บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

3.1. แบคทีเรียและปลา

3.1.1. แบคทีเรีย

1) *S. agalactiae* ที่ได้รับการยืนยันชนิดจากจากสถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

3.1.2. ปลานิลที่ใช้ในการศึกษา

1) ปลานิล จากเกษตรกรบางพระ จังหวัดชลบุรี น้ำหนักประมาณ 5-10 กรัม และ 50-100 กรัม

3.2. อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1. อุปกรณ์

1) Thermal cycler รุ่น T-Gradient thermoblock
2) ชุดแยกดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า
3) เครื่องส่องภาพเจล Transiluminator
4) GF-1 Bacterial DNA extraction kit
5) GF-1 Blood DNA extraction kit
6) pGEM-T and pGEM-T Easy Vecter System kit
7) Hi-Speed Plasmid Mini kit
8) Quant-iT assay kit
9) เข็มฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร
10) ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
11) เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader)
12) เครื่องผสมสาร (Vortex)
13) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
14) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
15) กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

3.2.2. สารเคมี

1) Agarose gel (Vivantis)
2) Amplicilin (200 mg/ml)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3) X-gal (40mg/ml)

4) 6x loading dye

5) Magnesium sulfate

6) EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic acid)

7) Nuclease free water

8) 100 bp DNA ladder (Vivantis)

9) 10 mM dNTP Mix (Vivantis)

10) 5U/µl *Taq* DNA polymerase (Vivantis)

11) ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ *16S rRNA*

F1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3')

IMOD (5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3')

ไพรเมอร์ *28S rRNA*

L99 (5'-CGA AGC CAG AGG AAA ATC TG -3')

OCE215R (5'- GAA ACT TCG GAG GGA ACC A -3')

ไพรเมอร์ตรวจสอบโคลน

M13 Forward (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3')

M13 Reverse (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3')

12) TBE buffer

13) Ethidium bromide

14) 0.85% โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

15) น้ำกลั่น

16) LB agar

17) LB broth

18) TSA (Trypic soy agar)

19) TSB (Trypic soy broth)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1. การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *S. agalactiae*

นำเชื้อบริสุทธิ์ *S. agalactiae* มาเลี้ยงในอาหารแข็ง Trypic Soy Agar (TSA) จากนั้นศึกษาคุณสมบัติของ *S. agalactiae* โดยย้อมสีแกรมและศึกษารูปร่างลักษณะของเซลล์ จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นในการคัดเลือกเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ -80 องศาเซลเซียส หรือไนโตรเจนเหลวเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.3.2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* บริสุทธิ์ ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง(TSA) นำเลี้ยงต่อในอาหารเหลว (TSB) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดปริมาณ CFU (colony forming unit) ของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* โดยวิธีการ plate count โดยเจือจางเชื้อแบคทีเรียแต่ละจานเลี้ยงเชื้อปริมาณตั้งแต่ 10^3 ถึง 10^9 ใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร spread ลงในจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณระหว่าง 30-300 โคโลนี

จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการนำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง และปั่นล้าง 3 ครั้งด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 % เก็บแบคทีเรียในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปศึกษาต่อไป

3.3.3. การเตรียมสัตว์ทดลองในการศึกษาความรุนแรงของ *S. agalactiae*

ปลานิลที่มีสุขภาพดี ปลอดจากการติดเชื้อด้วยการตรวจสอบเบื้องต้น ทางจุลชีววิทยา น้ำหนักในช่วง 5-10 กรัมโดยเลี้ยงไว้ในตู้ทดลองให้ปลาคุ้นเคยต่อสภาวะของการเลี้ยงต่อการทดลองเพื่อปรับสภาพ เป็นเวลา 3 วันก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 3 ครั้ง

3.3.4. การศึกษาปริมาณของ *S. agalactiae* ที่ทำให้ปลานิลตาย 50%

(Median lethal dose: LD_{50})

เตรียมปลานิลจำนวน 9 ชุดการทดลอง โดยที่ ชุดทดลอง 8 ชุด และชุดควบคุม 1 ชุด แต่ละชุด จำนวน 10 ตัว โดยใส่ในตู้ทดลองความจุ 10 ลิตร

