การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า

ผศ.ดร. สุรางค์ สุธิราวุธ

การตรวจสอบปริมาณและชนิดแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมธรรมชาติ เช่น จากตัวอย่างดิน ยาก ที่เราจะมีโอกาสพบแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ดังนั้นหากเราต้องการแยกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สนใจจึงจำเป็นต้องใช้วิธี enrichment culture method ซึ่งวิธีนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ ที่เหมาะสมกับแบคทีเรียเป้าหมายและยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นไม่ให้เติบโตหรือโตช้ากว่า ในกรณีของแบคทีเรียสร้างสปอร์ ถ้าต้องการแยกเชื้อจากธรรมชาติจำเป็นต้องใช้อาหารที่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อเป้าหมายเฉพาะที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการแยก *Paenibacillus polymyxa* ควรใช้อาหารที่มีแป้ง (starch) และ NH_4^+ เป็นองค์ประกอบ ถ้าเป็น *Sporosarcina ureae* ควรใช้อาหารที่มี urea 5% ผสม yeast extract 1% เป็นต้น

การตรวจสอบชนิดและจำนวนแบคทีเรียสร้างสปอร์จากตัวอย่างทางการค้าย่อมทำได้ง่ายกว่าวิธีการตรวจสอบแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่พบในธรรมชาติ เพราะเราทราบแล้วว่าต้องการหา Bacillus สปีชีส์ใดบ้าง ดังนั้นสิ่งที่จำเป็นข้อแรกคือการหาข้อมูลเบื้องต้นของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เหล่านั้น เช่น สัณฐานวิทยาของเชื้อ เช่น ขนาดเซลล์การเรียงตัวของเซลล์ รูปร่างตำแหน่งสปอร์ ตลอดจนคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่เป็น key tests ของแบคทีเรียต่างๆเหล่านั้น เพื่อที่จะนำไปประกอบการจำแนกชนิดให้เร็วที่สุด ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถหารายละเอียดได้จากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st Editon(1986) Volume 2 และ 2nd Editon(2009) Volume 3 เนื้อหาที่มีในบทความนี้แบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียสร้างสปอร์ในเชื้อผสมโดยวิธี Total Plate Count วิธีการแบ่งกลุ่ม Bacillus โดยสัณฐานวิทยา ตามวิธีของ Gordon(1989)และไดอะแกรมแบบง่ายๆ ในการจำแนกชนิด ชนิดของ Bacillus ที่นิยมใช้ในทางการค้า การเตรียมอาหารและวิธีการตรวจสอบชนิด Bacillus โดยConventional method และวิธีการจำแนกชนิด *Bacillus* sp. โดยวิธี Biolog

---

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรางค์ สุธิราวุธ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(4 กันยายน พศ. 2555)

การตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียสร้างสปอร์ในเชื้อผสมโดยวิธี Total Plate Count

1. สามารถใช้อาหาร Nutrient Agar หรืออาหาร Plate Count Agar เนื่องจาก *Bacillus* sp. โดยส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีในอาหารดังกล่าว

2. การเจือจางตัวอย่าง หากมีการระบุว่า เชื้อผสมมีปริมาณ cfu/g = 10^{10} เราควรเลือกเจือจางตัวอย่างให้เป็น 10^{-8} เนื่องจากค่าของจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ดังนั้น ความเจือจาง 3 ระดับที่ควรเลือกทำคือ 10^{-7},10^{-8},10^{-9}

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ควรบ่มเชื้อควรอยู่ในช่วง 30-35°C และควรบ่มเชื้อให้เจริญ 2-3 วัน เพื่อรอให้สปอร์ที่งอกช้าได้มีโอกาสเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นโคโลนีให้เห็น ซึ่งจะแตกต่างจากการทำ Total Plate Count ทั่วไปที่กำหนดการนับจำนวนโคโลนีไว้ที่ 24-48 ชม. เนื่องจากวิธีนี้ นับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งอาจเป็น vegetative cell ซึ่งพร้อมที่จะเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นโคโลนีให้เห็นบนจานอาหาร การเริ่มต้นจากเซลล์จึงใช้เวลาสั้นกว่า

4. การ pasteurized ตัวอย่างเชื้อผสมก่อนการทำเจือจาง เป็นสิ่งจำเป็นหรือไม่

โดยทั่วไป หากตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียสร้างสปอร์จากตัวอย่างในธรรมชาติควรมีขั้นตอนการ pasteurize ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell ของแบคทีเรียทั่วไป ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบที่มีในตัวอย่าง เพื่อให้เหลือแต่สปอร์อิสระที่สามารถรอดชีวิตจากความร้อนในระดับนี้ได้ และจะเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งถือว่าเป็นวิธีการคัดเลือกให้ได้แต่แบคทีเรียที่สร้างสปอร์

กรณีของการตรวจสอบในตัวอย่างทางการค้า การ pasteurize ตัวอย่างก่อนการทำเจือจางเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ pasteurize จะช่วยตอบได้ว่า ตัวอย่างเชื้อผสม อยู่ในรูปสปอร์ทั้งหมดหรือไม่ อีกข้อหนึ่งคือเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าตัวอย่างเชื้อผสมมีเชื้ออื่นๆ ปะปนมาด้วยหรือไม่ (เชื้อผสมทางการค้าอาจมีแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ปะปนมาด้วย เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตผงเชื้อ ในขั้นตอนการทำแห้งมักใช้วิธีผึ่งแห้งกับพื้นในสภาพเปิดโล่ง) ซึ่งการปะปนของเชื้ออื่น เพียงเล็กน้อยอาจไม่มีความสำคัญหากในตัวอย่างมีชนิดและจำนวนเชื้อตรงตามที่ระบุชัดเจน

หลังจากประสบความสำเร็จในการทำ Total Plate Count ควรเลือก ความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ใน ช่วง 30-300 มานับจำนวนโคโลนี ขั้นตอนนี้มีความสำคัญเนื่องจากเราต้องแยกประเภทของโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน ออกจากกันให้ได้ เมื่อได้โคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันโดยการสังเกตแล้ว จะสามารถระบุได้คร่าวๆ ว่าได้ชนิดแบคทีเรียตรงตามที่กำหนดชนิดมาหรือไม่ เช่นหากตัวอย่างเชื้อผสมระบุว่ามี *B.subtilis*, *B.megaterium, B.pumilus* และ *B.laterosporus* อย่างชัดเจน ข้อแรกที่สามารถทำได้คือสังเกตว่าจานอาหารที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนีนั้น มีโคโลนีที่แตกต่างกันกี่ชนิด หากได้โคโลนีที่แตกต่างกันมากกว่า 4 ชนิด เราจำเป็นต้องเก็บโคโลนีที่พบว่าแตกต่างกันทั้งหมดมาทำการ restreak หลายๆ ครั้งบนวุ้นอาหาร เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงตรวจสอบสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทัศน์ เนื่องจาก Bacillus ทั้ง 4 สปีชีส์นี้มีลักษณะเซลล์ที่แตกต่างกันคือ *B.megaterium* มีเซลล์ขนาดใหญ่ขนาดเซลล์กว้างกว่า 1 μm บางครั้งอาจถึง 1.5 μm ในเซลล์มีการสะสม poly-β-hydroxy

butyrate granule ซึ่งทำให้การติดสีในเซลล์ไม่สม่ำเสมอมีส่วนของเซลล์ที่ไม่ติดสีเป็นช่วงๆ ซึ่งลักษณะพิเศษนี้จะไม่พบใน Bacillus อีก 3 ชนิดที่มีในเชื้อผสม สปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *B.megaterium* จะเป็นรูปวงรี ไม่ทำให้เซลล์โป่งซึ่งจัดอยู่ใน Bacillus กลุ่ม IA ตามวิธีแบ่งของ Gordon (1989)

ส่วน *B.subtilis* และ *B.pumilus* เป็นพวกที่มีเซลล์ขนาดกว้างน้อยกว่า 1 μm มีสปอร์เป็นรูปวงรีที่ไม่ทำให้เซลล์โป่งจัดอยู่ในกลุ่ม IB ตามวิธีของ Gordon แต่เนื่องจากมี Bacillus หลายชนิด มากที่มีลักษณะเซลล์แบบนี้ จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างที่เป็นเอกลักษณ์ของ Bacillus 2 ชนิด นี้จากแบคทีเรียอื่นๆ โดยใช้สัณฐานวิทยา จำเป็นต้องตรวจสอบต่อไปโดยใช้คุณสมบัติอื่นๆ เช่น ชีวเคมีและสรีรวิทยาที่เป็น key testsตลอดจนการตรวจสอบลำดับเบสใน 16SrRNA เพื่อยืนยันความชัดเจน

B.laterosporus เป็นชนิดที่มีเอกลักษณ์และตรวจสอบง่ายเนื่องจากลักษณะสปอร์อิสระที่เป็นรูปตัว C ชัดเจน หากพบลักษณะโคโลนีที่มีความแตกต่างบนจานอาหารมีเพียง 2 ชนิด เมื่อตรวจสอบจากลักษณะเซลล์พบว่าเข้ากลุ่ม IB ก็แสดงว่า เราอาจพบเพียง *B.subtilis* และ *B.pumilus* แต่ไม่พบ *B.megaterium* และ *B.laterosporus* ก็อาจเป็นไปได้เนื่องจากเราตรวจไม่พบที่ความเจือจาง 10^{-7}, 10^{-8},10^{-9} อย่างไรก็ตามไม่ได้หมายความว่าในตัวอย่างไม่มี *B.megaterium* และ *B.laterosporus* อาจจะมีในระดับความเจือจางที่ต่ำกว่านี้ ทำให้ไม่สามารถพบในความเจือจางที่เราทำ ทั้งนี้หากเชื้อผสมมีปริมาณไม่เท่ากันจะทำให้เราไม่สามารถใช้วิธีนี้ตรวจสอบได้ เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีนี้ ทำให้เราจะตรวจสอบได้เฉพาะชนิดจุลินทรีย์ที่ Dominant ในตัวอย่าง

วิธีการแบ่งกลุ่ม Bacillus โดยสัณฐานวิทยา ตามวิธีของ Gordon (1989) และไดอะแกรมแบบง่ายๆ ในการจำแนกชนิด

หลังจากได้แบคทีเรียรูปท่อน ที่ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ ควรตรวจสอบต่อไปว่าสามารถสร้าง catalase ได้หรือไม่ ซึ่งการตรวจสอบสามารถทำแบบง่ายๆโดยใช้ลูปแตะเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงแล้วนำไปผสมกับหนึ่งหยด ของ3%H_2O_2ที่เตรียมไว้บนแผ่นสไลด์ ใช้ลูปกวนให้เข้ากัน หากเกิดฟองแก๊ส O_2แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่เป็น key test ว่าเข้าเกณฑ์จีนัส Bacillus หลังจากนั้นจึงพิจารณาจากรูปร่าง ขนาด และตำแหน่งสปอร์ และแบ่งคร่าวๆได้เป็นกลุ่มย่อยดังนี้

Bacillus Group I

สร้างสปอร์ วงรี หรือรูปไข่ ไม่ทำให้เซลล์โป่ง แบ่งออกเป็น2 กลุ่มย่อยคือ

Group IA ขนาดเซลล์กว้างมากกว่า 1μm และสร้าง poly-β hydroxy butyrate granule ได้แก่ *B.megaterium, B. thuringiensis*

Group IB ขนาดเซลล์กว้างน้อยกว่า 1μm ได้แก่ *B.subtilis, B.atrophaeus, B.amyloliquefaciens,B.licheniformis B.pumilus* เป็นต้น

Bacillus Group II

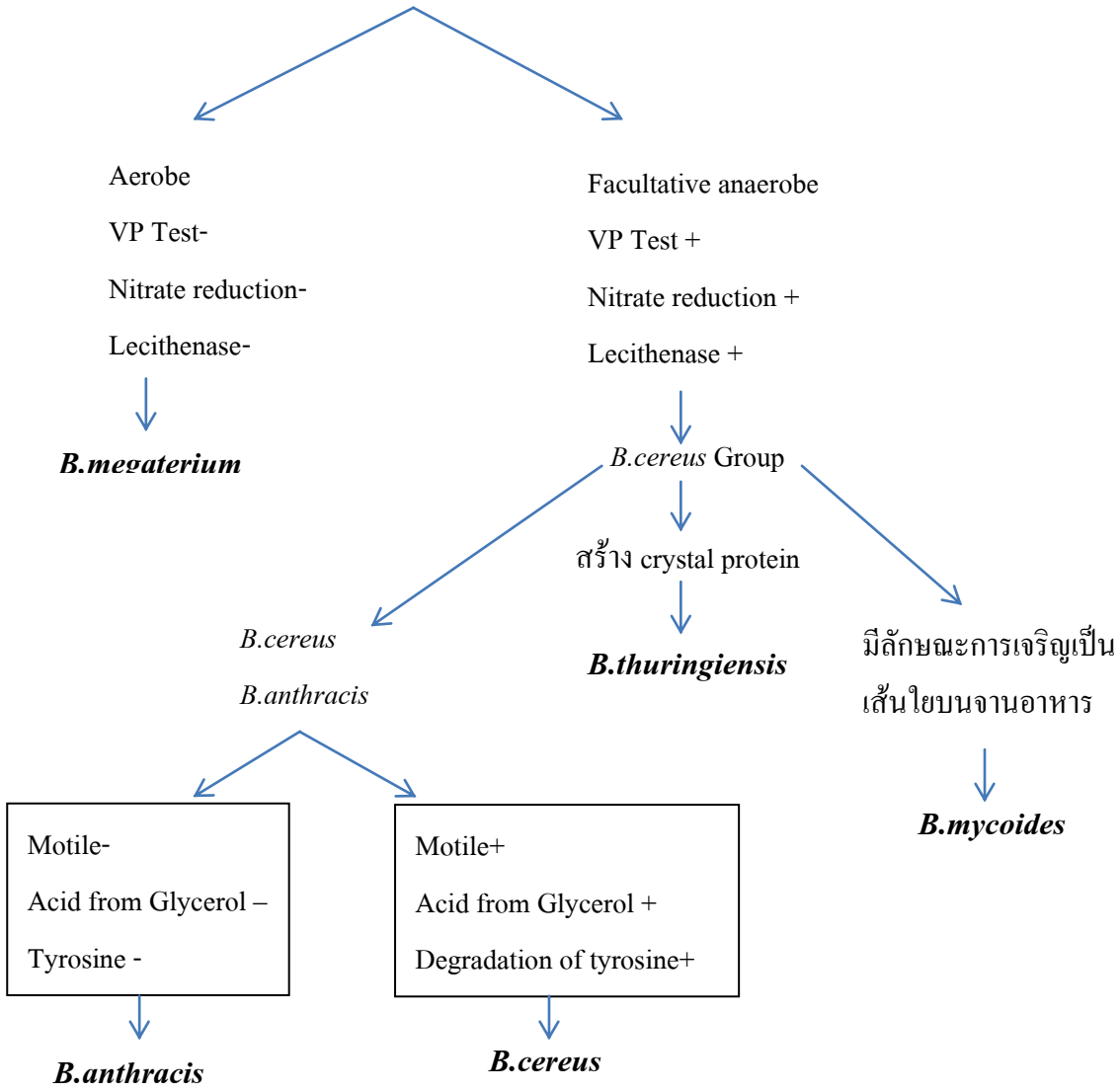
สร้างสปอร์ วงรี หรือรูปไข่ ทำให้เซลล์โป่ง เช่น *Paenibacillus polymyxa, Brevibacillus laterosporus*

Bacillus Group III

สร้างสปอร์กลม ทำให้เซลล์โป่ง เช่น *B.sphaericus*

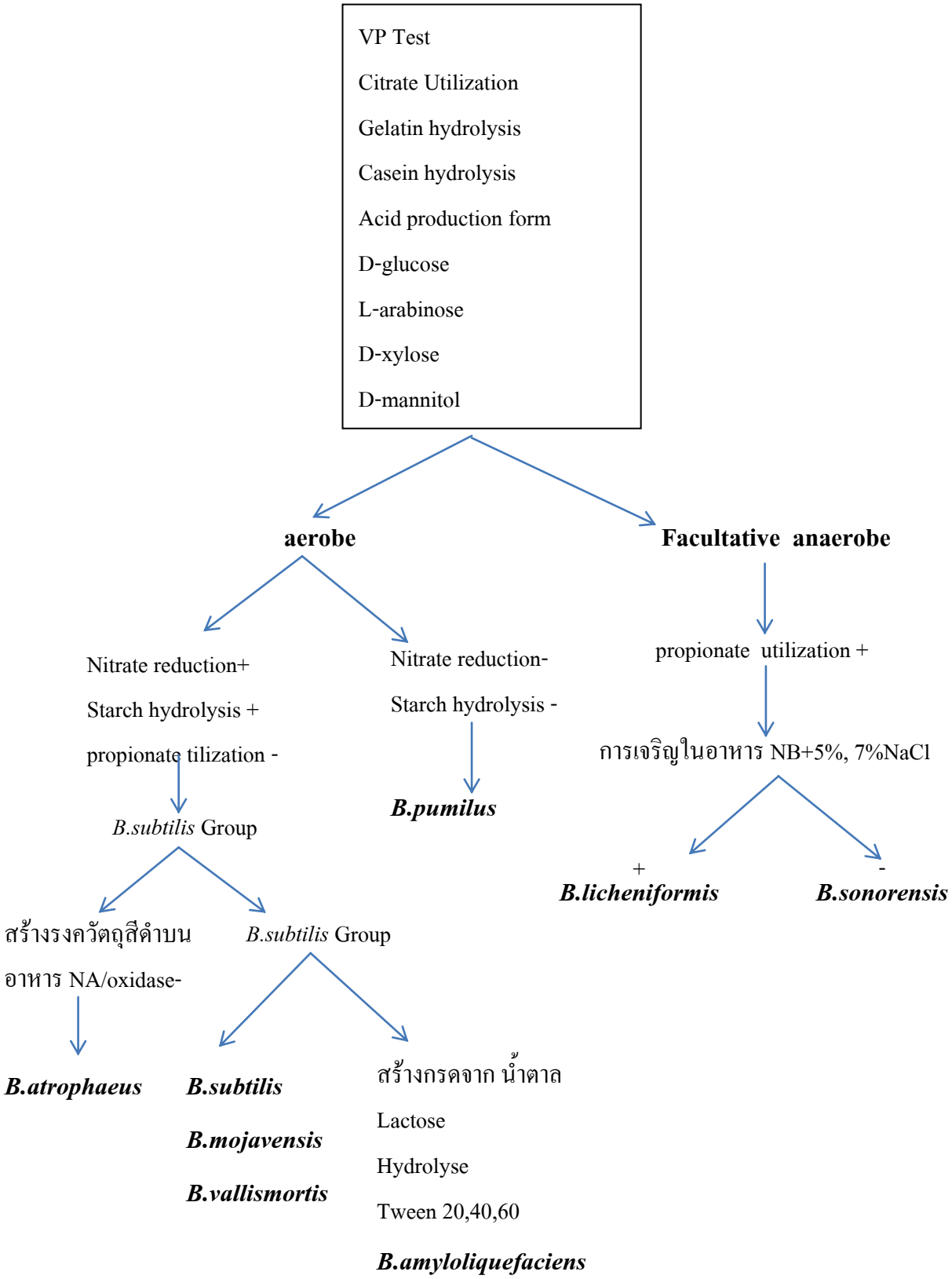
การแบ่งกลุ่มจะสามารถช่วยให้การจำแนกชนิดแคบลง เนื่องจากรูปร่างและตำแหน่งสปอร์เป็นข้อมูลประกอบที่มีในตารางการแบ่งชนิดของBacillus ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyทั้งใน1st edition(1986) และ 2nd edtion(2009)

การจำแนกชนิด Bacillus กลุ่ม IA (ขนาดเซลล์กว้าง >1μm สร้าง poly-β hydroxy butyrate granule สปอร์รูปวงรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง)



การจำแนกชนิด Bacillus กลุ่ม IB ขนาดเซลล์กว้าง <1μm สปอร์รูปวงรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง

ให้ผลบวกกับการทดสอบ



ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาของ *Bacillus* Species ในกลุ่ม IA

Property	*B.megaterium*	*B.cereus*	*B.thuringiensis*	*B.mycoides*	*B.anthracis*
Rods					
Width , um	1.2-1.5	1.0-1.2	1.0-1.2	1.0-1.2	1.0-1.2
Length , um	2-5	3-5	3-5	3-5	3-5
Gram reaction	+	+	+	+	+
unstained globules in the protoplasm	+	+	+	+	+
Spores					
ellipsoidal	+	+	+	+	+
round	v	-	-	-	-
central or paracentral	+	+	+	+	+
swelling the sporangium	-	-	-	-	-
Crystaline parasporal bodies	-	-	a	-	-
Motility	a	a	a	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	+	+	+	+
V-P reaction	-	+	+	+	+
pH in V-P broth	4.5-6.8	4.3-5.6	4.3-5.6	4.5-5.6	5.0-5.6
Temperature of growth ^{o}C					
maximum	35-45	35-45	40-45	35-40	40
minimum	3-20	10-20	10-15	10-15	15-20
Egg yolk reaction	-	+	+	+	+
Growyh in					
0.001% lysozyme	-	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	a	+
Media at					
pH 5.7	+	+	+	+	+
Ammonia glucose medium	+	-	-	-	-
Acid from					
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	a	-	-	-	-
Xylose	a	-	-	-	-
Mannitol	+	-	-	-	-
Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+
Use of citrate	+	+	+	a	b
Reduction of NO_3 to NO_2	b	+	+	+	+
Deamination of phenylalanine , 1 week	a	-	-	-	-
Decomposition of					
casein	+	+	+	+	+
tyrosine	a	+	+	a	-

+ = 85 to 100% of the strains positive ; a = 50 to 84% of the strains positive ; b = 15 to 49% of the strains positive ; - = 0 to 14% of the strains positive ; v = character inconstant

<u>ตารางที่ 2</u> เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาของ Bacillus Species ในกลุ่ม IB (ยกเว้น *B.coagulans*)

Property	*B.licheniform*	*B.subtilis*	*B.pumilus*	*B.firmus*	*B.coagulans*
Rods					
Width , um	0.6-0.8	0.7-0.8	0.6-0.7	0.6-0.9	0.6-1
Length , um	1.5-3	2-3	2-3	1.2-4	2.5-5
Gram reaction	+	+	+	+	+
Unstained globules in the protoplasm	-	-	-	-	-
Spores					
ellipsoidal or cylindrical	+	+	+	+	+
central or paracentral	+	+	+	v	v
subterminal or terminal	-	-	-	v	v
swelling the sporangium	-	-	-	-	v
Motility	+	+	+	a	+
Catalase	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	-	-	-	+
V-P reaction	+	+	+	-	a
pH in broth					
V-P	5.0-6.5	5.4-8.0	4.8-5.5	6.0-6.8	4.2-4
anaerobic glucose	5.0-5.6	6.2-8.2			
Temperature of growth ^{o}C					
maximum	50-55	45-55	45-50	40-45	55-60
minimum	15	5-20	5-15	5-20	15-25
Egg yolk reaction	-	-	-	-	-
Growyh in					
0.001% lysozyme	-	b	a	-	-
media at pH 5.7	+	+	+	-	-
7% NaCl	+	+	+	+	-
0.02% azide[a]	-	-	+		
Acid from					
Glucose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	b	a
Xylose	+	+	+	b	a
Mannitol	+	+	+	+	b
Hydrolysis of starch	+	+	-	+	+
hippurate , 4 week	-	-	+		
Use of citrate	+	+	+	-	b
propionate	+	-	-	-	-
Reduction of NO_3 to NO_2	+	+	-	+	b
Decomposition of					
casein	+	+	+	b	+
tyrosine	-	-	-	b	-
Liquefaction of nutrient Gelatin , 20 ^{o}C 2 wks	<1.0 cm	1.0 cm or more			

+ = 85 to 100% of the strains positive ; a = 50 to 84% of the strains positive ; b = 15 to 49% of the strains positive ; - = 0 to 14% of the strains positive ; v = character inconstant

<u>ตารางที่ 3</u> เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาของ Bacillus Species ในกลุ่ม II และ III

Property	*B.laterosporus	**B.polymyxa	B.sphaericus
Rods			
Width , um	0.5-0.8	0.6-0.8	0.6-1
Length , um	2-5	2-5	1.5-5
Gram reaction	v	v	v
Spores			
ellipsoidal	+	+	-
round	-		+
central or paracentral	+	v	-
subterminal or terminal	-	v	+
with “C” – shaped rims	+		-
swelling the sporangium	+	+	+
Motility	+	+	+
Catalase	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	-
V-P reaction	-	+	-
pH in V-P broth	5.0-6.0	4.5-6.8	7.4-8.6
Temperature of growth ^{o}C			
maximum	35-50	35-45	30-45
minimum	15-20	5-10	5-15
Growth in			
0.001% lysozyme	+	a	a
media at pH 5.7	-	+	b
5% NaCl	a	-	+
10% NaCl	-	-	-
0.02% azide[a]	-	-	
Acid from			
Glucose	+	+	-
Arabinose	-	+	-
Xylose	-	+	-
Mannitol	+	+	-
Hydrolysis of starch	-	+	-
Use of citrate	-	-	b
Reduction of NO_3 to NO_2	+	+	-
Formation of			
Dihydroxyacetone	-	+	-
indole	a	-	-
Deamination of phenylalanine , 3 week	-		+
Decomposition of			
casein	+	+	a
tyrosine	+	-	-

* = *Brevibacillus laterosporus* ** = *Paenibacillus polymyxa*

ตารางที่ 4 คุณสมบัติที่แตกต่างของ *B.cereus* และสปีชีส์ใกล้ชิด

characteristics	***B.anthracis***	***B.cereus***	***B.cereus emeticbiovar***	***B.mycoides***	***B.pseudo mycoides***	***B.thuringiensis***	***B.weihenstephanensis***
Motile	-	+	+	-	-	+	+
Rhizoid colony	-	-	-	+	+	-	-
Parasporal crystal	-	-	-	-	-	+	-
Acid from							
Glycerol	-	+	d	+	nd	+	nd
Glycogen	+	+	-	+	nd	+	+
Salicin	-	d	-	d	nd	d	d
Starch	+	+	-	+	nd	+	+
Arginine dihydrolase	-	d	d	d	nd	+	nd
Utilization of citrate	d	+	+	d	d	+	+
Nitrate reduction	+	d	+	d	+	+	d
Growth at							
5°C	-	-	nd	-	-	-	+
10°C	-	d	nd	d	-	d	+
40°C	+	+	nd	d	+	+	-
Degradation of Tyrosine	-	+	nd	d	+	+	+

ข้อมูลจาก. Bergey's Manual of systematic Backriology second edition (2009) Volume Three. The firmicute. Page 92

ชนิดของ *Bacillus* ที่นิยมใช้ในทางการค้า

Bacillus megaterium

เซลล์รูปท่อนขนาดใหญ่ 1.2-1.5 x 2-5μm สร้างสปอร์รูปวงรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง บางครั้งเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นคล้ายกระบอง ส่วนกว้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงได้ ทำให้เกิดลักษณะ pleomorphic ส่วนของสปอร์อิสระ อาจเป็นรูปกลมบ้าง โดยเฉพาะสปอร์ที่แก่ๆ สามารถสร้าง poly-β hydroxy butyrate granule ได้ในอาหาร ทั่วไปเช่น nutrient agar และสร้างได้มากขึ้นในอาหาร glucose agar

Key tests ที่ใช้แยกความแตกต่างจาก *B.cereus* group(เนื่องจากจัดอยู่ใน Bacillus กลุ่ม IA เช่นเดียวกัน)คือ เป็น aerobe ให้ผลลบกับ การทดสอบ VP , nitrate reduction และ ไม่สร้างเอนไซม์ lecithenase

Bacillus thuringiensis

เซลล์รูปท่อนขนาดใหญ่ 1.0 x 2-5μm สร้างสปอร์รูปวงรี ไม่ทำให้เซลล์โป่ง การเรียงตัวของเซลล์ต่อกันเป็นสายสามารถสร้าง poly-β hydroxy butyrate granule ได้ในอาหาร nutrient agar เช่นเดียวกับ ***Bacillus megaterium*** **key tests ที่สามารถแยกความแตกต่างจาก *B. megaterium*** อย่างชัดเจนคือ เป็น facultative anaerobe VP test ให้ผลบวก และสามารถสร้างเอนไซม์ lecithenase แต่เนื่องจากสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาคล้ายกับสมาชิกตัวอื่นๆใน *B. cereus* group จึงจำเป็นต้องตรวจสอบว่าสร้าง crystal protein หรือไม่ โดยวิธีย้อม endospore stain ในเชื้อที่เลี้ยงอายุ 3-4 วัน จึงจะสรุปได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดนี้

Bacillus amyloliquefaciens (= starch digesting)

Strictly aerobic, Gram-positive , motile rods ขนาด 0.7-0.9 x 1.8-3.0 μm ต่อกันเป็นสาย สร้างสปอร์ ellipsoidal ตำแหน่ง central, paracentral ,subterminal ไม่ทำให้เซลล์โป่ง ไม่เจริญที่ต่ำกว่า 15°C หรือ > 50°C Optimum temperature 30-40°C ย่อยสลาย casein, elastin, esculin, gelatin, starch Tween 20, 40, 60 รีดิวซ์ nitrateไปเป็น nitrite, VP positive ,citrate positive ,propionate negative เจริญในอาหารnutrient broth ผสมเกลือ NaCl 5% และส่วนใหญ่ทนได้ถึง 10%

Bacillus subtilis

Aerobic / Gram-positive ellipsoidal to cylindrical spore ตำแหน่ง central, paracentral, subterminal ไม่ทำให้เซลล์โป่ง ขนาด 0.7-0.8 x 2.0-3.0 μm อยู่เดียว/คู่ ไม่เป็นสาย

ลักษณะโคโลนี variable ในสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ อาจทำให้เห็นลักษณะเหมือนเป็น mixculture โคโลนีอาจกลมไปจนถึง irregular shape ขนาด 2-4 mm. สีโคโลนีมีตั้งแต่ขาว ครีม ไปจนถึงน้ำตาล เนื้อโคโลนีมีลักษณะตั้งแต่เป็นครีมเหลว ไปจนเป็นเมือกหรืออาจแห้งขรุขระเป็นแผ่น

สีโคโลนีมีตั้งแต่ครีม, เหลือง, ส้ม, ชมพู แดง เปลี่ยนไปเป็นสีดำ บนอาหาร *B.atrophaeus* opti temp. 28-30°C minimum 5-20°C max 45-55°C เจริญได้ตั้งแต่ pH 5.5 ไปถึง 8.5 เจริญได้ที่ NaCl 7%

บางสายพันธุ์ทนได้ถึง 10% Catalase positive , oxidase variable Positive กับ Casein, esculin, Gelatins, Starch Nitrate reduction , การสร้างกรดกับน้ำตาลต่างๆ และVP test Negative กับ การสร้าง Phenylalanine deaminase, Urease

1a. *B.subtilis* subsp. *subtilis*

เหมือนกับ *B.mojavensis*, *B.subtilis* subsp. spizizeii และ *B.vallismortis* โดย conventional method (ต่างจาก *B.atrophaeus* ดูจาก pigment)

B.natto ขณะนี้จำแนกชนิดเป็น *B.amyloliguefaciens*.

