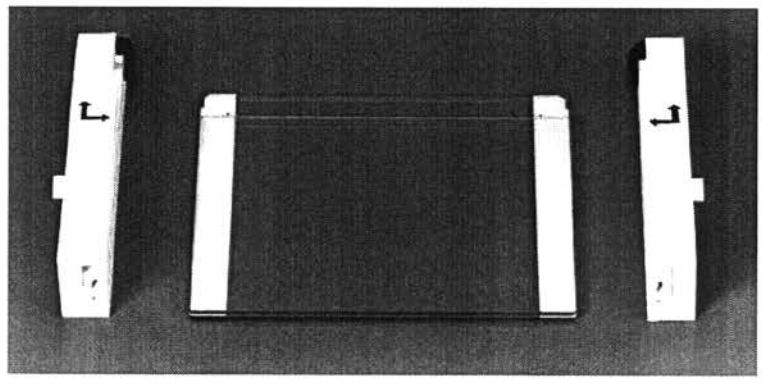
3853500410

ภาคผนวก ค

การประกอบเจลพอลิอะคลิลาไมด์

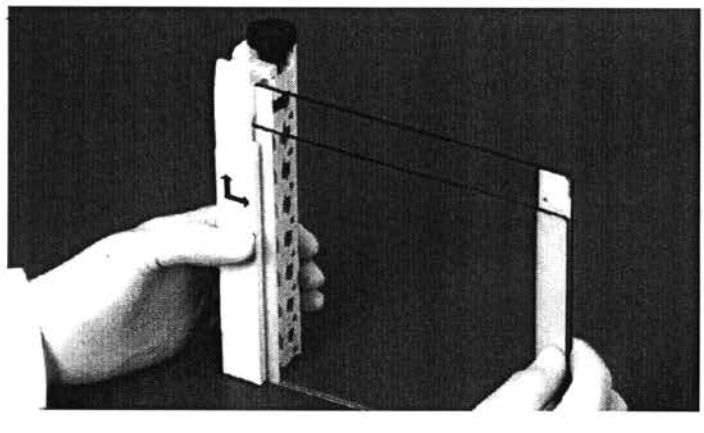
DGGE with Dcode ™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA

1. ล้างกระจก spacer และ combs ด้วย 95% alcohol ห้ามใช้สบู่หรือน้ำยาทำความสะอาด และห้ามขัดถูผึ่งให้แห้ง แล้วจึงประกอบชุดกระจกโดยสวมถุงมือในทุกขั้นตอน



ภาพที่ ค.1 Spacer และ plate clamps

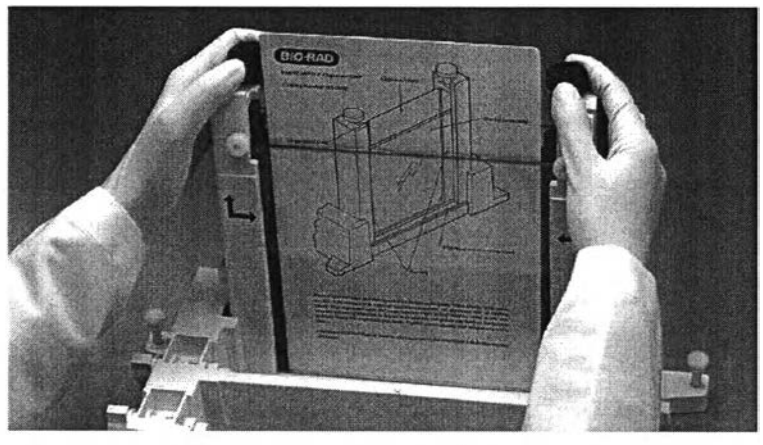
2. ประกอบกระจกโดยวางกระจกแผ่นใหญ่ไว้ด้านล่าง จากนั้นวาง spacer ไว้บนกระจกทั้งสองข้างและวางกระจกแผ่นเล็กไว้ด้านบน นำกระจกที่ประกอบไว้ใส่ไปใน plate clamps และหมุนเกลียวให้แน่นพอที่จะสามารถยึดกระจกได้