<u>ชุดการทดลอง</u> - ฉีดสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ที่ช่องท้องท้องปลาแต่ละตัวในกลุ่มการทดลอง ปริมาณ 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 CFU/ml เพื่อ โดยใช้เข็มฉีดยาขนาดเล็ก และหลอดฉีดยาขนาดเล็ก 1 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าที่ช่องท้องแต่ละตัวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

<u>ชุดควบคุม</u> - ฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ที่ช่องท้องท้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปลาแทนการใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรีย และสังเกตอาการปลานิลหลังการฉีดเชื้อ และบันทึกอัตราการตายของปลาทุก ๆ วันเป็นเวลานาน 14 วัน จากนั้นนำอัตราการตายที่บันทึกได้เพื่อคำนวณหาค่า LD_{50} เพื่อศึกษาความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

3.3.5. การเตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae*

เตรียมดีเอ็นเอจากแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA (Trypic soy agar) สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-bacterial DNA extraction kit (Vivantis) ปฏิบัติตามคู่มือที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิตซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอใน TSB (Trypic soy broth) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาที ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องจากนั้นปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลาย R1 และ lysozyme บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขั้นตอนต่อไปปั่นเก็บโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย R2 และ Proteinase K นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เติม ethanol และผสมให้เข้ากันจากนั้นนำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน column เติม wash buffer ขั้นตอนสุดท้ายละลายดีเอ็นเอใน column ด้วยน้ำปราศจากสารพันธุกรรม (DNA free water)

จากนั้นนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยชุด Quant-iT kit (ภาคผนวก) และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำพีซีอาร์ต่อไป

3.3.6. การตรวจสอบทางชีวโมเลกุล ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ที่สกัดโดยชุดสกัด GF1-bacterial DNA extraction kit (Vivantis) เตรียมดีเอ็นเอในปริมาณ 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 นาโนกรัมตามลำดับ นำมาทำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Martinez et al. (2001) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง*16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae* คือ F1 (5'-GAG TTT GAT CAT GGC TCA G-3') และ IMOD (5'-ACC AAC ATG TGT TAA TTA CTC-3') ที่มีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ 13 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ร่วมกับ 2x PCR Mastermix (10X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl *Taq* DNA polymerase) ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 32 รอบ โดยแต่ละขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ ขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟลิซิสอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อ

ปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (ภาคผนวก) เป็นเวลานาน 30 นาที ส่องดูภาพเจลภายใต้ รังสีอุลตร้าไวโอเลตเพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.3.7. การโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์ของดีเอ็นต้นแบบมาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM-T easy vector (Promega) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

เตรียมส่วนผสมดังนี้ในหลอดทดลอง

2x Rapid buffer	5	ไมโครลิตร
pGEM-T easy vector (50 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	3.5	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร

จากนั้นนำส่วนผสมนี้บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.3.8. การทรานสฟอร์มพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli*

นำพลาสมิดลูกผสมที่บ่มข้ามคืนจำนวน 3 ไมโครลิตร เติมลงในเซลล์ให้อาศัย *E. coli* (ภาคผนวก) เพื่อทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียในการศึกษานี้ทำตามคู่มือของ pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System ของบริษัท Promega

3.3.9. การสกัดพลาสมิดลูกผสม

เลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว และสีขาวอมฟ้า นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว (LB) 1 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini Kit (IBI) ทำตามคำแนะนำของบริษัทดังนี้

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรียใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
3. เทส่วนของเหลวทิ้ง
4. เติม PDI buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า
5. เติม PD2 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างช้า ๆ จากนั้นปั่น
6. เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนสารละลายใส
7. เติมในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
8. เทสารละลายใต้คอลัมน์ทิ้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9. เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
11. เติม Wash buffer (EtOH) 600 ไมโครลิตร
12. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
13. เทสารละลายใต้คอลัมน์ทิ้ง
14. ย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดทดลองใหม่
15. เติม dH_2O จำนวน 40 ไมโครลิตร ตรงกลางคอลัมน์พักไว้ 2 นาที
16. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที
17. เก็บพลาสมิดใต้คอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยวิธีอะกาโรสอิเล็กโทรลิซิสเจล ความเข้มข้น 0.8% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