1b *B.subtilis* subsp. spizizenii

แยกความแตกต่างทาง Phenotypic character จาก *B.subtilis* subsp. subtilis ไม่ได้ (แยกโดย DNA relatedness 58-68%)

B. atropheaus

จุดเด่นที่ต่างจากสปีชี่ส์ในกลุ่ม *B.subtilis* คือสร้างเอนไซม์ catalase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ ขนาดเซลล์ 0.5-1.0 x 2.0-4.0 μm อยู่เดี่ยว หรือเป็นโซ่สั้นๆ สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลดำ ใน 2-6 วันบนอาหารที่มี tyrosine หรือ อาหารอื่นที่มีสาร organic N source เป็นเชื้อที่ใช้เป็น indicator ในการตรวจ autoclave sterility test

B. vallismortis

สร้างเอนไซม์ทั้ง catalase และ oxidase คุณสมบัติไม่แตกต่างจากสปีชีส์ของ *B.subtilis* และสปีชีส์ใกล้ชิดแยกความแตกต่างโดย DNA relatedness การใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะที่ยีนส์จำเพาะ และ Fatty acid analysis

Paenibacillus polymyxa

ลักษณะโคโลนีบน nutrient agar บาง และแผ่กระจายแบบ amoeboid ถ้าเลี้ยงในอาหาร glucose agar โคโลนีจะนูนมากขึ้นและมีเมือกสร้างสาร Levan บนอาหารที่มี sucrose และสร้าง capsule

การกระตุ้นการสร้างสปอร์ ใช้ nutrient agar ผสมกับ ส่วนผสมของเกลือ $MnCl_2$ (50μM) + $CaCl_2$ (700μM) + $MgCl_2$ (1mM)

เป็น faculltative anaerobe ferment กลูโคลเป็นไป 2,3 – butanediol CO_2, ethanol รีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนเตรท์ ferment คาร์โบไฮเดรท และน้ำตาลได้หลายชนิด สามารถย่อยสลายสารแพคติน แป้ง xylan pullulan ได้ดีแต่ย่อยเซลลูโลสได้น้อย ส่วนใหญ่สามารถ ตรึงไนโตรเจนได้ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ

Key Test สำหรับ *Paenicillus polymyxa*

รูปร่างท่อน ขนาดเซลล์ 0.6-08. x 2-5 μm มีสปอร์รูปวงรีทำให้เซลล์โป่ง สร้างเอนไซม์ catalase เป็นfacultative anaerobe ให้ผลบวก กับการทดสอบ VP Test (pH ในอาหาร VP 7 วัน = 4.5-6.8) Nitrate reduction, Motile Acid production from D-Glucose, L-Arabinose, D-xylose. D-mannitol สร้าง

แก๊สจากการ ferment คาร์โบไฮเดรท starch hydrolysis , casein hydrolysis สร้างสาร dihydroxy acetone จากอาหาร glycerol agar ให้ผลลบกับ citrate utilizationและ การเจริญในอาหาร NB ที่มีเกลือ NaCl 5% และ10%

Key Test สำหรับ *B. sphaericus*

Rod shaped ขนาด 0.5-0.8 x 2-5 μm สปอร์กลม ทำให้เซลล์โป่ง อยู่ปลายเซลล์ ติดสี Gram variable catalase+ เคลื่อนที่ได้เป็น aerobe ให้ผลลบกับการทดสอบเกือบทุกชนิด เช่น

VP Test (pH ในอาหาร VP 7 วัน = 7.4-8.6)

Nitrate reduction

Acid production from D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannitol

Starch hydrolysis

Formation of dihydroxy acetone

ให้ผลบวกกับ Deamination of Phenyl alanine ตรวจผล 3 สัปดาห์ และอาจให้ผลบวกหรือลบกับ casein hydrolysis

***Brevibacillus lateroporus* (= with lateral spore)**

Gram positive, Gram-negative and Gram-variable motile, rod-shaped cell ขนาด 0.5-0.9 x2.0-5.0μm Facultative anaerobe มีลักษณะสปอร์ที่แตกต่างจากสปีชีส์อื่น เป็นรูป C shape คล้ายเรือ canoes ตำแหน่งสปอร์เกิดได้ที่ central paracentral และ subterminal อยู่ด้านข้าง ทำให้เซลล์โป่งบวมเป็น spindle shape ลักษณะการเจริญบน NA, TSA โคโลนี 1-3 mmϕ สีขาวครีม ขอบเรียบ หรือหยักเล็กน้อย

Catalase +	starch –
Nitrate +	urea –
Casein +	indole –
Gelatin +	
Optimal growth 30°C	ไม่เจริญในอาหารที่ pH 5.7

Genus Brevibacillus

Gram positive. Gram-variable หรือ Gram-negative rod shaped ขนาด 0.7-1.0 x 3.0-6.0 μm Motile โดย peritrichous flagella. สร้างสปอร์ รูปวงรี ทำให้เซลล์โป่ง (เล็กน้อย) สปีชีส์ส่วนใหญ่โตได้บน NA, TSA สร้างโคโลนีแบน ผิวเรียบ สีเหลืองอมแดง มีสปีชีส์เดียวสร้าง pigment สีแดง ส่วนใหญ่ strictly aerobic (มี 1 สปีชีส์ เป็นmicro aerophilic, 1สปีชีส์เป็น facultative anaerobe) catalase + , oxidase d ใช้ carbohydrate ได้แต่สร้างกรดน้อย

การเตรียมอาหารและวิธีการตรวจสอบชนิด Bacillus โดย Conventional method

1. **Glucose Agar**

เป็นอาหารเพื่อตรวจสอบการสร้าง granule ในเซลล์

สูตรอาหาร glucose 10 g ผสมใน nutrient agar 1 ลิตร Sterile โดยวิธี autoclave 115°C 20 นาที

วิธีการตรวจสอบ การเลี้ยงเชื้อในอาหารให้มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง แล้วนำแบคทีเรียมาตรวจสอบการสร้าง granule โดยการย้อมสีดู Poly-β-hydroxybutyrate granule ดังนี้

วิธีการย้อมโดยใช้สี sudan black B

1. เสมียร์เชื้อทิ้งให้แห้ง และฟิกซ์รอยเสมียร์ด้วยเปลวไฟ
2. จุ่มสไลด์ในสารละลาย 0.3% sudan black B ใน 70% ethanol นานอย่างน้อย 10 นาที
3. จุ่มสไลด์ใน xylol ยกขึ้นลงหลายๆ ครั้งแล้วซับให้แห้ง
4. ย้อมทับด้วย 0.5% safranino ในน้ำกลั่น 10 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา ซับให้แห้ง แล้วนำไปส่องกล้องจุลทัศน์ จะเห็นก้อนสีน้ำเงินแกมดำ หรือจุดดำในไซโตพลาสซึมสีชมพู

2. **อาหารเพื่อกระตุ้นการสร้าง endospore**

ในบางครั้งแบคทีเรียที่สร้าง endospore อาจไม่สร้าง endospore ถ้าผ่านการต่อเชื้อไปหลายๆ ครั้ง โดยเฉพาะเชื้อจากธรรมชาติที่เราแยกมาไม่นาน จึงควรใช้วิธีถ่ายเชื้อในอาหาร nutrient agar ที่ผสม $MnSO_4.H_2O$ 50 mg/l หลายๆ ครั้งติดต่อกันแล้วจึงนำมาย้อมสีดูเซลล์ อาจใช้วิธีย้อมแกรมหรือย้อม endospore ก็ได้

3. **Anaerobic Agar ใช้ทดสอบว่าแบคทีเรียนั้นเป็น aerobic หรือ facultative anaerobe**

สูตรอาหาร/I

Trypticase	20	g
Glucose	10	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
Sodium thiglycollte	2	g
Sodium formaldehyde sultoxylate	1	g
ปรับ pH ให้เป็น	7.2	

เตรียมอาหารใส่หลอดฝาเกลียวสั้นให้สูงเกือบถึงฝา โดยมีช่วงความลึกของอาหารประมาณ 7-8 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C 20 นาที

การใส่เชื้อ ใช้วิธี stab inoculation ลงในอาหารจนลึกถึงก้นหลอด

การตรวจผล ดูการเจริญตามแนวที่ stab ถ้าเจริญชัดตามแนวที่ stab จนถึงก้นหลอด แสดงว่าแบคทีเรียนี้เป็น facultative anaerobe ดูผลภายใน 7 วัน

4. Acetoin Production

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสาร acetoin จากขบวนการ Butylene Glycol Fermentation ได้หรือไม่

สูตรอาหาร

Protease peptone	7 g
Glucose	5 g
NaCl	5 g
ปรับ pH ให้เป็น	6.5

แบ่งใส่หลอดๆ ละ 5 ml sterile โดย autoclave ที่อุณหภูมิ 115°C นาน 20 นาที

การใส่เชื้อ ใช้ loop แตะเชื้อปริมาณมากใส่ลงในหลอดทดสอบบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

การตรวจผล ตรวจผลที่ระยะ 3, 5, 7 วัน โดยผสม 40% (w/v) NaOH ลงในหลอด 3 ml แล้วเติมผง creatine 0.5-1 mg สังเกตผลบวกโดยดูสีส้มเรื่อๆ ภายใน 30-60 นาที ที่อุณหภูมิห้องโดยวางหลอดให้สัมผัสกับอากาศ การตรวจผลที่ 7 วัน ต้องวัด pH โดย meter ก่อนแล้วจึงทดสอบผลบวกลบ

5. ความสามารถในการเจริญในอาหาร nutrient broth ที่มี 5, 7, 10% NaCl

สูตรอาหาร Nutrient broth ผสม NaCl ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามกำหนด

การใส่เชื้อ นำเชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร nutrient agar มา 1 loop ใส่ในน้ำ Sterile 5 cc เพื่อทำให้เป็น suspension แล้วจึงใส่เชื้อ 1 loop ในแต่ละหลอดทดสอบ

การตรวจผล ดูว่าเชื้อเจริญหรือไม่ จากความขุ่นในอาหารเหลวภายใน 7วัน

6. Indole production

อาหารมี tryptaphan เป็นสารตั้งต้นเพื่อตรวจสอบว่านั้นสามารถสร้างเอนไซม์ Tryptophanase ไปย่อย Tryplaphan แล้วเกิดสาร Indole หรือไม่ วิธีตรวจผลใส่ reagent ที่มีส่วนประกอบของ *Paradimethylaminobenzaldehyde* เช่น Ehrilich's reagent หรือ Kavac's reagent ลงไป แล้วดูการเกิดวงแหวนสีแดง

สูตรอาหาร

Peptone	10g
NaCl	5 g

การใส่เชื้อ ใส่เชื้อจาก nutrient agar slant 1 loop ต่อหลอด ทำ 2 หลอด/เชื้อ

การตรวจผล เช็คผล 3 และ 5 วัน

7. Nitrate reduction

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียนั้นสามารถ reduce nitrate ไปเป็น nitrite ได้หรือไม่หรือเกิดขบวนการ Denitrification เปลี่ยน $NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow N_2$

สูตรอาหาร

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
KNO_3	5 g

แบ่งใส่หลอดๆ ละ 6-8 ml ใส่ durham tube ด้วย

การใส่เชื้อ ใช้เชื้อ 1 loop จาก nutrient agar slant ใส่เชื้อลงในหลอดอาหาร

การตรวจผล 7 วัน และ 14 วัน

โดยแบ่งสารละลายเชื้อใส่หลอดขนาดเล็กประมาณ 1 ซีซี โดย aseptic technique หลังจากนั้นตรวจหาว่ามี nitrite หรือไม่ โดยเติม sulfanilic acid (reagent A) และ dimethyl-α-naphthylamine (reagent B) ลงไปอย่างละ 2-3 หยด ถ้าเกิดสารละลายสีแดงมีตะกอน แสดงว่าพบ nitrite ถ้าไม่พบ nitrite ให้เติมผงสังกะสี (Zn) ลงไป ผงสังกะสีจะไป reduce nitrate ให้เป็น nitrite ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง ฉะนั้นถ้าเกิดสีแดงหลังจากเติมผงสังกะสีแสดงว่ายังมี nitrate อยู่ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นไม่สามารถ reduce nitrate ได้ แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงหลังจากที่เติมผงสังกะสีก็แสดงว่า NO_3 ถูก reduce ไปเป็น NO_2 และ NO_2 ถูกเปลี่ยนไปเป็น N_2 หรือสารอื่นๆ แล้ว ส่วนขบวนการ Denitrification ดูการเกิดก๊าซในหลอด durham

8. Hydrolysis of casein

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ caseinase หรือไม่

สูตรอาหาร สำหรับอาหาร 400 ml

A: Skim milk	20 g ละลายในน้ำ 200 ml
B: ผงวุ้น	4 g ใส่น้ำ 200 ml

Sterile ที่ 121°C 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิ 45°C ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเทลงจานอาหาร

การใส่เชื้อ แบ่งอาหารออกเป็นสี่ส่วน แล้วใส่เชื้อโดยวิธี point inoculation

การตรวจผล ดูโซนใสรอบๆ บริเวณที่เชื้อเจริญ ภายใน7 วัน

9. Hydrolysis of starch

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ caseinase ออกมาย่อย amylase .น starch หรือไม่

สูตรอาหาร Nutrient agar 100 ml ผสมกับ soluble starch 1 g ละลายน้ำ 10 ml แยก autoclave แล้วนำมาผสมกันก่อนเทลงจานอาหาร

การใส่เชื้อ ใช้วิธี point inoculation

การตรวจผล ดูโซนใสหลังจากราดผิวหน้าอาหารด้วยสารละลาย iodine ภายใน7 วัน

10. Hydrolysis of Gelatin

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase หรือไม่

สูตรอาหาร Nutrient agar +0.4% gelatin ผสมรวมกัน autoclave ได้โดยตรง

การใส่เชื้อ ใช้วิธี point inoculation

การตรวจผล ดูโซนใสหลังจากราดผิวหน้าอาหารด้วยสารละลาย $HgCl_2$ ภายใน7 วัน

11. Egg Yolk medium

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ lecithenase หรือไม่

สูตรอาหาร

A: Tryptone	10 g
Disodium hydrogenphosphate	5 g
Potassium dihydrogen phosphate	1 g
NaCl	2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 g
Glucose	2 g

ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ก่อนผสมวุ้น 15 g ฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave 121°C 20 นาที

B: ไข่แดงผสมกับ 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณที่เท่ากัน ผสม A และ B ในสัดส่วน 10: 1 ก่อน เทลงจานอาหาร

การใส่เชื้อ ใช้วิธี point inoculation

การตรวจผล ดูโซนขาวทึบรอบบริเวณที่เชื้อเจริญ ถ้าพบแสดงว่าแบคทีเรียนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ lecithenase ได้ ตรวจผลหลังจากบ่มเชื้อนาน 3-7 วัน

12. การสร้างกรดจากสาร carbohydrate

สูตรอาหาร basal medium/l

Diammonium hydrogen phosphate	1 g
KCl	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
Yeast extract	0.2 g

ปรับ pH ให้เป็น 7 ก่อนเติม 0.04% (w/v) ของ brom cresol purple 15 ml

sterile โดยวิธี autoclave 121°C นาน 20 นาที

การเตรียม carbohydrate solution

ละลายสาร carbohydrate ในน้ำปริมาตรไม่ควรเกิน 10-20 ml(เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาตรsyringe โดยคำนวณให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5-1% แล้วฆ่าเชื้อโดยวิธีกรองผ่านเมมเบรน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 μm แล้วจึงผสมกับ basal medium ดังสูตรข้างบนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แบ่งใส่หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 3-5 ml

Carbohydrate ที่ใช้ในการทดลอง

D(+) glucose

L(+) arabinose

D(+) xylose

D(-) mannitol

Lactose กรณีการทดสอบการสร้างกรดจาก lactoseให้ใส่ในปริมาณความเข้มข้นสุดท้าย 2%

การใส่เชื้อ ใส่เชื้อโดยตรงจาก nutrient agar ใช้เชื้อ 1 loop ต่อหลอดอาหาร

การตรวจผล ดูการเปลี่ยนสีในอาหารจากม่วงเป็นเหลือง ตรวจผลภายใน 7-14 วัน

13. Citrate และ Propionate Utilization

สูตรอาหาร

Trisodium citrate $2H_2O$	1 g
หรือ sodium propionate	2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g
Diammonium Hydrogen phosphate	0.5 g
KCl	1.0 g
Trace element solution	40 ml

สูตร Trace element solution

EDTA	500 mg
$FeSO_4.\ 7H_2O$	200 mg
$ZnSO_4.\ 7H_2O$	10 mg
$MnCl_2.\ 4H_2O$	3 mg
H_3BO_3	30 mg
$CoCl_2.6H_2O$	20 mg
$CuCl_2.2H_2O$	1 mg
$NiCl_2.6H_2O$	2 mg
$Na_2.MoO_4.\ 2H_2O$	3 mg
น้ำกลั่น	1000 ml

วุ้น	15 g
น้ำกลั่น	920 ml

Phenol red 0.04% (w/v) solution 20 ml

ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ก่อนที่จะ sterile โดยการฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 20 นาที เตรียมในรูปของ slant

การใส่เชื้อ ทำ suspension ของเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วจึงใช้ suspension 1 loop ลากเป็นเส้นตรงในอาหารบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

การตรวจผล ดูการเจริญบนผิวอาหาร และเปลี่ยนสีอาหารไปเป็นสีบานเย็น ถ้าให้สีบานเย็นแสดงว่าบวก ตรวจผลภายใน 7-14 วัน กรณีของ propionate อาจต้องรอผลถึง 21วัน

14. Deamination of Phenylalanine

เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียนั้นมีเอนไซม์ phenyl alanine deaminase ไปย่อย Phenylalanine ให้เป็น phenyl pyruvic acid และ NH_3 หรือไม่ ซึ่งการตรวจสอบผลหลังจากบ่มเชื้อนาน 7 วัน ให้หยด 10% (w/v) Ferric chloride ลงไป 4-5 หยด สารนี้จะทำปฏิกิริยากับ phenylpyruvic acid เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเขียวบริเวณใต้วุ้นอาหารที่เชื้อเจริญ

สูตร อาหาร

Yeast extract	3 g
DL-phenylalanine	2 g
Na_2HPO_4	1 g
NaCl	5 g
Agar	12 g
น้ำกลั่น	920 ml
pH	7.3

เตรียมเป็น slant 5 ml ต่อหลอด ฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave ที่ 121°C นาน 20 นาที

วิธีการใส่เชื้อ ใช้วิธี streak เชื้อไปบนผิวอาหาร slant เชื้อละ 2 หลอด หลอดหนึ่งตรวจผลเมื่อครบ 7 วัน ถ้าได้ผลลบให้บ่มเชื้อหลอดที่ 2 และตรวจผลวันที่ 21

วิธีตรวจผล หยด สารละลาย 10%$FeCl_2$ 4-5 หยดลงบนผิวอาหาร สังเกตจากแนวสีเขียวเป็นเส้นใต้บริเวณที่เชื้อเจริญแสดงว่าให้ผลบวก

15. การตรวจสอบการสร้างสาร dihydroxyacetone

สูตรอาหาร

Glycerol agar	100 ml
Yeast extract	1 g
Glycerol	2 ml

เตรียมใส่ flask ฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave 121°C นาน 20 นาที แล้วเทใส่จานอาหาร point inoculation

วิธีใส่เชื้อ เพาะเชื้อโดยวิธี point inoculation บนจานอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 10 วัน

การตรวจผล เทราดบนผิวอาหารด้วย solution ที่ประกอบด้วย

a). hydrous copper sulfate 34.66 g ละลายในน้ำกลั่น 500 ml

b). Potassium sodium tartrate 173 , NaOH 50 g ละลายในน้ำกลั่น 500 ml เก็บสารในข้อ a) และ b) แช่ตู้เย็น เวลาจะใช้ให้นำมาผสมกันในสัดส่วนหลังจากเทราดด้วย solution ดังกล่าว ตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. แล้วสังเกตผล จากวงสีแดงล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ

16. การย่อยสลาย Tyrosine

สูตรอาหาร L-tyrosine 0.5 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ121°C นาน 20 นาที แล้วนำมาผสมกับ nutrient agar ที่ฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้อุณหภูมิ 50-60 °C ก่อนเทลงจานอาหาร

การใส่เชื้อ ใช้วิธี point inoculation แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7, 14 และ 21 วัน สำหรับแบคทีเรียที่โตช้า

วิธีตรวจผล สังเกตจากอาหารที่ถูกใช้จะใส เนื่องจาก tyrosine crystal หายไป

วิธีการจำแนกชนิด *Bacillus* sp. โดยวิธี Biolog

หลักการ

การจำแนกชนิด *Bacillus* sp. โดย conventional method ใช้คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบ่ง *Bacillus* sp. ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ โดยอาศัยรูปร่าง ตำแหน่งเอนโดสปอร์ และการทำให้เซลล์โป่งเป็นเกณฑ์คือ

กลุ่ม I มีเอนโดสปอร์เป็นรูปวงรีไม่ทำให้เซลล์โป่งออก

กลุ่ม II มีเอนโดสปอร์เป็นรูปวงรีทำให้เซลล์โป่งออก

กลุ่ม III มีเอนโดสปอร์เป็นรูปวงกลมที่ทำให้เซลล์โป่งออก

การแยกออกว่าเป็นสมาชิกในกลุ่มใดช่วยให้การจำแนกในระดับสปีชีส์เป็นไปได้ง่ายขึ้น หลังจากนั้นจึงศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาที่ใช้จัดจำแนกชนิด *Bacillus* sp.ตามวิธีการของ Gordon (1989) และ sneath (1984) ซึ่งวิธีการดังกล่าวมีประมาณ 25-30 คุณสมบัติทำให้ต้องใช้เวลาในการตรวจสอบมีความยุ่งยากและความซับซ้อนในการเตรียมอาหารซึ่งอาจไม่สะดวกสำหรับผู้ไม่มีประสบการณ์

หลักการของวิธีการจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดย Biolog system ใช้ความแตกต่างของความสามารถในการเจริญในสารอาหารประเภทต่างๆ 95 ชนิด ซึ่งชนิดของสารอาหารดังกล่าวจะแตกต่างกันในแบคทีเรีย

แกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ หรือราเส้นสาย มีผลทำให้จุลินทรีย์แต่ละชนิดมี metabolic pattern ที่แตกต่างกัน metabolic pattern ที่แตกต่างกันทำให้เราสามารถแยกตามแตกต่างของจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์

การตรวจสอบความเจริญดูจากการเปลี่ยนสี tetrazolium viotlet ที่ผสมในอาหาร ซึ่งจะเปลี่ยนจากไม่มี เป็นสีม่วง หากจุลินทรีย์เจริญได้ ผลการเจริญสามารถอ่านได้ด้วยตา ภายใน 24 ชั่วโมง หรืออ่านผลโดยเครื่องอ่าน (Microstation reader) และจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล

วิธีการ (เฉพาะ *Bacillus* sp.)

1. แยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์
2. เตรียมจานอาหาร Biolog Universal Growth Medium (BUG) ที่ผสม maltose 0.25% (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีกรองผ่าน membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 μm) และก่อนการ streak แบคทีเรีย swab ผิวหน้าอาหารด้วย 50 mM sodium thioglycollate รอให้ผิวหน้าแห้ง แล้วจึงใช้ loop แตะโคโลนีที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง ไป streak โดยวิธีขีดเป็นรูปตัว N แคบๆ ตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจานอาหาร 2 ครั้งในทิศตั้งฉากกัน
3. บ่มเชื้อเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C
4. เตรียม suspension ของแบคทีเรีย โดยใช้ไม้ปลายทู่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 170 มิลลิเมตร แตะเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ มาบดขยี้ในหลอดแก้วฝาเกลียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อให้แบคทีเรียที่ชอบสร้างเมือกหรือมีธรรมชาติของการเจริญเป็นแผ่นแห้งหรือเป็นขุย มีโอกาสกระจายตัวและหลุดออกจากกันได้ง่ายขึ้น ทำให้ suspension โดยเจือจางกับ inoculation fluid (IF ซึ่งมีสูตรดังกล่าว 0.04% NaCl, 0.03% Pluronic F-68 และ 0.02% Gellan Gum) โดยปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ 28% (หรือค่า OD = 0.55 ที่ความยาวช่วงคลื่น 590 nm)
5. หยด suspension ของเชื้อในข้อ 4 ลงบนอาหาร GP2 microplate 95 หลุม ๆ ละ 150 ml โดยใช้ multichannel micropipette ที่สามารถใส่ suspension ของเชื้อได้ครั้งละ 8 หลุม
6. บ่ม GP2 microplate ที่อุณหภูมิ 30°C
7. อ่านผลที่ 6, 16 และ 24 ชั่วโมง โดยเครื่องอ่านผล microplate reader
8. จำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล

หนังสืออ่านประกอบ

1. Slepecky R.A. 1992. What is a *Bacillus* ? *In* Biology of Bacilli Applications to Industry, edited by R.H Doi and M. Mcgloughin Butterworth-Heinemann, 370 pp. a division of Reed Publishing (USA) Inc. pp 1-21
2. Gordon, R.E. 1989. The Genus *Bcillus*; *In* Practical Handbook of Microbiology Edited by: W.M. O'Leary 681 pp. CRC Press Inc. pp 109-126
3. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1st . Vol.2
4. GP2 Microplate™ instructions for use. Gypyright APR 1999. Biolog. Inc.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition (2009) Volume Three. The firmicute. page1-323

การใช้ลำดับเบส rRNA ในการจำแนกชนิดของเห็ดโดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล NCBI

หทัยรัตน์ อุไรรงค์

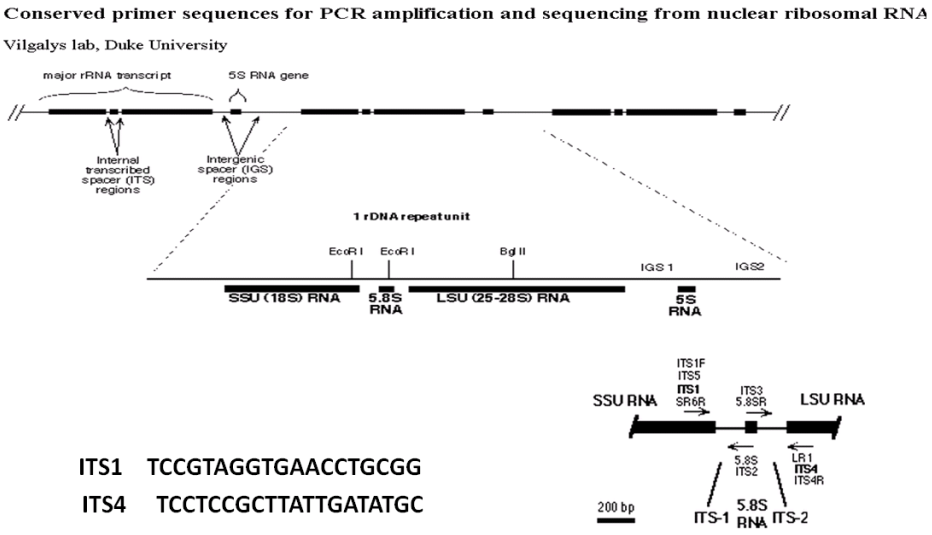
<u>กรณีศึกษา</u> : การจำแนกชนิดเห็ด :ไม่ทราบชนิด

ดำเนินการดังนี้ (รายละเอียดตามบทปฏิบัติการ)

1.สกัดดีเอ็นเอ จากส่วนต่างๆของเห็ดหรือจากเส้นใยเห็ด

2. ขยายยีน rRNA โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพร์เมอร์ ITS1, ITS4

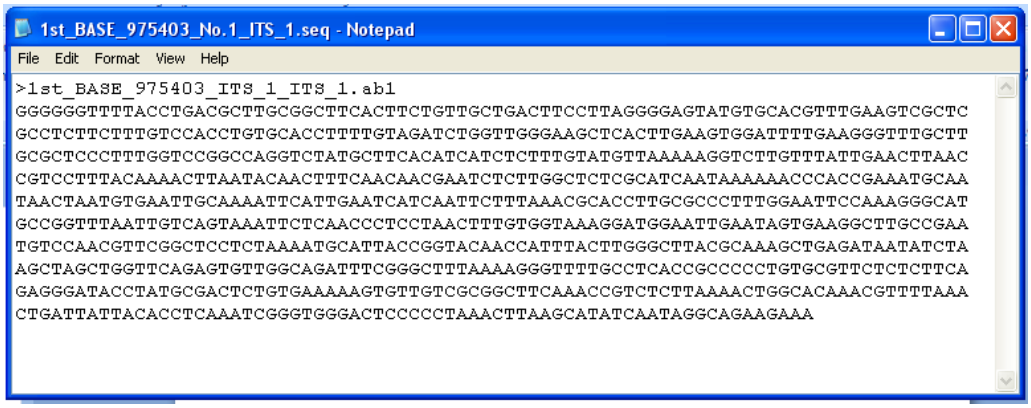
3. ทำ cycle sequencing เพื่อหาลำดับเบสของชิ้น DNA บริเวณ ITS1, ITS4 แล้วตรวจสอบคุณภาพของลำดับเบสที่ได้



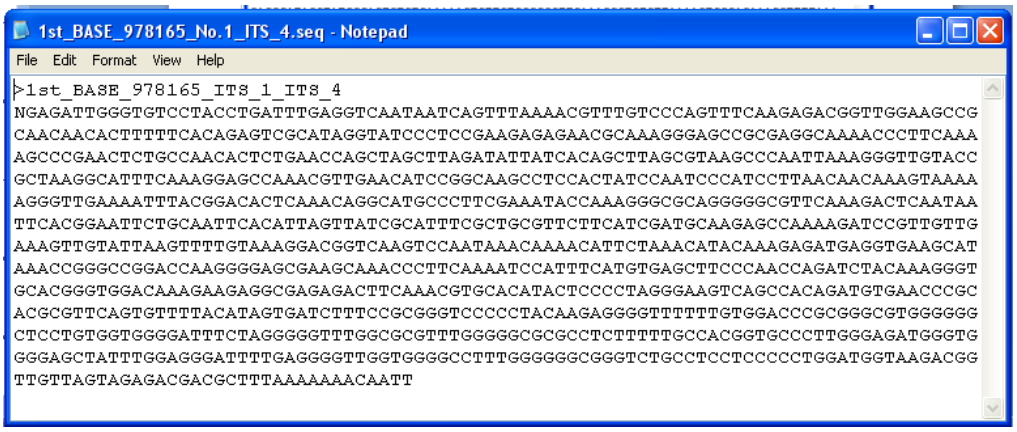
4. การใช้ลำดับเบส rRNA ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูล

ผลการอ่านลำดับพันธุกรรม (sequence) ได้ลำดับเบส 2 เส้น

- จาก ไพรเมอร์ forward(ITS1)



- จาก ไพรเมอร์ reverse(ITS4)

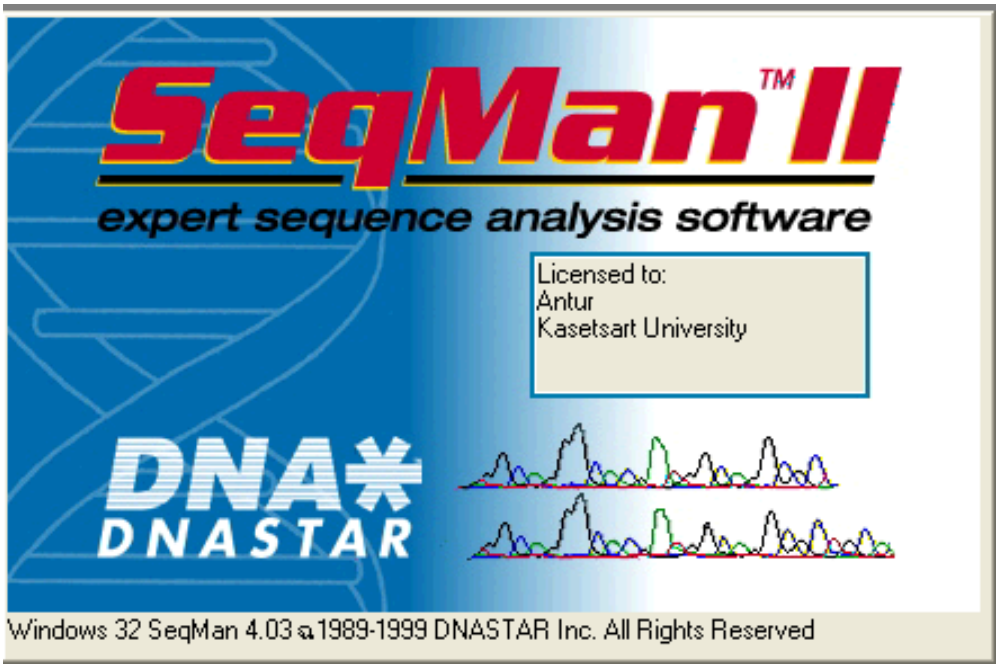


การเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล

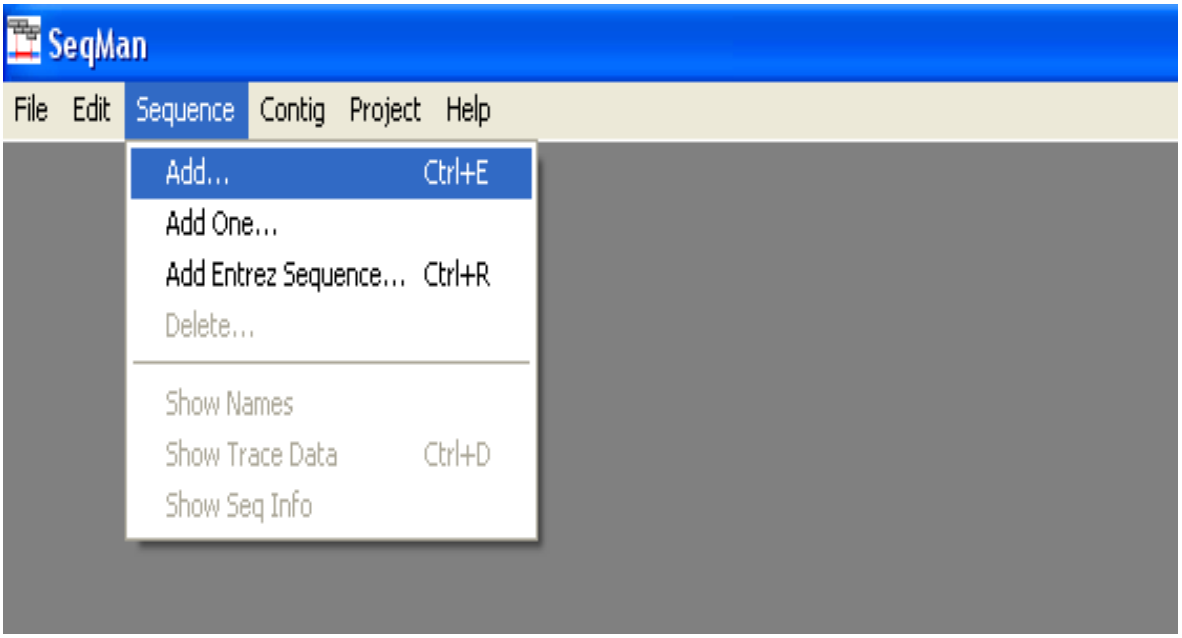
1. ใช้ลำดับเบสของ forward หรือ reverse primer ที่ได้นำไปเทียบหาชนิดของเห็ดได้เลย
2. นำลำดับเบสของ forward และ reverse primer มารวมกัน (assemble fragment) เป็นเส้นเดียวที่สมบูรณ์

การทำ Assemble fragments ของลำดับเบส forward และ reverse primer

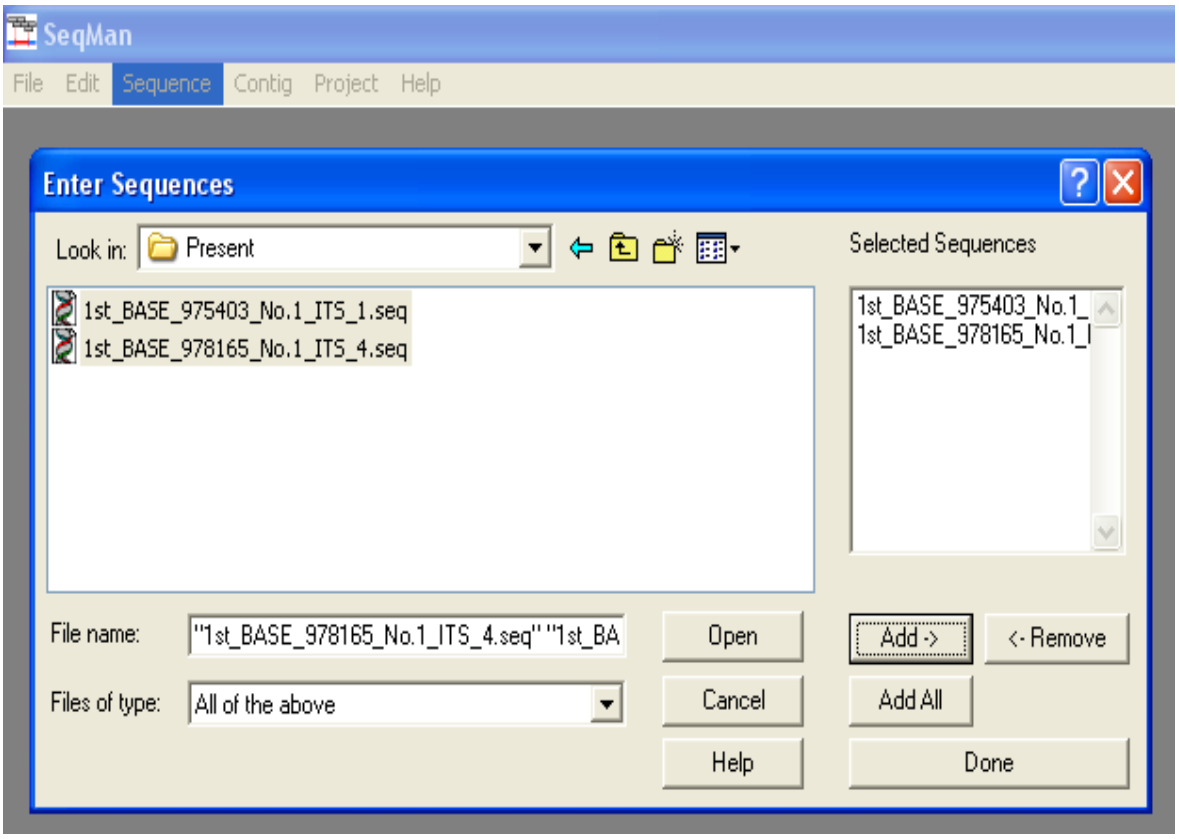
โดย โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส *SeqMan*™ II



1. เปิดโปรแกรม SeqMan ดังภาพ ทำการ import sequence ที่ต้องการ assembly โดยเลือกไปที่ เมนูบาร์ Sequence จากนั้น เลือก add

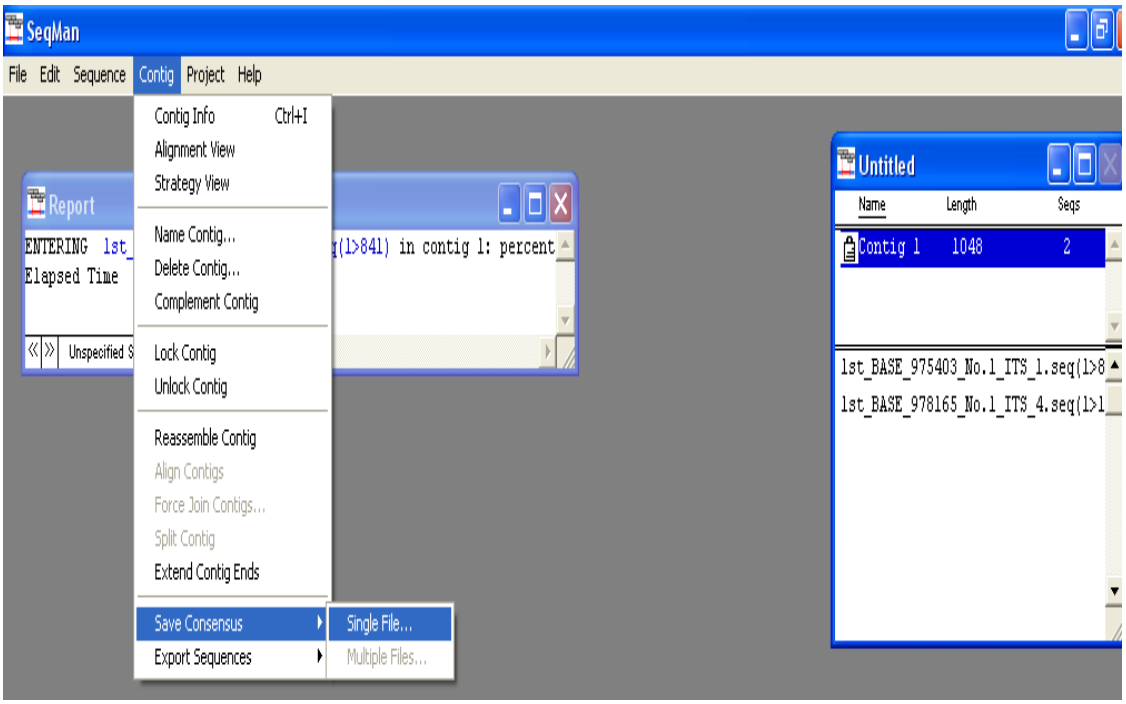


2. Enter Sequence menu เลือก file ของ sequence ทั้ง 2 ที่ต้องการนำมาต่อกันจาก folder แล้วทำการ add file ให้ปรากฏ ชื่อ file ที่ selected sequence ด้านขวามือ

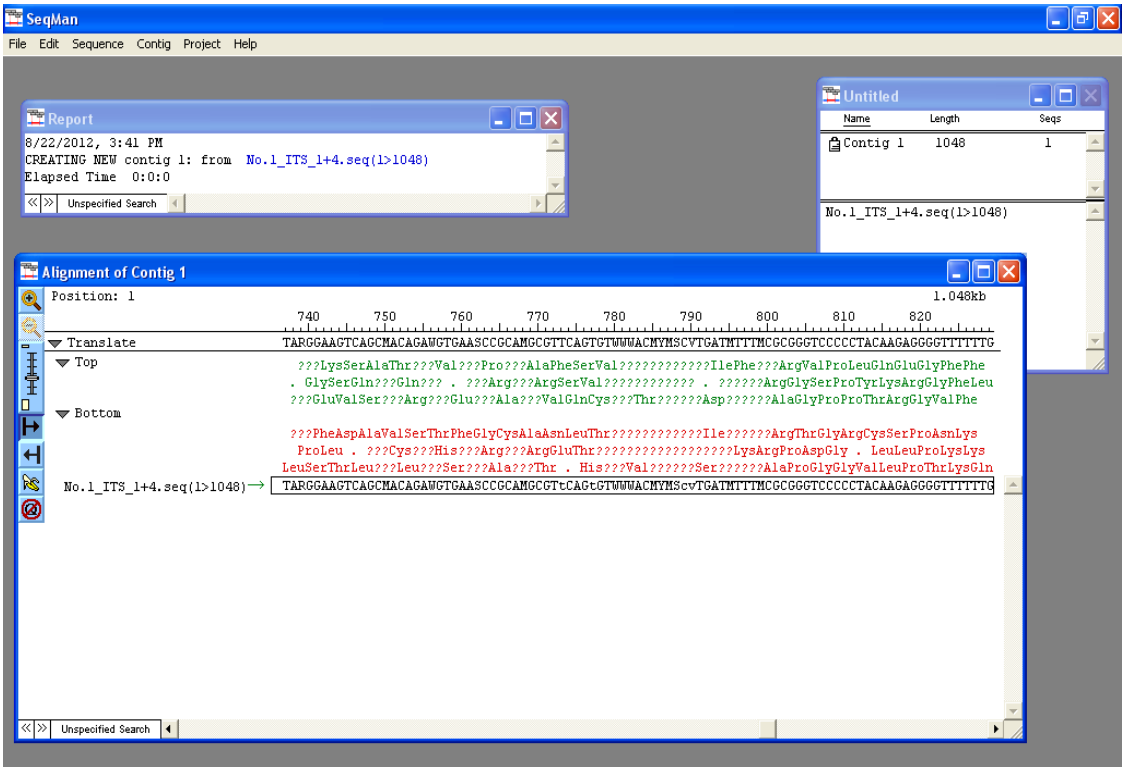


3. จากเมนูด้านล่าง เลือก Contig – Save Consensus – Single File

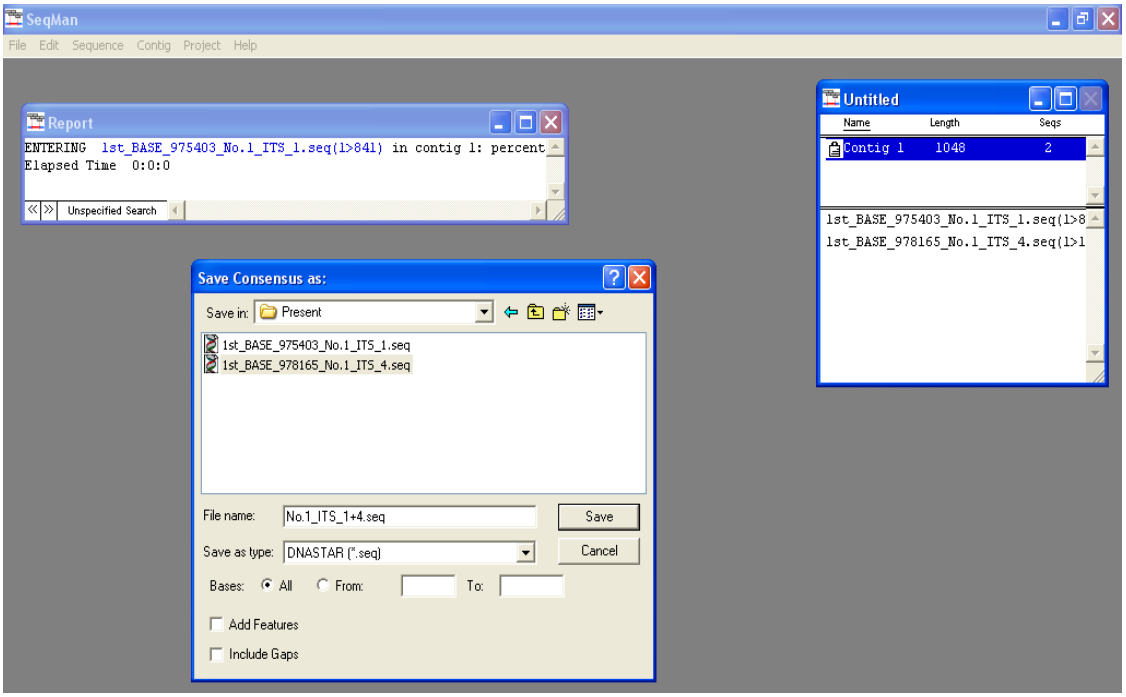
- ภาพขวามือ มี 1 Contig ขนาด 1048 bp ที่รวมมาจาก 2 Seqs.



- หน้าจอจะแสดงผล



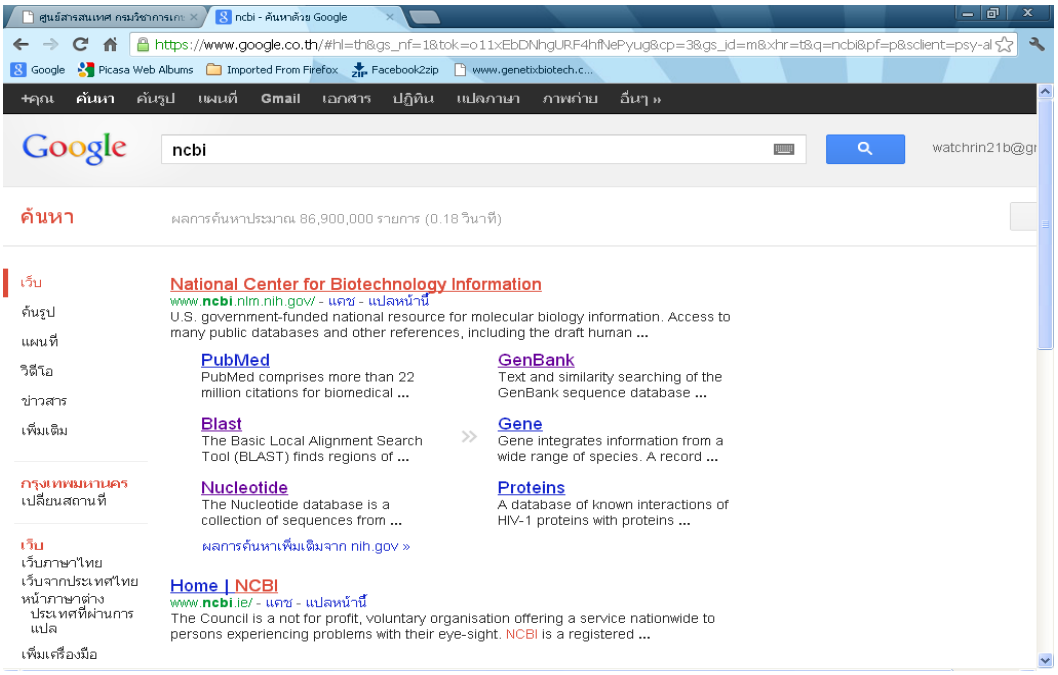
4. ทำการ save file ใหม่ที่รวม Seqs ของ ITS1+ITS4