ภาพที่ ค.2 การประกอบกระจก

3853500410

3. วางฟองน้ำลงบน casting stand แล้วล็อคกระจกเข้ากับฐานของ casting stand

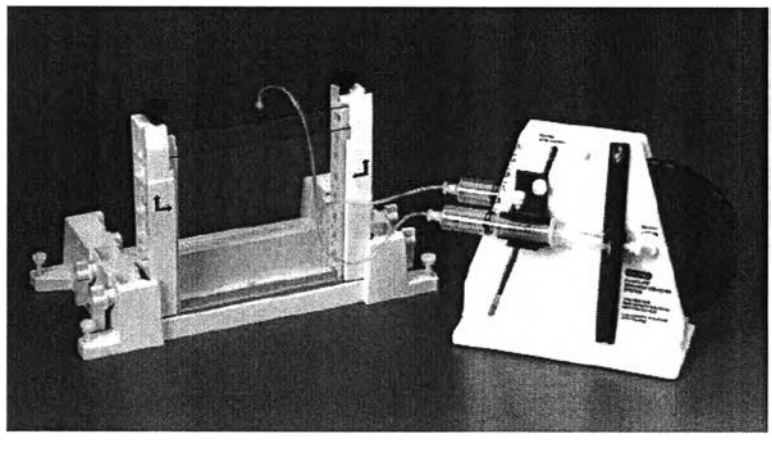


ภาพที่ ค.3 การประกอบกระจกเข้ากับฐานของ casting stand

3853500410

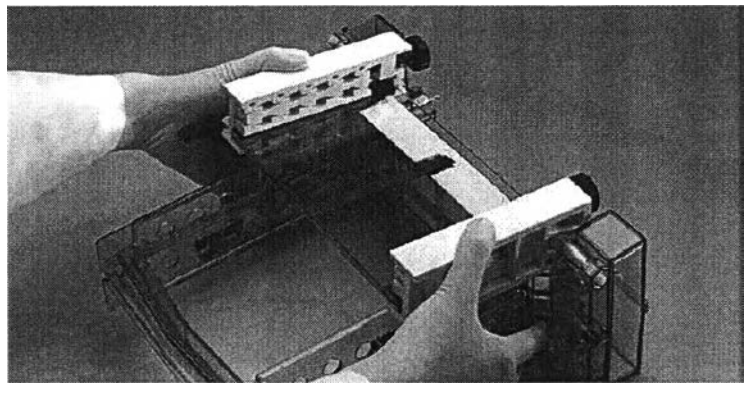
4. นำสารละลายเจล (gel solution) ความเข้มข้นของสาร denaturant ร้อยละ 45 และ 70 ความเข้มข้นละ 16 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม TEMED ปริมาตร 14.4 ไมโครลิตร และ 10% ammonium persulfate ปริมาตร 144 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และใช้ไซริงค์ดูดสารละลายที่เตรียมไว้ และประกอบเข้ากับชุด gradient delivery system

5. จากนั้นค่อยๆปล่อยสารละลายเจลลงในชุดกระจกที่ประกอบไว้ เสียบ comb ลงตรงกลาง ทิ้งเจลให้แข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง



ภาพที่ ค.4 การสร้างเจลพอลีอะคลิลาไมด์ (casing gel)

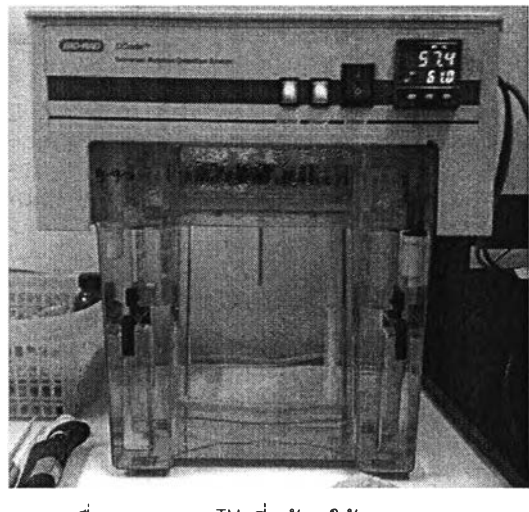
5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ดึง comb ออก และนำชุดกระจกที่มีเจลอยู่ประกอบเข้ากับ sandwich core



ภาพที่ ค.5 การประกอบเจลเข้ากับ sandwich core

6. นำ sandwich core ที่ประกอบไว้ ใส่ลงใน electrophoresis tank ที่บรรจุ running buffer (1XTAE buffer) ซึ่งให้ความร้อนไว้ล่วงหน้าแล้วที่อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส

7. นำผลิตภัณฑ์ PCR ผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) อัตราส่วน 2:1 ใส่ลงในหลุมบนเจล และวิเคราะห์ผลิตผลพีซีอาร์ภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมแปร์ อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงด้วยเครื่องเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System



ภาพที่ ค.6 แสดงการประกอบครื่อง Dcode ™ ที่พร้อมใช้งาน

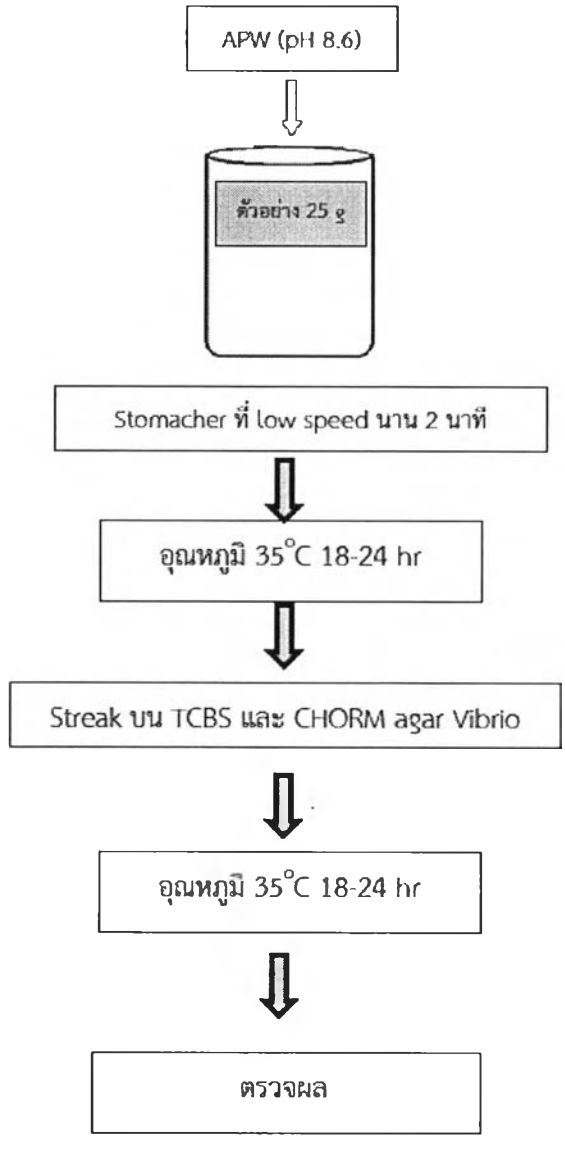
3853500410

8. แกะแผ่นเจลออกจากกระจก จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation

3853500410

ภาคผนวก ง

วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5)



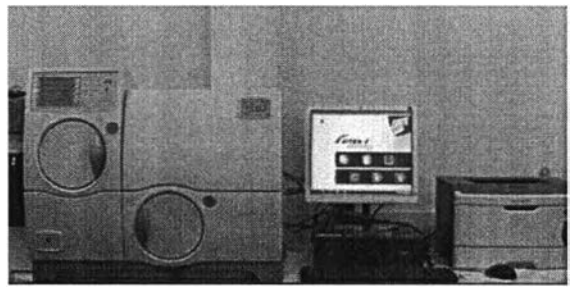
ภาพที่ ง.1 วิธีการตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp. ในอาหาร (FDA-BAM Chepter 5)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bacteriological Analytical Manual Online (BAM online); USFDA, 2004

3853500410

ภาคผนวก จ

วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อวิบริโอด้วยเครื่อง VITEK ®2 system



ภาพที่ จ.1 เครื่อง VITEK 2 ® system

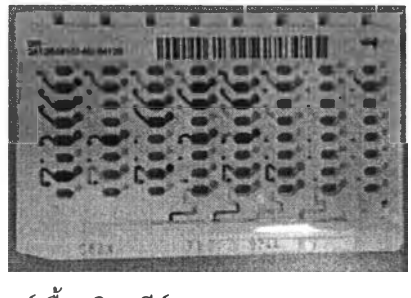
1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อที่ได้ โดยการย้อมแกรม เชื้อวิบริโอที่ต้องการทดสอบจะต้องเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) รูปร่างท่อนตรงหรือโค้ง (curved rod) ไม่สร้างสปอร์

2. ใช้น้ำเกลือ 0.45 % ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด

3. เขี่ยโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อที่แยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว ใส่ลงในหลอดน้ำเกลือที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

4. วัดค่าความขุ่นของสารละลายเชื้อด้วยเครื่อง McFarland ให้มีค่าความขุ่นประมาณ 0.5-0.63 McFarland

5. นำสารละลายเชื้อที่ได้และการ์ดสำหรับเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ (GN) ใส่ลงในช่องของถาดสำหรับใส่การ์ด (cassette) และนำเข้าเครื่อง



ภาพที่ จ.2 การ์ดสำหรับวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ (GN card)

6. จากนั้นเครื่องจะทำการบ่มสารละลายเชื้อและอ่านผล เทียบกับฐานข้อมูลเพื่อแปรผลว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด

3853500410

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ตารางที่ ฉ.1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลาหมึกแช่แข็งที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

Replication	Dilution			
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
สรุป พบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด น้อยกว่า 100 CFU/ml				

3853600410

ตารางที่ ฉ.2 ผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐาน

ตัวอย่างอาหาร	ตัวแทนไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ		ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK ® 2
		TCBS agar	CHOMagar Vibrio	
1. ปลาหมึก (สด)	S1-1	สีเขียวใส	Not detect	-
	S1-2	ใส ตรงกลางดำ	Not detect	-
	S1-3	สีเหลืองขุ่น	สีชมพูอ่อน	*Aeromonas salmonicida* (95%)
	S1-4	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (95%)
2. เนื้อปลากะพงแล่ (แช่แข็ง)	S2-1	สีเขียวใส	Not detect	-
	S2-2	สีเหลืองใส	Not detect	-
3. เนื้อปลาเก๋าแล่ (แช่แข็ง)	S3-1	สีเขียวใส	สีชมพูอ่อน	*Morganella morganii ssp morganii* (95%)
	S3-2	สีเหลืองใส	สีครีม	*Morganella morganii ssp morganii* (93%)
	S3-3	ใส ตรงกลางดำ	Not detect	-
4. ปลาหมึก (แช่แข็ง)	S5-1	สีเหลืองขุ่น (เล็ก)	สีน้ำเงิน	*Vibrio cholerae* (96%)
	S5-2	สีเหลืองขุ่น (ใหญ่)	สีน้ำเงิน	*Vibrio cholerae* (97%)
5. หนวดปลาหมึก (สด)	S6-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (90%)
	S6-2	สีเหลืองใส	Not detect	-
6. ปลาหมึกกล้วย (สด)	S7-1	สีเขียวขุ่น (ใหญ่)	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (94%)
	S7-2	สีเขียวขุ่น (เล็ก)	สีน้ำเงิน	*Vibrio mimicus* (99%)
7. กุ้งขาว (สด)	S8-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (99%)
	S8-2	สีเขียวใส	Not detect	-

3853650410

ตารางที่ ฉ.2 ผลการตรวจวิบริโอในตัวอย่างอาหารโดยวิธีมาตรฐาน (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ตัวแทนไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ		ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยเครื่อง VITEK ® 2
		TCBS agar	CHOMagar Vibrio	
8. ปลาทู (สด)	S9-1	สีเหลืองใส	Not detect	-
	S9-2	สีเขียวขุ่น	สีชมพูอ่อน	*Morganella morganii ssp morganii* (99%)
9. กุ้งแม่น้ำ (สด)	S10-1	สีเหลืองขุ่น	สีน้ำเงิน	*Vibrio cholerae* (98%)
	S10-2	สีเหลืองใส	Not detect	
10. เนื้อปลาดอลรี่แล่ (แช่แข็ง)	S11-1	สีเหลืองขุ่น	สีครีม	*Vibrio metschnikovii* (88%)
	S11-2	สีเขียวใส	Not detect	-
11. หอยแครง (สด)	S12-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio parahaemolyticus* (91%)
	S12-2	สีเหลืองขุ่น	สีชมพู	*Vibrio fluvialis* (96%)
12. หอยนางรม (สด)	S13-1	สีใส	Not detect	-
	S13-2	เขียวตรงกลางดำ	Not detect	-
13. ปลาแซลมอนแล่ (สด)	S14-1	สีเขียวขุ่น	สีชมพู	*Vibrio fluvialis* (94%)
	S14-2	สีเหลืองใส	Not detect	-
14. ปลาอินทรีย์แล่ (สด)	S15-1	สีเขียวใส	Not detect	-
	S15-2	สีเหลืองใส	Not detect	-

3853500410

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกาญจนา ชาหอม เกิดเมื่อวันที่ 14 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดชัยนาท สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อปีการศึกษา 2550 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

Chahorm, K. and Prakitchaiwattana, C. 2013. Detection of Vibrio spp. using PCR - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. In 5 th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (poster presentation), 21-23 August 2013 at the Centara Hotel and Convention Centre Khon Kean Thailand.

3853500410

ห้องสมุดคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาฯ
FACULTY OF SCIENCE LIBRARY
CHULALONGKORN UNIVERSITY