3.3.10. การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิดสายผสมโดยเทคนิคพีซีอาร์

นำโคโลนีแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอย่างรวดเร็วด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Forward และ M13 Reverse มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

เตรียมส่วนประกอบต่าง ๆ ในหลอดทดลองดังนี้

2x Master Mix	3	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมล M13F	0.25	ไมโครลิตร
10 มิลลิโมล M13R	0.25	ไมโครลิตร
dH_2O	2.5	ไมโครลิตร
รวม	6	ไมโครลิตร

ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 28 รอบ โดยแต่ละขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ annealing ที่ 53 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที สำหรับขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที สำหรับ Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที และตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอวิธีอะกาโรสอิเล็กโทรลิซิสเจล ความเข้มข้น 0.8% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 40 นาที

3.3.11. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ

นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการไปอ่านลำดับเบสโดยส่งวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลเปรียบเทียบกับลำดับเบสนิวคลีโอไทด์กับฐานของมูลที่เก็บไว้ใน GenBank เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรียโดยใช้โปรแกรม Bioedit (version 7.0.9.0) และ BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST/)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากนั้นเก็บพลาสมิดที่สกัดแยกได้นำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น Positive control ในการทำพีซีอาร์ต่อไป

3.3.12. การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *28S rRNA* ต่อเลือดปลานิล

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดปลานิลที่สกัดโดยชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction kit (Vivantis) (ภาคผนวก) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *28S rRNA* คือ L99 และ Oce215R (ชูตา บุญภักดี และคณะ, 2550) โดยดีเอ็นเอจากเลือดที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ 13 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ร่วมกับ 2x PCR Mastermix (10X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl *Taq* DNA polymerase) โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 32 รอบ โดยแต่ละขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ ขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาทีและวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟลิซิสอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (ภาคผนวก) เป็นเวลานาน 30 นาที

3.3.13. การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *16S rRNA* ต่อเลือดของปลานิล

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดปลานิลที่สกัดโดยชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction kit (Vivantis) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *16S rRNA* คือ F1 และ IMOD ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เช่นเดียวกับข้อที่ 3.3.13. และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟลิซิสอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE เป็นเวลานาน 30 นาที

3.3.14. การศึกษาความไวของปฏิกิริยาพีซีอาร์และมัลติเพล็กพีซีอาร์

3.3.14.1. การศึกษาความไวของการตรวจหาเชื้อ *S. agalactiae*

นำดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* ที่สกัดโดยชุดสกัด GF-1 Bacterial DNA extraction kit (Vivantis) ปริมาณ 100, 10, 1, 0.1,0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 นาโนกรัม โดยใช้ไพรเมอร์ของ Martinez (2001) มีรายละเอียดดังนี้ โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ 13 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ร่วมกับ 2x PCR Mastermix (10X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl *Taq* DNA polymerase) จะมีการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อ *S. agalactiae* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *16S rRNA* ของเชื้อ *S. agalactiae* คือ F1 และ IMOD ที่มีความจำเพาะ

กับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ (Matinaze et al., 2001) ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามข้อที่ 3.3.6. และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ อิเล็กโทรโฟลิซิสอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder plus) โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE (ภาคผนวก ก) เป็นเวลานาน 30 นาที ส่องดูภาพเจลภายใต้รังสีอุลตร้าไวโอเลตเพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล

3.3.14.2. การศึกษาความไวของดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดปลานิล

นำดีเอ็นเอจากเลือดที่สกัดโดยวิธีการใช้ชุดสกัด GF-1 Blood DNA extraction kit (Vivantis) และวัดปริมาณดีเอ็นเอ ปริมาณ 10, 1, 0.1,0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001 และ 0.0000001 นาโนกรัมนำมาทำเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *28S rRNA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ L99 และ Oce215R (ชูดา บุญภักดี และคณะ, 2551) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ 13 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ร่วมกับ 2x PCR Mastermix (10X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl *Taq* DNA polymerase) โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำในเครื่อง Thermal cycler รุ่น T-Gradient thermoblock โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 32 รอบ โดยแต่ละขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ ขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที หลังจบปฏิกิริยาพีซีอาร์นำผลผลิตมาวิเคราะห์ขนาดโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส ความเข้มข้น 1% และใช้ TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus จำนวน 250 นาโนกรัม ส่องดูภาพเจลภายใต้รังสีอุลตร้าไวโอเลตเพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.3.14.3. การศึกษาความไวของดีเอ็นเอพลาสมิด *28S rRNA*

นำดีเอ็นเอพลาสมิดจากยีน *28S rRNA* ปริมาณ 1, 0.1,0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัมนำมาเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *28S rRNA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ L99 และ Oce215R (ชูดา บุญภักดี และคณะ 2551) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ 13 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ร่วมกับ 2x PCR Mastermix (10X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl *Taq* DNA polymerase) โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำในเครื่อง Thermal cycler รุ่น T-Gradient thermoblock โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 32 รอบ โดยแต่ละขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ annealing ที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ ขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที หลังจบปฏิกิริยาพีซีอาร์นำผลผลิตมาวิเคราะห์ขนาดโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส ความเข้มข้น 1% และใช้ TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus จำนวน 250 นาโนกรัม ส่องดูภาพเจลภายใต้รังสีอุลตร้าไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

3.3.14.4. การศึกษาความไวของปฏิกิริยามัลติเพล็กพีซีอาร์จาก *28S rRNA* และ *16S rRNA*

นำดีเอ็นเอพลาสมิดจากยีน *28S rRNA* และพลาสมิดดีเอ็นเอของเชื้อ *S. agalactiae* 1, 0.1,0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 และ 0.00000001 นาโนกรัม นำมาเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของ *S. agalactiae* ที่ตำแหน่ง *16S rRNA* F1 และ IMOD และไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง *28S rRNA* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ L99 และ Oce215R (ชูตา บุญภักดี และคณะ, 2551) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร นำมาผสมกับ 13 ไมโครลิตรของไพรเมอร์ร่วมกับ 2x PCR Mastermix (10X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, 25mM $MgCl_2$, 5U/µl *Taq* DNA polymerase) โดยขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำในเครื่อง Thermal cycler รุ่น T-Gradient thermoblock โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 32 รอบ โดยแต่ละขั้นตอนดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ ขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สำหรับ Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที หลังจบปฏิกิริยาพีซีอาร์นำผลผลิตมาวิเคราะห์ขนาดโดยทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส ความเข้มข้น 1% และใช้ TBE buffer ภายใต้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus จำนวน 250 นาโนกรัม ส่องดูภาพเจลภายใต้รังสีอุลตร้าไวโอเลตเพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3.15. การติดตามการปรากฏของเชื้อ *S. agalactiae* ในเลือดของปลานิลทดลองโดยเทคนิคมัลติเพล็กพีซีอาร์

ปลานิลที่มีสุขภาพดี ปลอดจากการติดเชื้อด้วยการตรวจสอบเบื้องต้น ทางจุลชีววิทยา น้ำหนักในช่วง 50-100 กรัม โดยเลี้ยงไว้ในตู้ทดลอง ให้ปลาคุ้นเคยต่อสภาวะของการเลี้ยงต่อการทดลองเพื่อปรับสภาพ เป็นเวลา 3 วันก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยให้อาหารเม็ด วันละ 2 ครั้ง เตรียมปลานิลจำนวน 60 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่มการทดลองกลุ่มละ 10 ตัวแบ่งเป็น

ชุดการทดลอง - ฉีดสารละลายเชื้อ *S. agalactiae* ที่ช่องท้องของปลาแต่ละตัวในกลุ่มการทดลอง ปริมาณ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 และ 10^5 CFU/ml โดยใช้เข็มฉีดยาและหลอดฉีดยาขนาดเล็ก 1 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าที่ช่องท้องแต่ละตัวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

ชุดควบคุม - ฉีดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ที่ช่องท้องของปลาแทนการใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* สุ่มเก็บเลือดปลานิลในแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว เก็บเลือดแต่ละตัว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ (ข้อที่ 3.3.15) และการเลี้ยงในอาหารแข็ง (ข้อที่ 3.3.2) บันทึกเปอร์เซ็นต์การตรวจพบ *S. agalactiae* ในเลือดของปลานิลในระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7

3.3.16. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีไคน์สแควร์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาพีซีอาร์ และการเพาะเชื้อใน TSA

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University