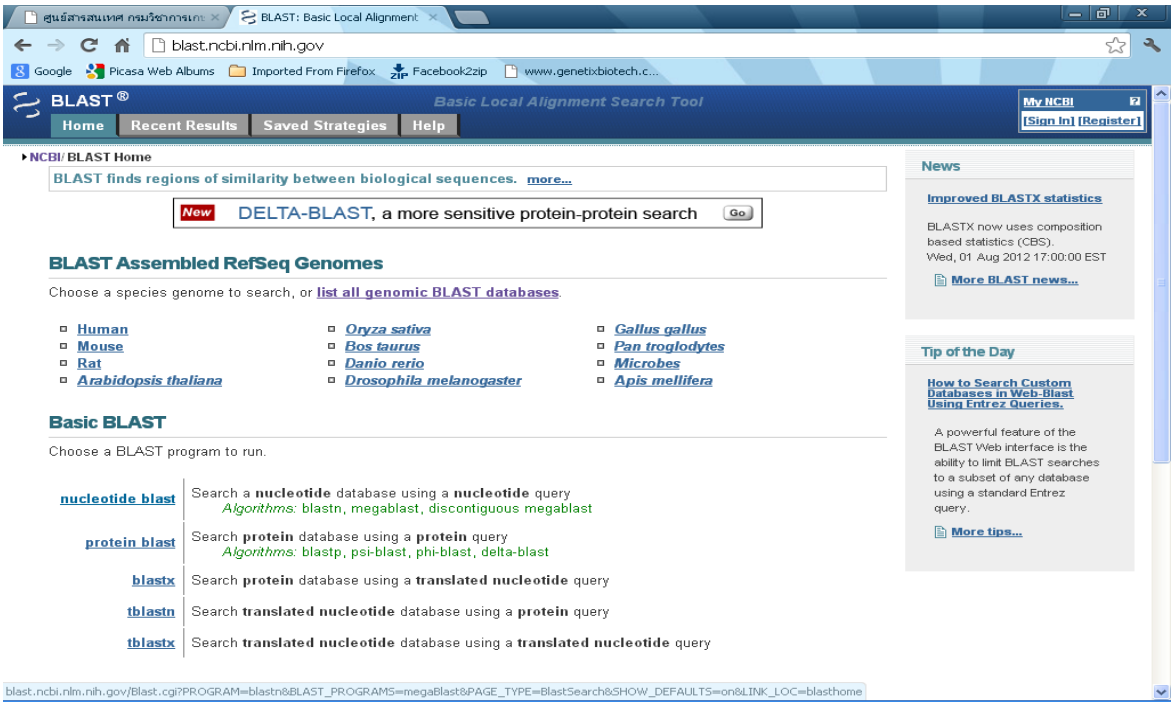
การจำแนกชนิดของเห็ด : ไม่ทราบชนิด

โดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST

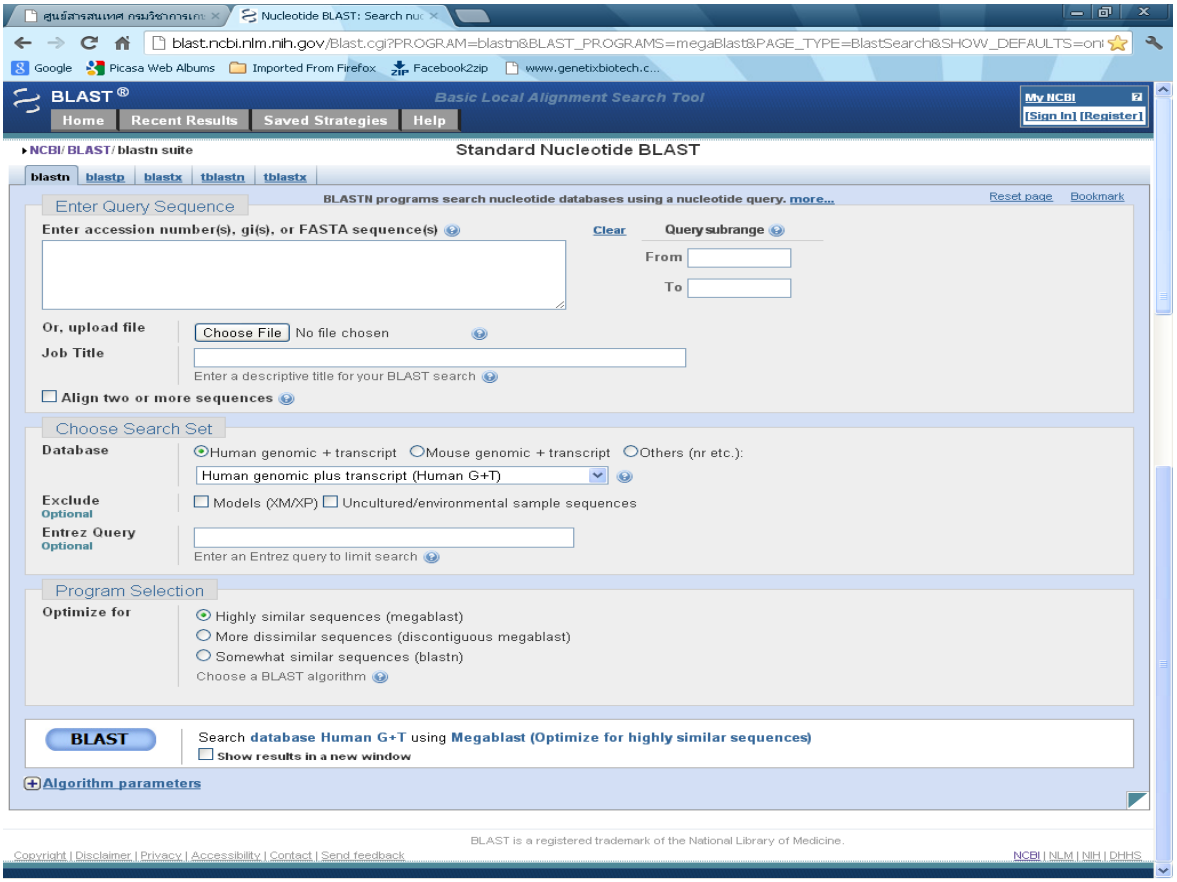
1. เข้า website ของ NCBI



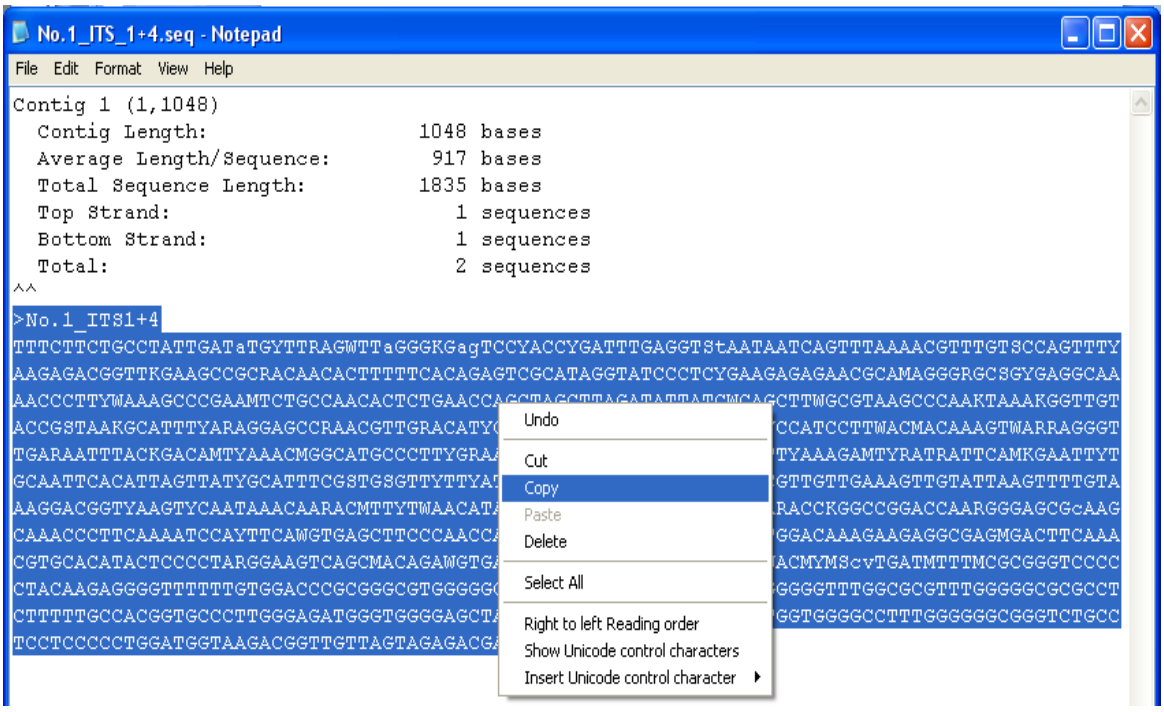
2. เลือก Nucleotide Blast



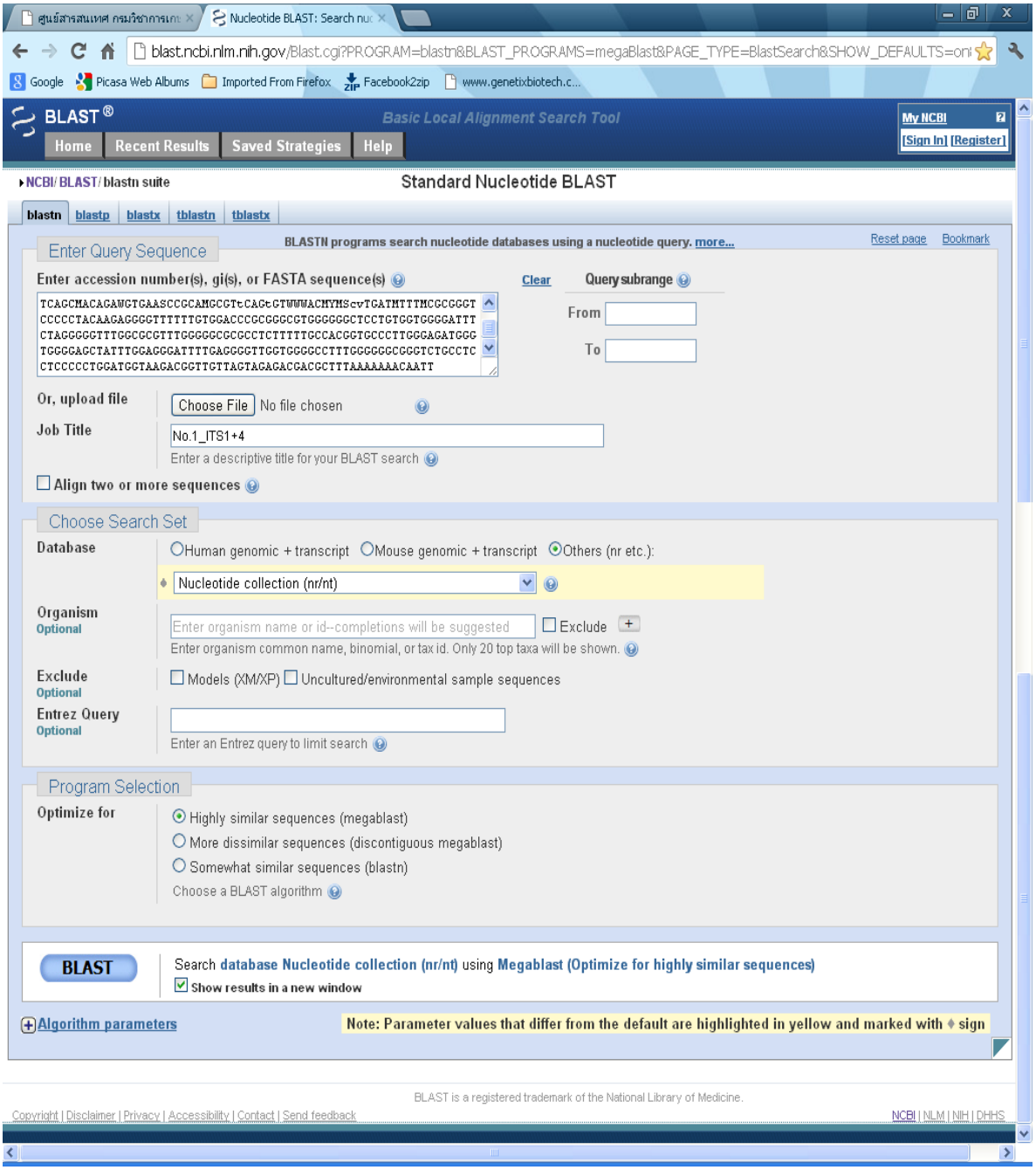
3. หน้าจอแสดงผล ดังภาพ



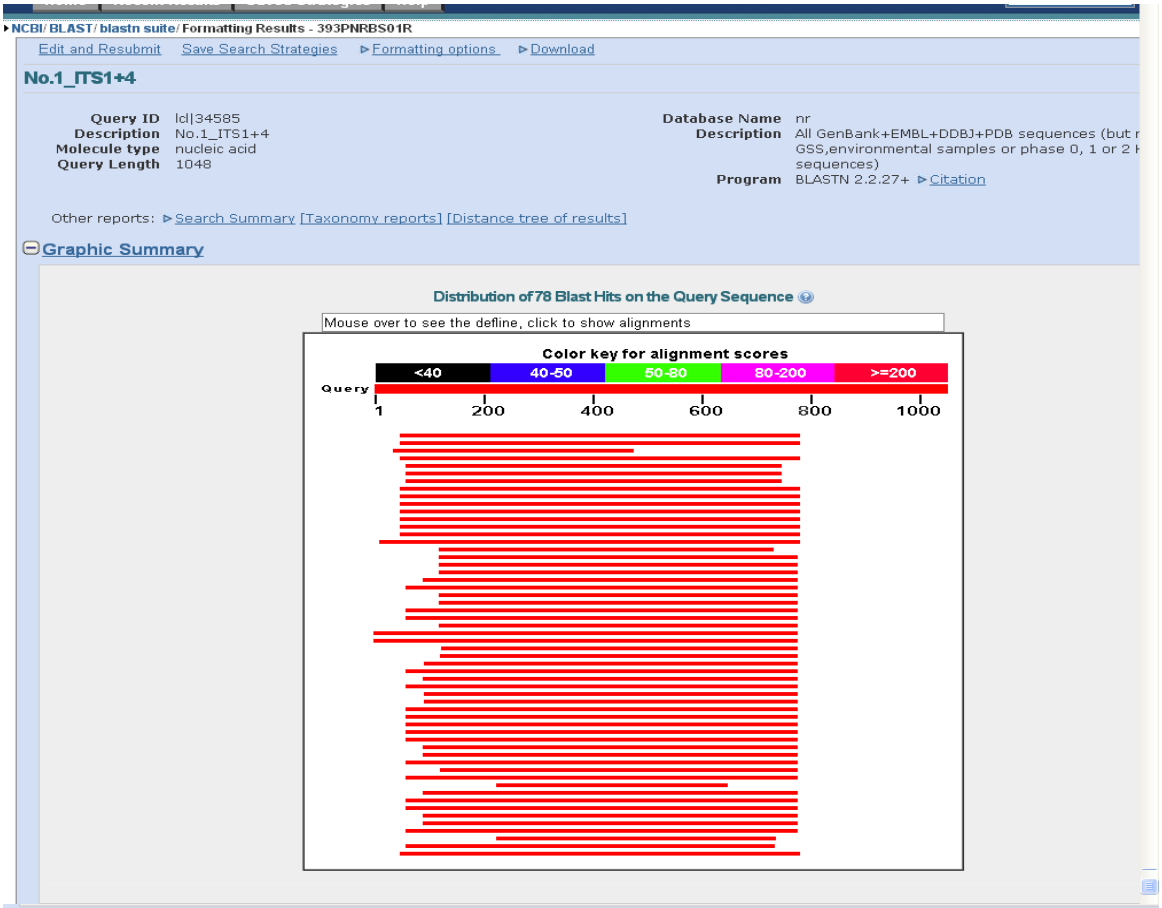
4. ทำการ copy seq. ใหม่ ที่รวมแล้ว ไป paste ไว้ที่ ช่อง Enter Query Sequence



5. ตั้งค่าต่างๆ ดังภาพ แล้ว เลือก BLAST



6. แสดงผลการค้นหา



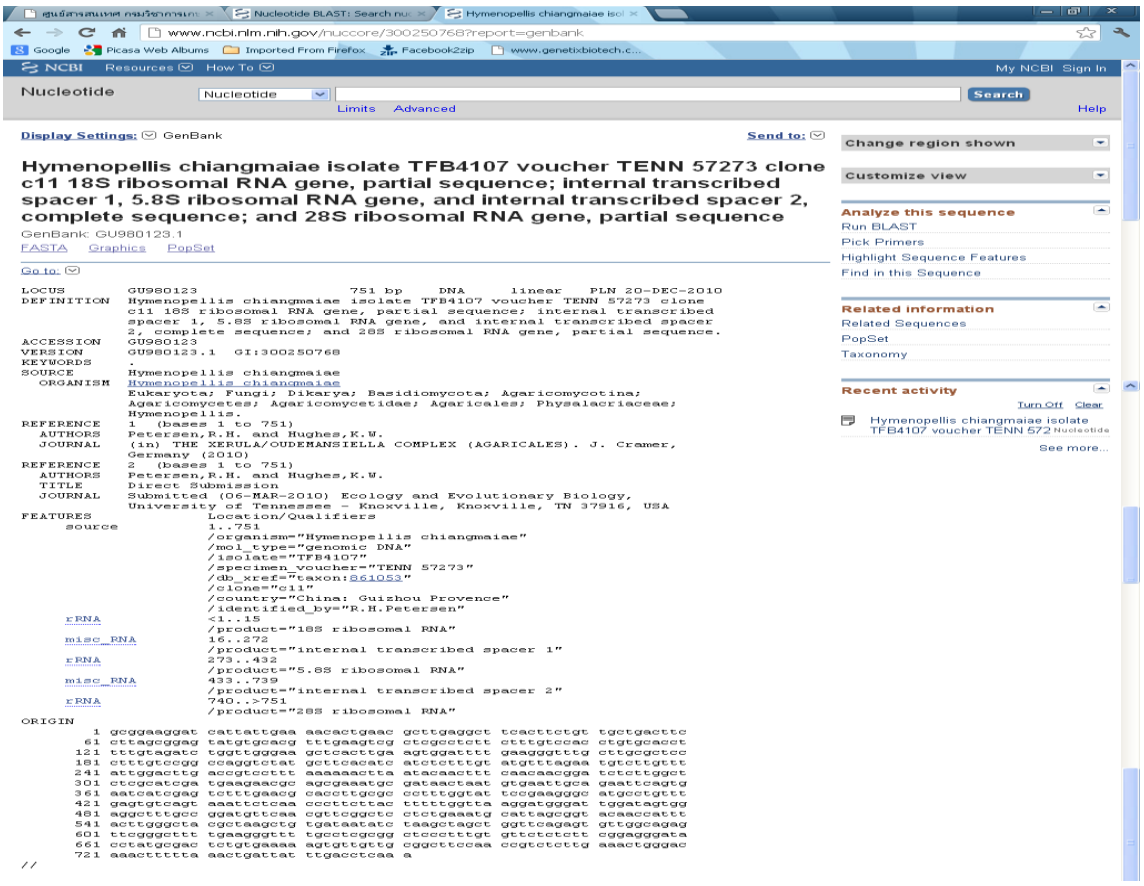
Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU980123.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 5	1000	1000	69%	0.0	88%
GU980129.1	Hymenopellis raphanipes isolate LFZ 278 single spore 1 vou	990	990	69%	0.0	88%
AB509719.1	Hymenopellis radicata gene for 5.8S ribosomal RNA, internal	606	606	41%	9e-170	88%
GU980127.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 5	987	987	69%	0.0	87%
AF321482.1	Xerula furfuracea strain QXW2446 internal transcribed spac	904	904	65%	0.0	87%
AF321483.1	Xerula furfuracea strain QXW2570 internal transcribed spac	874	874	65%	0.0	86%
AF321481.1	Xerula furfuracea strain QXW2430 internal transcribed spac	857	857	65%	0.0	86%
GU980126.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 5	909	909	69%	0.0	86%
GU980124.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 5	907	907	69%	0.0	86%
GU980125.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 5	898	898	69%	0.0	85%
GU980131.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate LFZ 237 18S ribosomal RN	889	889	69%	0.0	85%
GU980130.1	Hymenopellis raphanipes isolate LFZ 220 voucher HKAS 425	885	885	69%	0.0	85%
GU980132.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate LFZ 238 single spore 6 vo	876	876	69%	0.0	85%
GU980122.1	Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 5	880	880	69%	0.0	84%
AY534119.1	Oudemansiella radicata strain MKACC 50093 internal transcr	880	880	73%	0.0	84%
AF321495.1	Xerula radicata strain EK88/27 internal transcribed spacer 1	647	647	58%	0.0	83%

7. แสดงข้อมูลรายละเอียดของ Accession no. ที่มีความคล้ายคลึง และ ลำดับเบส (Fasta format)



www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300250768?report=genbank

Nucleotide

Display Settings: GenBank

Send to:

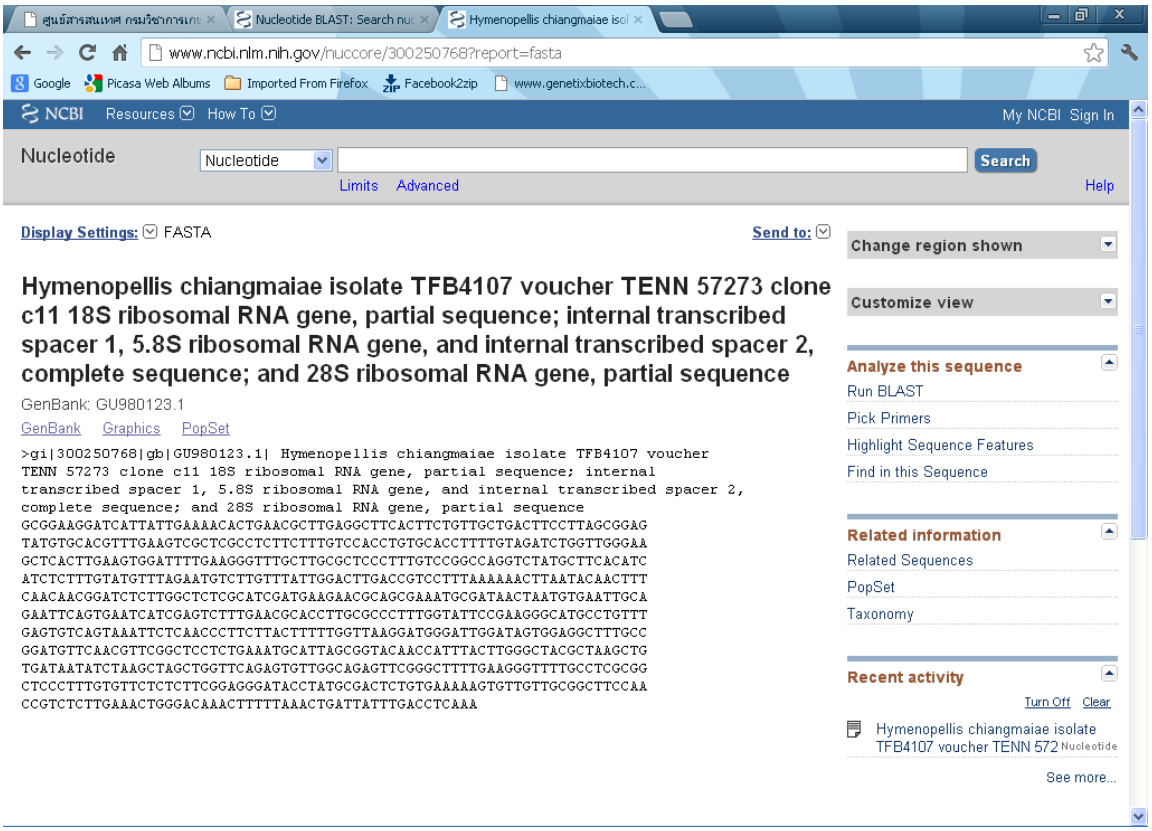
Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone c11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GU980123.1

FASTA Graphics PopSet

Go to:

```
LOCUS       GU980123                751 bp    DNA     linear   PLN 20-DEC-2010
DEFINITION  Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone
            c11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed
            spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer
            2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   GU980123
VERSION     GU980123.1  GI:300250768
KEYWORDS    .
SOURCE      Hymenopellis chiangmaiae
  ORGANISM  Hymenopellis chiangmaiae
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
            Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Physalacriaceae;
            Hymenopellis.
REFERENCE   1  (bases 1 to 751)
  AUTHORS   Petersen,R.H. and Hughes,K.W.
  JOURNAL   (in) THE XERULA/OUDEMANSIELLA COMPLEX (AGARICALES). J. Cramer,
            Germany (2010)
REFERENCE   2  (bases 1 to 751)
  AUTHORS   Petersen,R.H. and Hughes,K.W.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-MAR-2010) Ecology and Evolutionary Biology,
            University of Tennessee - Knoxville, Knoxville, TN 37916, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..751
                     /organism="Hymenopellis chiangmaiae"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="TFB4107"
                     /specimen_voucher="TENN 57273"
                     /db_xref="taxon:861053"
                     /clone="c11"
                     /country="China: Guizhou Provence"
                     /identified_by="R.H.Petersen"
     rRNA            <1..15
                     /product="18S ribosomal RNA"
     misc_RNA        16..272
                     /product="internal transcribed spacer 1"
     rRNA            273..432
                     /product="5.8S ribosomal RNA"
     misc_RNA        433..739
                     /product="internal transcribed spacer 2"
     rRNA            740..>751
                     /product="28S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gcggaaggat cattattgaa aacactgaac gcttgaggct tcacttctgt tgctgacttc
       61 cttagcggag tatgtgcacg tttgaagtcg ctcgcctctt ctttgtccac ctgtgcacct
      121 tttgtagatc tggttgggaa gctcacttga agtggatttt gaaggtttg cttgcgctcc
      181 ctttgtccgg ccaggtctat gcttcacatc atctctttgt atgttagaa tgtcttgttt
      241 attggacttg accgtccttt aaaaaacttа atacaacttt caacaacgga tctcttggct
      301 ctggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataactaat gtgaattgca gaattcagtg
      361 aatcatcgag tctttgaacg caccttgcgc cctttggtat tccgaagggc atgcctgttt
      421 gagtgtcagt aaattctcaa ccctcttac tttttggtta aggatgggat tggatagtgg
      481 aggctttgcc ggatgttcaa cgttcggctc ctctgaaatg catttagcgg tacaacctt
      541 acttgggcta cgctaagctg tgataatatc taagctagct ggttcagagt gttggcagag
      601 ttcgggcttt tgaagggttt tgcctcgcgg ctcccttgt gttctctctt cggagggata
      661 cctatgcgac tctgtgaaaa agtgttgttg cggcttccaa ccgtctcttg aaactgggac
      721 aaactttta aactgattat ttgacctcaa a
//
```



www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300250768?report=fasta

Nucleotide

Display Settings: FASTA

Send to:

Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone c11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: GU980123.1

GenBank Graphics PopSet

```
>gi|300250768|gb|GU980123.1| Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher
TENN 57273 clone c11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal
transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2,
complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GCGGAAGGATCATTATTGAAAACACTGAACGCTTGAGGCTTCACTTCTGTTGCTGACTTCCTTAGCGGAG
TATGTGCACGTTTGAAGTCGCTCGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGATCTGGTTGGGAA
GCTCACTTGAAGTGGATTTTGAAGGGTTTGCTTGCGCTCCCTTTGTCCGGCCAGGTCTATGCTTCACATC
ATCTCTTTGTATGTTTAGAATGTCTTGTTTATTGGACTTGACCGTCCTTTAAAAAACTTAATACAACTTT
CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTT
GAGTGTCAGTAAATTCTCAACCCTTCTTACTTTTTGGTTAAGGATGGGATTGGATAGTGGAGGCTTTGCC
GGATGTTCAACGTTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGTACAACCATTTACTTGGGCTACGCTAAGCTG
TGATAATATCTAAGCTAGCTGGTTCAGAGTGTTGGCAGAGTTCGGGCTTTTGAAGGGTTTTGCCTCGCGG
CTCCCTTTGTGTTCTCTCTTCGGAGGGATACCTATGCGACTCTGTGAAAAAGTGTTGTTGCGGCTTCCAA
CCGTCTCTTGAAACTGGGACAAACTTTTTAAACTGATTATTTGACCTCAAA
```

Change region shown

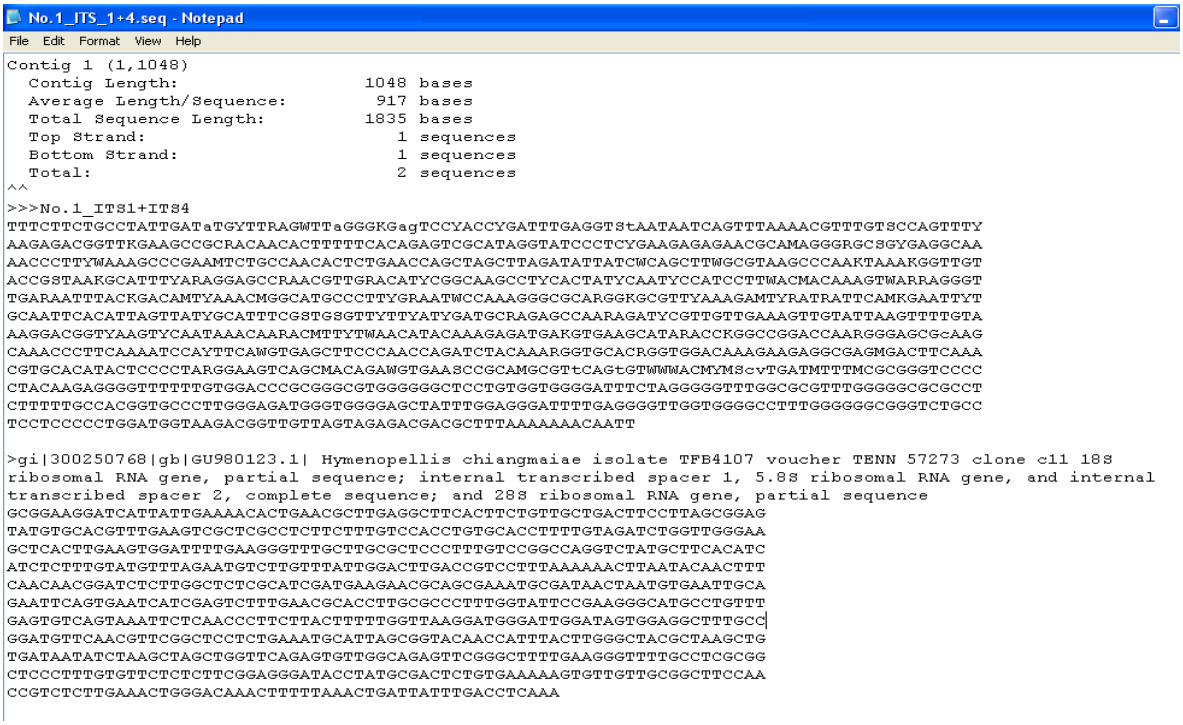
Customize view

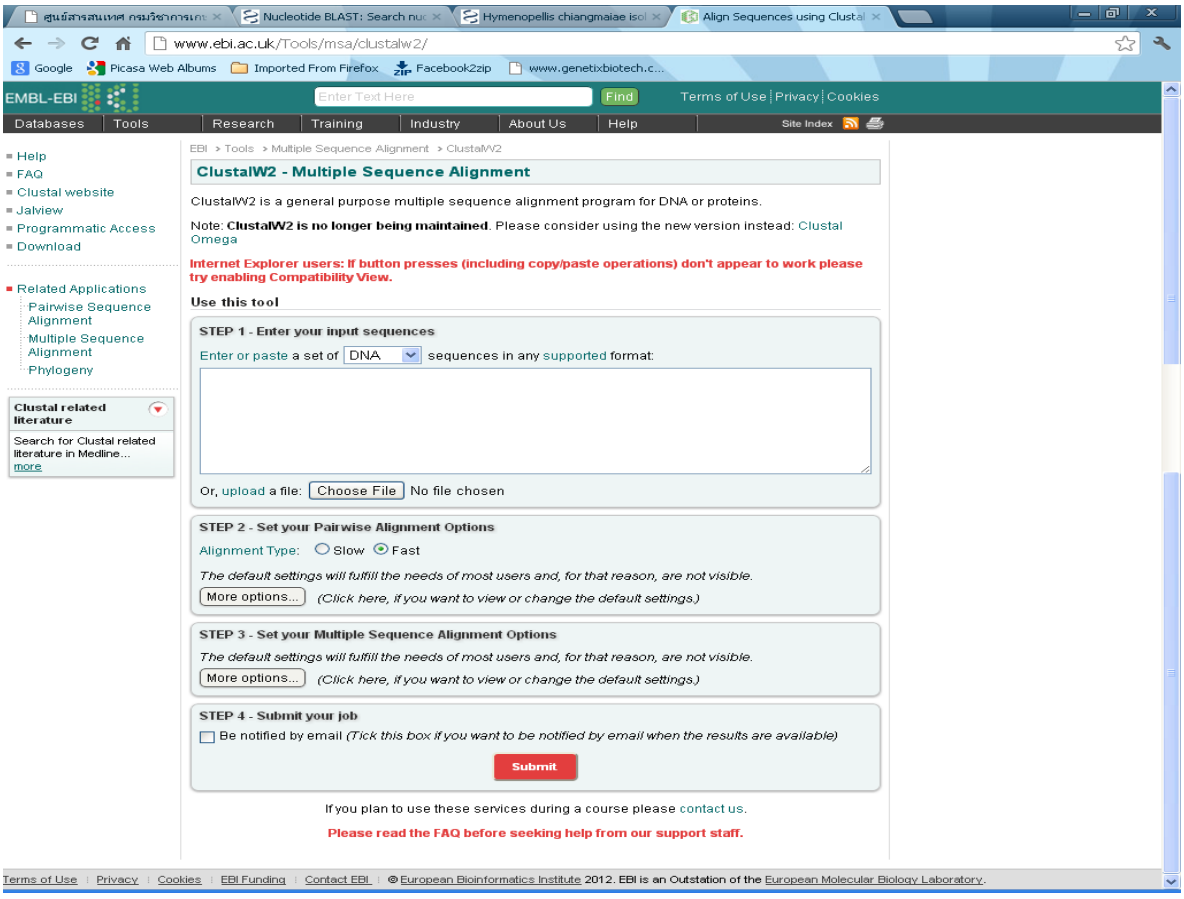
Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

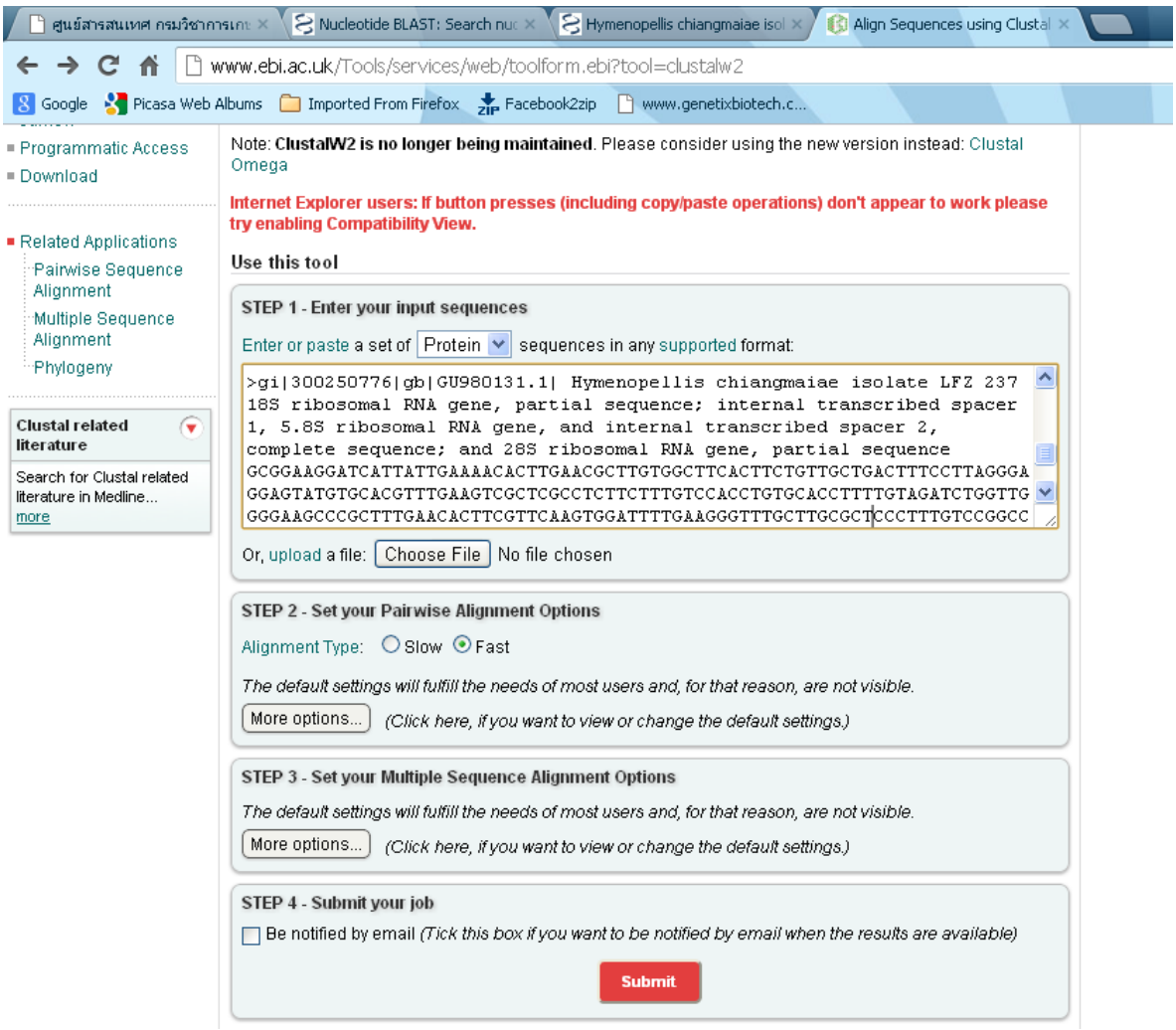
Related information
Related Sequences
PopSet
Taxonomy

Recent activity
Turn Off Clear
Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 572 Nucleotide
See more...

