ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ก
สูตรเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สูตรอาหาร Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose agar (TCBS)

Proteose peptone	10.00 g
Yeast extract	5.00 g
Sodium thiosulphate	10.00 g
Sodium citrate	10.00 g
Bile	8.00 g
Sucrose	20.00 g
Sodium chloride	10.00 g
Ferric citrate	1.00 g
Bromo thymol blue	0.04 g
Thymol blue	0.04 g
Agar	15.00 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

Final pH (at 25°C) 8.6±0.2 สูตรเตรียมอาหารสำเร็จรูป ชั่งอาหาร 89.08 g ในการเตรียมอาหาร 1,000 ml เติม Agar 15.0 g

สูตรอาหาร Trypticase soy broth (TSB) + NaCl 2 เปอร์เซ็นต์

Pancreatic digest of casein	17.00 g
Pancreatic digest of soybean meal	3.00 g
Sodium chloride	5.00 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5 g
Dextrose (Glucose)	2.5 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

Final pH (at 25°C) 7.3±0.2

หมายเหตุ เติม NaCl เพิ่ม 2%	20 g

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สูตรอาหาร Trypticase soy broth (TSB) +NaCl 1.5 % และGlycerol 15 %

Pancreatic digest of casein	0.17 g
Pancreatic digest of soybean meal	0.3 g
Sodium chloride	0.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.25 g
Dextrose (Glucose)	0.25 g
Glycerlor 15 %	15 ml
น้ำกลั่น	85 ml
หมายเหตุ เติม NaCl เพิ่ม 1.5%	1.5 g

สูตรอาหารปริมาตร 100 ml ชั่งอาหารตามด้านบน เติม Glycerlor 15 ml และน้ำกลั่น 20 ml ละลายบีกเกอร์ เติม NaCl เพิ่ม 1.5 g ละลายกับน้ำกลั่น 20 ml จะเหลือน้ำกลั่นอีก 45 ml ใส่ขวดปรับปริมาตรให้ถึงขีด ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที

สูตรอาหาร Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

สูตรอาหาร Nutrient broth (NB)

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

สูตรอาหาร Minimal medium (MM)

Sucrose (น้ำตาลทรายขาว)	10.00 g
Potassium hydrogen phosphate	2.5 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5 g
Diammonium hydrogen phosphate	1.0 g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2 g
Iron (II) sulfate heptahydrate	0.01 g
Manganese sulfate heptahydrate	0.007 g
น้ำกลั่น	1,000 ml

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ข
สูตรเตรียมสารเคมีและสารละลาย

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

Normal saline (0.85% NaCl)

ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที

Normal saline (1.5% NaCl)

ชั่ง NaCl 1.5 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที

70% Alcohol จาก 95% Alcohol

ตวง 95% Alcohol ปริมาตร 750 ml ผสมลงไปในน้ำกลั่น 250 ml

TAE buffer (1x)

ปิเปต TAE buffer (50x) ปริมาตร 20 ml ผสมลงในในน้ำกลั่น 1,000 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที

เตรียม Working Primer

เตรียม Working Primer 3 คู่ คือ Vp-fleE F/R, TumsatVp1 (C4) F/R, TumsatVp3 F/R จาก Stock Primer ที่ความเข้มข้น 100 µM ให้มีความเข้มข้น 10 µM โดยเตรียมแยกแต่ละเส้น และนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

เตรียมจาก Stock Primer ที่ความเข้มข้น 100 µM

จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

(ความเข้มข้นของสาร1)(ปริมาตรของสาร1) = (ความเข้มข้นของสาร2)(ปริมาตรของสาร2)

(100 µM)(V_1) = (10 µM)(500 µl)

V_1 = 50 µl

ปิเปต Stock Primer ที่ความเข้มข้น 100 µM ปริมาตร 50 µl ผสมน้ำกลั่นเกรด PCR ปริมาตร 450 µl จะได้ 10 µM Working Primer จากนั้น ผสม 10 µM primer แต่ละเส้นในปริมาตรเท่า ๆ กันจะได้ mix primer โดยใช้ mix primer 2.40 µl/20 µl reaction คิดเป็นความเข้มข้น 0.2 µM final concentration