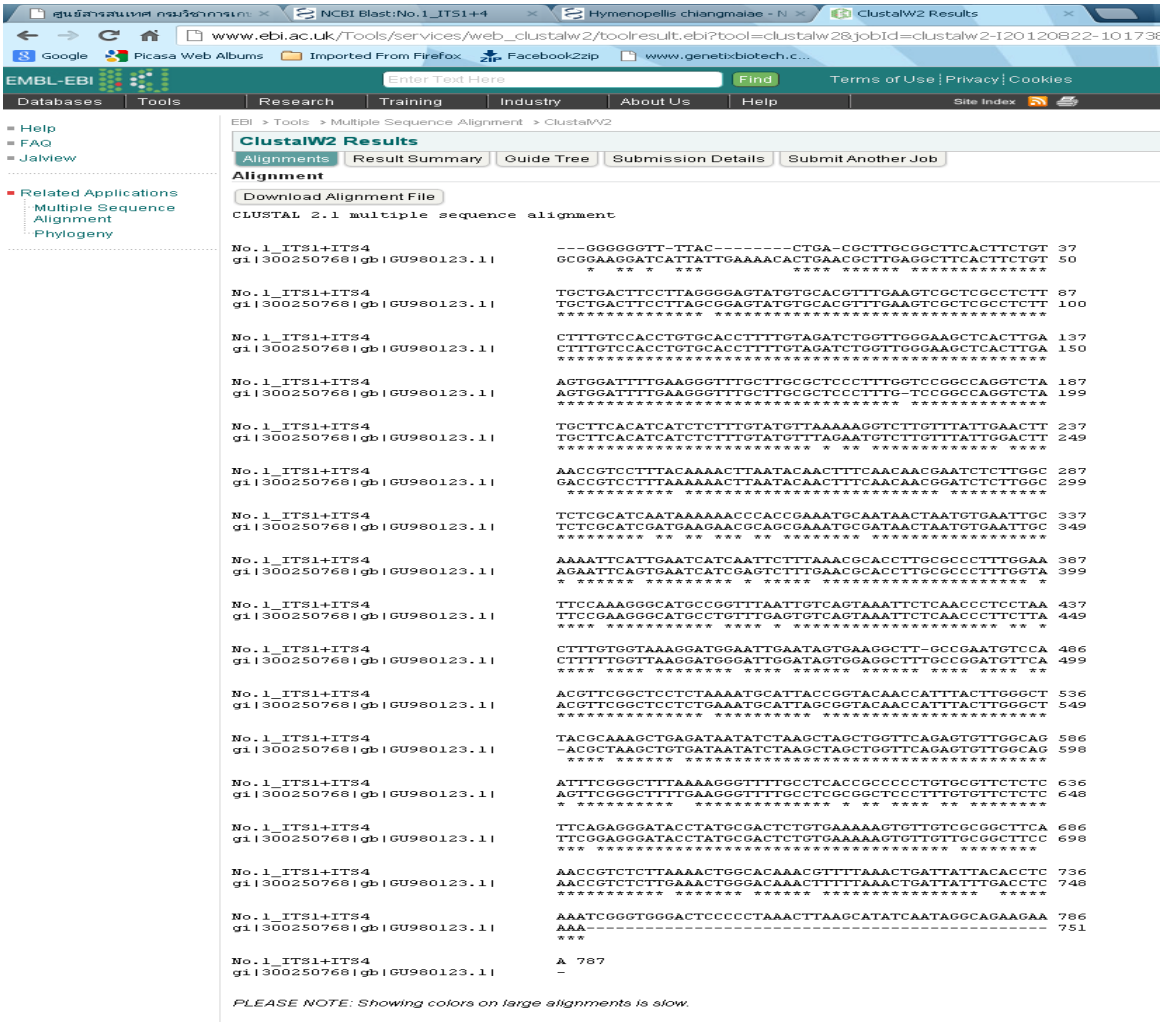
อาจลองเปรียบเทียบ Seqs. ทั้งสองโดยใช้ โปรแกรม Clastal W






ศูนย์สารสนเทศ กรมวิชาการเก
Nucleotide BLAST: Search nuc
Hymenopellis chiangmaiae isol
Align Sequences using Clustal
www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=clustalw2
Google
Picasa Web Albums
Imported From Firefox
Facebook2zip
www.genetixbiotech.c...
Programmatic Access
Download
Related Applications
Pairwise Sequence Alignment
Multiple Sequence Alignment
Phylogeny
Clustal related literature
Search for Clustal related literature in Medline...
more
Note: ClustalW2 is no longer being maintained. Please consider using the new version instead: Clustal Omega
Internet Explorer users: If button presses (including copy/paste operations) don't appear to work please try enabling Compatibility View.
Use this tool
STEP 1 - Enter your input sequences
Enter or paste a set of Protein sequences in any supported format:
>gi|300250776|gb|GU980131.1| Hymenopellis chiangmaiae isolate LFZ 237 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GCGGAAGGATCATTATTGAAAACACTTGAACGCTTGTGGCTTCACTTCTGTTGCTGACTTTCCTTAGGGA
GGAGTATGTGCACGTTTGAAGTCGCTCGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGATCTGGTTG
GGGAAGCCCGCTTTGAACACTTCGTTCAAGTGGATTTTGAAGGGTTTGCTTGCGCTCCCTTTGTCCGGCC
Or, upload a file: Choose File No file chosen
STEP 2 - Set your Pairwise Alignment Options
Alignment Type: Slow Fast
The default settings will fulfill the needs of most users and, for that reason, are not visible.
More options... (Click here, if you want to view or change the default settings.)
STEP 3 - Set your Multiple Sequence Alignment Options
The default settings will fulfill the needs of most users and, for that reason, are not visible.
More options... (Click here, if you want to view or change the default settings.)
STEP 4 - Submit your job
Be notified by email (Tick this box if you want to be notified by email when the results are available)
Submit

การแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของเห็ด:ไม่ทราบชนิด และ ลำดับเบสของเห็ดชนิดที่มีความใกล้เคียงในฐานข้อมูล



ClustalW2 Results

www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolresult.ebi?tool=clustalw2&jobId=clustalw2-I20120822-101738

EMBL-EBI

Databases | Tools | Research | Training | Industry | About Us | Help

EBI > Tools > Multiple Sequence Alignment > ClustalW2

ClustalW2 Results

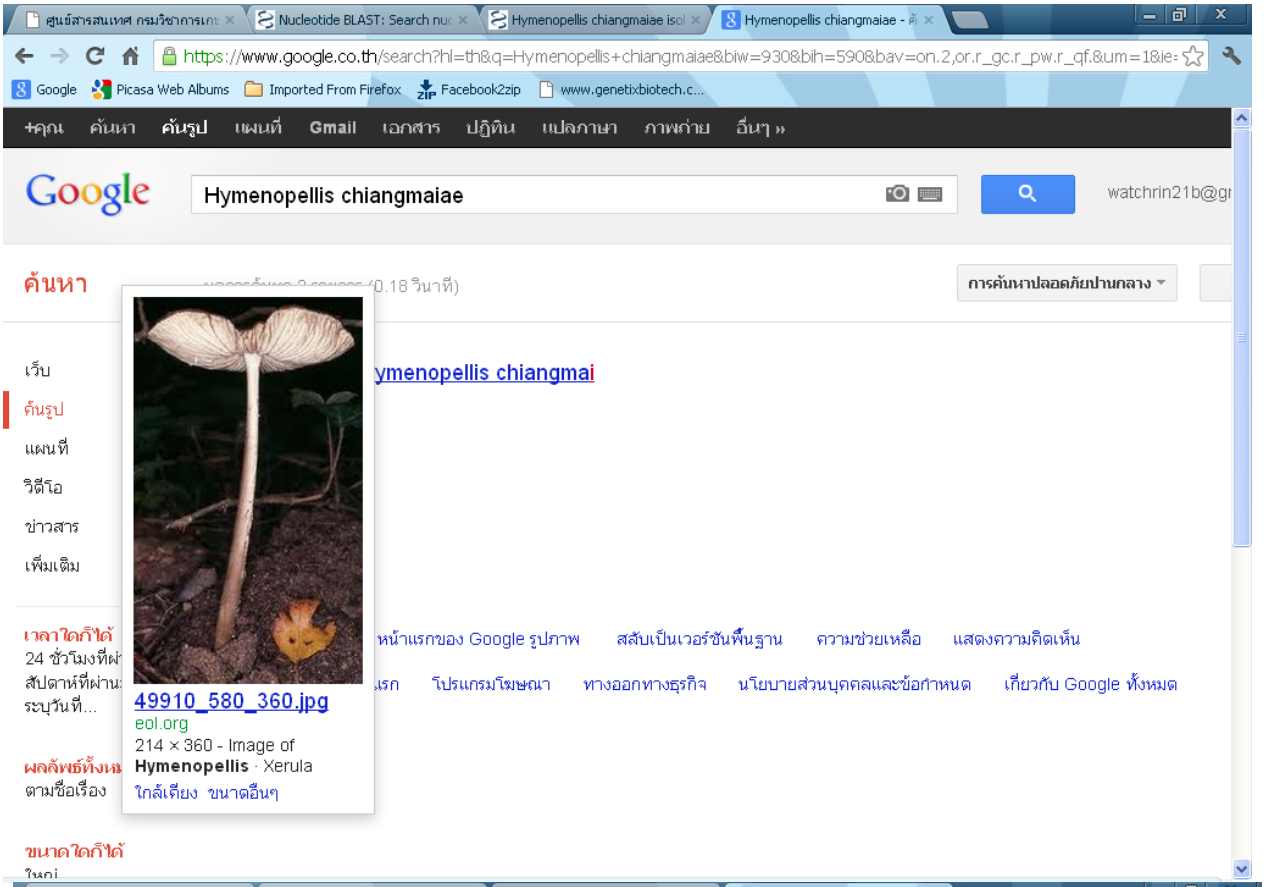
Alignments | Result Summary | Guide Tree | Submission Details | Submit Another Job

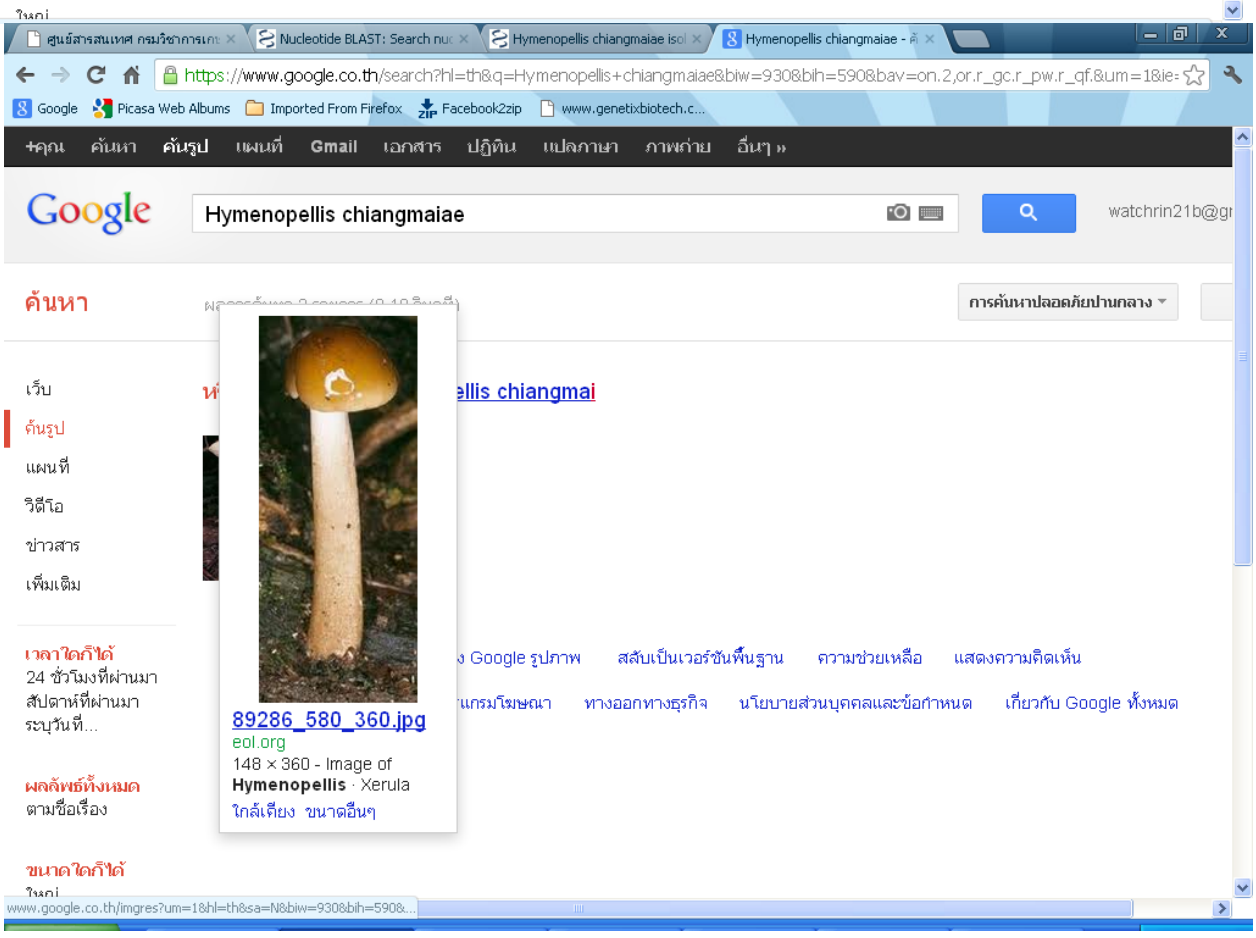
Alignment

Download Alignment File

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

No.1_ITS1+ITS4                  ---GGGGGGTT-TTAC---------CTGA-CGCTTGCGGCTTCACTTCTGT 37
gi|300250768|gb|GU980123.1|     GCGGAAGGATCATTATTGAAAACACTGAACGCTTGAGGCTTCACTTCTGT 50
                                   *  ** *  ***          **** ****** ***************

No.1_ITS1+ITS4                  TGCTGACTTCCTTAGGGGAGTATGTGCACGTTTGAAGTCGCTCGCCTCTTT 87
gi|300250768|gb|GU980123.1|     TGCTGACTTCCTTAGCGGAGTATGTGCACGTTTGAAGTCGCTCGCCTCTTT 100
                                ********** ********** ************************************

No.1_ITS1+ITS4                  CTTTGTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGATCTGGTTGGGAAGCTCACTTGA 137
gi|300250768|gb|GU980123.1|     CTTTGTCCACCTGTGCACCTTTTGTAGATCTGGTTGGGAAGCTCACTTGA 150
                                ************************************************

No.1_ITS1+ITS4                  AGTGGATTTTGAAGGGTTTGCTTGCGCTCCCTTTGGTCCGGCCAGGTCTA 187
gi|300250768|gb|GU980123.1|     AGTGGATTTTGAAGGGTTTGCTTGCGCTCCCTTTG-TCCGGCCAGGTCTA 199
                                ************************************ ***************

No.1_ITS1+ITS4                  TGCTTCACATCATCTCTTTGTATGTTAAAAAGGTCTTGTTTATTGAACTT 237
gi|300250768|gb|GU980123.1|     TGCTTCACATCATCTCTTTGTATGTTTAGAATGTCTTGTTTATTGGACTT 249
                                ***************************** * ** ************** ****

No.1_ITS1+ITS4                  AACCGTCCTTTACAAAACTTAATACAACTTTCAACAACGAATCTCTTGGC 287
gi|300250768|gb|GU980123.1|     GACCGTCCTTTAAAAAACTTAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGC 299
                                 ************ ***************************** ***********

No.1_ITS1+ITS4                  TCTCGCATCAATAAAAAACCCACCGAAATGCAATAACTAATGTGAATTGC 337
gi|300250768|gb|GU980123.1|     TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC 349
                                ********* ** ** *** ** ********* ********************

No.1_ITS1+ITS4                  AAAATTCATTGAATCATCAATTCTTTAAACGCACCTTGCGCCCTTTGGAA 387
gi|300250768|gb|GU980123.1|     AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTA 399
                                * ****** ********* * ***** ************************ *

No.1_ITS1+ITS4                  TTCCAAAGGGCATGCCGGTTTAATTGTCAGTAAATTCTCAACCCTCCTAA 437
gi|300250768|gb|GU980123.1|     TTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCAGTAAATTCTCAACCCTTCTTA 449
                                **** *********** **** * ********************** ** *

No.1_ITS1+ITS4                  CTTTGTGGTAAAGGATGGAATTGAATAGTGAAGGCTT-GCCGAATGTCCA 486
gi|300250768|gb|GU980123.1|     CTTTTTGGTTAAGGATGGGATTGGATAGTGGAGGCTTTGCCGGATGTTCA 499
                                **** **** ******** **** ****** ****** **** **** **

No.1_ITS1+ITS4                  ACGTTCGGCTCCTCTAAAATGCATTACCGGTACAACCATTTACTTGGGCT 536
gi|300250768|gb|GU980123.1|     ACGTTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGTACAACCATTTACTTGGGCT 549
                                ********** ********** ************************

No.1_ITS1+ITS4                  TACGCAAAGCTGAGATAATATCTAAGCTAGCTGGTTCAGAGTGTTGGCAG 586
gi|300250768|gb|GU980123.1|     -ACGCTAAGCTGTGATAATATCTAAGCTAGCTGGTTCAGAGTGTTGGCAG 598
                                 **** ****** ***************************************

No.1_ITS1+ITS4                  ATTTCGGGCTTTAAAAGGGTTTTGCCTCACCGCCCCCTGTGCGTTCTCTC 636
gi|300250768|gb|GU980123.1|     AGTTCGGGCTTTTGAAGGGTTTTGCCTCGCGGCTCCCTTTGTGTTCTCTC 648
                                * **********  ********** * ** **** ** *********

No.1_ITS1+ITS4                  TTCAGAGGGATACCTATGCGACTCTGTGAAAAAGTGTTGTCGCGGCTTCA 686
gi|300250768|gb|GU980123.1|     TTCGGAGGGATACCTATGCGACTCTGTGAAAAAGTGTTGTTGCGGCTTCC 698
                                *** ************************************ *********

No.1_ITS1+ITS4                  AACCGTCTCTTAAAACTGGCACAAACGTTTTAAACTGATTATTACACCTC 736
gi|300250768|gb|GU980123.1|     AACCGTCTCTTGAAACTGGGACAAACTTTTTAAACTGATTATTTGACCTC 748
                                ********** ******* ****** ***************  *****

No.1_ITS1+ITS4                  AAATCGGGTGGGACTCCCCCTAAACTTAAGCATATCAATAGGCAGAAGAA 786
gi|300250768|gb|GU980123.1|     AAA-------------------------------------------------- 751
                                ***

No.1_ITS1+ITS4                  A 787
gi|300250768|gb|GU980123.1|     -

PLEASE NOTE: Showing colors on large alignments is slow.
```

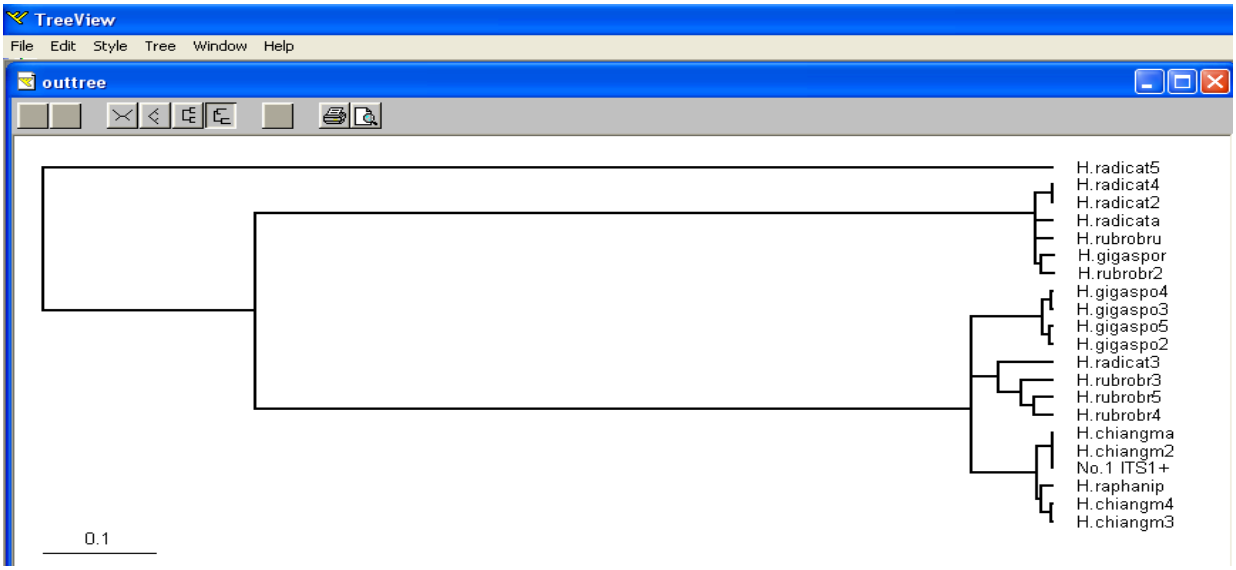
การค้นหาข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดชนิดที่มีความใกล้เคียงทาง internet





สิ่งที่ควรทราบ

1. คุณภาพลำดับเบสที่ใช้ ตรวจสอบลำดับเบส ให้ถูกต้องก่อนนำไป Blast ทำการตัดลำดับเบสส่วนต้นและท้าย (ทางปลาย 5'และ3') ที่มี N ออกก่อน จึงแก้ไขลำดับเบส) ที่มี N ภายใน การแก้ไขลำดับเบสมีโอกาสผิดพลาด 1 ใน 5,000 หรือ 1 ใน 10,000 คู่เบส แต่ข้อผิดพลาดนี้ไม่มีผลต่อการจำแนกฯ
2. ความยาวของ Sequence มีผลต่อการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์มาก
3. ควรใช้ Forward Sequence หรือ Reverse Sequence หรือต้องรวม Sequence ทั้งสองก่อนนำไป Blast พบว่า ในห้องปฏิบัติการใหญ่ๆ หลายแห่งใช้เฉพาะ Forward Sequence อย่างเดียว มีการทดสอบใช้ Forward และ reverse Sequence ของชื้อ 50 isolates นำไป Blast เพื่อจำแนกเชื้อพบว่ามีเพียง 1% ที่ให้ผลแตกต่างกัน (Clarridgc *et al*., 2001)
4. คุณภาพของ Database ผลการจำแนกเชื้อโดยวิธีนี้คุณภาพของฐานข้อมูลที่สืบค้นมีผลมากใน Gen Bank เริ่มมีการ deposit ข้อมูลลำดับเบสของ rRNA ในช่างศตวรรษที่ 1990 มีลำดับเบสที่ผิดและสับสนเป็นจำนวนมากที่มีผลต่อการสืบค้น อาจเห็น N,R,Y,W,M,S หรือ K หรือ B,D,H และV แทนที่ในตำแหน่งที่พบ 3 base ในตำแหน่งเดียวกัน
5. โปรแกรมนี้ใช้ในการสืบค้นเพื่อจำแนกเชื้อ โปรแกรม Blast เร็วกว่าแต่มีความแม่นยำน้อยกว่าโปรแกรม Needleman Nunsch algorithm พบว่าใน 500 คู่เบส Blast และ Needle man พบความแตกต่าง 1.8 และ 2.8% ตามลำดับ
6. ควรมีการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่จำแนกได้จากวิธีนี้ เปรียบเทียบกันคุณสมบัติต่างๆ หรือถ้าเป็นเชื้อ Unknown ที่ไม่รู้จักอาจใช้วิธีการทำ phylogenetic tree ดังภาพตัวอย่าง No.1 ITS1+4



เอกสารอ้างอิง

Clarridgc J.E., O. Zhomg and Heward. 2001. Abrtr.10: 1st Gen. Meet .Am. Soc. Microbial 2001. (Abslr, C-44, 2001)

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ในอดีตการจัดจำแนกชนิดและการจัดหมวดหมู่ หรือที่เรียกว่าอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ อาศัยความสัมพันธ์ของลักษณะที่แสดงออกภายนอก (phenotype) ซึ่งอาศัยลักษณะที่สำคัญบางประการ ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) เป็นการศึกษาจากลักษณะรูปร่าง และโครงสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การศึกษาลักษณะของการเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristics) ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน บางชนิดต้องการสารอินทรีย์ บางชนิดต้องการสารอนินทรีย์ เป็นต้นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ (chemical composition) ลักษณะทางเมแทบอลิซึม (metabolism characteristics) ลักษณะทางแอนติเจน (antigenic characteristics) ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ลักษณะทางนิเวศวิทยา (ecological characteristics) และที่สำคัญคือการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genetic characteristics)

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม ของจุลินทรีย์และของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีการถ่ายทอดสารพันธุกรรม (genetic material) หรือยีน (gene) จากบรรพบุรุษสู่ลูกหลาน ซึ่งในปัจจุบันการจัดจำแนกเพื่อแสดงความสัมพันธ์อาศัยลักษณะพันธุกรรม(genotype) ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ได้ถูกนำมาใช้มากขึ้นและเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย

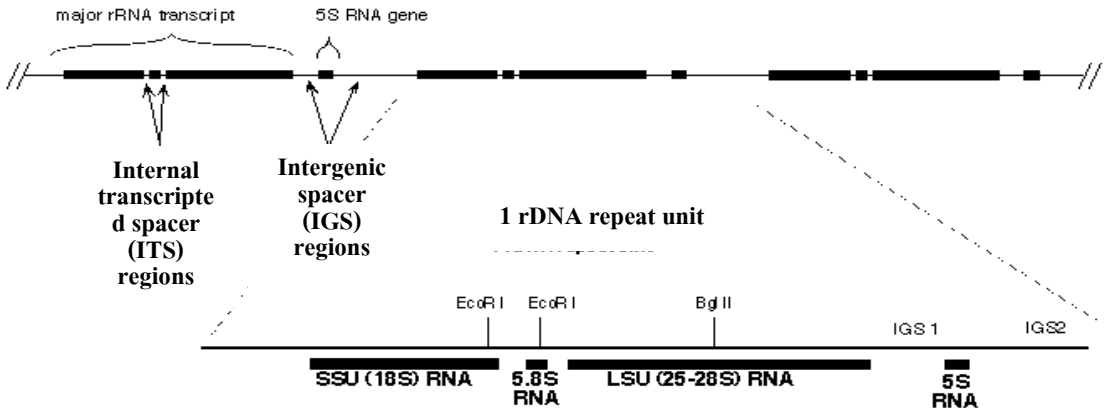
เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของของจุลินทรีย์ ได้แก่ การวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสของ DNA (DNA base composition) คือ การวิเคราะห์หาปริมาณ G+C (GC content) โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดจะมีปริมาณ G+C แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียมีปริมาณ G+C อยู่ระหว่าง 25-75 mol% โดยแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีส มีปริมาณ G+C ค่อนข้างสูง (*Streptomyces coelicolor* มีปริมาณ G+C เท่ากับ 72 mol%) ยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeast มีปริมาณ G+C อยู่ระหว่าง 27-50 mol% (*Saccharomyces cerevisiae* มีปริมาณ G+C เท่ากับ 38 mol%) ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์ในสกุลเดียวกันมีปริมาณ G+C แตกต่างกันไม่เกิน 10% และในสปีชีส์เดียวกันมีปริมาณ G+C แตกต่างกันไม่เกิน 1-2 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้วิเคราะห์ การวิเคราะห์ปริมาณ G+C ทำได้หลายวิธี เช่น thermal melt, buoyant density และ HPLC เป็นต้น และอีกวิธีการหนึ่งปัจจุบันที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลาย คือ การวิเคราะห์ลำดับ (sequence) ของนิวคลีโอไทด์เบสใน DNA ซึ่งมีความจำเพาะกับชนิดของจุลินทรีย์ โดยการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น การศึกษาความหลากหลายของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) เช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Polymerase Chain Reaction (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence analysis) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวย่อมมีข้อดี ข้อด้อยแตกต่างกันไปจึงควรเลือกใช้ให้เหมาะสม

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไรโบโซมเพื่อการจำแนกพันธุ์

ไรโบโซม (ribosome) เป็นออร์แกเนลล์ขนาดเล็ก อาจลอยอยู่เป็นอิสระหรือต่อกันเป็นสาย หรือเกาะกับเยื่อหุ้มของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100-200 อังสตรอม ไรโบโซมมี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่เกาะกับเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งพบมากในเซลล์ต่อมที่สร้างเอนไซม์ต่างๆ พลาสมาเซลล์เหล่านี้จะสร้างโปรตีนที่นำไปใช้นอกเซลล์เป็นสำคัญ และชนิดที่อยู่อย่างอิสระในไซโตพลาสซึม ไรโบโซมกระจายอยู่ทั่วไปภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์โปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ไรโบโซมมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA; rRNA) และโปรตีนไรโบโซม (ribosomal protein)

สิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอตมีไรโบโซมขนาด 70*S* (S = Svedberg unit of sedimentation coefficient ซึ่งเป็นค่าความเร็วในการตกตะกอน) ประกอบด้วยหน่วยย่อย large subunit และ small subunit ซึ่งมีขนาด 50*S* และ 30*S* ตามลำดับ โดย large subunit ประกอบด้วย 5*S* rRNA และ 23*S* rRNA รวมอยู่กับโปรตีนประมาณ 34 ชนิด สำหรับ small subunit ประกอบด้วย 16*S* rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 21 ชนิด

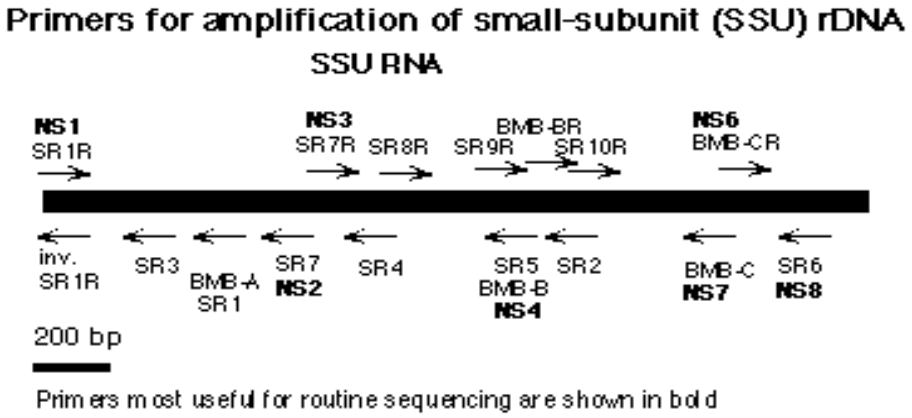
ส่วนสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตมีไรโบโซมขนาด 80*S* ประกอบด้วย large subunit และ small subunit ซึ่งมีขนาด 60*S* และ 40*S* ตามลำดับ ซึ่ง large subunit ประกอบด้วย 5*S* rRNA, 5.8*S* rRNA และ 28*S* rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 49 ชนิด สำหรับ small subunit ประกอบด้วย 18*S* rRNA รวมอยู่กับโปรตีนประมาณ 33 ชนิด (Watson *et al*., 2004) โดย ribosomal RNA gene (rDNA) มีการเรียงตัวซ้ำๆ กัน (repeated copy) แบบต่อเนื่องในลักษณะ tandem แต่ละซ้ำ (repeat unit) มีความยาวระหว่าง 7.7 ถึง 24 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน (coding region) ซึ่งเป็นส่วน 35*S* และ 5*S* โดยส่วน 35*S* จะถอดรหัสไปเป็น 18*S* rRNA, 5.8*S* rRNA และ 28*S* rRNA และบริเวณที่มีลำดับเบสแต่ไม่สามารถแปลรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน (non-coding region) ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า non-transcribed spacer (NTS) หรือ intergenic spacer (IGS) (Guarro *et al*., 1999) แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะการเรียงตัวของ ribosomal RNA gene

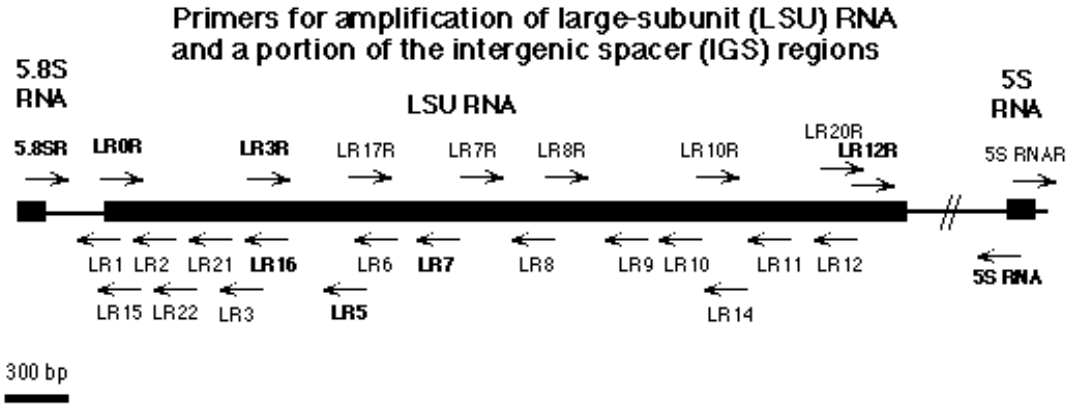
ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

ข้อมูลลำดับเบสในส่วนดีเอ็นเอไรโบโซมนั้นมีการนำมาใช้เพื่อบ่งชี้และจัดจำแนกเนื่องจากพบปริมาณมากในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และค่อนข้างเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) เนื่องจากเป็นบริเวณที่ยีนมีรหัสสำหรับสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิดต่างๆ นอกจากนี้บริเวณที่เป็น spacer ต่างๆ ซึ่งได้แก่ บริเวณ internal และ external transcribed spacers (ITS และ ETS) เป็นบริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือไม่มีรหัสสำหรับยีนใด โดย ITS มีตำแหน่งอยู่บริเวณ upstream และ downstream ของยีน 5.8*S* rDNA ซึ่งเรียกว่า ITS1 และ ITS2 เป็นส่วนที่มีความผันแปรของลำดับเบสสูง (variable region) บริเวณนี้จึงสามารถนำมาใช้แยกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกันโดยทั่วไปใช้สำหรับแยกความแตกต่างระดับชนิด (Schilling *et al*., 1996; Waalwijk *et al*., 1996; Guarro *et al*., 1999) ได้มีการศึกษาและออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนต่างๆ ดังกล่าว โดยรายละเอียดของตำแหน่งของไพรเมอร์ในแต่ละ region และลำดับการเรียงตัวของเบสของไพรเมอร์นั้นได้แสดงไว้ดังภาพที่ 2 - 5 และตารางที่ 1 - 4



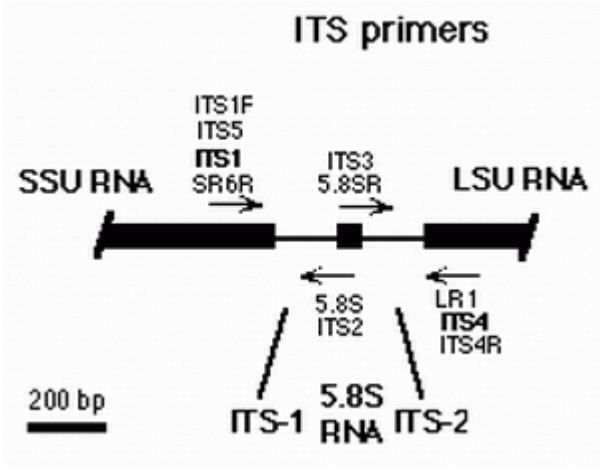
ภาพที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ small subunit (SSU)

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm



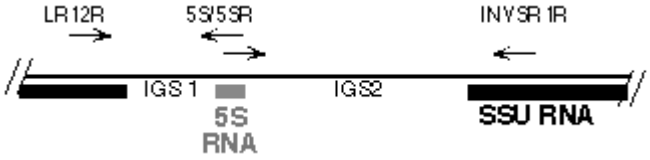
ภาพที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ large subunit (LSU)

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm



ภาพที่ 4 บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) 1 และ ITS2 ของ rDNA

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm



ภาพที่ 5 ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ intergenic spacer (IGS) รวมถึงบริเวณ 5S RNA

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

ตารางที่ 1 ลำดับการเรียงตัวของเบสของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ small subunit (SSU)

Primer name	**Sequence (5'-->3')**	**Position within *S. cereviseae* 17S RNA**
BMB-'A'	GRATTACCGCGGCWGCTG	580-558
BMB-'B'	CCGTCAATTCVTTTPAGTTT	1146-1127
BMB-'C'	ACGGGCGGTGTGTPC	1638-1624
BMB-BR	CTTAAAGGAATTGACGGAA	1130-1148
BMB-CR	GTACACACCGCCCGTCG	1624-1640
SR1R	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT	1-21
SR1	ATTACCGCGGCTGCT	578-564
SR2	CGGCCATGCACCACC	1277-1263
SR3	GAAAGTTGATAGGGCT	318-302
SR4	AAACCAACAAAATAGAA	838-820
SR5	GTGCCCTTCCGTCAATT	1146-1130
SR6	TGTTACGACTTTTACTT	1760-1744
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	1744-1763
SR7	GTTCAACTACGAGCTTTTTAA	617-637
SR7R	AGTTAAAAAGCTCGTAGTTG	637-617
SR8R	GAACCAGGACTTTTACCTT	732-749
SR9R	QAGAGGTGAAATTCT	896-910
SR10R	TTTGACTCAACACGGG	1181-1196
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	
NS	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	(similar to BMB-B)
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	(is similar to BMB-BR)
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	

BMB = "universal" SSU primers developed by Lane et al., 1985

SR = primers developed by Vilgalys lab

NS = primers described by White et al., 1990

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

ตารางที่ 2 ลำดับการเรียงตัวของเบสของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ large subunit (LSU)

Primer name	**Sequence (5'-->3')**	**Position within *S. cereviseae* rRNA**	**comments**
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	51-35 (5.8S RNA)	contains EcoRI site
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	34-51 (5.8S RNA)	contains EcoRI site
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	26-42	
LR1	GGTTGGTTTCTTTTCCT	73-57	
LR2	TTTTCAAAGTTCTTTTC	385-370	
LR2R	AAGAACTTTGAAAAGAG	374-389	
LR3	CCGTGTTTCAAGACGGG	651-635	
LR3R	GTCTTGAAACACGGACC	638-654	
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	964-948	
LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC	1141-1125	
LR7	TACTACCACCAAGATCT	1448-1432	contains BglII site
LR7R	GCAGATCTTGGTGGTAG	1430-1446	contains BglII site
LR8	CACCTTGGAGACCTGCT	1861-1845	
LR8R	AGCAGGTCTCCAAGGTG	1845-1861	
LR9	AGAGCACTGGGCAGAAA	2204-2188	
LR10	AGTCAAGCTCAACAGGG	2420-2404	
LR10R	GACCCTGTTGAGCTTGA	2402-2418	
LR11	GCCAGTTATCCCTGTGGTAA	2821-2802	
LR12	GACTTAGAGGCGTTCAG	3124-3106	
LR12R	CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA	3106-3126	
LR14	AGCCAAACTCCCCACCTG	2616-2599	
LR15	TAAATTACAACTCGGAC	154-138	
LR16	TTCCACCCAAACACTCG	1081-1065	
LR17R	TAACCTATTCTCAAACTT	1033-1050	
LR20R	GTGAGACAGGTTAGTTTTACCCT	2959-2982	
LR21	ACTTCAAGCGTTTCCCTTT	424-393	
LR22	CCTCACGGTACTTGTTCGCT	364-344	

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

ตารางที่ 3 ลำดับการเรียงตัวของเบสของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

primer name	sequence (5'->3')	comments	reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		White et al, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	(is similar to 5.8S below)	White et al, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	(is similar to 5.8SR below)	White et al, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	(is similar to SR6R)	White et al, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA		Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG		Gardes & Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG		Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG		Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG		Vilgalys lab

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

ตารางที่ 4 ลำดับการเรียงตัวของเบสของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ intergenic spacer (IGS) รวมถึงบริเวณ 5S RNA

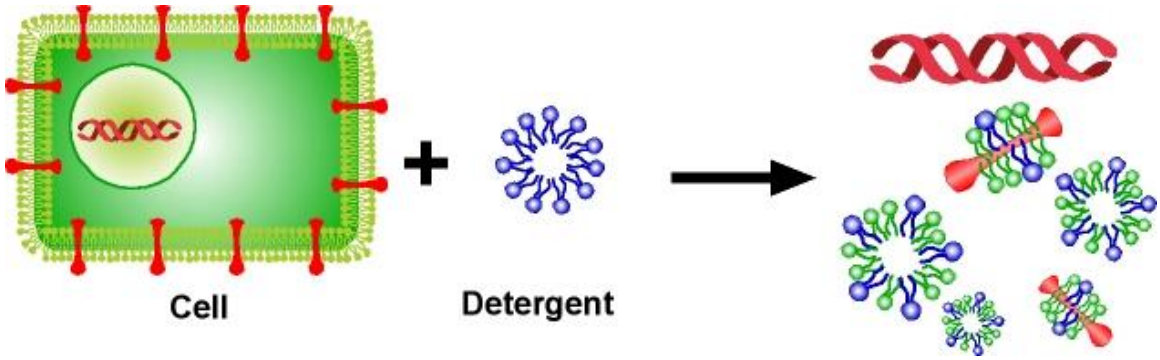
primer name	sequence (5'->3')	comments	reference
LR12R	GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC	located within the LSU RNA (see above)	Vilgalys lab
invSR1R	ACTGGCAGAATCAACCAGGTA	located within the SSU RNA (positions 21-1)	Vilgalys lab
5SRNA	ATCAGACGGGATGCGGT	(complementary to 5S RNA positions 46-26)	Vilgalys lab
5SRNAR	ACQGCATCCCGTCTGAT	(5S RNA positions 26-46)	Vilgalys lab

ที่มา : http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

การสกัดดีเอ็นเอ

การแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยขั้นตอนโดยทั่วไป คือ

1. การทำให้เซลล์แตก อาจใช้โกร่งบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวหรือสารประกอบจำพวกdetergent เช่น cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) หรือ sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อย่อยผนังเซลล์ เอนไซม์ protinase K ช่วยย่อยโมเลกุลของโปรตีนที่หลุดออกจากเซลล์และผนังเซลล์ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงกลไกการทำงานของ detergent ในการทำให้เซลล์แตก
ที่มา : http://gslc.genetics.utah.edu/basic/lesson/dna/howto/index.htm

2. การแยกกรดนิวคลีอิกออกจากโปรตีนขนาดเล็กและสารประกอบที่ปะปนโดยการเติมฟีนอล และคลอโรฟอร์ม ซึ่งสารทั้งสองชนิดจะช่วยทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและตกตะกอนแยกออกจากดีเอ็นเอ

3. การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วนเอธิลแอลกอฮอร์ (เอธานอล) หรือ ไอโซโพรพานอล ซึ่งการตกตะกอนจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส) และมี monovalent cation (NH_4^+, K^+, Na^+) อยู่ในสารละลายนั้นด้วย เมื่อนำไปหมุนเหวี่ยงดีเอ็นเอก็จะตกตะกอนอยู่ก้นหลอด ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้สามารถละลายด้วยน้ำหรือบัฟเฟอร์ เพื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอต่อไป

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

Electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการแยกสารชีวโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันโดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันบางประการของโมเลกุลในการแยก เช่น ขนาด รูปร่าง ประจุ เป็นต้น ในการเคลื่อนที่ของสารให้แยกออกจากกันต้องอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและตัวกลางชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการแยกวิเคราะห์และทำให้สารบริสุทธิ์ได้ เมื่อทำการแยกแล้วสามารถตรวจดูตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ ได้ด้วยการย้อมสีหรือ enzymes เป็นต้น

Agarose gel electrophoresis

Agarose gel electrophoresis เป็นวิธีมาตรฐานในการแยกวิเคราะห์ DNA หรือ RNA ที่มีประจุลบใน pH ของบัฟเฟอร์ที่ค่อนข้างเป็นด่างเล็กน้อย จะเคลื่อนที่ไปยัง anode (ขั้วไฟฟ้าบวก) DNA หรือ RNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก ทำให้สามารถแยกได้ตามขนาด การติดตามตำแหน่งของแถบ DNA หรือ RNA หลังจาก electrophoresis มักนิยมย้อม agarose ด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูด้วยแสง ultraviolet จะเห็นแถบ DNA มีแสงวาวสีส้ม วิธีนี้สามารถตรวจหา DNA ปริมาณต่ำๆ ได้

Agarose เป็นสารที่แยกมาได้จากผนังเซลล์สาหร่ายทะเล เป็นสาร polysaccharide ซึ่งประกอบด้วย galactose และอนุพันธ์ของ galactose สาย agarose จะพันไขว้กัน (crosslinked) ทำให้เจลมีลักษณะเป็นรูพรุน ในท้องตลาดมีขายหลายชนิดและหลายเกรดขึ้นกับงานที่ใช้ ซึ่ง agarose gel นิยมใช้ในการศึกษาและวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก เนื่องจาก agarose ไม่เป็นพิษ และขนาดรูพรุนที่เกิดขึ้นมีความสม่ำเสมอ แต่ก็มีข้อจำกัดคือ มีความเปราะเมื่อเตรียมที่ความเข้มข้นสูง และยากต่อการเคลื่อนที่เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้นต่ำ โดยทั่วไปนิยมเตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.3-2 เปอร์เซ็นต์ และเทให้ gel มีความหนาประมาณ 2-3 mm ซึ่งความเข้มข้นต่ำหรือสูงกว่านี้จะทำให้ยากต่อการใช้งาน และขนาดของกรดนิวคลีอิกที่ต้องการศึกษาจะเป็นตัวกำหนดความเข้มข้นของ agarose gel เช่น การแยก genomic DNA ควรใช้ความเข้มข้นต่ำ (0.8-1 เปอร์เซ็นต์) เพราะ DNA มีขนาดโมเลกุลใหญ่ หลักทั่วๆไปคือ DNA ชิ้นเล็กให้ใช้เจลความเข้มข้นสูง กรณีของ PCR product ที่มีหลายขนาดความยาวปะปนกันให้ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของ agarose gel

Agarose gel ที่นิยมใช้ในปัจจุบันมี 2 ชนิด ดังนี้

1. regular agarose ถ้าใช้ในงานตรวจสอบดูแถบชิ้น DNA คร่าวๆ (general screening) สามารถใช้พวก standard low-endoosmotic agarose ได้ แต่ถ้าต้องการความบริสุทธิ์มากๆเนื่องจากต้องสกัด DNA จาก gel และนำไปศึกษาต่อก็ควรใช้ ultra pure agar ซึ่งจะไม่มีสารที่ยับยั้งการทำงานของ restriction enzyme และยังช่วยให้ DNA ที่ย้อมด้วย ethidium bromide ยังคงอยู่ได้นาน เมื่อตรวจดูด้วยแสง ethidium bromide ทำให้ความไวของการตรวจเพิ่มขึ้น

2. melting หรือ low gelling agarose เป็น agarose ที่มีจุดหลอมละลายที่ 62-65 องศาเซลเซียส และจะแข็งเมื่ออยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 นาที และเมื่อละลายแล้วจะคงอยู่ในภาวะเหลวที่ 37 องศาเซลเซียส ได้อีกนานหลายชั่วโมง การใช้ agarose ประเภทนี้มีประโยชน์ในแง่ที่ว่า

- สามารถตัดชิ้น DNA ด้วย restriction enzyme ได้โดยตรงหลังจากทำ electrophoresis แล้ว โดยละลายเจลในส่วนที่มี DNA อยู่ และอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับตัด DNA ด้วย enzyme แล้วนำไป run gel electrophoresis ในเจลแผ่นใหม่ได้
- สามารถแยกชิ้น DNA จากเจลโดยไม่ต้องผ่านขบวนการ electroelution หรือทำลายเจล และยังทำให้ DNA บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี phenol-chloroform extraction ที่อุณหภูมิที่เจลหลอมละลาย (65 องศาเซลเซียส) ได้เลย

การเคลื่อนที่ของ DNA

การเคลื่อนที่ของ DNA ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1. ขนาดและรูปร่างของ DNA ขนาดของ DNA กำหนดโดยใช้จำนวนของ nucleotide หรือจำนวนคู่ของเบสเป็นสิ่งบ่งบอก เช่น มีขนาด 4,500 bp (base pair) โดย DNA ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ผ่าน pore ได้เร็วกว่าโมเลกุลใหญ่ ในกรณีที่ DNA มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน DNA ที่มีรูปแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalently closed circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าDNA ปลายเปิดแบบเส้นตรง (linear) และ DNA แบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนเปิด (open circular หรือ nick circular) ซึ่งจะพบรูปแบบของ DNA เหล่านี้ในการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย ส่วนผลผลิต PCR ซึ่งเป็น DNA สายคู่เส้นตรง หากนำมาแยกให้เป็น DNA สายเดี่ยวด้วยความร้อน DNA สายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (non-denaturing condition) จะมีการขดหรือจับกันระหว่างเบสคู่สมภายในโมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้าง (conformation) จำเพาะ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเบสและความยาวของ DNA สายเดี่ยวนั้นๆ

2. ความเข้มข้นของ agarose gel ความเข้มข้นของ agarose gel ต่ำ รูพรุนจะมีขนาดใหญ่ การเคลื่อนที่ของ DNA ก็จะสูง ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ agarose gel ความเข้มข้นสูงๆ ขนาดของรูพรุนจะเล็กกว่า การเคลื่อนที่ของ DNA จะช้าลง ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราการเคลื่อนที่ของ DNA ใน agarose ขึ้นกับความเข้มข้นของ agarose (ตารางที่ 5)

3. ความต่างศักย์ไฟฟ้า การแยกขนาด DNA โดย วิธี electrophoresis ต้องใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้ค่าสูงเกินไป DNA เคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี ในขณะที่ค่าต่ำเกินไป DNA จะเคลื่อนที่ได้ช้ามีการแยกตัวดีแต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัดเพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของ DNA ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA โดย โมเลกุล DNA แบบ linear มีอัตราการเคลื่อนที่แปรผันตรงกับค่าความต่างศักย์ แต่ถ้าค่าความต่างศักย์สูงขึ้นโมเลกุล DNA ขนาดใหญ่จะมีอัตราการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นมากกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก

4. บัฟเฟอร์ (buffer) ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด

1) TAE (Tris-acetate EDTA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ ใช้ได้ทั่วไปและใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำ DNA กลับมาใช้อีก เช่น ติดฉลาก (labeling) DNA เพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบ (probe) หรือการโคลนย่อย (sub-cloning) ต่อไป แต่ TAE มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ต่ำจึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำ electrophoresis เป็นเวลานาน หรือนำมาหมุนเวียน (recirculation) ใช้หลายๆ ครั้ง การจะเก็บบัฟเฟอร์นี้ให้ได้นานต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ก่อน และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพราะมิฉะนั้นจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตได้

2) TBE (Tris-borate EDTA) มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง แถบ DNA ที่แยกได้จะคมชัดและเล็ก เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้น 10 เท่า สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโต เนื่องจากมี boric acid เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อ

3) TPE (Tris-phosphate EDTA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง ให้แถบ DNA ชัดเจนเช่นเดียวกับ TBE แต่สารละลาย 10 เท่า จุลินทรีย์ยังสามารถเจริญได้และไม่ค่อยนิยมในงานทั่วไป

การเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 1 เท่า หรือ 0.5 เท่า บัฟเฟอร์นอกจากจะช่วยรักษาระดับ pH แล้วยังให้ประจุ (ion) เพื่อการนำไฟฟ้า (conductivity) หากใช้น้ำแทนบัฟเฟอร์ในการทำ electrophoresis DNA จะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ การใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่ำทำให้ลดค่าใช้จ่ายและลดความร้อนในขณะทำ electrophoresis หากใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้นสูง เช่น 10X จะเกิดความร้อนจนอาจละลาย gel ได้ กรณีที่ต้องการนำDNA กลับมาใช้อีกควรเปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาจาก DNA ปนเปื้อน

ตารางที่ 5 ช่วงขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอที่แยกได้โดย agarose gel และ polyacrylamide gel

Agarose gel (%w/v)	Range of separation (bp)	Aacryramide (%w/v)	Range of separation (bp)
0.3	5,000 - 60,000	3.5	1,000-2,000
0.6	1,000 - 20,000	5.0	80-500
0.7	800 - 10,000	8.0	60-400
0.9	500 - 7,000	12.0	40-200
1.2	400 - 6,000	15.0	25-150
1.5	200 - 4,000	20.0	6-100
2.0	100 - 3,000		

ที่มา : Sambrook และคณะ (1989)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการ run electrophoresis

1. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ให้กระแสไฟฟ้าเป็นกระแสตรง และใช้แยกชิ้น DNA เพียงงานเดียวมักใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ขนาด 500 volt/200 mA ดังภาพที่ 7 ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงๆ คือ งานวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ขึ้นอยู่กับเครื่องมือของแต่ละบริษัท แต่โดยทั่วไปต้องใช้เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ากำลังสูงถึง 2,000 volts

2. กล่องใส่บัฟเฟอร์และขั้วไฟฟ้า ประกอบด้วยกล่องใส่บัฟเฟอร์ซึ่งก็คือ gel chamber มี 2 ส่วน เชื่อมต่อกัน (ภาพที่ 8) โดยอาศัยบัฟเฟอร์และ gel ที่เป็นตัวกลาง เมื่อต่อกับกระแสไฟฟ้าขั้วหนึ่งของ chamber จะต่อเข้ากับขั้วไฟฟ้าลบและอีกขั้วหนึ่งจะต่อเข้ากับขั้วไฟฟ้าบวก

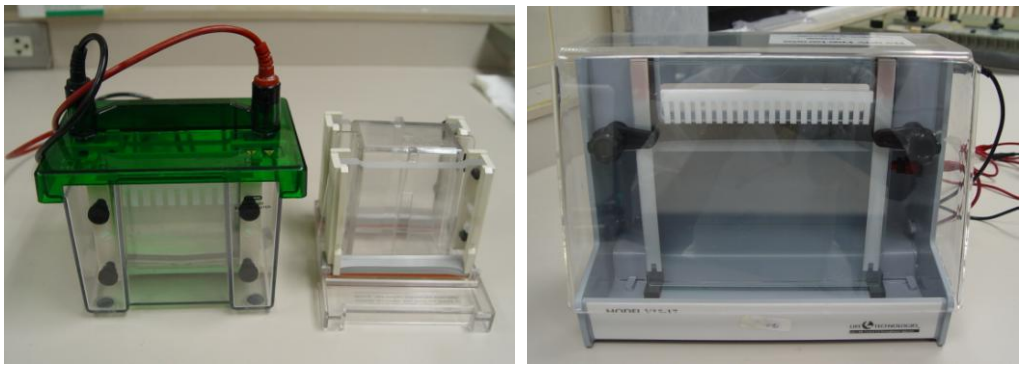
ขนาดของ gel ที่ใช้ขึ้นกับชนิดของงานที่ต้องการ ถ้าต้องการวิเคราะห์แถบ DNA น้อยแถบและขนาดของโมเลกุลต่างกันมากก็สามารถใช้ gel ขนาดเล็กได้ แต่ถ้ามีแถบที่ต้องการศึกษาและวิเคราะห์มากและขนาดใกล้เคียงกันก็อาจต้องใช้ gel ขนาดยาวขึ้น โดยเฉพาะเมื่อต้องการแยกแถบ DNA นั้นมาทำให้บริสุทธิ์

การ run electrophoresis ในลักษณะนอนมักต้องเท gel ลงใน plastic plate ขนาดต่างๆ ก่อนส่วนการ run ในลักษณะตั้งมักต้องเท gel ในระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นที่ประกอบและปล่อยให้ gel เกิดการ polymerize แล้วจึงจะนำมาใช้ได้

เครื่อง gel electrophoresis

อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยก gel electrophoresis มี 2 รูปแบบ ดังนี้

1. แบบแนวตั้ง (vertical) (ภาพที่ 7)



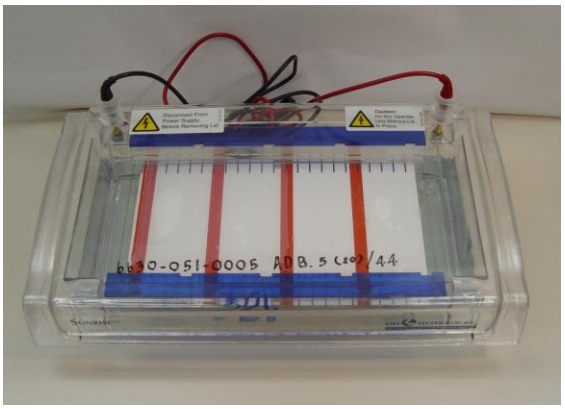
ภาพที่ 7 เครื่อง electrophoresis แบบแนวตั้ง (Vertical)

2. แบบแนวนอน (horizontal)

เป็นที่นิยมใช้กันมาก โดยใช้กับ agarose slab gel เนื่องจากมีข้อดีคือ สามารถใช้กับ agarose gel ที่มีความเข้มข้นของ gel ต่ำๆ ได้ เนื่องจากมี gel supporter และง่ายต่อการเคลื่อนย้าย และนอกจากนี้มีความทน และราคาของชุดอุปกรณ์ไม่แพงสามารถประกอบใช้เองได้ (ภาพที่ 8)

สนามไฟฟ้าเกิดจากการปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านลวดทองคำขาว (platinum) ซึ่งแช่ใน electrophoresis buffer วัสดุที่ใช้ทำเป็นกล่องบรรจุ buffer อาจทำด้วยพลาสติกแข็งที่มีชื่อทางการค้าเรียกว่า Plexiglass® gel supporter หรือ gel mold ทำด้วย Plexiglass® ที่มีลักษณะเป็นถาดสี่เหลี่ยม ช่องสำหรับหยอดสารตัวอย่าง (gel slot หรือ well) เกิดจากการจุ่มหวี (comb) ใน agarose gel ที่หลอม และเมื่อ gel แข็งตัว ถอดหวีออก

ในงาน DNA และ RNA มักนิยมในระบบ horizontal gel ส่วนโปรตีนนิยมระบบ vertical gel อย่างไรก็ตาม การ run ทั้งโปรตีนและ DNA จะเลือกแบบใดก็ได้ขึ้นกับงานที่ทำและความเหมาะสม แต่ในการแยก DNA หรือ RNA นิยมใช้ agarose gel แช่อยู่ในบัฟเฟอร์ในลักษณะ horizontal submarine gel



ภาพที่ 8 เครื่อง electrophoresis แบบแนวนอน (Horizontal)

การย้อม DNA ที่อยู่ใน agarose gel

Ethidium bromide เป็นสีย้อมที่นิยมใช้ย้อม DNA จาก agarose gel มากที่สุด โดยโมเลกุลของ ethidium bromide จะเข้าไปจับกับเบสคู่สมของ DNA เกลียวคู่โดยการ intercalate

การย้อม agarose ด้วย ethidium bromide โดยทั่วไปมี 2 วิธีคือ แช่ agarose gel ลงใน ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15-30 นาที ขึ้นกับความเข้มข้นของเจล จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำเพื่อขจัด ethidium bromide ที่ไม่จับกับ DNA ออก และอีกวิธีหนึ่งคือเติม ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงในเจลและบัฟเฟอร์โดยตรง เนื่องจาก ethidium bromide เป็น mutagen จึงต้องสวมถุงมือเสมอขณะทำการทดลอง

การตรวจดูแถบ DNA

การตรวจดูแถบ DNA หลังย้อมด้วย ethidium bromide ทำโดยใช้แสง ultraviolet ความยาวคลื่นต่ำๆ เพราะ DNA และ ethidium bromide มีความสามารถในการดูดแสงความยาวคลื่น 300-360 นาโนเมตร และปล่อยแสงสีส้ม (fluorescent radiation) ออกมาที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ปัจจุบันมีเครื่องกำเนิดแสง ultraviolet จำหน่ายจากหลายบริษัท ทั้งที่เป็นลักษณะที่แสงส่องมาจากด้านบนของเจล (incident light) และแสงส่องจากด้านล่างของเจล (transmitted light) ซึ่งเครื่องที่มีลักษณะแบบ transmitted light มักมีลักษณะเป็นกล่องและมีหลอด ultraviolet อยู่ภายใน บางครั้งเรียกเครื่องนี้ว่า UV transillumitor

ประโยชน์ในการทำ agarose gel electrophoresis

1. ทราบถึงปริมาณและขนาด DNA ในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกัน DNA ที่ทราบขนาดและน้ำหนักโมเลกุล

2. สามารถแยกเอา DNA ที่ต้องการศึกษาต่อและทำให้บริสุทธิ์ได้ โดยทำให้ DNA เคลื่อนที่ออกจากเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroelution) หรืออาจทำให้ DNA ออกจากเจล โดยใช้ low melting temperature agarose ก็ได้

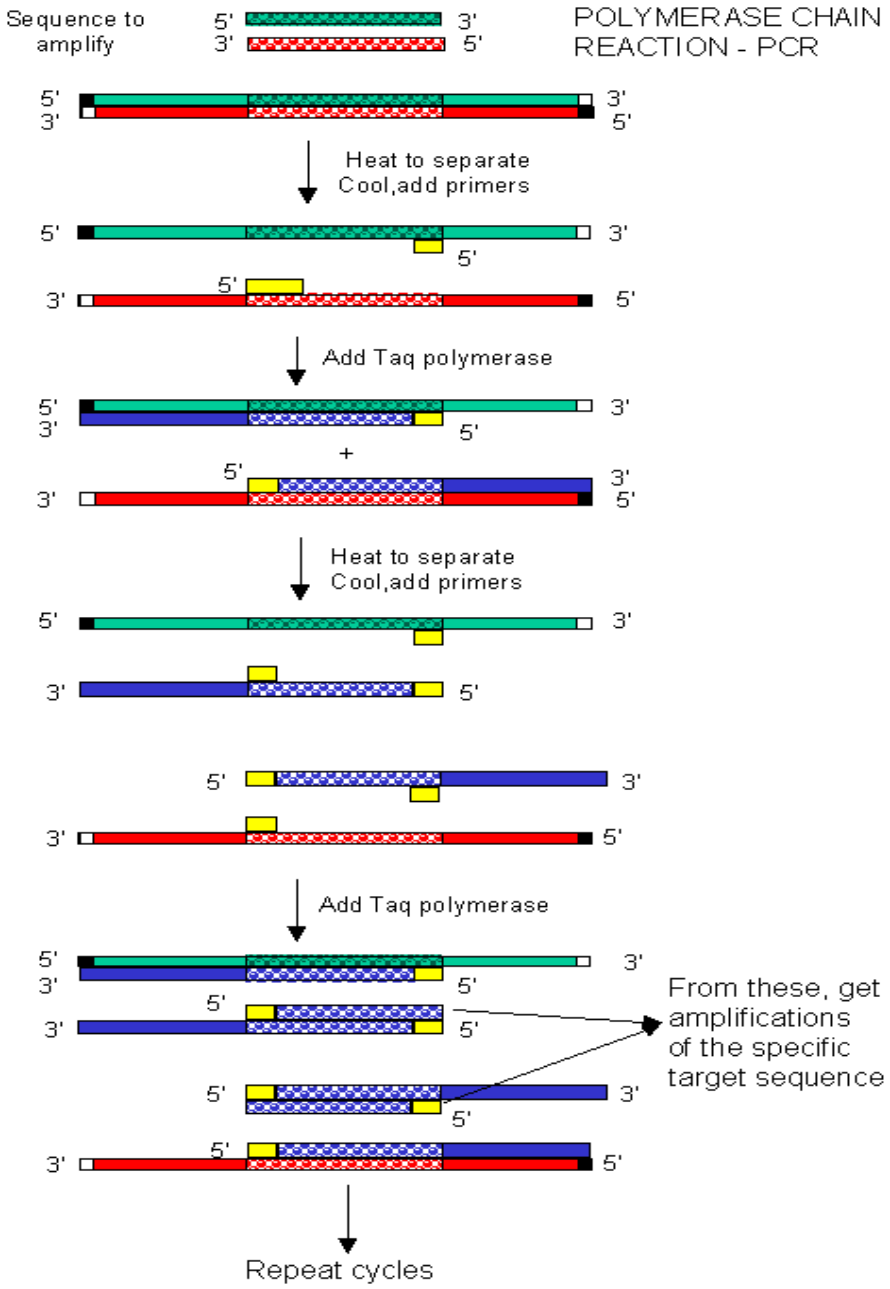
3. ใช้เป็นพื้นฐานในการตรวจหา DNA ที่ต้องการศึกษาโดยสามารถนำไปใช้ในการทำ Southern blotting หรือ PCR เป็นต้น

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส หรือพีซีอาร์ จัดเป็นความก้าวหน้าทางเทคนิคเกี่ยวกับอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetics) ที่สำคัญที่สุดเทคนิคหนึ่ง โดยในปี ค.ศ. 1983 แครี่ มัลลิส เป็นผู้ค้นพบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยบังเอิญ ซึ่งในขณะนั้นเป็นนักวิทยาศาสตร์ของบริษัทซีตัส แห่งมลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา พีซีอาร์ เป็นปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะในหลอดทดลองที่อาศัยการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมเบสที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ มีไพรเมอร์เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ยาวประมาณ 10-30 นิวคลีโอไทด์ ต่อ 1 เส้น หรือ 1 คู่ เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอ และมีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นแม่แบบ

หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ อาศัยคุณสมบัติทางเคมีของสายดีเอ็นเอ และอาศัยคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาสร้างสายดีเอ็นเอของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสโดยการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันด้วยความร้อน และเมื่อทำให้เย็นลงสายดีเอ็นเอที่มีลักษณะเบสเข้าคู่ หรือ คู่สมกัน (complementary) จะมาจับกัน ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ (สายเดียว) ทำหน้าที่เป็นสายเริ่มต้น(primer) ท่อนสั้นๆ ที่สร้างขึ้นให้มีลักษณะการเรียงตัวกันของเบสสอดคล้องกับบริเวณปลายทั้ง 2 ข้างของสานดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีไพรเมอร์ 2 สายที่มีเบสเข้าคู่กับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายโดยพันธะไฮโดรเจนและมีปลาย 3′ ในทิศทางเข้าหากัน (ภาพที่ 9) ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ลำดับเบสที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ทั้งสองมีความสำคัญโดยจะต้องมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ ดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ปลาย 5′ ของไพรเมอร์ไม่จำเป็นจะต้องมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบอย่างสมบูรณ์ก็ได้ โดยปกติปฏิกิริยาขยาย (extension) ของสายดีเอ็นเอสามารถเกิดขึ้นได้เองแต่มีความเร็วต่ำมากเมื่อเติมเอนไซม์โพลิเมอเรสปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก (ประมาณ 60 เบส/วินาที) ระยะเวลาที่ไพรเมอร์ใช้จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นเพียง 30 วินาทีก็เพียงพอ ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างหรือขยายดีเอ็นเอนั้นขึ้นอยู่กับความยาวของท่อนดีเอ็นเอที่จะขยาย การขยายท่อนดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะไม่เกิน 2 กิโลเบส ดังนั้นเวลาที่ใช้สำหรับช่วงขยายในแต่ละช่วงขึ้นอยู่กับความยาวของช่วงที่จะขยาย โดยความยาวไม่เกิน 2 กิโลเบสจะใช้เวลาเพียง 1 นาที ก็เพียงพอ



ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา: http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/oldnalanguage.html

ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังนี้

ขั้นแรก เรียกว่า denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปในขั้น denaturation จะใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เพียง 30 วินาที แต่ในปฏิกิริยารอบแรกควรใช้เวลานานกว่า คือ 1-2 นาที เพื่อให้

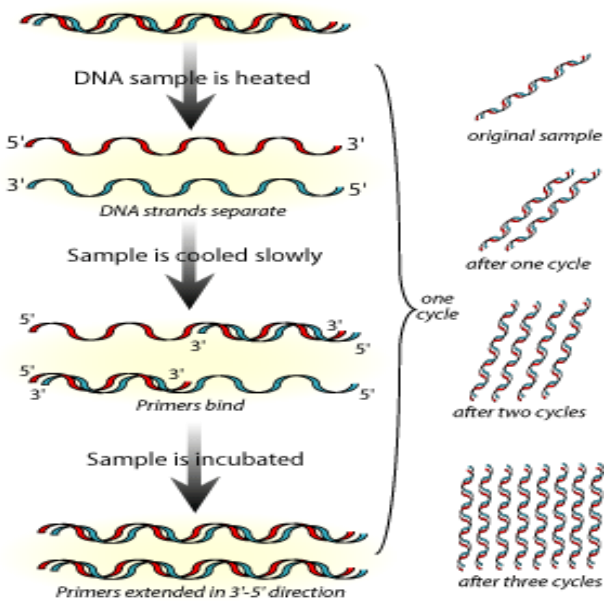
ดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) แยกเป็นสายเดี่ยวหรือเสียสภาพได้อย่างสมบูรณ์ แต่ดีเอ็นเอต้นแบบบางชนิดอาจต้องการอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อให้เกิดการแยกเป็นสายเดี่ยวที่สมบูรณ์ เช่น ดีเอ็นเอที่มีองค์ประกอบเป็น G+C สูง ควรเพิ่มเวลาหรือเพิ่มอุณหภูมิในการทำให้แยกเป็นสายเดี่ยว บางครั้งอุณหภูมิในหลอดทดลองอาจไม่สูงเท่าอุณหภูมิที่เครื่องแสดง ดังนั้นจึงต้องเพิ่มอุณหภูมิให้เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวกลับมาจับคู่กัน โดยการลดอุณหภูมิลงให้อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 17-24 เบส) ที่มีลำดับเบสเบสเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดเกิดขึ้นแบบสุ่มขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไพรเมอร์ และการมีตำแหน่งให้ไพรเมอร์เกาะอย่างเพียงพอ การมีตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะได้ไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดการแข่งขันกับตำแหน่งที่แท้จริง โดยเมื่อลดอุณหภูมิลงจากขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวไพรเมอร์จะเคลื่อนไหวอยู่อย่างอิสระในปฏิกิริยา และเกิดพันธะกับดีเอ็นเอต้นแบบเมื่ออุณหภูมิลดลงเรื่อยๆ และจะเกิดสมดุลอุณหภูมิหนึ่ง คือ T_m (T_m คือ อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิสูงกว่าค่า T_m ไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้น้อย ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่า T_m ไพรเมอร์จะเกาะได้อย่างสมบูรณ์ที่ตำแหน่งที่ถูกต้อง แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำลงมากไพรเมอร์จะเกาะตำแหน่งที่ไม่ถูกต้องได้ด้วย นอกจากนี้ดีเอ็นเอในเซลล์ที่มีชุดซ้ำจำนวนมากก็จะกลับมาจับกันได้อย่างรวดเร็ว และจะขัดขวางการจับตัวระหว่างไพรเมอร์กับตำแหน่งเป้าหมาย โดยทั่วไปในการปรับประสิทธิภาพของปฏิกิริยาจะเริ่มทดลองทำพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิที่ T_m-5 องศาเซลเซียส และปรับโดยเพิ่มหรือลดอุณหภูมิครั้งละ 2 องศาเซลเซียส จนเลือกได้อุณหภูมิที่เหมาะสมคือได้ผลผลิตที่ถูกต้องปริมาณมาก สำหรับเวลาที่ใช้ในขั้นนี้โดยทั่วไปใช้ประมาณ 30-60 วินาที

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 3’ ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ *Taq* polymerase จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ประมาณพันเบสต่อนาที ดังนั้นถ้าผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหมายมีขนาดน้อยกว่า 500 คู่เบส จะใช้เวลาประมาณ 30 วินาที ถ้าผลผลิตมีขนาดอยู่ระหว่าง 500-1500 คู่เบสจะใช้เวลา 60 วินาที และถ้าผลผลิตขนาดยาวกว่า 1500 คู่เบสจะใช้เวลา 90 วินาที โดยเฉลี่ยใช้เวลาเพิ่มขึ้นประมาณ 1 นาทีต่อผลผลิตที่มีขนาดเพิ่มขึ้น 1000 คู่เบส

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมาก แม้ตัวอย่างที่นำมาศึกษามีปริมาณสารพันธุกรรมน้อยมาก เราก็สามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวนได้หลายเท่าทวีคูณ ลักษณะการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาเป็นแบบ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำๆ กัน (denaturation-annealing-extension) 25 รอบ จะได้ดีเอ็นเอชุดใหม่จำนวน 2^{25} ชุด หรือประมาณ 34

ล้านเท่าของปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (ภาพที่ 10) แต่หากคำนึงถึงประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ (efficiency factor) ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา จำนวน copy ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (Y) = $X(1+efficiency)^n$ โดย X = จำนวน copy ของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ใส่ในปฏิกิริยา และ n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ขึ้นกับปริมาณเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยทั่วไปจะใช้ 30-35 รอบ หรือไม่เกิน 40 รอบ จำนวนรอบมากกว่า 40 รอบอาจทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริงเพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 10 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา : http://www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and-nutraceuticals/

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา (PCR buffer)

โดยทั่วไป PCR buffer ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ (mM) KCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 ที่อุณหภูมิห้อง บัฟเฟอร์นี้ช่วยให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ดำเนินไปได้ดีในสภาพ pH และ ionic strength ที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อ melting temperature (T_m= อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างสายผสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ และมีผลต่อ ฟannealing temperature (อุณหภูมิที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาจับคู่กัน) สารเคมี เช่น DMSO (dimethyl sulfoxide) และ glycerol นิยมใส่ในปฏิกิริยา เมื่อดีเอ็นเอเป้าหมายมีค่า T_m สูง บริษัทผู้ขายมักจะให้ PCR buffer มาพร้อมกับเอนไซม์ *Taq* polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10X buffer) ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

2. ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs)

ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 mM โดยอาจซื้อสำเร็จหรือซื้อแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นชนิดละ 100 mM แล้วจึงนำมารวมกันให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM)

3. ไพรเมอร์ (Primer)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งที่จำเพาะ จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่บริเวณนั้นๆ พอที่จะสามารถพัฒนาไพรเมอร์ 2 สายที่มีเบสเข้าคู่กับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยปลาย 3′ ของไพรเมอร์ทั้งสองมีทิศทางเข้าสู่ส่วนที่ต้องการสังเคราะห์ ไพรเมอร์ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 18-25 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ และมีการกระจายของทั้ง 4 นิวคลีโอไทด์ในแต่ละไพรเมอร์อย่างสม่ำเสมอ โดยปลาย 3′ ของไพรเมอร์ควรเป็น G หรือ C ไพรเมอร์ทั้ง 2 สายที่ใช้คู่กันควรมีค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกันโดยต่างกันไม่ควรเกิน 5 องศาเซลเซียส การคำนวณค่า T_m ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์สามารถคำนวณโดยประมาณได้จากสูตร $T_m = [4 \times (G+C)] + [2 \times (A+T)]$ โดย G, C, A และ T คือจำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิสำหรับ Annealing จะใช้ประมาณ T_m ±5 องศาเซลเซียส ลำดับเบสที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์หนึ่งไม่ควรเป็นคู่สมกับบริเวณใดๆของอีกไพรเมอร์หนึ่งในปฏิกิริยาเดียวกัน ปลาย 3′ ของไพรเมอร์มีความจำเป็นต้องเป็นคู่สมอย่างสมบูรณ์กับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณเพื่อให้การเพิ่มปริมาณเกิดขึ้นจำเพาะกับลำดับเบสหนึ่งเดียวเท่านั้น หรือที่เรียกว่า “Allele-specific PCR” ไม่ควรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำแบบกลับ (inverted repeats) หรือมีคู่สมกันภายในไพรเมอร์เดียวกัน (self-complementary sequences) มากกว่า 3 เบส การออกแบบไพรเมอร์อาจทำโดยดูจากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เมื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์แล้ว นำมาละลายในน้ำหรือ TE (Tris-EDTA) buffer ให้มีความเข้มข้น 5 pMol/μl (5 μM) ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 0.1-2.0 μM

4. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากคราบเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟิน แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะได้ผลผลิตดีและมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5 -500 ng โดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ในช่วง 10-50 ng ต่อปฏิกิริยา

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

อาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหากเพื่อให้ปรับใช้ได้ในปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส และมีผลต่อปฏิกิริยา PCR มาก ความเข้มข้นที่เหมาะสมมีผลทำให้แมกนีเซียม

ไอออนจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตที่อยู่ในปฏิกิริยาทำงานได้ดี ทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ดี หากความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนน้อยเกินไปปฏิกิริยาจะไม่เกิดขึ้นหรือเกิดได้ไม่ดีทำให้เกิดผลผลิตต่ำ หรือถ้ามีแมกนีเซียมไอออนมากเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ใช้เป้าหมายที่แท้จริงมากขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยาโดยทั่วไป คือ 1.5 mM ส่วนที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอต้นแบบและคู่ไพรเมอร์ในแต่ละปฏิกิริยาสามารถหาได้จากช่วง 1.5-4 mM โดยเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{+2} ครั้งละ 0.5 mM นอกจากนี้สารหรือส่วนผสมของ TE buffer ที่ใช้ละลายดีเอ็นเออาจมีผลทำให้ลดความเข้มข้นของ Mg^{+2} ในปฏิกิริยาลง ได้แก่ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)

6. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase)

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้ควรเลือกใช้ชนิดที่ทนความร้อนได้ดี (Thermostable DNA polymerase) เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT 1 ที่เจริญในน้ำพุร้อน ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 7.3-8.3 เอนไซม์ชนิดที่ 2 แยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* เช่นเดียวกัน เป็นชนิดที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันเนื่องจากมีราคาถูก แม้ว่าจะมีอัตราการสังเคราะห์เบสผิดพลาดสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น มีชื่อเรียกคือ *Taq* polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ต่อมาได้มีการตัดโพลีเพพไทด์ของเอนไซม์นี้ออกไปบางส่วน ทำให้ทนความร้อนได้มากขึ้นเรียกว่า stoffel fragment สามารถทำงานได้ในช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนที่กว้างขึ้น มีเอนไซม์อีกหลายชนิดได้ถูกแยกจากแบคทีเรียต่างๆ แม้ว่าเอนไซม์เหล่านี้จะมีความหลากหลายในโครงสร้างแต่พบว่าทุกชนิดประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงสายเดียว (monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 60.3-100 กิโลดาลตัน (kD)

การเลือกใช้เอนไซม์ในการทำพีซีอาร์ เบื้องต้นจะพิจารณาจากความสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ยาวมากน้อยเพียงใดจากการเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละครั้ง (processivity) และความถูกต้องในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (fidelity) *Taq* polymerase ซึ่งไม่มี 3′->5′ exonuclease proofreading มีอัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาดเท่ากับ 2×10^{-5} ในขณะที่ *Pfu* polymerase มีอัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาดเท่ากับ 1.6×10^{-6} ในการทำพีซีอาร์เพื่อการวิเคราะห์ผลทางคุณภาพอาจเลือกใช้เอนไซม์ชนิดใดก็ได้ แต่ถ้าต้องการความถูกต้องสูง เช่น การทำพีซีอาร์เพื่อการโคลนยีน การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียว ควรเลือกใช้เอนไซม์ที่มีระบบการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดคือ มี 3′->5′ exonuclease proofreading (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสทนความร้อนบางชนิด

Enzymes(From Organisms)	Molecular	Reaction Conditions				Exonuclease		References
	Mass	Mg^{+2}	K^{+}	pH	Temp.	Activity		
	(kD)	(mM)	(mM)		(ºC)	5'->3'	3'->5'	
Bst (Bacillus stearothermophilus)	95	10-30	100-200	8-9	60-65	-	-	Stenesh and Roe (1972)
Pfu (Pyrococcus furiosus)*	92	1.5-8	10	8-9	70-80	+	+	Lundberg *et al.* (1991)
Pwo (Pyrococcus woesei)*	90	2	n.d.	n.d.	70-80	+	+	
Mth(Methanobacterium thermoautotrophicum)	72	10-20	100-300	7-9	65	+	+	Klimczak *et al.* (1986)
Sac (Streptomyces solfolobus)	100	2-8	n.d.	7-8	70-80	-	+	Klimczak *et al.* (1985)
Tac (Thermophilus acidophilum)	88	2-4	n.d.	8-9	65	-	+	Hamal *et al.* (1990)
Taq (Thermus aquaticus)*	94	2-4	50-55	7.8-9.4	70-80	-	-	Chien *et al.* (1976)
Tfl (Thermus flavus)	66	10-15	5-10	7-8	70	-	-	Kaledin *et al.* (1981)
Tli (Thermococcus litoralis)								
A	110-150	n.d.	n.d.	n.d.	50	-	-	Neuner *et al.* (1990)
B*	~110	n.d.	n.d.	n.d.	63	-	-	
C	~110	n.d.	n.d.	n.d.	63	-	-	
Tma (Thermotoga maritima)	70	1.5-2	10-35	8.3	75-80	-	+	Huber *et al.* (1986)
Tru (Thermus rubber)	70	2-3	15	7-12	50	-	-	Kaledin *et al.* (1982)
Tsp (Thermatoga spp.)	85	10	10	7.5-8	80	-	-	Simpson *et al.* (1990)
Tth (Thermus thermophilus)*	100-120	1.5-2.5	100	8-9.3	50-60	+	-	Ruttimann *et al.* 1985); Carballeira *et al.* (1990)
Stoffel fragmant* *(Thermus aquaticaus)*	61.3	2-10	10	8.3	70-80	-	-	Lawyer *et al.* (1993)

* Commercially available n.d. = Not determined

ที่มา : (Fanning และ Gibbs, 1997)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler หรือ PCR machine) (ภาพที่ 11)

ในอดีตการทำพีซีอาร์ ไม่จำเป็นต้องมีเครื่องมือที่ยุ่งยาก เพียงแต่มีอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 3 อ่าง สำหรับ 3 อุณหภูมิก็สามารถทำพีซีอาร์ได้ แต่มีปัญหาคือ อาจทำให้เกิดความสับสนเนื่องจากต้องวนเวียนยกไปแช่ในอ่างทั้ง 3 อ่าง ที่ต้องทำซ้ำถึง 20-30 รอบ จึงได้มีการคิดค้นเครื่องกำหนดอุณหภูมิเป็นรอบ (Thermal cycler) แบบอัตโนมัติ หรือ PCR machine ปัจจุบันมีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบ และการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต หลักการของเครื่อง Thermal cycler ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนทำความร้อน ส่วนทำความเย็น และส่วนควบคุมอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบ ส่วนทำความร้อนอาจเป็นแผ่นทำความร้อน หลอดไฟ ระบบอิเล็คทรอนิคส์ หรืออาจใช้วิธี Resistance heating โดยตัวต้านทานความร้อนซึ่งมีลักษณะเป็นสปริงแบบง่ายๆ คล้ายกับในไส้ของหลอดไฟกลม หรือ ขดลวดสปริงในเครื่องปิ้งขนมปังที่จะร้อนเมื่อมีพลังงานไฟฟ้าผ่านเข้าไป ส่วนทำความเย็นอาจใช้พัดลมเป่าคอมเพรสเซอร์ ระบบอิเล็คทรอนิคส์ ใช้น้ำเย็นหล่อ หรือใช้ peltier วิธีนี้ถูกนำมาใช้เพื่อทำความเย็นให้กับองค์ประกอบที่มีความไวต่ออุณหภูมิสูง โดยไม่จำเป็นต้องใช้ thermoelectric cooler หรือเครื่องทำความเย็น (compressor) โดย peltier นั้นเป็น semiconductor ชนิดพิเศษ ทำหน้าที่เป็นปั๊มให้ความร้อน

แบบ solid-state โดยใช้พลังงานไฟฟ้ากระแสสลับแรงดันต่ำให้ความร้อนโดยการเปลี่ยนตำแหน่งของขั้วไฟฟ้า (จาก + เป็น -) ความร้อนจะถูกปั๊มจากด้านหนึ่งไปสู่อีกด้านหนึ่ง จึงทำให้ด้านหนึ่งร้อนขณะที่ด้านตรงกันข้ามจะเย็น ข้อสำคัญของการผลิตเครื่อง Thermal cycler คือ ต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ โดยสามารถตั้งโปรแกรมให้อุณหภูมิสุดท้ายอยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังปฏิกิริยาครบจำนวนรอบที่กำหนด เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ขยายปริมาณได้อยู่ที่อุณหภูมิต่ำ ไม่สลายตัว และเพื่อหยุดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้เวลาไม่นานนัก ซึ่งระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้น อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

ภาพที่ 11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิสำหรับเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (PCR Thermal cycler) **ที่มา** : http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~lsureera/PCR.htm

- Applied Biosystems รุ่น Gene Amp? PCR System 9700
- Hybaid รุ่น Omn-E thermal cycler with 0.5 ml Blocks

ลักษณะของ Thermal cycler ที่ดี

1. สามารถควบคุมการทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ต่ำที่สุดไม่ควรเกิน 4 องศาเซลเซียส และสูงสุดไม่ควรต่ำกว่า 99 องศาเซลเซียส

2. สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง โดยที่อุณหภูมิห้องไม่ส่งผลต่ออุณหภูมิที่ทำการควบคุมระบบ และทำงานในที่ซึ่งมีความชื้นสูงได้

3. ความแม่นยำในการควบคุมอุณหภูมิทั้งระบบ (Overall Temp.) และอุณหภูมิต่อหน่วย (Unit Temp.) ไม่ควรคลาดเคลื่อนเกิน 5 องศาเซลเซียส (+/-5)

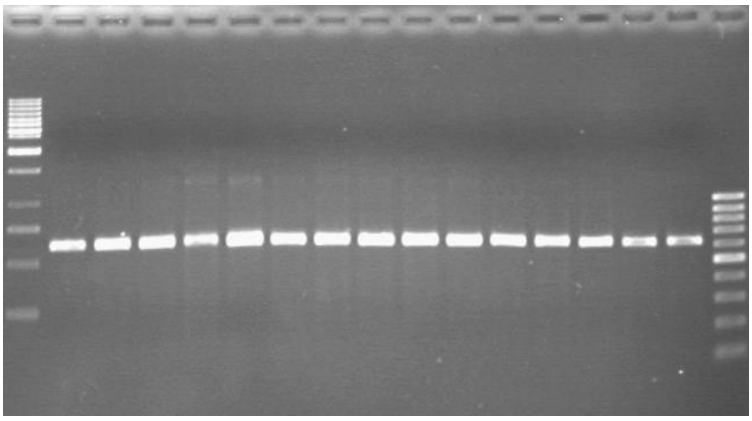
4. อัตราการเพิ่มและลดอุณหภูมิไม่ควรเกิน 3 องศาเซลเซียส ต่อวินาที และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิควรจะเร็วกว่าอัตราการลดอุณหภูมิ

5. สามารถกำหนดค่าอุณหภูมิต่อรอบได้หลายค่า (สูงสุดไม่น้อยกว่า 9 ค่า) และทำซ้ำโปรแกรมเดิมได้หลายรอบ

6. มีช่องใส่ตัวอย่างหลายแบบ เพื่อให้สามารถใส่หลอดตัวอย่างได้หลายขนาด อย่างน้อยควรเปลี่ยนช่องใส่ตัวอย่างได้ 2 แบบ คือ ช่องใส่ตัวอย่างขนาด 0.2 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในหลอดทลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์ มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจล (agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตร้าไวโอเลต ซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นเจล (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ปัญหาของการทำพีซีอาร์ (Troubleshooting for PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์นั้นบางครั้งก็ไม่ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ หรือได้ผลผลิตปริมาณน้อย หรือมีชิ้นดีเอ็นเออื่นที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริงเกิดขึ้น ปัญหาที่มักพบ แนวโน้มของสาเหตุ และแนวทางแก้ไขพอสรุปได้ดังนี้ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ปัญหาโดยทั่วไปของการทำพีซีอาร์ แนวโน้มของสาเหตุ และแนวทางแก้ไข

ปัญหา	แนวโน้มของสาเหตุ	แนวทางแก้ไข
1. ไม่ได้ผลผลิตพีซีอาร์ตามที่ต้องการ หรือได้ผลผลิตปริมาณน้อย	- คุณภาพของสารประกอบในปฏิกิริยา เช่นบัฟเฟอร์ หรือเอนไซม์ที่ใช้ ไม่ดี มีความผิดปกติของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler)	- เช็คคุณภาพของสารประกอบในปฏิกิริยา การทำงานของเครื่องมือทดลองเพิ่มปริมาณโดยใช้ สารใหม่และดีเอ็นเอต้นแบบที่มีคู่สมกับไพรเมอร์หรือเคยเพิ่มปริมาณมาแล้วได้ผลดีเป็นตัวควบคุม (Positive control)
	- ไพรเมอร์ไม่มีคุณภาพ	- เลือกใช้ไพรเมอร์ชนิดใหม่ที่มีขนาดยาวขึ้นหรือสั้นลงและมีคุณสมบัติดีหรือเปลี่ยนตำแหน่งที่สังเคราะห์ไพรเมอร์ใหม่
	- อุณหภูมิ Annealing ไม่เหมาะสม	- ปรับเปลี่ยนสภาวะของปฏิกิริยาให้ เหมาะสม เช่นเพิ่มหรือลดอุณหภูมิ Annealing
	- สภาวะในการทำพีซีอาร์ไม่เหมาะสม	- ทดสอบหาความเข้มข้นของ Mg^{+2} ที่เหมาะสม - เช็ค pH โดยทั่วไป pH ที่เหมาะสมคือ 8.3 pH ที่เหมาะสมกับแต่ละปฏิกิริยา สามารถหาได้โดยเพิ่ม pH ครั้งละ 0.5 จาก 8-10 - ทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ dNTP ที่เหมาะสม - เติม 10%DMSO หรือ Formamide ซึ่งจะช่วยลด T_m สำหรับการจับของไพรเมอร์ และส่งเสริม Denaturation โดยเฉพาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณ G และ C สูง อย่างไรก็ตามสารนี้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีเมอเรส
	- ระยะเวลาการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (Denaturation) ไม่เพียงพอ	- เพิ่มเวลาหรืออุณหภูมิของ Denaturation เนื่องจากมีปริมาณ G และ C สูง
	- มีสารยับยั้ง (Inhibjtor) การทำงานของเอนไซม์โพลีเมอเรสจากขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ	- ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบบริสุทธิ์ขึ้น
2. เกิด Primer dimer และลดปริมาณผลผลิตพีซีอาร์	- มีลำดับเบสคู่สมระหว่างคู่ไพรเมอร์ที่ใช้	- เลือกไพรเมอร์ใหม่ - ทดสอบหาอุณหภูมิ Annealing และความเข้มข้นของ Mg^{+2} ที่เหมาะสม

ตารางที่ 7 (ต่อ) ปัญหาโดยทั่วไปของการทำพีซีอาร์ แนวโน้มของสาเหตุ และแนวทางแก้ไข

ปัญหา	แนวโน้มของสาเหตุ	แนวทางแก้ไข
3. ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริง (Non-specific products)	- ไพรเมอร์สามารถจับกับลำดับเบสในสายดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง	- ใช้ Hot start PCR - ทำ Touch-down หรือ Booster PCR - ทำ Nested PCR - เลือกไพรเมอร์ใหม่ เนื่องจากไพรเมอร์เดิมไม่จำเพาะ - เพิ่มอุณหภูมิ Annealing เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบจำเพาะขึ้น - ทดสอบหาความเข้มข้นของ Mg^{+2} ที่เหมาะสม เช็คค่า pH - ลดความเข้มข้นของไพรเมอร์ หรือลดปริมาณดีเอ็นเอพอลิเมอเรส - หากไม่สามารถหาสภาวะที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์เพียงชนิดเดียวได้ ก็ให้ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ (Specific band) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์

ที่มา : (Fanning และ Gibbs, 1997)

การประยุกต์ใช้เทคนิคพีซีอาร์

ปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ได้ถูกพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆมากมาย โดยมีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์งานทางด้านดีเอ็นเอทั้งที่เกี่ยวกับงานวิจัย และในห้องปฏิบัติการทางคลินิก การวิจัยเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ดังตัวอย่างการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อการวิจัย และการประยุกต์ใช้พีซีอาร์ในรูปแบบดัดแปลง ได้แก่

1. PCR-based การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชและสัตว์โดยใช้ PCR-based markers เช่น อาร์เอพีดี (RAPD : Random amplified polymorphic DNA) เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified fragment length polymorphism) เอสเอสซีพี (SSCP: Single strand conformational polymorphism) และไมโครแซทเทลไลท์ หรือ เอสเอสอาร์ (SSR :Simple sequence repeat) อาร์เอพีดี และเอเอฟเอลพี เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลายตำแหน่ง (multi-locus PCR) จากการใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ เอเอฟเอลพี เป็นรูปแบบหนึ่งของ Linker-primed PCR เริ่มโดยการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นผลให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมากมายที่มีปลายจำเพาะเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ด้วยดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ (oligonucleotide linker หรือ adaptor) จากนั้นทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับ ลำดับเบสของ linker และบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนเอสเอสซีพีและ

เอสเอสอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว (Single-locus PCR) เนื่องจากความจำเพาะของตำแหน่งไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในเอสเอสซีพี และความจำเพาะของตำแหน่งไพรเมอร์ที่พัฒนาเพื่อให้ประกบส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำๆในเอสเอสอาร์

2. RT-PCR (Reverse transcriptase PCR) เป็นการทำพีซีอาร์โดยใช้ cDNA (complementary DNA) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สนใจ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน ปริมาณ mRNA (messenger RNA) เป็นตัวแสดงถึงปริมาณการแสดงออกของยีนนั้นๆในสิ่งมีชีวิต cDNA จะถูกสังเคราะห์จาก mRNA โดย reverse transcriptase ในหลอดทดลอง เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณภายหลังการทำพีซีอาร์ ไม่ได้สะท้อนถึงปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถบอกถึงปริมาณเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบหรือ cDNA ที่ต่างกันได้ อันเนื่องมาจาก “Plateau phase” ของพีซีอาร์ competitive PCR เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถเปรียบเทียบและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น โดยอาศัยหลักการที่ใส่ดีเอ็นเอที่รู้ความเข้มข้นที่เรียกว่า competitor ที่มีลำดับเบสของตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับเช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณที่เรียกว่า target DNA ดีเอ็นเอจากทั้งสองแหล่งจะถูกเพิ่มปริมาณไปด้วยกันและจะแข่งขันกันสำหรับไพรเมอร์ ทำให้สามารถประเมินปริมาณของดีเอ็นเอเริ่มต้นในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาได้ ปัจจุบันมีเครื่องเพิ่มปริมาณที่สามารถวัดปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ในรูปสารเรืองแสง (fluorescence-detecting thermocycler) ได้อย่างรวดเร็วในขณะเพิ่มปริมาณที่เรียกว่า Real-time PCR แต่มีราคาสูงมาก differential display-PCR เป็นรูปแบบหนึ่งของ RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบ mRNA จาก 2 แหล่งเพื่อให้ได้มาซึ่งยีนที่ให้ระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันนั้น

3. RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends) เป็นรูปแบบหนึ่งของ anchored-primed PCR เพื่อให้ได้ลำดับเบสของ cDNA ที่สมบูรณ์ โดยการต่อปลายทาง 5′ หรือ 3′ ของ cDNA ที่ทราบลำดับเบสแล้วออกไป โดยทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์หนึ่งจำเพาะกับลำดับเบสภายในของ cDNA (internal primer) และอีกไพรเมอร์หนึ่งที่จดจำและจับกับปลายโพลี A (anchor primer) ที่มีอยู่แล้วของ mRNA (3′ RACE-PCR) หรือที่เติมเข้าไปโดย terminal transferase และ dATP (5′ RACE-PCR)

4. Inverse PCR เป็นการทำพีซีอาร์เพื่อให้ได้มาซึ่งลำดับเบสของดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับลำดับเบสที่ทราบมาก่อนแล้ว ทำโดยตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้มีปริมาณพอเหมาะ แล้วเชื่อมดีเอ็นเอแต่ละสายเข้าด้วยกัน (intramolecular ligation) ด้วยเอนไซม์ไลเกส จะได้เป็นดีเอ็นเอรูปวงแหวน จากนั้นทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมาให้สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ทราบลำดับเบสแล้วโดยให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีทิศที่ออกจาก ดีเอ็นเอต้นแบบที่ทราบลำดับเบสแล้วออกสู่ดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบลำดับเบส จากนั้นหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบ

5. Alu-PCR เป็นการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับ Alu repeat ซึ่งเป็นลำดับเบสที่พบในทุกๆ 3 กิโลเบสในจีโนมมนุษย์ เมื่อ Alu repeat ที่อยู่ใกล้กันในจีโนมและมีทิศทางของลำดับเบสในลักษณะตรงข้าม ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ Alu repeat เพียงชนิดเดียวก็จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่าง Alu repeat ทั้งสองได้

6. Recombinant circle PCR (RCPCR) เป็นการดัดแปลงปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อใช้ในการสร้างจุดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งที่จำเพาะ โดยอาจเป็นการแทนที่เบสที่ตำแหน่งเดียว (point mutation) หรือเป็น insertion โดยเบสจำนวนหนึ่ง (ในรายงาน insertion ได้ถึง 85 เบส) หลักการ คือ ทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็น

เอเป้าหมายที่เป็นวงกลมทำปฏิกิริยาแยก 2 หลอด แต่ละหลอดใช้ไพรเมอร์ต่างคู่กัน ในหลอดที่ 1 ไพรเมอร์ของ sense strand ผิดปกติ และในหลอดที่ 2 ไพรเมอร์ของ anti sense strand ผิดปกติแบบคล้องจอง (complementary) กัน และที่ตำแหน่งตรงกัน หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครบรอบแล้วจึงเอาผลผลิตมาทำให้บริสุทธิ์โดย agarose gel electrophoresis และนำผลผลิตจากทั้งสองหลอดมาผสมกัน ทำให้ร้อนเพื่อให้ผลผลิตที่เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกกัน และจับกันใหม่ ทำให้ได้ดีเอ็นเอผลผลิตที่กลับจับเป็นวงกลมใหม่ และเหมือนดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมครึ่งหนึ่ง และดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์ครึ่งหนึ่ง แล้วจึงนำดีเอ็นเอดังกล่าวไป transfect เข้าแบคทีเรีย *E. coli* ต่อไป RCPCR อาจใช้ถ่ายดีเอ็นเอส่วนใดส่วนหนึ่งของพลาสมิดหนึ่งไปสอดใส่ในอีกพลาสมิดหนึ่งตรงตำแหน่งที่จำเพาะและทิศทาง (orientation) จำเพาะได้

นอกจากนี้ในปัจจุบันนิยมเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลายๆ ตำแหน่งในปฏิกิริยาเดียวกัน (multiplex PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ ผลผลิตพีซีอาร์จากแต่ละตำแหน่งควรมีขนาดต่างกันหรือมีการติดฉลากสารเรืองแสง (fluorescence label) ต่างกันที่ไพรเมอร์ใดไพรเมอร์หนึ่งของแต่ละคู่และตรวจสอบผลโดยเครื่องตรวจอัตโนมัติ วิธี multiplex PCR นี้ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ

ประโยชน์ของเทคนิคพีซีอาร์ ในการตรวจวินิจฉัยโรค

พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล โดยเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ รวมถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตร ที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยสาเหตุโรคต่างๆ ทั้งโรคติดเชื้อ และโรคที่เกิดจากพันธุกรรม การศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน การทำแผนที่ยีน และการศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย และสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว

ประโยชน์ของพีซีอาร์ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น โรคเอดส์ วัณโรค มาเลเรีย การตรวจหายีนก่อมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งประโยชน์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในด้านการเกษตร เทคนิคพีซีอาร์มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจวินิจฉัยโรค สายพันธุ์พืชต้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรค การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน พืช และเชื้อโรค รวมถึงการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ ซึ่งเทคนิคนี้จะช่วยให้มนุษย์เข้าใจพันธุกรรมของเชื้อโรคพืช และพืชอาศัย ตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส หรือสาเหตุโรค และศัตรูพืชอื่นๆ

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics)

ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) เป็นศาสตร์ที่ว่าด้วยการจัดเก็บข้อมูลทางชีววิทยาจำนวนมากให้เป็นระบบโดยอาศัยเทคโนโลยีด้านสารสนเทศหรือ IT (Information Technology) เข้ามาจัดการช่วยให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนมากได้พร้อมกันเพื่อตอบคำถามทางชีววิทยา เช่น ข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งมีมากมายมหาศาล ปัจจุบันได้จัดเก็บลงบนฐานข้อมูลอย่างเป็นระบบบนคอมพิวเตอร์ตัวบริการ (Computer Server) ในหลายสถาบันทั่วโลกและมีการเชื่อมต่อกับเครือข่ายอินเทอร์เน็ต ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์สามารถสืบค้นข้อมูลจีโนมได้อย่างสะดวกและรวดเร็วผ่าน web browser รวมทั้งมีการพัฒนาโปรแกรมประยุกต์หลายรูปแบบเพื่อวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองปรากฏการณ์ทางชีววิทยาบนคอมพิวเตอร์

เครื่องมือชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics tools)

ชีวสารสนเทศน์ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้กับงานด้านจีโนมหรือด้านอณูวิทยา จำแนกได้ 3 ประเภท คือ

1. ประเภทที่มีราคาแพง (expensive)

ประเภทนี้มีใช้เฉพาะในศูนย์หรือสถาบันการศึกษาด้านจีโนมเท่านั้น ใช้งานได้สะดวก มีการผนวกโปรแกรมต่างๆ เช่น DNA sequence alignment, sequence assemble, gene finding, phylogenetic tree, protein modeling ฯลฯ เข้าด้วยกัน เพื่อประหยัดเวลาในการสืบค้น การวิเคราะห์ข้อมูล และการทำนายผล บางศูนย์หรือสถาบันสามารถกำหนดให้โปรแกรมสืบค้นหายีนจาก sequence ที่ได้จากเครื่อง automate DNA sequencer เทียบกับฐานข้อมูลจาก public domain จาก GenBank โดยอัตโนมัติ แต่มีข้อเสียของโปรแกรมนี้คือ องค์กรต้องเตรียมงบประมาณไว้ต่อเนื่อง เพื่อปรับปรุงหรือ upgrade ในส่วนของฮาร์ดแวร์ ซอฟต์แวร์ อยู่เสมอ

2. ประเภทราคาถูกหรือไม่เสียค่าใช้จ่าย (low cost)

มีซอฟต์แวร์ทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์จำนวนมากที่สามารถใช้บริการผ่านเว็ปไซต์โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย เช่น GenBank (http://ncbi.nlm.nih.gov) หรือที่ EMBL (http://ebi.ac.uk) หรือโปรแกรมบางโปรแกรมสามารถดาวน์โหลดมาติดตั้งกับคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคลได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายแต่มักประสบปัญหาในการใช้งานจะใช้ยาก ไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน และข้อจำกัดอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น ไม่สามารถวิเคราะห์ sequence จำนวนมากพร้อมกันในคราวเดียวกันได้

3. ประเภทต้องสมัครเป็นสมาชิกและใช้บริการผ่านอินเทอร์เน็ต

ระบบข้อมูลทางชีวภาพ ได้จัดเก็บรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอและโปรตีนทางชีวภาพไว้อย่างมีระบบ มีทั้งฐานข้อมูลทั่วไป และฐานข้อมูลเฉพาะ แยกไว้ตามหมวดหมู่ดังนี้

- DDBJ ฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศญี่ปุ่น
- EMBL ฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในทวีปยุโรป
- ENZYME ฐานข้อมูลของเอ็นไซม์
- GENBANK ฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศสหรัฐอเมริกา
- PIR แหล่งข้อมูลของโปรตีนและฐานข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของนานาชาติ
- PROSITE แหล่งข้อมูลซึ่งเก็บเว็บไซต์และโครงร่างของโปรตีน
- REBASE ฐานข้อมูลของเอ็นไซม์จำเพาะ
- SWISSPROT ฐานข้อมูลของลำดับกรดอะมิโน
- THEMBL ฐานข้อมูลซึ่งแปลมาจากฐานข้อมูล EMBL

สำหรับฐานข้อมูลลำดับเบสที่มักมีการอ้างอิงถึงเสมอ ได้แก่

GENBANK	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
EMBL	http://www.ebi.ac.uk/
DDBJ	http://www.ddbj.nig.ac.jp/

แต่ละฐานข้อมูลตั้งอยู่ตามแหล่งข้อมูลสำคัญของโลก (สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และญี่ปุ่น) แต่จะมีการแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสระหว่าง 3 ฐานข้อมูลเป็นประจำทุกวัน ดังนั้นไม่ว่าจะติดต่อกับฐานข้อมูลใดผู้ใช้จะได้ข้อมูลเดียวกันและทันสมัยตลอดเวลาวันต่อวัน

บรรณานุกรม

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 735 หน้า

วิจารณ์ พานิช. 2533. ปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส. ว. สงขลานครินทร์. 8(4) : 395-409.

Fanning, S. and Gibbs. 1997. PCR in genome analysis, pp 249-299. In B. Birren, E.D. Green, S. Klapholz, R.M. Myers and J. Roskams (eds.) Genome Analysis: A Laboratory Manual Volume 1- Analyzing DNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Gardes, M., and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol.Ecol. 2 : 399-410.

Guarro, J., J. Gene and A.M. Stchigel. 1999. Development in fungal taxonomy. Clinical Microbiol. Rev. 12(3) : 454-500.

Schilling, A.G., E.M. Moller, and H.H. Geiger. 1996. Polymerase chain reaction-base assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology 86 : 515-522.

Waalwijk, C., R.P. Baayen, J.R.A. Koning, and W. Gams. 1996. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Eleganas*. Sydowia 48 : 90-114.

Watson, J.D., T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Levine, and R. Losick. 2004. Molecular biology of the gene, 5th Ed. Pearson Education, Inc.: San Francisco.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.

http : //employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/oldnalanguage.html

http : //www.scq.ubc.ca/dna-fingerprinting-in-the-standardization-of-herbs-and- nutraceuticals/

http : //pioneer.netserv.chula.ac.th/~lsureera/PCR.htm

http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

http://gslc.genetics.utah.edu/basic/lesson/dna/howto/index.htm

การตรวจสอบ endophytic bacteria ในพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็ม

Detection of endophytic bacteria from plants growing in the saline soils.

มัทนา ศรีหัตถกรรม[1/] จรรยา มณีโชติ[2/] นลินี ศรีวิกร[3/]
หทัยรัตน์ อุไรรงค์[1/] อัญชลี เชียงกูล[1/]

.....

Abstract

Saline soils has profound effects on growth of growing crops in several provinces, particularly in the north eastern provinces of Thailand. It caused death of growing crops. However, halophiles and salt-loving microorganisms are able to live under extreme salinity. If halophiles and salt-loving microorganisms were introduced into the saline soils, they might act as salt-reducing agents as those of mineral toxicity – reducing agents reported. The experiments were aimed at developing a technique for ease, high accuracy and specificity identification of endophytic bacteria isolated from roots of crop plants growing in saline soils by a PCR technique. The DNA extraction protocols and PCR conditions were optimized and the new specific primers were subsequently designed from the 16S rDNAs sequences of these endophytic bacteria isolates by the DNA Star Program. Results showed that thirty one genera of the endophytic bacteria isolated were identified namely *Achromobacter, Alteromonadaceae, Azotobacter, Bacillus, Bacterium, Bowmanella, Brachybacterium, Brevibacterium, Brevundimonas, Dietzia, Enterobacter, Firmicutes, Halomonas, Klebsiella*, *Leucobacter, Lysinibacillus, Mangroveibacter, Microbacterium, Oceanobacillus, Ochrobactrum, Pantoae, Paracoccus, Proteobacterium, Pseudaminobacter, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Serratia, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Vibrio* and *Virgibacillus*. The new specific primer for ease, high accuracy and specificity identification of endophytic bacteria isolates of Thailand were F 5'-GATCTGTTCAGCTTCGTGTTCGTT 3' and R 5'- TGCAGCG CGGGCCCATCAGTA 3'.

บทคัดย่อ

ดินเค็มทำความเสียหายต่อพืชปลูกในหลายจังหวัดของประเทศไทย พืชไม่สามารถขึ้นเจริญได้ แต่พบว่ามีจุลินทรีย์ทนเค็ม และชอบความเค็มหลายชนิดสามารถเจริญได้ปกติในสภาพเค็มจัด ถ้าได้ใส่จุลินทรีย์ทนเค็ม และชอบความเค็มลงไปในดินเค็ม จุลินทรีย์เหล่านี้อาจไปลดความเค็มของดินเหมือนจุลินทรีย์ที่ลดพิษของโลหะที่มีรายงานไว้ งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบ endophytic bacteria ที่แยกได้จากรากพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็ม โดยเทคนิค PCR ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความเฉพาะเจาะจงสูง ในการทดลอง DNA extraction protocols and PCR conditions จะถูกปรับให้เหมาะสม และดีไซน์ specific primer ตัวใหม่ จากลำดับเบสของ 16S rDNAs ของไอโซเลท

ต่างๆโดยใช้ DNA Star Program ผลการทดลอง สามารถจำแนก endophytic bacteria ทนเค็มโดยเทคนิค PCR ได้ 31 สกุล คือ *Achromobacter, Alteromonadaceae, Azotobacter, Bacillus,Bacterium, Bowmanella, Brachybacterium, Brevibacterium, Brevundimonas, Dietzia, Enterobacter, Firmicutes, Halomonas, Klebsiella, Leucobacter, Lysinibacillus, Mangroveibacter, Microbacterium, Oceanobacillus, Ochrobactrum, Pantoae, Paracoccus, Proteobacterium, Pseudaminobacter, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Serratia, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Vibrio* และ *Virgibacillus* ได้ new specific primer สำหรับใช้ในการตรวจสอบ endophytic bacteria ทนเค็มไอโซเลทของประเทศไทย ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความเฉพาะเจาะจงสูง คือ F 5'-GATCTGTTCAGCTTCGTGTTCGTT 3' และ R 5'- TGCAGCGCGGG CCCATCAGTA 3'

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-03-03-02-49

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
[2/] กลุ่มงานวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/] กลุ่มงานโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ที่ประสบปัญหาดินเค็มอยู่ 21.7 ล้านไร่ และมีพื้นที่ที่มีศักยภาพในการแพร่กระจายของดินเค็มอีกประมาณ 21.9 ล้านไร่ หรือร้อยละ 6.83 ของพื้นที่ประเทศไทย ส่วนใหญ่พื้นที่ที่ประสบปัญหาดินเค็มจะอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีตัวเลขสูงถึง 17.8 ล้านไร่ และยังมีแนวโน้มที่จะแพร่กระจายเพิ่มขึ้นอีก 19.4 ล้านไร่ (สุกรานต์, 2544) ดินเค็ม คือดินที่มีเกลือสะสมอยู่ในดินมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำทะเลมีความเค็มเท่ากับ 3%) (http ://gould.as.arizona.edu/~mmeyer /ast202/ handoutd/ extreme.html) ดินเค็มเป็นปัญหาต่อการเพาะปลูกของเกษตรกรมาเป็นเวลานาน มีแนวโน้มว่าจะยิ่งทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น และแพร่กระจายไปในพื้นที่เพาะปลูกมากขึ้น การแก้ปัญหาดินเค็ม ทำได้ครอบคลุมพื้นที่น้อยมากไม่สามารถรองรับสภาพปัญหาที่เกิดได้จริง(สุกรานต์,2544) ถ้าหากสามารถหามาตรการที่มีประสิทธิภาพ คุ้มทุน และปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม มาช่วยลดหรือดูดซับความเค็มของเกลือให้พืชปลูกสามารถเจริญ และให้ผลผลิตได้ในสภาพดินเกลือได้แล้ว จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและประเทศชาติโดยรวม ในปัจจุบัน โครงการพระราชดำริได้ใช้หลากหลายวิธี สหสาขาวิชาการ ในการแก้ปัญหาดินเค็มอย่างยั่งยืน งานทดลองนี้สนใจศึกษาการใช้จุลินทรีย์ โดยเฉพาะ endophytic bacteria เนื่องจากพบว่า จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวที่สามารถเจริญได้ในสภาพ เค็มจัด กรดจัด ด่างจัด หรือในสภาพแวดล้อมที่เป็นพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในพืชหรืออยู่รอบๆรากพืช จุลินทรีย์พวกนี้จะช่วยลดหรือดูดซับพิษของสารพิษ หรือของกรด ด่าง ไม่ให้เป็นพิษต่อพืชปลูกได้ และสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ด้วย(Xiaolin *et al*.,2002; Barac, 2004; Araujo *et al*., 2002) สำหรับในกรณีของดินเค็ม ขณะนี้ยังไม่พบจุลินทรีย์ชนิดใดช่วยลดหรือดูดซับความเค็ม

ให้กับพืชปลูกได้ แม้ว่าจะพบ halophiles (salt loving) ที่เจริญในสภาพเค็มยิ่งยวดหลายชนิด ด้วยเหตุนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเพื่อหาวิธีการตรวจสอบ endophytic bacteria ในพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็มของประเทศไทยโดยเทคนิคพีซีอาร์ และเพื่อนำตัวเชื้อมาทดลองใช้ลดความเค็มให้กับพืชปลูก และเพื่อใช้ในงานวิจัยอื่นๆ

เทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรีย นิยมใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA เพราะว่า สะดวก รวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อทั้งที่บริสุทธิ์และไม่บริสุทธิ์ ไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อบนอาหาร ใช้ได้กับตัวอย่างจำนวนมาก สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่ตรวจสอบได้ และสามารถใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆได้ (Araujo *et al*., 2002; Siciliano *et al.*, 2001; Leaphart *et al*., 2003; Zinniel *et al.*, 2002) เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั่วโลก

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบและจำแนก endophytic bacteria ในพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็ม ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความเฉพาะเจาะจงสูง

วิธีการดำเนินการ

1. การตรวจสอบและจำแนก endophytic bacteria ในพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็ม

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด 8 สูตร คือ

1. Nitrogen free medium broth + NaCl 3 % (ใช้ NaCl 3 % เนื่องจากน้ำทะเลมีความเค็มประมาณ 3 % และ เทียบจากอาหาร Marine medium)
2. Marine medium broth + NaCl 3 %
3. Nutrient broth + NaCl 3 %
4. Trypticase soy broth + NaCl 3 %
5. Nitrogen free medium agar + NaCl 3 %
6. Marine medium agar + NaCl 3 %
7. Nutrient agar + NaCl 3 %
8. Trypticase soy agar + NaCl 3 %

2. ตู้บ่มเชื้อ
3. ตู้เย็น
4. ขวดแก้วขนาด 20 ออนซ์
5. DNA extraction buffer(100 mM Tris-HCl pH8, 100 mM sodium EDTA pH8, 100mM sodium phosphate pH8, 1.5 M NaCl, 1 % CTAB)
6. proteinase K(10 มก./มล.)
7. lysozyme(100 มก./มล.)

8. water bath

9. centrifugation

10. spectrophotometer

11. เครื่อง PCR

12. เครื่อง electrophoresis

13. fume hood

วิธีการ

มีวิธีการตามลำดับ ดังนี้

1. เก็บตัวอย่างพืช และดินรอบๆราก และดินในบริเวณดินเค็ม /บ่อเกลือ /นาเกลือ ระหว่างเดือน ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2549

2. แยกจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ภายในรากพืชที่เก็บมาในอาหารเหลว และบนอาหารแข็ง โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวรากด้วย Clorox 10-20 % นาน 10-15 นาที (ขึ้นอยู่กับชนิดของรากพืช) จากนั้นล้างรากด้วยน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง เพื่อล้าง Clorox ออกจากรากให้หมด เสร็จแล้วนำรากไปบดละเอียดในน้ำเกลือ 1.95 % ดูดสารละลายที่ได้ไปเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และบนอาหารแข็ง 4 ชนิด 8 สูตร ที่ได้แสดงไว้ข้างต้น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการแยกเชื้อทั้งหมดบนอาหาร Nutrient agar + NaCl 3 % จนได้โคโลนีเดี่ยว เก็บโคโลนีเดี่ยวบน Nutrient agar + NaCl 3 % ผิวหน้าเอียง ที่ 4 ^{0}ซ การแยกเชื้อจากดิน แยกโดยวิธี dilution plate technique บนอาหาร Nutrient agar + NaCl 15 % บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงทำการแยกเชื้อบนอาหาร Nutrient agar + NaCl 15 % จนได้โคโลนีเดี่ยว เก็บโคโลนีเดี่ยวบน Nutrient agar + NaCl 15 % ผิวหน้าเอียง ที่ 4 ^{0}ซ

3. ตรวจสอบและจำแนกแบคทีเรีย ดำเนินการดังนี้

3.1 ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียที่ระดับความเค็มต่างๆ

ถ่ายแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่แยกเก็บไว้ ลงในอาหารเหลว (nutrient broth) ที่ระดับความเค็มต่างๆ ตั้งแต่ 5-30 % (0.86-5.1 M) เชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้อากาศแก่เชื้อโดยการเขย่าขวดอาหารเช้า-กลางวัน-เย็น ตรวจสอบการมีชีวิตของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเหลว ที่ 5, 10, 15, 20, 25, 30 วัน บน Nutrient agar + NaCl 3 %

3.2 ตรวจสอบ Gram's ของแบคทีเรีย โดยวิธี solubility test ใน 3% KOH

ดำเนินการโดยการหยด 3% KOH ลงบนสไลด์ แล้วใช้ไม้จิ้มฟันหรือลูปแตะเซลล์แบคทีเรีย มาใส่ลงใน 3% KOH กวนผสมให้เข้ากันดีโดยเร็ว ถ้าเป็นเมือกเหนียว เมื่อยกขึ้นมา แสดงว่าเป็น Gram ลบ ถ้าไม่เป็นเมือกเหนียว แสดงว่าเป็น Gram บวก

3.3 จำแนกแบคทีเรียโดยเทคนิค PCR มีขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

3.3.1 สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่แยกเก็บไว้ โดยวิธี SDS DNA extraction method ตามวิธีการของ Zhou *et al.*(1996) มีวิธีการคือ

1. เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient broth + NaCl 3 % ข้ามคืน(12-16 ชม.)

2. ดูดแบคทีเรียมา 1.5-3.0 มล. ใส่ลงในทิ้วขนาด 1.5 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที จากนั้น เทส่วนใสทิ้ง

3. 800 µl DNA extraction buffer ลงไป vortex จนเซลล์แบคทีเรียผสมกันดีกับ DNA extraction buffer

4. เติม 200 µl lysozyme solution แล้ว vortex เพื่อผสมให้เข้ากันดี

5. เติม 100 µl proteinase K คว่ำ-หงาย เพื่อผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 225 รอบ/นาที ที่ 37 ^{0}ซ 30 นาที(ไม่จำเป็นต้องใส่ proteinase K ก็ได้ เพราะว่า SDS จะเป็นตัวกำจัดโปรตีนอยู่แล้ว นำไปบ่มที่ 37 ^{0}ซ 30 นาที ได้เลย)

6. เติม 66-90 µl 20% SDS (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ)

7. บ่มปฏิกิริยาใน water bath ที่ 65 ^{0}ซ เป็นเวลา 2 ชม. หรือจนกระทั่งเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์เป็นสารละลายใส คว่ำ-หงายทุกๆ 15-20 นาที

8. ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที 30 นาที

9. ดูดส่วนใส 750 µl ใส่ลงใน tube สะอาด

10. เติม chloroform : isoamyl alcohol(24 : 1 v/v) 750 µl (ในอัตราส่วน 1 : 1) คว่ำ-หงาย จนปฏิกิริยาสมบูรณ์

11. ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที 30 นาที

12. ดูดส่วนใส ใส่ลงใน tube สะอาด

13. ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 0.6 Volume cold isopropanol คว่ำ-หงาย บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.

14. เติม RNase A(100 มก./มล.) 4 – 10 µl บ่มบนเครื่องเขย่า 225 รอบ/นาที ที่ 37 ^{0}ซ 30 นาที

15. ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที 30 นาที

16. ล้างดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70 % cold ethyl alcohol 2 ครั้ง

17. ผึ่งแห้งที่อุณหภูมิห้อง

18. วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธี electrophoresis บน agarose gel 1 % 0.5 TBE 180 Volt 50 Amp.

3.3.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S rDNA โดยใช้ primer 63 F(5'-CAG GCCTAACACATGCAAGTC) และ 1387 R(5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC) ปรับ Initial denaturation, denaturation และ annealing ให้เหมาะสม ให้ได้ band เดี่ยวขนาด 1,300-1,500 bp.

3.3.3 ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ โดยวิธี electrophoresis บน agarose gel 1 % 0.5 TBE 100 Volt 50 Amp.

3.3.4 ตัด band ที่ได้ ใส่ลงใน tube สะอาด

3.3.5 purify PCR product โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit มีวิธีการตามคู่มือที่แนบมากับชุด kit

3.3.6 ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ โดยวิธี electrophoresis บน agarose gel 1 % 0.5 TBE 100 Volt 50 Amp.

3.3.7 ส่ง PCR product ไปหาลำดับเบสโดยเครื่องอัตโนมัติ

3.3.8 เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในยีนแบงค์ โดยการ blast alignment (NCBI Blast)

3.3.9 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ(phylogenetic tree)

3.3.10 ออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม DNA Star เพื่อไว้ใช้ตรวจสอบ endophytic bacteria ในประเทศไทยต่อไป

3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีกับที่มีรายงานไว้ในเอกสารวิชาการ และในยีนแบงค์

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2548 สิ้นสุด กันยายน 2552

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบและจำแนก endophytic bacteria ในพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็ม

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช/ดิน เก็บได้ 600 ตัวอย่าง ใน 13 จังหวัดๆละ 2 แหล่ง ดังนี้

1. จ. สมุทรสงคราม ต. นาโคก และ ต. คลองด่าน อ. เมือง
2. จ. ฉะเชิงเทรา อ. บางประกง
3. จ. ชลบุรี ต. คลองตำหรุ อ. เมือง
4. จ. ร้อยเอ็ด อ. ธวัชบุรี และ อ. จตุรพักพิมาน
5. จ. ขอนแก่น อ. พระยืน และ อ. บ้านไผ่
6. จ. มหาสารคาม บ. โนนแดง และ บ. หนองบ่อ อ. บรบือ
7. จ. กาฬสินทร์ อ. ยังตลาด และ อ. เชียงยืน
8. จ. นครราชสีมา อ. ศรีพัฒนา และ อ. บ้านวัง
9. จ. บุรีรัมย์ อ. คูเมือง และ อ. สตึก
10. จ. สุรินทร์ อ. ชุมพลบุรี และ อ. ท่าตูม
11. จ. ศรีสะเกศ กิ่ง อ. ศิลาลาด
12. จ. อุบลราชธานี อ. เขื่องใน และ อ. ม่วงสามสิบ