ตารางที่ ข.1 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR

PCR components	Volume (µl)/reaction	Final concentration
DNA free water	5.60	-
2X PCR master mix	10.00	1X
10 µM F/R Mix Primer (V-flaE, Vp1, Vp3)	2.40	0.2 µM each
DNA Template	2.00	
Total	20.00	

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ค

การตายของกุ้งระหว่างการทดลอง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตาราง ค.1 การตายของกุ้งระหว่างการทดลอง

		จำนวนกุ้งที่ตายระหว่างการทดลอง (ตัว)					
	ว/ด/ป	อาหารไม่ผสมจุลินทรีย์	อาหารผสม ปม.1	อาหารผสม BS	อาหารผสม BM	อาหารผสม BL	อาหารไม่ผสมจุลินทรีย์
จำนวนวันหลังติดเชื้อ	13/4/63	เริ่มแช่เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND 10^8 CFU/ml นาน 1 ชม.					กุ้งไม่ติดเชื้อ (uninfected)
1	14/4/63	0	0	0	0	0	0
2	15/4/63	7	3	4	2	3	0
3	16/4/63	4	1	7	2	12	0
4	17/4/63	5	0	3	0	5	0
5	18/4/63	6	0	1	2	3	0
6	19/4/63	4	0	3	0	1	0
7	20/4/63	3	0	2	0	1	0
8	21/4/63	1	0	1	2	0	0
9	22/4/63	2	0	0	0	1	0
10	23/4/63	1	0	0	2	0	0
11	24/4/63	0	0	0	1	1	0
12	25/4/63	0	0	1	1	1	0
13	26/4/63	0	0	0	1	0	0
14	27/4/63	0	0	1	2	1	0
15	28/4/63	1	0	0	0	0	0
16	29/4/63	0	0	0	0	0	0
17	30/4/63	1	0	1	0	0	0
18	1/5/63	0	0	0	0	0	0

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

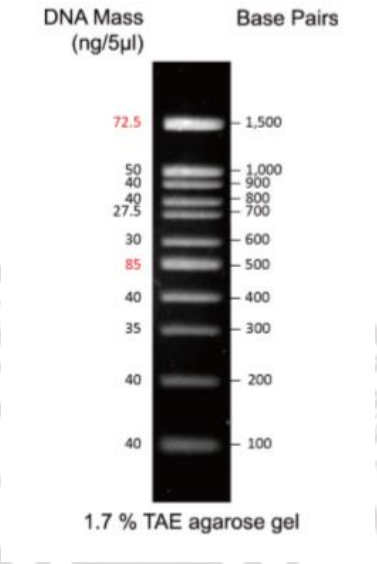
		จำนวนกุ้งที่ตายระหว่างการทดลอง (ตัว)					
	ว/ด/ป	**อาหารไม่ผสมจุลินทรีย์**	**อาหารผสม ปม.1**	**อาหารผสม BS**	**อาหารผสม BM**	**อาหารผสม BL**	**อาหารไม่ผสมจุลินทรีย์**
จำนวนวันหลังติดเชื้อ	13/4/63	**เริ่มแช่เชื้อ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ก่อโรค AHPND 10^8 CFU/ml นาน 1 ชม.**					**กุ้งไม่ติดเชื้อ (uninfected)**
19	2/5/63	0	0	0	0	0	0
20	3/5/63	0	0	0	0	0	0
21	4/5/63	0	0	0	0	0	0
ยุติการทดลอง	5/5/63						
จำนวนที่ตายทั้งหมด		35	4	24	15	29	0
จำนวนที่รอดชีวิตทั้งหมด		25	56	36	45	31	60

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ง

ข้อมูล DNA Ladder และอุปกรณ์ gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ ง.1 100bp DNA Ladder RTU (GenedireX,USA)

ภาพที่ ง.2 การตรวจ PCR product ด้วย gel electrophoresis

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี