13. จ. ยโสธร อ. มหาชนะชัย และ อ. คำเขื่อนแก้ว

1.2. การแยกเชื้อ endophytic bacteria ทนเค็ม

แยกเชื้อเก็บไว้ทั้งหมด 200 ไอโซเลท จากจำนวนมากว่า 1000 ไอโซเลท เก็บเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Nutrient agar + NaCl 3 % ผิวหน้าเอียง และ Nutrient agar + NaCl 15 % ผิวหน้าเอียง ที่ 4 ^{0}ซ

1.3 การจำแนก endophytic bacteria ทนเค็ม

โดยการตรวจสอบการเจริญในอาหารเหลว(nutrient broth) ที่ระดับความเค็มต่างๆตั้งแต่ 5-30 %(0.86 - 5.1 M) ในระยะ เวลา 30 วัน ได้แบคทีเรียทนเค็ม 5% 1 ไอโซเลท, 10 % 16 ไอโซเลท, 15 % 22 ไอโซเลท, 20 % 10 ไอโซเลท, 25 % 49 ไอโซเลทและ 30 % 58 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

1.4 การจำแนกแบคทีเรียโดยวิธี Solubility test

พบทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (ตารางที่1)

ตารางที่1 การจำแนก endophytic bacteria ทนเค็ม

ชื่อจุลินทรีย์	รหัส	Maximum identity	Accession No.	Gram's Stain	ความเข้มข้นสูงสุดของเกลือที่เชื้อเจริญได้ (%)
Microbacterium esteraromaticum strain PA4	NAHalo 1	96%	EU647562.1	+	10
P. pseudoalcalligenes strain B50	NAHalo 2	98%	GQ433374.1	-	10
Pseudomonas aeruginosa strain FDB	NAHalo 3	96%	-	-	15
Bacillus sp. By231Ydz-fq	NAHalo 4	99%	EU0703372.1	+	25
Brachybacterium sp. M-6-3	NAHalo 5	98%	GQ339911.1	+	25
Bacillus sp. FS502	NAHalo 7	100%	GQ352429.1	+	25
Paracoccus sp. MB2009-P1	NAHalo 8	98%	FN652906.1	+	15
S. maltophilia strain BL-13	NAHalo 9	98%	AB194324.1	-	10
Azotobacter paspali	NAHalo 10	-	-	-	25
Bacillus sp. S3-6	NAHalo 11	99%	FJ373032.1	+	25
P. agglomerans strain XJ2	NAHalo 12	100%	GQ374472.1	-	25
Pantoea sp. M3S5	NAHalo 13	99%	FJ560472.1	-	15
Xanthomonas sp. 3C3	NAHalo 14	97%	AY689031.1	-	5
Dietzia sp. 158Xalormis st.	NAHalo 15	97%	EU090135.1	-	20
Bacillus sp. DU179(2010)	NAHalo 16	98%	HM567060.1	+	25
Pseudomonas sp. D22(2010)	NAHalo 17	99%	GU566356.1	-	10
P. agglomerans strain XJ2	NAHalo 19	99%	GQ374472.1	-	25
Leucobacter sp. CC20	NAHalo 20	85%	FJ394921.1	+	25
P. aeruginosa strain 21R	NAHalo 21	97%	GU263805.1	+	15
Pantoea dispersa strain M1R4	NAHalo 22	99%	GQ246183.1	-	15
Staphylococcus sciuri strain YSY1-11	NAHalo 25	99%	GU197536.1	-	20
Ochrobactrum intermedium TM73	NAHalo 26	99%	AM490627.1		25
B. cereus strain JBE0004	NAHalo 30	96%	FJ982654.1	+	30
B. flexus strain OS1	NAHalo 34	99%	FJ226761.1	+	30
B. cereus strain KU206-3	NAHalo 35	98%	EU557028.1	+	30
B. subtilis strain CRB115	NAHalo 38	99%	GQ161967.1	+	15
Stenotrophomonas sp. LCR33	NAHalo 39	97%	FJ976542.1	-	30
S. maltrophilia strain NCCP-47	NAHalo 43	99%	AB547227.1	-	30
Achromobacter sp. ddt-1	NAHalo 45	93%	FJ577965.1	+	15
B. iodenum strain ATCC 15728	NAHalo 54	98%	FJ652620.1	+	30
Bacillus sp. B3(2007)	NAHalo 55	96%	EU281629.1	+	30
Lysinibacillus fusiformis strain 210_19	NAHalo 58	97%	GQ199721.1	+	30
B. megaterium strain 2G022	NAHalo 59	99%	GU124692.1	+	30
Bacillus sp. 095305	NAHalo 60	94%	EF522799.1	+	30
B. pumilus strain 3L-10B	NAHalo 61	99%	EU379269.1	+	30
Bacillus sp. NJSS63	NAHalo 63	98%	EF061447.1	+	30
Bacillus sp. B3(2007)	NAHalo 64	98%	EU281629.1	+	30
B. subtilis strain YB7	NAHalo 66	98%	GQ241354.1	+	30
Brevundimonas diminuta strain SR	NAHalo 67	96%	DQ925736.1	+	30
Microbacterium paraoxydans strain M-Btll-3	NAHalo 68	98%	FJ828878.2	+	10
Bacillus sp. B3(2007)	NAHalo 70	92%	EU281629.1	+	30

ตารางที่ 1 (ต่อ) การจำแนก endophytic bacteria ทนเค็ม

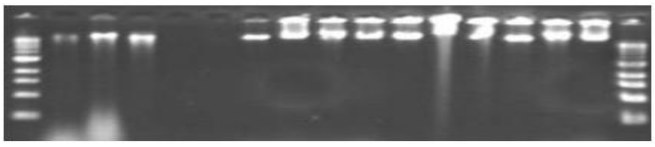
ชื่อจุลินทรีย์	รหัส	Maximum identity	Accession No.	Gram's Stain	ความเข้มข้นสูงสุดของเกลือที่เชื้อเจริญได้ (%)
Stenotrophomonas maltophilia	NAHalo 73	99%	AF417866.1	-	30
Halomonas elongata strain ATCC 33173	NAHalo 75	97%	AM941743.1	-	30
B. pumilus strain 3L-10B	NAHalo 76	99%	EU379269.1	+	30
P. aeruginosa strain PMA1	NAHalo 77	96%	GQ217529.1	-	10
Bacillus sp. OC-6	NAHalo 78	99%	AY669167.1	+	30
Enterobacter sp. ZJUPD3	NAHalo 79	86%	EU430753.1	-	10
B. flexus strain SV6	NAHalo 80	100%	GU143789.1	+	30
B. cereus	NAHalo 81	98%	EU159483.1	+	30
B. flexus strain HU37	NAHalo 82	93%	EF101733.1	+	30
B. flexus strain MDLD1	NAHalo 83	97%	FJ861081.1	+	25
Lysinibacillus sp. 210_19	NAHalo 84	99%	GQ199721.1	+	30
B. pumilus strain BZ3-10	NAHalo 85	99%	GU332600.1	+	30
B. pumilus isolate NUC-F	NAHalo 86	98%	DQ833752.1	+	30
B. subtilis strain N10	NAHalo 87	98%	AF318900.1	+	30
B. cereus isolate LBS5	NAHalo 88	98%	EU400647,1	+	30
B. marisflavi strain SU1	NAHalo 90	98%	FJ554665.1	+	25
B. aquimaris strain 1-3	NAHalo 92	98%	FJ607042.1	+	20
B. megaterium strain 210_64	NAHalo 93	97%	GQ199766.1	+	30
Oceanobacillus iheyensis strain S8-19	NAHalo 97	96%	EU624422.1	+	30
B. cereus strain DC3	NAHalo 98	99%	GQ344805.1	+	30
B. flexus strain EP23	NAHalo 100	99%	GQ279347.1	+	25
B. megaterium strain 210_55	NAHalo 102	98%	GQ199757.1	+	25
B. megaterium strain BG1-13	NAHalo 104	99%	GU048867.1	+	25
B. pumilus strain gf-3	NAHalo 106	93%	EU219735.1	+	25
B. epidermidis strain ZJB-07021	NAHalo 108	100%	EU046495.1	+	15
Brevibacterium sp. YST1	NAHalo 109	100%	EU289144.1	+	15
Brevibacterium sp. SC9	NAHalo 110	99%	EU099382.1	+	25
B. megaterium strain YM1c10	NAHalo 111	88%	EU221339.1	+	25
B. thuringiensis strain ODPY	NAHalo 112	99%	HM770098.1	+	25
Brevibacterium sp. SC9	NAHalo 113	99%	EU099382.1	+	25
B. marisflavi strain DS6	NAHalo 115	97%	EU835732.1	+	25
Bacterium 1-gw3-8	NAHalo 116	96%	DQ990028.1	+	25
Firmicutes bacterium OOYDA	NAHalo 117	82%	EU810867.1	+	25
Virgibacillus proomii strain CTSP31	NAHalo 118	97%	EU855209.1	+	15
B. pumilus strain CTSP14	NAHalo 119	99%	EU855196.1	+	25
B. cereus strain PCSB8	NAHalo 120	99%	HM449698.1	+	25
B. cereus strain JBS10	NAHalo 121	100%	GU812900.1	+	25
B. altitudinis strain 126YG20	NAHalo 123	93%	FJ174641.1	+	25
B. licheniformis strain MKU8	NAHalo 124	96%	DQ071568.1	+	25
B. megaterium strain B303	NAHalo 125	99%	GU904680.1	+	25

ตารางที่1 (ต่อ) การจำแนก endophytic bacteria ทนเค็ม

ชื่อจุลินทรีย์	รหัส	Maximum identity	Accession No.	Gram's Stain	ความเข้มข้นสูงสุดของเกลือที่เชื้อเจริญได้ (%)
B. epidermidis strain ZJB-07021	NAHalo 126	99%	EU046495.1	+	25
Brevibacterium aureum strain Enb17	NAHalo 127	98%	AY299093.1	+	25
Bacillus sp. DU37(2010)	NAHalo 129	99%	HM567092.1	+	25
B. megaterium strain R3-05	NAHalo 130	99%	HM371417,1	+	25
B. pumilus strain HS6	NAHalo 131	99%	GU323367.1	+	25
Vibrio vulnificus strain MP-4	NAHalo 136	98%	AY911393.1	-	25
O. intermedium strain TM73	NAHalo 137	99%	AM490613.1	+	25
B. pumilus strain SA175001	NAHalo 138	99%	AY289549.1	+	25
B. licheniformis strain OWS-F3	NAHalo 139	98%	AY536536.1	+	25
B. pumilus strain 1352	NAHalo 140	98%	GU726861.1	+	25
B. licheniformis strain W7	NAHalo 141	99%	GU945228.1	+	25
B. altitudinis strain 4YG40	NAHalo 142	96%	FJ174623.1	+	20
Pantoea agglomerans strain ZFJ-6	NAHalo 143	99%	GQ246183.1	-	25
B. cereus strain QD87	NAHalo 144	99%	EF472263.1	+	25
Enterobacter sp. R4M-Q	NAHalo 146	99%	GQ478271.1	-	10
Klebsiella sp. TP1MC	NAHalo 147	99%	GU272365.1	-	-
B. megaterium strain 210_20	NAHalo 149	98%	GQ199722.1	+	25
Enterobacter cloacae strain SJ6	NAHalo 150	97%	EU779827.1	-	10
Ochrobactrum sp. WatG-BA isolate O	NAHalo 151	98%	AB272074.1	+	30
O. intermedium strain ADV24	NAHalo 153	78%	-	+	30
S. maltophilia strain IFC_YC1	NAHalo 159	89%	HM196283.1	+	30
Serratia marcescens strain sls-1	NAHalo 161	99%	EU876700.1	-	30
Ochrobactrum sp. p1	NAHalo 168	99%	HM004554.1	+	30
P. dispersa strain M1R4	TSAHolo 1	100%	GQ246183.1	-	10
Alteromonadaceae bacterium PH39	TSAHolo 2	99%	AF513471.1	+	10
Pseudomonas sp. JG13	TSAHolo 3	98%	EU937756.1	-	15
Proteobacterium M3-2	MAHolo 1	99%	AY880307.1	+	20
Bowmanella denitrificans strain BD1	MAHolo 2	99%	DQ343294.1		10
Bacillus sp. QQDP517	MAHolo 3	86%	FJ555568.1	+	25
Proteobacterium M3-2	MAHolo 4	99%	AY880307.1	+	25
Pseudoal teromonas piscicida strian S2755	MAHolo 5	100%	FJ457196.1	-	10
Pseudaminobacter sp. W11-4	MAHalo6	99%	DQ659452.1	-	-
Mangroveibacter plantisponsor MSSRF40	NFMHolo 1	98%	EF643377.1	+	10
P. dispersa strain M1R4	NFMHolo 2	99%	GQ246183.1	-	15
Microbacterium hominis	NFMHolo 3	99%	HM032799.1	-	10

1.5 การจำแนก endophytic bacteria โดยเทคนิค PCR

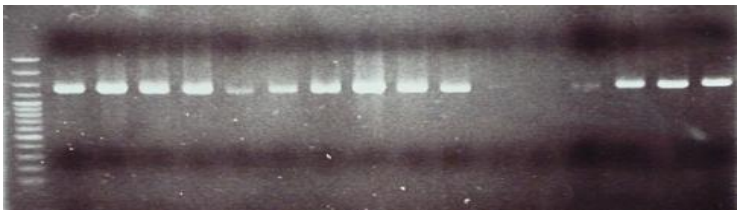
การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี SDS DNA extraction method ใช้ได้ผลดีกับ endophytic bacteria ทนเค็ม ให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์และปริมาณมาก และดีเอ็นเอที่ได้ไม่เป็นเมือกเหนียว (รูปที่1)



รูปที่ 1. ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยวิธี SDS DNA extraction method

PCR condition สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S rDNA ไม่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อทุกเชื้อ จำเป็นต้องปรับ condition ใหม่ สำหรับบางเชื้อ ได้ PCR product ขนาด 1300 bp.(รูปที่2) PCR condition เมื่อใช้ QIAGEN *Tag* DNA Polymerase and Q-solution / Fermantus *Tag* DNA Polymerase จำนวน 30 รอบ คือ

Initial denaturation	94 ^{0}ซ	3 นาที / 95^{0}ซ 2 นาที
denaturation	94 ^{0}ซ	55 วินาที
annealing	55-60 ^{0}ซ	55 วินาที / 55 ^{0}ซ 55 วินาที
extension	72 ^{0}ซ	1 นาที
final extension	72 ^{0}ซ	10 นาที
stop PCR	4 ^{0}ซ	~

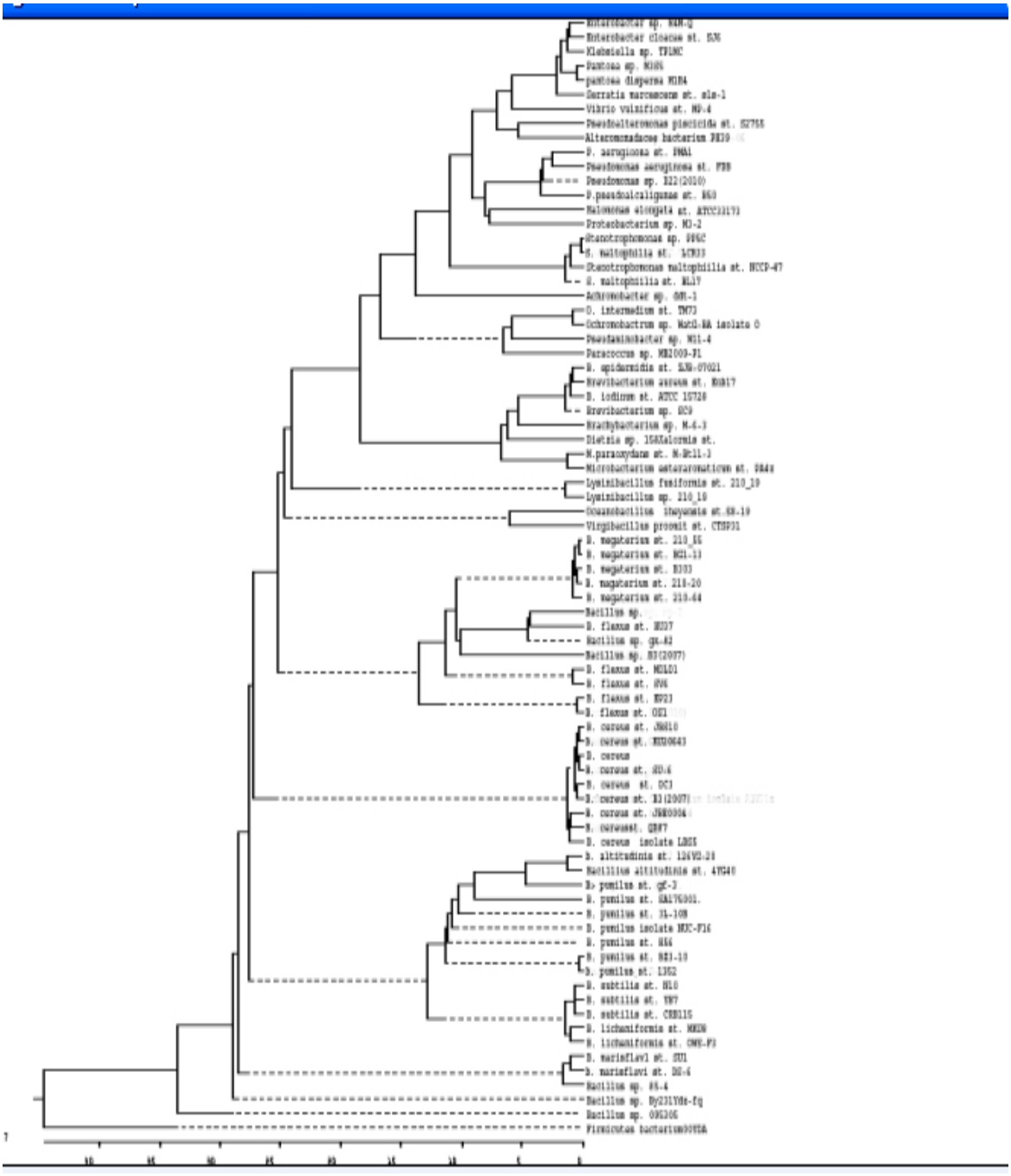


รูปที่ 2. PCR product ขนาด 1300 bp.ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S rDNA

ชื่อสกุลและชนิดของ endophytic bacteria ทนเค็มที่จำแนกได้ แสดงไว้ในตารางที่ 1มีความสัมพันธ์กัน (phylogenetic tree) ดังรูปที่ 3 endophytic bacteria ทนเค็ม ที่แยกได้ ส่วนใหญ่เป็น *Bacillus* spp. พบในพืชทนเค็มทุกชนิดที่เก็บมา และไม่พบความเฉพาะเจาะจงของ endophytic bacteria ทนเค็ม กับชนิดของพืชที่เก็บมา endophytic bacteria ทนเค็มที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ คือ *Achromobacter sp., Azotobacter chroococcum*, *Klebsiella* sp., *Ochrobactrum* และ *Pseudomonas*

primer ที่ออกแบบจากส่วนของลำดับเบส 16 S rDNA ของ endophytic bacteria ทนเค็ม เพื่อไว้ใช้ตรวจสอบและจำแนก endophytic bacteria ทนเค็มสายพันธุ์ไทย คือ

F 5’- GATCTGTTCAGCTTCGTG TTCGTT 3’ และ R 5’- TGCAGCGCGGG CCCATCAGTA 3’



รูปที่ 3. ความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) ของ endophytic bacteria ทนเค็มที่แยกได้ในการทดลองนี้

วิจารณ์ผลการทดลอง

endophytic bacteria ทนเค็มที่ตรวจสอบได้ในการทดลองนี้เหมือนที่มีรายงานในหลายประเทศ ได้แก่ *Achromobacte, Azotobacter, Bacillus., Brevibacterium, Enterobacter, Klebsiella, Ochrobactrum, Pantoae, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomonas* และ *Vibrio* (Ventosa *et al*., 1998; http://en.Wikipedia.org/wiki/rhizobia; http://www. nature.com/nrmicro/journal/v7/n7/abs/nrmicro2163.html, http://www3.interscience.wiley.com/journal/ 119941790 /abstract; http://www3.interscience.wiley.com /journal/119419882/abstract, http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/67/6/2683) ซึ่งเกือบทั้งหมดเป็น salt tolerance มีเพียง *Halobacterium* ที่เป็น salt loving bacteria (http://gould.as.arizona.edu/mmeyer/ ast 202/handoutd/extreme.html, http://www.springerlink.com/content/u10863wn 48370365/) salt tolerance จะสามารถปรับตัวให้เจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ(Ventosa *et al*., 1998) โดย *Bacillus* และ *Pseudomonas* สามารถทนเค็มได้ถึง 30 % ส่วน *Halomonas* และ halophilic archaea เซลล์จะแตกตายไปที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10 % (Ventosa *et al*., 1998) จึงเป็นเหตุให้พบ *Halomonas* และ halophilic archaea ในการทดลองนี้น้อย เพราะใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือเพียง 3 % ตามที่ระบุไว้ใน Marine Agar medium

Primer 63F และ 1387R จำแนกความแตกต่างระหว่างสกุลและชนิดของ endophytic bacteria ทนเค็มได้ไม่เฉพาะเจาะจง มีความเป็นไปได้หลายเชื้อ (ที่ maximum identity เท่ากัน) ต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อช่วยในการจำแนกเชื้อ ทำให้ต้องใช้เวลามากในการจำแนกเชื้อ และหาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย primer ที่ได้ออกแบบใหม่จาก endophytic bacteria ทนเค็มสายพันธ์ไทยในการทดลองนี้ จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้

สรุปผลการทดลอง

สามารถจำแนก endophytic bacteria ทนเค็มโดยเทคนิค PCR ได้ 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 primer ที่ออกแบบจากลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ endophytic bacteria ทนเค็มที่พบในประเทศไทยเพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนก endophytic bacteria ในดินเค็มต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ได้ตัวเชื้อ endophytic bacteria ทนเค็ม สำหรับใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เช่นทำปุ๋ยน้ำหมัก และกำจัดโรคพืช เป็นต้น

2. ได้ primer ที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบและจำแนก endophytic bacteria ทนเค็มสายพันธุ์ไทย ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความเฉพาะเจาะจงสูง

คำขอบคุณ

1. ขอขอบคุณลูกจ้าง และผู้ช่วยวิจัยทุกคนที่ได้ทุ่มเทแรงกายและใจในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้

2. คุณชวลิต หาญดี ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมการข้าว ที่ได้จัดหากล้าข้าว กข31

เอกสารอ้างอิง

สุกรานต์ โรจน์ไพรวงศ์. 2547. สถานการณ์สิ่งแวดล้อมไทย 2542-2542. บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). กรุงเทพฯ.

Araujo,W. L., J. Marcon, W.Maccheroni, Jr., J. D. van Elsas, J. W. L. van Vuurde and L. Azevedo. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with Xylella fastidiosa in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol*. 68(10) : 4906-4914.

Barac, T., S. Taghavi, B. Borremans, A. Provoost, L. Oeven, JV. Colpae, J. Vangronsveld and D. van der Lelie. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. Nat. Biotechnol. 22(5) : 583-588.

Leaphart, A. B., M. J. Friez and C. R. Lovell. 2003. Formyltetrahydrofolate synthetase sequences from salt marsh plant roots reveal a diversity of acetogenic bacteria and other bacterial functional groups. *Appl. Environ. Microbiol*. 69(1) : 693-696.

Siciliano, S.D. N. Fortin, A. Mihoc, G. Wisse, S. Labelie, D. Beaumier, D. Ouellette, R. Roy, L. G. Whyte, M. K. Banks, P. Schwab, K. Lee, and C. W. Greer. 2001. Selection of specific endophytic bacteria genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol*. 67(6) : 2469-2475.

Ventosa, A. J. J. Nieto, and A. Oren. 1998. Biology of moderately Halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2) : 504-544.

Xiaolin, L., C. Baodong, F. Gu and C. Perter. 2002. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of Zn phytotoxicity and mineral nutrition of host plants. P. 1334. In : Soil Science : confronting new realities in the 21 th century. Abstract Vol. IV. World Congress of Soil Science 17 th. Queen Sirikit National Convention Center. 14-21 August 2002. Bangkok.

Zhou, J., M. A. Bruns and J. M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol*. 62(2) : 316-322.

Zinniel, D. K., P. Lambrecht, B. Harris, Z. Feng, D. Kuczmarski, P. Higley, C. A. Ishimaru, A. Arunakumari, R. G. Barletta and A. K. Vidaver. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and Prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol*. 68(5) : 2198-2208.

.....

การศึกษารวบรวมและพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการผลิตเอทานอล ในมันสำปะหลัง

Study on Ethanol Producible Microbial for Ethanol Production from Cassava

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ กรกช จันทร
ภรณี สว่างศรี หทัยรัตน์ อุไรรงค์
กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงปลูกมันสำปะหลังในภูมิภาคต่าง ๆ บนชิ้นส่วนมันสำปะหลัง ที่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ บนอาหาร PDA แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันจำนวนทั้งสิน 58 ไอโซเลท นำราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหาร PDB นาน 5 วันนำเส้นใยที่ได้มา สกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณในส่วนของ ITS1 และ ITS4 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ นำไป หาลำดับเบสจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว แล้วนำข้อมูลการเรียงลำดับดีเอ็นเอที่ ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank โดยการทำ multiple aligment ด้วยโปรแกรม Clustal W สามารถจำแนกราจำนวน 58 ตัวอย่าง ออกเป็น genus และ species พบว่าเชื้อราที่พบ ได้แก่ *Aspergillus niger* จำนวน 26 ไอโซเลท *Aspergillus oryzae* จำนวน 1 ไอโซเลท *Byssochlamys nivea* จำนวน 1 ไอโซเลท *Mycocladus corymbiferus* จำนวน 1 ไอโซเลท *Rhizopus oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท *Syncephalastrum racemosum* จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma asperellum* จำนวน 10 ไอโซเลท *Trichoderma gamsii* จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma viride* จำนวน 5 ไอโซเลท และ Uncultured soil fungus จำนวน 9 ไอโซเลท เมื่อนำราที่ได้ไปทดสอบการใช้อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นส่วนประกอบ เพื่อดูความสามารถในการย่อยแป้งดิบ สามารถคัดเลือกราที่ประสิทธิภาพย่อยแป้งดิบได้ดีในระดับ 4 ได้แก่ *Aspergillus niger* จำนวน 14 ไอโซเลท *Mycocladus corymbiferus* จำนวน 1 ไอโซเลท *Rhizopus oryzae* จำนวน 1 ไอโซเลท *Syncephalastrum racemosum* จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma asperellum* จำนวน 3 ไอโซเลท *Trichoderma viride* จำนวน 1 ไอโซเลท และ Uncultured soil fungus จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งสามารถนำไปใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลแล้วจึงทำการหมักด้วยยีสต์ให้กลายเป็นเอทานอลต่อไป หรือนำราเหล่านี้ไปผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งดิบต่อไป

คำนำ

ปัจจุบันสถานการณ์ด้านพลังงานของโลกกำลังประสพปัญหาการขึ้นราคาน้ำมันเชื้อเพลิงอย่างต่อเนื่อง หลายประเทศได้หันมาหาแหล่งพลังงานทดแทนแหล่งใหม่ซึ่งจะต้องเป็นแหล่งพลังงานสะอาดใช้แล้วไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ และสาเหตุของการสะสมความร้อนของโลก เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงที่สะอาดและได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีหลายประเทศประสพความสำเร็จในการผลิตและการใช้ทดแทนพลังงานจากน้ำมันดิบ เช่น บราซิล สหรัฐอเมริกา จีน เป็นต้น การผลิตเอทานอลได้มาจากวัตถุดิบที่สำคัญคือแป้งจากข้าวโพดและมันสำปะหลัง และน้ำตาลจากอ้อย ในประเทศไทยได้รับการส่งเสริมให้ผลิตจากมันสำปะหลัง เนื่องจากไทยผลิตมันสำปะหลังได้ปริมาณมากพอ ในการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง มีขั้นตอนที่สำคัญคือ การย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วจึงหมักน้ำตาลด้วยยีสต์จนได้เอทานอลในที่สุด ในการย่อยแป้งเดิมจะต้องต้มแป้งให้สุกเสียก่อน ทำให้สูญเสียพลังงานและเวลาในขั้นตอนนี้เป็นอันมาก ต่อมาได้ค้นพบจุลินทรีย์ย่อยแป้งดิบ และเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ จากราหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ alpha-amylase, beta-amylase glucoamylase และเอนไซม์เกี่ยวข้องชนิดอื่นเช่น debranching enzyme เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ต่าง ๆ เหล่านี้ ได้แยกมาจากธรรมชาติและศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ นานหลายปีแล้ว และสามารถผลิตนำมาใช้ในอุตสาหกรรมด้วยต้นทุนต่ำ นอกจากนี้ได้นำเทคโนโลยีใหม่ๆ พัฒนาการผลิตเอนไซม์โดยการโคลนยีน ปรับปรุงโครงสร้างของยีนให้สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดพร้อม ๆ กัน

เดิม การย่อยแป้งได้นั้นจะต้องทำให้แป้งเป็นเจลาติน ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วจึงใช้เอนไซม์ย่อยเจลาตินให้เป็นน้ำตาล ต่อมาได้ค้นพบเอนไซม์อะไมเลสกลุ่มที่สามารถย่อยแป้งดิบ (raw starch digesting amylase) จึงได้พัฒนามาทดแทนเอนไซม์กลุ่มเดิม และเริ่มนิยมใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากลดขั้นตอนและพลังงานจากการต้มแป้งลง

ในการศึกษารวบรวมและพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการผลิตเอทานอลในมันสำปะหลัง ได้มุ่งเน้นการค้นหาจุลินทรีย์ย่อยแป้งดิบเป็นหลัก

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุลและจุลชีววิทยา และอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเชื้อ
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ lamina flow
4. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ(SORVALL RC28C)

8. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM® 310 Genetic analyzer)
9. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส

<u>วิธีดำเนินการ</u>

1. การเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมันสำปะหลังและบริเวณใกล้เคียง

ดำเนินการสุ่มดินจากแปลงปลูกมันสำปะหลังจากแหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศไทยของเกษตรกรในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคเหนือ โดยทำการเก็บบริเวณรอบๆ รากของต้นมันสำปะหลัง และบริเวณรอบ ๆ ลานตากมันเส้น และชิ้นส่วนมันเน่าที่อยู่ในแปลงมันสำปะหลัง ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด แช่ในถังน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพจนถึงห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งดิบจากดินปลูกมันสำปะหลัง

นำตัวอย่างดินมาผสมและคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วสุ่มชั่ง 5 กรัม ใส่ในขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร เทลงบนจานเพาะเชื้อแก้ว จากนั้นนำชิ้นมันจากหัวมันสดที่ฝานบาง ๆ ตามขวางมาคลุกดินที่เตรียมไว้นั้น นำชิ้นมันไปวางในจานเพาะเชื้อแก้วที่รองด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อพอให้เกิดความชื้น ทิ้งไว้ 5 วัน เชื้อราจะงอกฟูแต่ยังไม่มากเกินไป นำเข็มเขี่ยเชื้อ มาแยกเอาเส้นใยไปเลี้ยงในอาหาร PDA เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว และแยกเอาเส้นใยจากอาหาร PDA อีก ครั้ง เพื่อให้เชื้อราที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เมื่อเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวทำการแยกเก็บโคโลนีทุกลักษณะไว้ในหลอดเก็บเชื้อและเก็บใน glycerol 40 เปอร์เซ็นต์ ในตู้ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์

การสกัดดีเอ็นเอเชื้อรา

ทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อราตามวิธีการของ Doyle and Doyle, 1987 โดยมีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน แล้วกรองเอาส่วนที่เป็นเส้นใย ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำเส้นใยเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งที่เย็นจัดเติม extraction buffer 700 ml. และ mercapto-ethanol 3 ไมโครลิตร บดให้ละเอียด จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พลิกหลอดกลับไปมาเป็นครั้งคราว เติม chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลานส่วนบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ที่เย็นจัด 0.7 เท่า ของสารละลายตัวอย่าง พลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ นาน 10 นาที แล้วเทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้ง นำไปล้างตะกอน DNA ด้วย 75% ethanol : 10 mM ammonium acetate (1:1) 500 ไมโครลิตร แล้วเทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือแต่เฉพาะตะกอน DNA ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer 40 ไมโครลิตร แล้วกำจัด

RNA ด้วยการเติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร (10 mg/ml) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer(PARKIN ELMER MBA2000) ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 และตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยการหยอดดีเอ็นเอลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1xTBE buffer ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า(Voltage) 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แช่แผ่นวุ้นในเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS ของเชื้อราด้วยคู่ไพรเมอร์

Forward : ITS1 5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’

Reverse : ITS4 5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร , 10x PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2.0 ไมโครลิตร, ไพร์เมอร์ ITS1 (5 ไมโครโมล) 0.7 ไมโครลิตร, ไพร์เมอร์ ITS4 (5 ไมโครโมล) 0.7 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Promega (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 0.2 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลผลิตของ PCR (PCR product) โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis โดยการหยอด PCR product ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1xTBE buffer ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า(Voltage) 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แช่แผ่นวุ้นในเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที บันทึกแถบ PCR product ด้วยชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)

5. การหาลำดับเบสของยีน

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย ชุดน้ำยาทำความสะอาดดีเอ็นเอ High Pure PCR product Purification kit แล้วส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอจากบริษัทเอกชน

นำข้อมูลการเรียงลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank โดยการทำ multiple aligment ด้วยโปรแกรม Clustal W

6. การทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบ

โดยการเตรียมสูตรอาหาร ดัดแปลงจากอาหาร PDB โดยการใช้น้ำตาลกลูโสส 20 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งอาหารลงในฟลาสแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเพียง 20 มิลลิลิตร เติมแป้งมันสำปะหลังดิบที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วโดยแป้งยังคงสภาพไม่กลายเป็นเจลาตินปริมาณ 1 กรัม นำราที่

เตรียมไว้นอาหารแข็ง (PDA) ตัดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ใส่ลงไปจากนั้นนำไปเลี้ยงไว้โดยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 130 rpm/min นาน 5 วัน แล้วนำมาตรวจสอบการใช้แป้งโดยสารละลายไอโอดีน ให้ค่าคะแนนความสามารถในการใช้แป้งเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ความสามารถในการย่อยแป้งดิบดีมาก = 4 ความสามารถในการย่อยแป้งดิบดี = 3 ความสามารถในการย่อยแป้งดิบพอใช้ = 2 ไม่มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบ = 1

เวลาและสถานที่ที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง

ระยะเวลาเริ่มต้น ต.ค.2550 สิ้นสุด ก.ย.2552 รวม 2 ปี

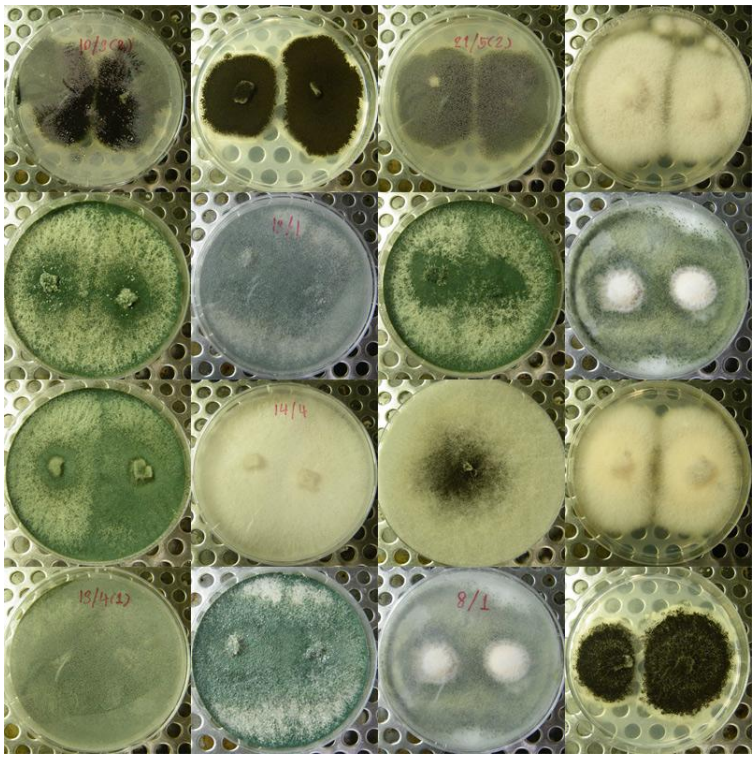
สถานที่ดำเนินการทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลาง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกเชื้อรา

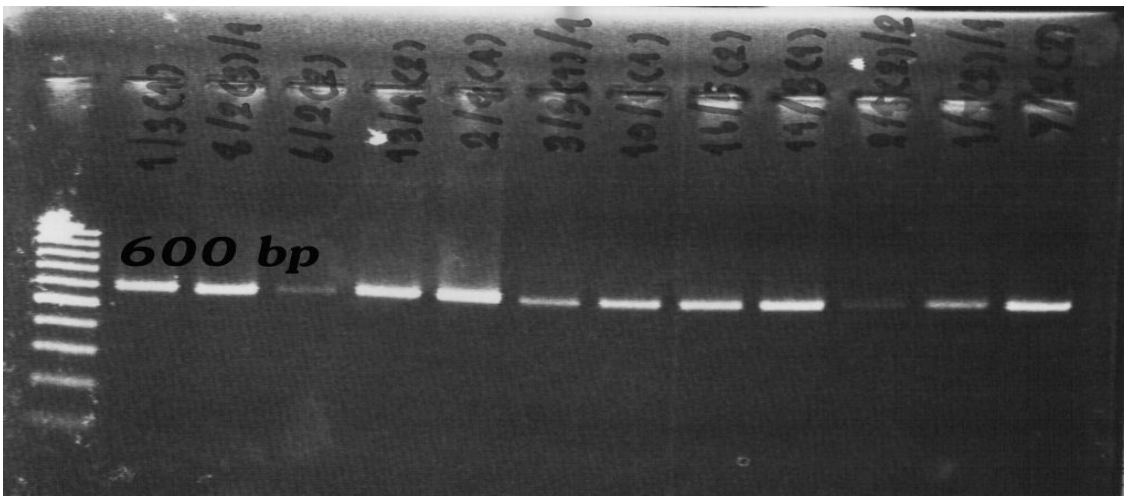
ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินที่เก็บมาได้บนชิ้นส่วนมันสำปะหลัง ที่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 58 ไอไซเลท ซึ่งได้ราที่มีคุณลักษณะต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA

นำเชื้อแต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหาร PDB นำเส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณในส่วนของ ITS1 และ ITS4 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ ดังภาพที่ 2

นำเชื้อแต่ละไอโซเลทเลี้ยงในอาหาร PDB นำเส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณในส่วนของ ITS1 และ ITS4 จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 600 นิวคลีโอไทด์ ดังภาพที่ 2 หาลำดับเบสจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว แล้วนำข้อมูลการเรียงลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank โดยการทำ multiple aligment ด้วยโปรแกรม Clustal W สามารถจำแนกราจำนวน 58 ตัวอย่าง ออกเป็น genus และ species พบว่าเชื้อราที่พบ ได้แก่ *Rhizopus* sp., *Aspergillus sp.* และ *Penicillium* ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 2 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นที่ทำปฏิกิริยาโพลีเมอเรส ในส่วนของ ITS ขนาด 600 นิวคลีโอไทด์

2. การทดสอบการย่อยแป้งดิบ

เมื่อนำรามาทดสอบการย่อยแป้งดิบ (ภาพที่ 3) สามารถแบ่งกลุ่มราที่มีประสิทธิภาพ ดังตารางที่ 1

ภาพที่ 3 แสดงผลการทดสอบการย่อยแป้งดิบด้วยราที่แยกได้จากดินในแปลงปลูกมันสำปะหลัง เมื่อนำมาหยดสารละลายไอโอดีน เมื่อหลอดที่ 1 แสดงผลของสารละลายไอโอดีนต่อน้ำแป้งดิบที่ไม่มีเชื้อรา (control)

หลอดที่ 2 และ 3 แสดลงผลของการย่อยได้ค่าคะแนนระดับ 4

หลอดที่ 11 แสดลงผลของการย่อยได้ค่าคะแนนระดับ 3

หลอดที่ 4 และ 6 แสดลงผลของการย่อยได้ค่าคะแนนระดับ 2

หลอดที่ 5 7 8 และ 9 แสดลงผลของการย่อยได้ค่าคะแนนระดับ 1

หลอดที่ 10 แสดงสารละลายไอโอดีน

ตารางที่ 1. ผลการจำแนกตัวอย่างเชื้อราและผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบ

No.	เชื้อรา	ไอโซเลท	ความสามารถในการย่อยแป้งดิบ
1	*Aspergillus niger*	1/1	1
2	*A. niger*	1/2(1)/2	4
3	*A. niger*	1/7(2)/1	4
4	*A. niger*	2/5(1)	4
5	*A. niger*	2/5(2)	4
6	*A. niger*	2/7(2)	1
7	*A. niger*	3/5(1)/2	4
8	*A. niger*	4/1(1)	1
9	*A. niger*	4/1(2)	4
10	*A. niger*	4/2	1
11	*A. niger*	6/1	1
12	*A. niger*	6/2(2)	4
13	*A. niger*	6/3(1)/3	4
14	*A. niger*	7/1(1)	4
15	*A. niger*	7/2(2)	1
16	*A. niger*	8/2(3)/1	4
17	*A. niger*	8/2(3)/2	3
18	*A. niger*	10/1(1)	4
19	*A. niger*	10/1(2)	4
20	*A. niger*	11/3(1)	2
21	*A. niger*	13/2(1)	4
22	*A. niger*	14/4	4
23	*A. niger*	14/5	1
24	*A. niger*	16/5(2)	1
25	*A. niger*	18/1	1
26	*A. niger*	ram2	2
27	*Aspergillus oryzae*	3/3(1)/1	1

ตารางที่ 1. (ต่อ) ผลการจำแนกตัวอย่างเชื้อราและผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบ

No.	เชื้อรา	ไอโซเลท	ความสามารถในการย่อยแป้งดิบ
28	*Byssochlamys nivea*	2/8(2)/1	1
29	*Mycocladus corymbiferus*	10/3(2)	4
30	*Rhizopus oryzae*	9/4	4
31	*R. oryzae*	19/3	1
32	*R. oryzae*	23/1(1)	1
33	*Syncephalastrum racemosum*	3/5(1)/1	4
34	*Trichoderma asperellum*	1/2(1)	1
35	*T. asperellum*	1/3(2)	4
36	*T. asperellum*	1/3(3)	4
37	*T. asperellum*	2/8(1)	1
38	*T. asperellum*	2/8(2)/3	1
39	*T. asperellum*	2/8(3)	2
40	*T. asperellum*	2/8(4)	1
41	*T. asperellum*	5/3(1)	3
42	*T. asperellum*	5/3(2)	3
43	*T. asperellum*	6/2(3)	4
44	*Trichoderma gamsii*	ram1	1
45	*Trichoderma viride*	1/3(1)	2
46	*T. viride*	13/3	1
47	*T. viride*	13/4(1)	1
48	*T. viride*	13/4(2)	4
49	*T. viride*	3/3(2)	1
50	Uncultured soil fungus-1	2/7(2)	1
51	Uncultured soil fungus-2	2/8(2)/2	4
52	Uncultured soil fungus-3	3/3(1)/3	1
53	Uncultured soil fungus-4	2/7(2)	1
54	Uncultured soil fungus-5	8/2(1)	4
55	Uncultured soil fungus-6	10/1	4
56	Uncultured soil fungus-7	11/2	4

ตารางที่ 1. (ต่อ) ผลการจำแนกตัวอย่างเชื้อราและผลการทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งดิบ

No.	เชื้อรา	ไอโซเลท	ความสามารถในการย่อยแป้งดิบ
57	Uncultured soil fungus-8	13/4(3)	1
58	Uncultured soil fungus-9	14/5	1

หมายเหตุ : ความสามารถในการย่อยแป้งดิบดีมาก = 4
ความสามารถในการย่อยแป้งดิบดี = 3
ความสามารถในการย่อยแป้งดิบพอใช้ = 2
ไม่มีความสามารถในการย่อยแป้งดิบ = 1

สรุปผลการทดลอง

1. ได้เชื้อราจากการคัดเลือกทั้งหมด 58 ไอไซเลท ได้แก่ *Aspergillus niger* จำนวน 26 ไอโซเลท *Aspergillus oryzae* จำนวน 1 ไอโซเลท *Byssochlamys nivea* จำนวน 1 ไอโซเลท *Mycocladus corymbiferus* จำนวน 1 ไอโซเลท *Rhizopus oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท *Syncephalastrum racemosum* จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma asperellum* จำนวน 10 ไอโซเลท *Trichoderma gamsii* จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma viride* จำนวน 5 ไอโซเลท และ Uncultured soil fungus จำนวน 9 ไอโซเลท

2. เมื่อนำราที่ได้ไปทดสอบการใช้อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังดิบเป็นส่วนประกอบ เพื่อดูความสามารถในการย่อยแป้งดิบ สามารถคัดเลือกราที่ประสิทธิภาพย่อยแป้งดิบได้ดีในระดับ 4 ได้แก่ *Aspergillus niger* จำนวน 14 ไอโซเลท *Mycocladus corymbiferus* จำนวน 1 ไอโซเลท *Rhizopus oryzae* จำนวน 1 ไอโซเลท *Syncephalastrum racemosum* จำนวน 1 ไอโซเลท *Trichoderma asperellum* จำนวน 3 ไอโซเลท *Trichoderma viride* จำนวน 1 ไอโซเลท และ Uncultured soil fungus จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งสามารถนำไปใช้ย่อยแป้งมันสำปะหลังดิบเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลแล้วจึงทำการหมักด้วยยีสต์ให้กลายเป็นเอทานอลต่อไป หรือนำราเหล่านี้ไปผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งดิบต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการรวบรวมศึกษาราที่ช่วยย่อยแป้งดิบจากแปลงปลูกมันสำปะหลัง ที่คัดเลือกได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ดังนี้

1. นำราที่ทราบชนิดเหล่านี้ไปทดสอบประโยชน์ด้านอื่นเช่น ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส

2. นำราที่ได้ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งดิบ
3. นำไปโคลนยีนและผลิตเอนไซม์จากยีนที่โคลนได้โดยพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ระยองในการเก็บตัวอย่างหัวมันสำปะหลังสดที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

จรุงสิทธ์ ลิ่มศิลา และคณะ. 2547. เอกสารวิชาการ มันสำปะหลัง. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตรจตุจักร กรุงเทพฯ. 124 หน้า.

นิรนาม. 2549. เอทานอลจากจุลินทรีย์. www.jobpub.com/articles/showarticle.asp?id=793

นิรนาม. 2005. ผ่านโยบาย"เอทานอล/แก๊สโซฮอล์" ผลประโยชน์ตกอยู่กับใคร. www.consumerthai.org/egat_board/view.php?id=503

ปาริชาติ วัฒนา ประภา เฟื่องฟูพงศ์ และ มาลัย เมืองน้อย. 2519. การผลิต starch syrup จากแป้งมันสำปะหลังโดยการไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ กรด และเอนไซม์กับกรดร่วมกัน. รายงานผลการวิจัยประเภทอาจารย์และศาสตราจารย์ ประจำปี 2519. กรุงเทพ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิสมัย เจนวนิชปัญจกุล. 2548. Biofuel Roadmap, APEC Symposium on Foresighting Future Fuel Technology. ณ อาคารสำนักงานใหญ่ บริษัทปตท. จำกัด (มหาชน) วันที่ 28 พฤศจิกายน 2548.

สุกัญญา จันทชุม. 2522. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของกลูโคอะไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์. กรุงเทพ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพงษ์ เจริญรัถ. 2546. เอทานอล (Ethanol) จากมันสำปะหลัง พลังงานเชื้อเพลิงทดแทนของไทย. www. Matichon.co.th/techno/techno.php?srctag=0504150846&srcday=2003/08..

Adam , M. 1953. Amylase : their kinds and properties and factors which influence their activity.Food Technology. 7 : 35-38.

Ingle, M. B. and R. J. Erickson. 1978. Bacterial α-amylase. Advances in Applied Microbiology.24:257-278.

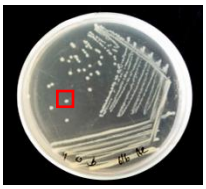
Sarawat, P.,S. Sakuanrungsirikul, A. Limsila, and W. Watananonta.2005. Cassava Breeding and Biotechnology Research at the Department of Agriculture, Thailand: The Present Status and Future Needs.Proceedings : Starch Update 2005:The 3 rd Conference on Starch Technology. 4-5 November 2005 Queen Sirikit National Convention Center Bangkok,Thailand.:77-80.

Ureda, S. and J. J. Marshall. 1980. Raw Starch Digestion by B. polymyxa beta-amylase. Micro. Abstr. 16 (5) :5.

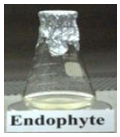
Watananonta, Watana (2005). Status of Cassava Production and Utilization in Thailand. Paper presented at workshop on “Collaborative Cassava Project Planning Meeting” at BIOTEC building, Thailand Science Park, Thailand.

Windish, W.W. and N.S. Mhatre. 1965. Microbial amylase. Advances in Applied Microbiology.7:273-283.

Yoonan,K. and J. Kongkiattikajorn. 2005. Fermentable Sugars from Cassava Pulps Hydrolysate for Ethanol Production. Proceedings : Starch Update 2005:The 3 rd Conference on Starch Technology.4-5 November 2005 Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand.:373-382.

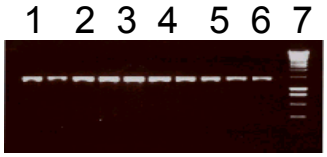


เลี้ยง



สกัด DNA

PCR (16S r RNA)



Direct Cycle Sequencing

Clone PCR Product กับ Plasmid Vector

ล้างตะกอน

เตรียมปฏิกิริยา

Transformation ไปยัง Host

เลี้ยง

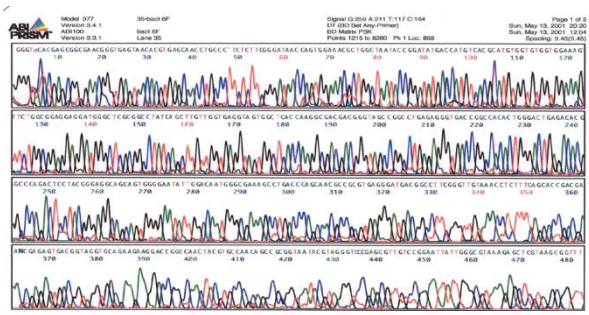
สกัด Plasmid

Cycle Sequencing

ABI 377

OR

ABI 310



Identify genus/species โดยใช้โปรแกรม Fasta3

ขั้นตอนการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

บทปฏิบัติการ

การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเทคนิคชีวโมเลกุล

บทปฏิบัติการที่ 1 : การสกัดDNAของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา

อุปกรณ์

1. ตู้ถ่ายเชื้อ
2. flask ขนาด 50 ml สำหรับเลี้ยงเชื้อ
3. loop
4. forceps
5. กระดาษ cellophane (ปลอดเชื้อ)
6. แผ่น slide (ปลอดเชื้อ)
7. โกร่ง (ปลอดเชื้อ)
8. ตู้ incubator
9. เครื่อง หมุนเหวี่ยง
10. water bath
11. ตู้ incubator
12. micro-tube ขนาด 1.5 ml
13. micro-pipette ขนาด P 20, 200 และ 1,000 µl
14. Pipette tip ขนาด P 20, 200 และ 1,000 µl

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria-Bertani medium)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) slant
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) plate
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (Potato Dextrose Broth)
5. 10% SDS
6. Proteinase k (เข้มข้น 10 mg/ml)
7. 5M NaCl
8. 2X CTAB (ภาคผนวก)
9. Chloroform : isoamyl alcohol (24:1)
10. 3M NaOAc
11. Isopropanol
12. 70% ethanol
13. TE buffer (ภาคผนวก)

14. Extraction buffer (ภาคผนวก)
15. Washing solution (ภาคผนวก)

การสกัดDNAของเชื้อแบคทีเรีย

<u>การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย</u>

1. ใช้ loop ปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อมาเลี้ยงใน flask ขนาด 50 ml ที่มีอาหารเหลว LB (Luria-Bertani medium) 5 ml อยู่ภายใน
2. บ่มที่ อุณหภูมิ 37 ˚C เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm นานประมาณ 16 ชั่วโมง (แล้วแต่ชนิดของเชื้อ) จากนั้นนำไปสกัดDNA

<u>วิธีการสกัดDNAของเชื้อแบคทีเรีย</u>

1. ดูดเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร LB 1 ml ใส่ใน micro-tube ขนาด 1.5 ml หมุนเหวี่ยงที่ 6,000รอบ/นาที (rpm) 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย เทน้ำใสทิ้ง (ทำซ้ำอีก 2 รอบ)
2. ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย 1XTE buffer 300 µl หมุนเหวี่ยง ที่ 6,000 rpm นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง
3. ละลายตะกอนด้วย 1XTE buffer 760 µl ผสมให้เข้ากันด้วย pipette
4. เติม 10% SDS 40 µl และ protenase-k (เข้มข้น 10 mg/ml) 8 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C นาน 15 นาที
6. เติม 5M NaCl 100 µl
7. เติม 2X CTAB 100 µl (ที่อุ่นให้ร้อนที่ 65 ˚C) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ˚C นาน 20 นาที (กลับหลอดไปมา ทุก 5 นาที)
8. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาช้าๆ นาน 5 นาที แล้วนำไป หมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที
9. ดูดน้ำใสส่วนบน 600 µl ใส่ micro-tube หลอดใหม่ เติม 3M NaOAc 60 µl ผสมให้เข้ากัน
10. เติม isopropanol 400 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที (ตู้ -20 ˚C นาน 30 นาที หรือข้ามคืน)
11. นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 rpm นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง
12. ล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethanol 300 µl
13. หมุนเหวี่ยง ที่ 14,000 rpm นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง
14. ปล่อยให้ตะกอน DNA แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง (คว่ำหลอด) ประมาณ 30 นาที
15. ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer 20 µl บ่มที่ 60 ˚C นาน 20 นาที
16. นำ DNA ที่ได้ไปตรวจปริมาณ และคุณภาพ เพื่อเตรียมทำ PCR ต่อไป

การสกัด DNA ของเชื้อรา

<u>การเตรียมเชื้อรา</u>

1. เลี้ยงเชื้อราใน PDA (Potato Dextrose Agar) slant บ่ม ที่ 30 ˚C ประมาณ 1-3 วัน
2. ใส่อาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) ลงไปประมาณ 3-5 ml
3. ใช้ loop ปลอดเชื้อขูดเส้นใยเบาๆ ให้เส้นใยหลุดออกมาในอาหารเหลว
4. spread บน กระดาษ cellophane (ปลอดเชื้อ) ที่วางบน PDA
5. บ่มที่อุณหภูมิ 30 ˚C ประมาณ 1 วัน
6. ขูดเส้นใยด้วยแผ่น slide ปลอดเชื้อ ใส่ใน micro-tube ขนาด 1.5 ml สำหรับนำไปสกัด DNA หรือ เก็บไว้ที่ ตู้ -20 ˚C เพื่อรอการสกัด DNA

<u>วิธีการสกัดDNAของเชื้อรา</u>

1. นำเส้นใยของเชื้อรา 0.1-0.3 g (ประมาณครึ่ง micro-tube) ใส่โกร่งบดด้วย Liquid Nitrogen แล้วบดให้เป็นผงแป้ง
2. เติม Extraction buffer ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 ˚C ปริมาตร 600 µl และ proteinase k (เข้มข้น 10 mg/ml) 6 µl บดให้เข้ากันอีกครั้ง
3. เทส่วนผสมทั้งหมดลงใน micro-tube ขนาด 1.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 65 ˚C นาน 30 นาที (หรือ 1 ชั่วโมง) ผสมทุก 10 นาที
4. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 600 µl (เท่ากับปริมาณของตัวอย่าง) กลับหลอดไปมา นาน 10 นาที หมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 rpm นาน 10 นาที
5. ดูดน้ำใสส่วนบนใส่ micro-tube อันใหม่ ระวังอย่าดูด chloroform ติดไปด้วย
6. เติม 3M NaOAc 0.3 เท่า และ isopropanol 0.6 เท่า ของปริมาตรน้ำใส (ข้อ 5) ผสมให้เข้ากันช้าๆ
7. แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที (หรือ ตู้เย็น -20 ˚C นาน 30 นาที หรือ ข้ามคืน) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง
8. ล้างตะกอน DNA ด้วย washing solution 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมานาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)
9. ล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นาน 5 นาที แล้ว นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง
10. ปล่อยให้ตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง (คว่ำหลอด) ประมาณ 30 นาที
11. ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer 20 µl บ่มที่ 60 ˚C นาน 20 นาที นำ DNA ไปตรวจวัดปริมาณและคุณภาพ เพื่อเตรียมทำ PCR ต่อไป

บทปฏิบัติการที่ 2 : การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA โดยวิธี agarose gel electrophoresis

อุปกรณ์

1. flask ขนาด 500 ml
2. ปากกา marker
3. M wrap (พลาสติกที่ใช้หุ้มอาหาร)
4. เตา microwave
5. เครื่อง electrophoresis แบบแนวราบ (horizontal electrophoresis apparatus)
6. UV transiluminator
7. Pipette ขนาด P 20 µl
8. Pipette tip ขนาด P 20 µl

สารเคมี

1. agarose
2. 1XTBE buffer
3. น้ำกลั่น
4. สารละลาย DNA
5. mass Ladder ขนาด 1 kb และ 100 kb
6. ethidium bromide (ที่มีความเข้มข้น 0.5 µl/ml)
7. 6X loading buffer

วิธีการ

1. เตรียม 1 % agarose gel ใน 1XTBE buffer (สำหรับตรวจสอบ PCR product ใช้ 1.5 % agarose gel) โดยชั่ง agarose 0.8 g ใส่ใน flask ขนาด 500 ml แล้วเติม 1XTBE buffer ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 80 ml (1 ถาดเล็ก ใช้ประมาณ 40 ml) ปิดปาก flask ด้วย M wrap (พลาสติกที่ใช้หุ้มอาหาร) เจาะรูสำหรับระบายไอน้ำและใช้ปากกา marker ขีดระดับของเหลวก่อนหลอม agarose ให้ละลายในเตา microwave ด้วยความร้อนปานกลาง ปรับปริมาตรของเหลวให้เท่าเดิม ด้วยน้ำกลั่น
2. เท agarose เหลวที่มีอุณหภูมิ 50 °C ลงในถาดเตรียม gel ที่มีหวี (comb) เสียบอยู่ (สามารถเทได้ 2 ถาด) เมื่อ agarose แข็งตัวแล้ว เท 1XTBE buffer ให้ท่วม agarose gel จากนั้นจึงดึงหวีออก เพื่อให้เกิดช่อง (well)
3. นำถาด gel ใส่ลงใน electrophoresis tank โดยวางด้านที่มีช่องไว้ทางขั้วลบ เท 1XTBE buffer ให้พอท่วม agarose gel
4. ผสมสารละลาย DNA 1 µl ลงในหลอดที่ใส่ TE buffer ไว้แล้ว 3 µl แล้วเติม 6X loading buffer 1 µl ผสมให้เข้ากัน (กรณีตรวจผล PCR product ใช้ 3 µl กับ 6X loading buffer 1 µl)
5. ใส่สารละลาย DNA ในข้อ 4 ลงในช่อง (well) และใส่ DNA marker ชนิดที่ทราบปริมาณ (mass Ladder) ขนาด 1 kb และ 100 kb ขนาบทั้งสองข้างของตัวอย่าง

6. ปิดฝา electrophoresis tank ให้กระแสไฟฟ้าโดยปรับให้มีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า เท่ากับ 100 โวลท์ (Volt) เป็นเวลา 30 นาที
7. แช่แผ่น agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide (ที่มีความเข้มข้น 0.5 µl/ml) นาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที
8. นำแผ่น agarose gel วางบน UV transiluminator และ ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV
9. วัดปริมาณของ DNA โดยเปรียบเทียบจากแถบที่ทราบปริมาณของ mass Ladder

บทปฏิบัติการที่ 3 : การเพิ่มปริมาณDNAบริเวณ 16S rRNA gene โดยปฏิกิริยา PCR

อุปกรณ์

1. หลอด micro-tube ขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml
2. Pipette ขนาด P 2, 20 และ 200 µl
3. Pipette tip ขนาด P 2 และ 200 µl
4. ถาดวางหลอด PCR
5. เครื่อง Thermal cycler
6. เครื่อง หมุนเหวี่ยง
7. เครื่อง vortex mixer

สารเคมี

1. น้ำ (ddH_2O)
2. 4 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
3. 10X PCR buffer (มี $MgCl_2$)
4. Primer 63F (5 µM) (Forward) 5′-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3′
5. Primer 1387R (5 µM) (Reverse) 5′-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3′
6. *Taq* DNA Polymerase (FINNZYMES)
7. DNA Template
8. stock solution A (3M NaOAc และ 95% Ethanol)
9. 70% Ethanol

<u>หมายเหตุ</u> สารเคมีที่ใช้ทำ PCR ควรเก็บไว้ตู้เย็น -20 °C

วิธีการเตรียมปฏิกิริยา PCR

1. ทำความสะอาดบริเวณที่ทำ PCR โดยฉีดพ่นด้วย 70% Ethanol และเช็ดให้สะอาดก่อนการปฏิบัติงาน
2. ดูดสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR ใส่หลอด PCR ขนาด 200 µl ดังนี้

- น้ำ (ddH_2O)	11.7	µl
- 4mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	2	µl
- 10X PCR buffer (มี $MgCl_2$)	2	µl
- 63F (5 µM) (Primer Forward)	1	µl
- 1387R (5 µM) (Primer Reverse)	1	µl
- *Taq* DNA Polymerase (FINNZYMES) (2 Units/µl)	0.3	µl
- DNA Template (50 ng)	2	µl
Total	**20**	**µl**

3. นำปฏิกิริยา PCR ที่ได้ในข้อ 2 เข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งรอบปฏิกิริยา ดังนี้

Preamplification : 1 รอบ ที่ 94 °C นาน 10 นาที

Amplification : 30 รอบ ดังนี้

Denatuation : 94 °C นาน 30 วินาที

Annealing : 55 °C นาน 30 วินาที

Extention : 72 °C นาน 1 นาที

Post extention : 1 รอบ ที่ 72 °C นาน 10 นาที

Hold ที่ 4 °C infinity (α)

4. ดูด PCR product ที่ได้ 3 µl ไปตรวจวิเคราะห์ผลโดยการวิธี Electrophoresis ซึ่งปฏิบัติเช่นเดียวกับบทปฏิบัติการที่ 3 ส่วนที่เหลืออีก 17 µl นำไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปทำ cycle sequencing ต่อไป

วิธีการเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

ดูด PCR product จำนวน 17 µl (ดูดไปใช้วิเคราะห์ผลด้วย Electrophoresis 3 µl จึงเหลือ 17 µl) ที่ได้จากบทปฏิบัติการที่ 4 ใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 ml

1. เติม stock solution A : 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 µl
   : 95% Ethanol ปริมาตร 85 µl
2. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer นาน 10 วินาที นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 °C ความเร็ว 14,000 rpm นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง
4. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 300 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที
5. นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 °C ความเร็ว 14,000 rpm นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง
6. ปล่อยให้ตะกอนDNAแห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย ddH_2O ปริมาตร 6 µl
7. ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ PCR product จำนวน 1 µl ผสม TE buffer 2 µl และ loading dye 1 µl จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของ PCR product เพื่อใช้ในการทำ cycle sequencing ในบทปฏิบัติการต่อไป

บทปฏิบัติการที่ 4 : การโคลนยีนบริเวณ 16S rRNA gene

อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
3. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
4. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 ˚C และ -80 ˚C
5. ชุดถ่ายภาพเจล (Gel Documentation)
6. หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ
7. Pipette ขนาด P2, P20, P200 และ P1,000 µl

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
3. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit® (RBC Bioscience)
4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด DNA GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
5. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α
6. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่

   ไพรเมอร์ 16S rDNA : Primer 63F (Forward), Primer 1387R (Reverse)

   ไพรเมอร์ T&A Cloninng vector : M13-F (forward), M13-R (reverse)
7. อาหาร LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

วิธีการเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Cloning vector

นำDNAของยีนซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์ข้างต้นมาเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector (RBC Bioscience)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาดังนี้

Ligation Buffer A	1	µl
Ligation Buffer B	1	µl
T&A Cloning vector	2	µl
T4 DNA Ligase	1	µl
PCR product	2	µl
ddH_2O	3	µl
ปฏิกิริยาทั้งหมด	**10**	**µl**

ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 ˚C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์ *E. coli* ทันที นำปฏิกิริยา ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ˚C

วิธีการเตรียม Competent Cells และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α

1. เตรียมอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 µg/ml เทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10-15 ml

2. หลังจากอาหารแข็งแล้วเติม 100 mM IPTG 100 µl และ X-Gal (50 µg/ml) 20 µl ลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง

3. ทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 µl ใส่ลงในหลอด competent cell ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันและแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 ˚C เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 µl ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. นำcompetent cell ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37˚C นาน14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้น insert ของยีน ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 50 µg/ml ที่อุณหภูมิ 37˚C เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm นาน 14-16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิด DNA ในขั้นตอนต่อไป

วิธีการสกัดพลาสมิด DNA โดยชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)

1. ดูดตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 5 นาที เพื่อนำมา ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 µl

2. เติม Lysis Solution 250 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอด 4–6 ครั้ง

3. เติม Neutralization Solution 350 µl ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลง 4–6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 5 นาที

4. ดูดสารละลายเซลล์ใส่ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง

5. เติม Wash Solution 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 ml

6. เติม Elution Buffer 25 µl บ่มนาน 15–30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpmนาน 1 นาที ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพลาสมิด DNA ด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis และเก็บพลาสมิด DNA ที่อุณหภูมิ -20˚C

วิธีการตรวจสอบการปรากฏของยีน 16S rRNA gene ใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิด DNA ที่ได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

M13-F 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

M13-R 5' TCACACAGGAAACAGCTATGA C 3'

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

DNA (50 ng/µl)	2	µl
10x PCR buffer	2	µl
4mM dNTP	2	µl
50 mM $MgCl_2$	0.6	µl
ไพรเมอร์ M13-F (5 µM)	1	µl
ไพรเมอร์ M13-R (5 µM)	1	µl
Taq DNA polymerase(0.5 units/µl, Immulase)	0.15	µl
ddH_2O	11.25	µl
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	**20**	**µl**

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

95 °C	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 °C	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
60 °C	30 วินาที	
72 °C	2 นาที	
72 °C	5 นาที	
4 °C	infinity (α)	

ตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นDNAด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 µg/ml) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบDNAด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบ DNA กับ DNA มาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

บทปฏิบัติการที่ 5 : การทำ cycle sequencing และการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

อุปกรณ์

1. เครื่อง Thermal cycler
2. หลอด PCR ขนาด 200 µl
3. ถาดวางหลอด PCR
4. Pipette ขนาด P 2, 20, 200 และ 1,000 µl
5. Pipette tip ขนาด P 2, 200 และ 1,000 µl

สารเคมี

1. BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V2.0 Ready Reaction
2. Primer 63F (Forward) (5 µM) 5′-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3′
3. Primer 1387R (Reverse) (5 µM) 5′-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3′
4. DNA Template (PCR product)
5. น้ำ (ddH_2O)
6. stock solution A (ddH_2O และ 95% ethanol)
7. 70% Ethanol

การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

1.1 ทำความสะอาดบริเวณที่ทำ cycle sequencing โดยฉีดพ่นด้วย 70% ethanol และเช็ดให้สะอาดก่อนการปฏิบัติงาน

1.2 ดูดสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา cycle sequencing ดังนี้

- น้ำ (ddH_2O)	3.4	µl
- BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V2.0 Ready Reaction	4	µl
- Primer 63F หรือ 1387R (5 µM) ข้างใดข้างหนึ่ง	1.6	µl
- DNA Template (100 ng)	1	µl
Total	**10**	**µl**

นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ในข้อ 1.2 เข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งรอบปฏิกิริยา ดังนี้

Preamplification :1 รอบ ที่ 96 °C นาน 1 นาที
Amplification : 25 รอบ ดังนี้
Denaturation : 96 °C นาน 10 วินาที
Annealing : 50 °C นาน 5 วินาที
Extention : 60 °C นาน 4 นาที
Hold ที่ 4 °C infinity (∞)

การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

2.1 นำผลผลิต cycle sequencing ที่ได้จากข้อ 1 จำนวน 10 µl มาใส่ลงในหลอด micro tube ขนาด 1.5 ml

2.2 เติม stock solution A : ddH_2O ปริมาตร 16 µl

: 95% ethanol ปริมาตร 64 µl

2.3 ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที

2.4 นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 °C ความเร็ว 14,000 rpm นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง

2.5 ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 µl ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที

2.6 นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 oC ความเร็ว 14,000 rpm นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนผลิตภัณฑ์แห้งในที่มืด

บทปฏิบัติการที่ 6 : การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรม

1. เครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรม (Genetic Analyzer)

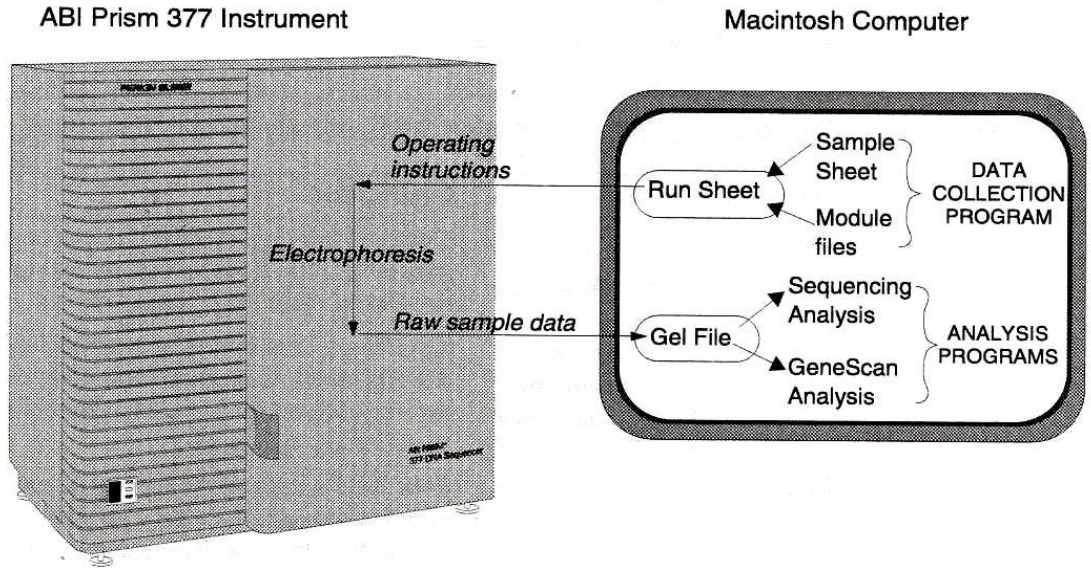
เครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรมที่ใช้มี 2 รุ่น คือ

1. เครื่อง ABI PRISM 377® DNA Sequencer เป็นเครื่องวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมแบบกึ่งอัตโนมัติ ซึ่งต้องมีการเตรียมเจลอะคริลาไมด์ลงบนกระจกแบบดั้งเดิม แต่สามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละ 36 ตัวอย่าง เวลาในการ Run ประมาณ 7-8 ชั่วโมง เครื่องรุ่นนี้มีลักษณะดังภาพ

2. เครื่อง ABI PRISM 310 Genetic Analyzer เป็นเครื่องวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ โดยใช้ Capillary 1 เส้น เครื่องรุ่นนี้ใช้เจล POP6 ผ่าน Syring ไม่ต้องสัมผัสเจลโดยตรงมีความปลอดภัยสูง สามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละ 1 ตัวอย่าง เวลาในการ Run ประมาณ 2-3 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง เครื่องรุ่นนี้มีลักษณะดังภาพ

การใช้เครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer

เครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer หรือ เรียกว่า เครื่อง Automate เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งสามารถตรวจสอบชิ้นของดีเอ็นเอ โดยการติดฉลากสีที่ dNTPs ด้วยสารเรืองแสงที่สายดีเอ็นเอ ในขณะทำ PCR หรือ ติดฉลากที่ปลาย 5′ ของ Primer ในขณะที่ทำ PCR และ Software จากเครื่องคอมพิวเตอร์จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยเครื่องจะคำนวณค่าขนาดของดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ออกมาอยู่ในรูปของ Gel File, Electropherogram และ Tabular Data



ภาพที่ 1 แสดงการเชื่อมโยงของเครื่อง ABI Prism 377 กับ เครื่องคอมพิวเตอร์

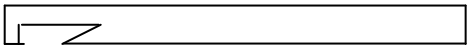
เครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer ควบคุมการทำงานและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ Macintosh ซึ่งประกอบด้วยโปรแกรม 3 โปรแกรมคือ

1. Data Collection Program ซึ่งเป็นโปรแกรมเก็บรวบรวมข้อมูลและการตั้งค่า Module ต่างๆ
2. Analysis Program ประกอบด้วย โปรแกรมที่วิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing Analysis) และโปรแกรมวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (GeneScan Analysis)
3. Genotyper Program เป็นโปรแกรมสำหรับพิมพ์ (print) ผลการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ

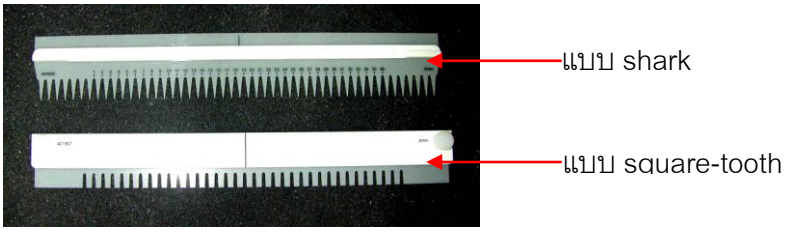
อุปกรณ์ที่ใช้กับเครื่อง ABI Prism 377

1. Cassette เป็นส่วนที่ใช้ในการยึด Glass Plates

2. Spacers มี 2 อัน หนา 0.2 มิลลิเมตร เป็นตัวกันระหว่าง Glass Plates ทั้ง 2 แผ่น เพื่อควบคุมความหนาของ gel และป้องกันการรั่วของ gel ในระหว่างการ load gel



3. หวี (Comb) มี 2 แบบ คือ แบบ shark และ แบบ square-tooth



4. Upper chamber และ Lower chamber เป็นส่วนที่ใช้ในการบรรจุ buffer ในการทำ electrophoresis

5. กระจก (Glass Plates) ประกอบด้วย 2 แผ่น คือ ส่วนของด้านหน้า (Front plate) และด้านหลัง (Rear plate)

กระจก (Glass Plate) มี 2 ขนาด คือ ความยาว 36 เซนติเมตร และ 48 เซนติเมตร ในการเลือกใช้ขนาดของ Glass Plate ขึ้นอยู่กับความเร็วในการ Run , สูตรเจล และ ความยาวของเบส ดังตาราง

Plate Size and Run Speed	สูตรเจล (Gel Formulation)	Expected Read Length in Bases
- 36-cm well-to-read (WTR) plates - 1200 scans/hr	- 4.5% 29:1 polyacrylamide - 5.0% Long Ranger (concentrate or Single™ gel forms) - 4.8% PAGE-PLUS	650-800
- 36-cm WTR plates - 2400 scans/hr	- 4.5% 29:1 polyacrylamide	550-700
- 48-cm WTR plates - 1200 scans/hr	- 4.25% 29:1 polyacrylamide - 4.75% Long Ranger (concentrate or Single™ gel forms) - 5.25% PAGE-PLUS	750-900

การทำความสะอาดแผ่นกระจกที่ใช้กับเครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer

<u>การทำความสะอาด glass plates</u>

1. นำ glass plate ออกจาก cassette เพื่อทำความสะอาด
2. ใช้น้ำ deionized ทำความสะอาดให้ทั่ว glass plates โดยเฉพาะบริเวณ read region
3. ตรวจดู glass plates ถ้าพบ ฝุ่น, เศษเส้นใย, หยดน้ำ หรือรอยนิ้วมือ ให้ทำความสะอาดอีกครั้ง
4. ตั้ง glass plates ผึ่งให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนการทำความสะอาด glass plates หลังการ Loading the Gel</u>

1. นำ glass plate ออกจาก cassette เพื่อทำความสะอาด
2. ใช้ spedtular สอดด้านมุมใดมุมหนึ่งของกระจก (glass plates) แล้วค่อยๆ ดันกระจกด้านบนขึ้น เพื่อให้อากาศเข้าไประหว่างกระจกทั้งสองแล้วจึงนำกระจกด้านบนออก
3. นำ Gel ออกจาก glass plates โดยใช้กระดาษทิชชูวางให้เต็มแผ่นกระจกทั้งสอง แล้วม้วนกระดาษทิชชูขึ้นไปจนสุด glass plates และ Gel จะติดออกมากับกระดาษทิชชู
4. หยด aclonox เพียงเล็กน้อย แล้วใช้มือถูให้ทั่ว glass plates ทั้งด้านหน้าและด้านหลังให้สะอาด โดยเฉพาะด้านในของกระจก (ด้านที่เห็นตัวอักษรกลับด้าน) และบริเวณ read region
5. ใช้น้ำล้างให้ทั่ว glass plates เพื่อล้าง aclonox ออกให้หมด
6. ใช้น้ำ deionized ทำความสะอาดให้ทั่ว glass plates อีกครั้ง โดยเฉพาะบริเวณ read region

7. ตั้ง glass plates ผึ่งให้แห้งประมาณ 1 ชั่วโมง
8. ตรวจดู glassplates อีกครั้ง ถ้าพบ ฝุ่น,เศษเส้นใย,หยดน้ำหรือรอยนิ้วมือ ให้ทำความสะอาดอีกครั้ง
9. ทำความสะอาด comb และ spacer ด้วยน้ำกลั่น และผึ่งให้แห้ง สำหรับ cassette ล้างให้สะอาดเช่นเดียวกัน

<u>หมายเหตุ</u>

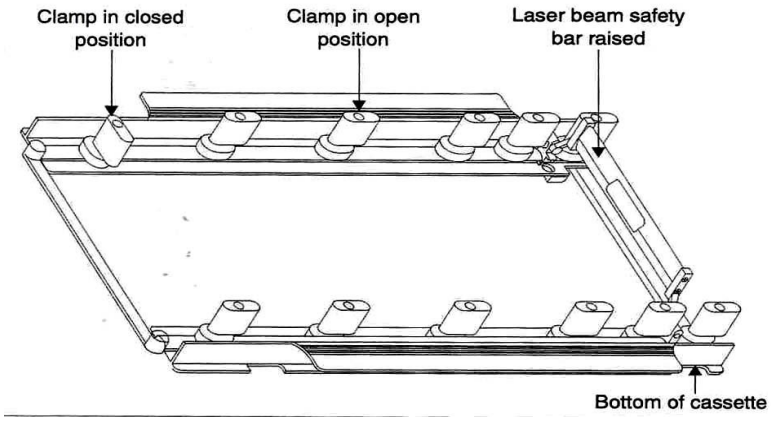
- ❖ การล้าง glass plates ต้องล้าง aclonox ออกให้หมด ไม่เช่นนั้นเมื่อ run samples จะได้ background ของ gel ที่ไม่ใช่สีดำ
- ❖ การทำความสะอาด glass plates
  - ควรใส่ถุงมือทุกขั้นตอนของการทำความสะอาด เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน fluorescent
  - หลังจาก Run ตัวอย่าง ได้ประมาณ 5-6 ครั้ง ให้ล้างด้วยน้ำอุ่นทั้งชุด

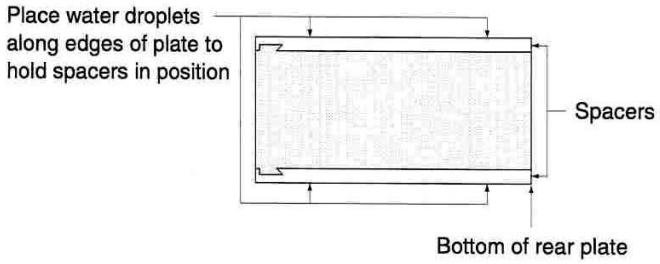
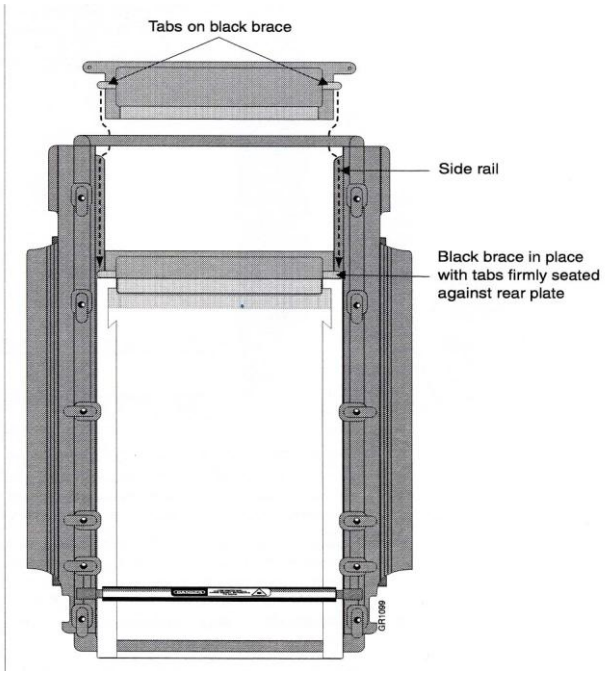
การประกอบ Glass Plate เข้ากับ Gel Cassette

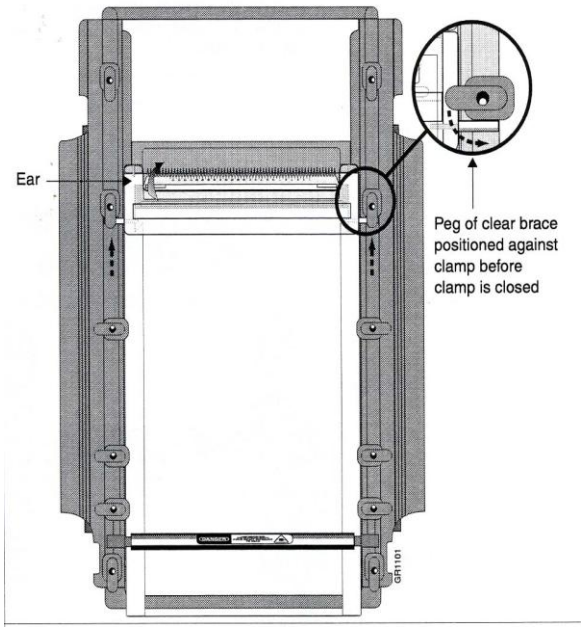
<u>ข้อควรปฏิบัติก่อนการประกอบ glass plate เข้ากับ gel cassette</u>

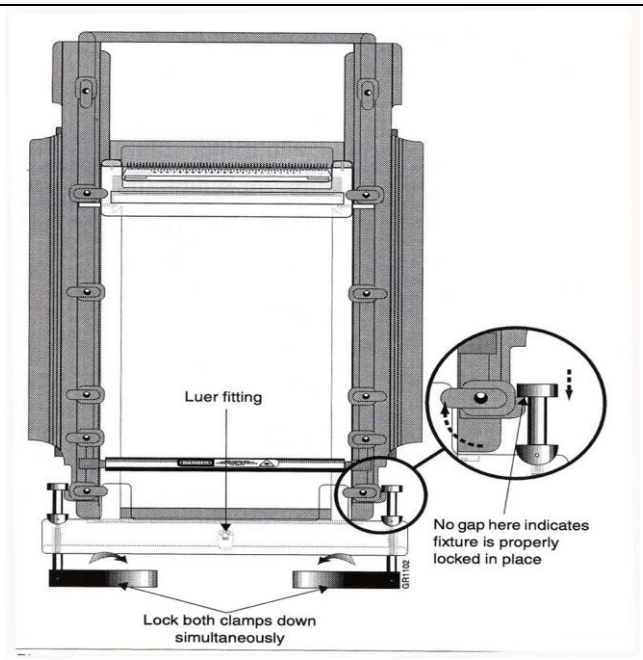
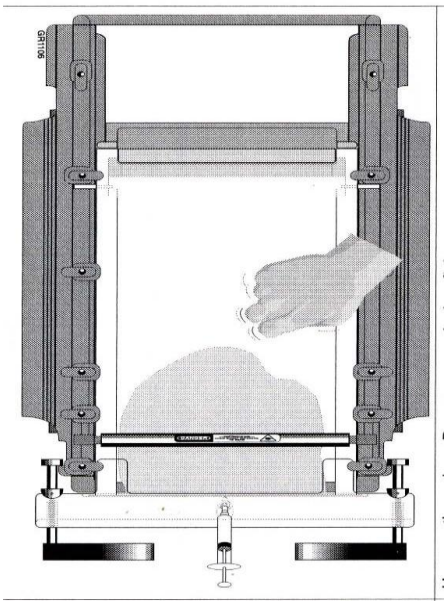
- บริเวณที่ประกอบ glass plate และ การ load gel ต้องสะอาด
- glass plate, spacers และ comb ต้องสะอาดและแห้ง
- ความยาวของ spacer ต้องมีความยาวเท่ากับความยาวของ glass plate ถ้า spacer ยาวกว่า glass plate จะทำให้ gel ที่ load เข้าไปรั่วไหลออกมา ถ้าจำเป็นอาจจะตัด spacer ให้มีความยาวเท่ากับกระจก

ขั้นตอนการประกอบ glass plate เข้ากับ gel cassette

ขั้นตอนที่	วิธีการ
1	วาง cassette บนพื้นที่สะอาดและเรียบ
2	ยกส่วนของ Laser beam safety bar ขึ้นและบิด clamp ให้อยู่ในตำแหน่งที่เปิด 

ขั้นตอนที่	วิธีการ
3	ตรวจสอบดูแผ่นกระจกด้านในว่ามีหยดน้ำ ฝุ่น ผง ต่างๆ ติดอยู่หรือไม่ ถ้ามีควรเช็ดด้วยกระดาษ Kimwipe ที่ชุบน้ำหมาด
4	วาง Rear plate ลงบน cassette โดยหันให้ด้านที่อ่านตัวหนังสือออกคว่ำลงและให้แผ่นกระจกที่เป็นรอยบากอยู่ทางด้านล่างของ cassette (ด้าน Laser beam safety bar raised)
5	วาง spacer บนขอบแผ่นกระจกดังภาพ โดยให้ด้านที่เป็นรอยบากของ spacer อยู่ทางด้านบนของกระจก และจัดให้ขอบของ spacer และกระจกให้เท่ากัน spacer จะปิดส่วนของรอยบากของกระจกพอดี 
6	วาง Front plate ลงบน Rear plate และ spacer โดยให้ด้านที่อ่านตัวหนังสือไม่ได้คว่ำลง และจัดให้ขอบกระจกด้านล่างทั้ง 2 แผ่นเท่ากัน
7	วาง Front plate ลงบน Rear plate และ spacer โดยให้ด้านที่อ่านตัวหนังสือไม่ได้คว่ำลง และจัดให้ขอบกระจกด้านล่างทั้ง 2 แผ่นเท่ากัน 

ขั้นตอนที่	วิธีการ
8	ใช้นิ้วสัมผัสกับด้านล่างของขอบกระจกเพื่อให้แน่ใจว่าขอบของกระจกทั้ง 2 แผ่นเสมอกัน ถ้าไม่เสมอกันจะทำให้ gel ที่ฉีดเข้าไปรั่วไหลได้
9	Lock แผ่นกระจกด้วย Clamps
10	ใช้นิ้วสัมผัสกับด้านล่างของขอบกระจกอีกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าขอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเสมอกัน ถ้าไม่เสมอกันควรเปิด Clamp และปรับให้เสมอกันอีกครั้ง
11	ใช้ clear brace ล็อค แผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นทางด้านบน และล็อค clear brace ด้วย clamp ทั้ง 2 ข้าง ดังภาพ 

ขั้นตอนที่	วิธีการ
12	ใส่ Gel injection fixture ที่บริเวณด้านล่างของ read region เพื่อ fix ไม่ให้ Gel ไหลออกมาขณะที่ load Gel และ ล็อคด้วย Clamp ทั้งสองด้าน ดังภาพ 
13	ค่อยๆ feed เจล และเคาะกระจกเพื่อไล่ฟองอากาศ 
14	ใส่ Comb ระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น และทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมงแล้วนำไปประกอบกับตัวเครื่อง ABI Prism 377® กรณีที่เป็น comb แบบ shark-tooth ให้ใส่ทางด้านเรียบ กรณีที่เป็น comb แบบ square-tooth ให้ใส่ทางด้านที่เป็นฟันหวี

1. การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 377® DNA Sequencer

1.1 การเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับเครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer

1) ล้างกระจกขนาด 36 X 48 เซนติเมตร ด้วยน้ำเปล่าให้ทั่วทั้งแผ่นให้สะอาด

2) นำกระจกมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

3) นำกระจกมาประกอบเข้ากันชุดอุปกรณ์ casting โดยใช้ spacer หนา 0.2 มิลลิเมตร อยู่ระหว่างขอบของกระจก 2 แผ่น

4) เตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วย

สาร	ปริมาณ	
Urea	9.0	กรัม
ddH_2O	13.0	มิลลิลิตร
50% Long Ranger	2.5	มิลลิลิตร
10X TBE	2.5	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulphate	125.0	ไมโครลิตร
TEMED	17.5	ไมโครลิตร
รวม	25	มิลลิลิตร

5) ละลายยูเรียกับน้ำแล้วจึงเติม 50%Long Ranger, 10X TBE และ 10% APS (Ammonium persulfate) ผสมให้เข้ากันดี นำไปไล่อากาศ แล้วจึงเติม TEMED

6) ใช้กระบอกฉีดยาฉีดเจลจากด้านล่างกระจก พร้อมเคาะกระจกไล่ฟองอากาศที่อาจมีขึ้น

7) ใส่หวีด้านบนของกระจก ปล่อยเจลให้แข็งตัวไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมตัวอย่างพร้อม load บนเจลโพลิอะคริลาไมด์

นำตัวอย่างที่ได้จากบทปฏิบัติการที่ 6 มาละลายด้วยส่วนผสมของ Hidi formamide : 2 mM EDTA ที่มี blue dextran (50 mg/ml) อัตราส่วน 5:1 ปริมาตร 6 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้พร้อมที่จะนำไป load บนเจลของเครื่อง ABI PRISM 377® DNA Sequencer

1.3 การนำตัวอย่างเข้าเครื่อง

1) ประกอบกระจกที่เตรียมเจลเรียบร้อยแล้วจากข้อ 2.1 เข้ากับเครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer

2) ตรวจสอบคุณภาพของเจลและความสะอาดของกระจกก่อนทำอิเลคโทรโฟริซิสด้วยการทำ plate check

3) Prerunning 30 นาที

4) นำตัวอย่างจากข้อ 2.2 มา load ใช้ lane ละ 1 ไมโครลิตร แล้ว run electrophoresis บนเครื่อง ABI 377® DNA sequencer โดยใช้ 1X TBE buffer

หมายเหตุ ดูรายละเอียดการ set กระจก เพิ่มเติมจากภาคผนวกเรื่อง การใช้เครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer

2. การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

2.1 นำตัวอย่างที่ได้ มาละลายด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร

2.2 Mix ตัวอย่างในหลอดให้ DNA sequence ละลายกับ Hidi formamide ให้ดี แล้วนำไปปั่นให้ DNA ตก (spin down) ที่ก้นหลอด microtube

2.3 ดูด DNA sequence ในข้อ 2.2 ทั้งหมด (10 ไมโครลิตร) ใส่หลอด Septa สำหรับเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

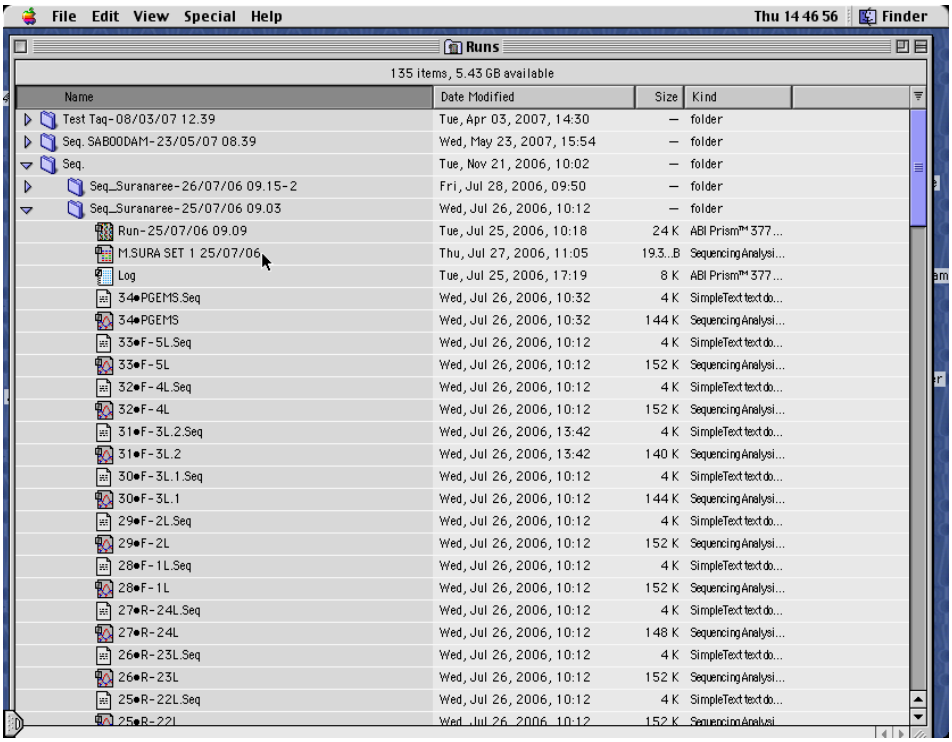
2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้พร้อมที่จะนำไป load เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

การวิเคราะห์ผลลำดับเบสจากเครื่อง ABI PRISM 377® DNA Sequencer

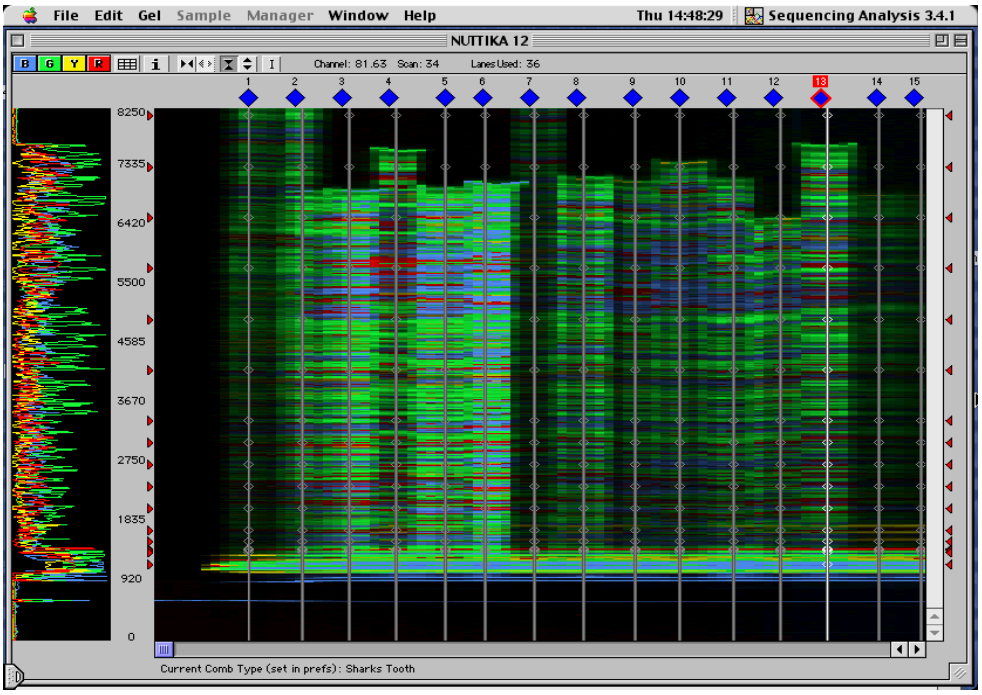
หลังจากเครื่อง Run ตัวอย่างเสร็จแล้ว ต้องทำการวิเคราะห์ผลจากเครื่อง โดยใช้ Software โปรแกรม Sequencing Analysis ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

1. ดับเบิ้ลคลิกไอคอน Runs alias บน Desktop

2. เลือก Folder ที่สั่ง Run ไปแล้วและต้องการวิเคราะห์ผล ดังภาพ

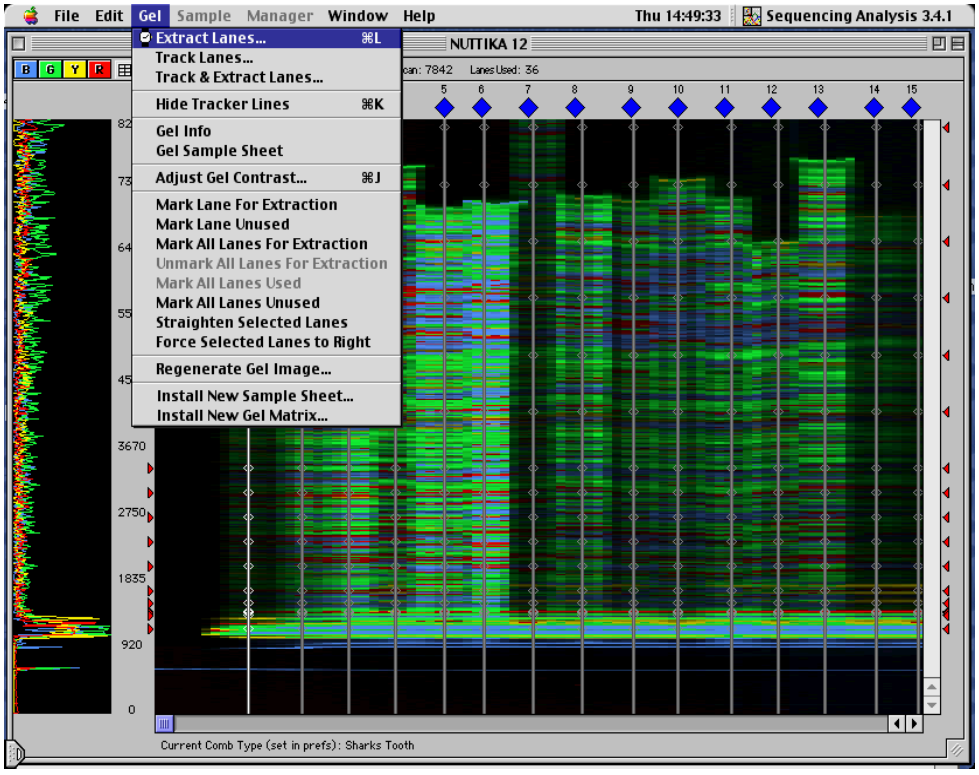


3. ดับเบิ้ลคลิก Gel file จะเห็นหน้าจอขึ้น ดังภาพ

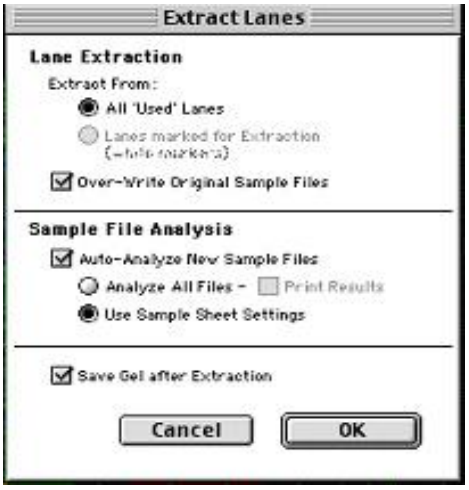


4. จัด lane ตัวอย่างที่ load ให้ตรงกับภาพ gel ที่ได้

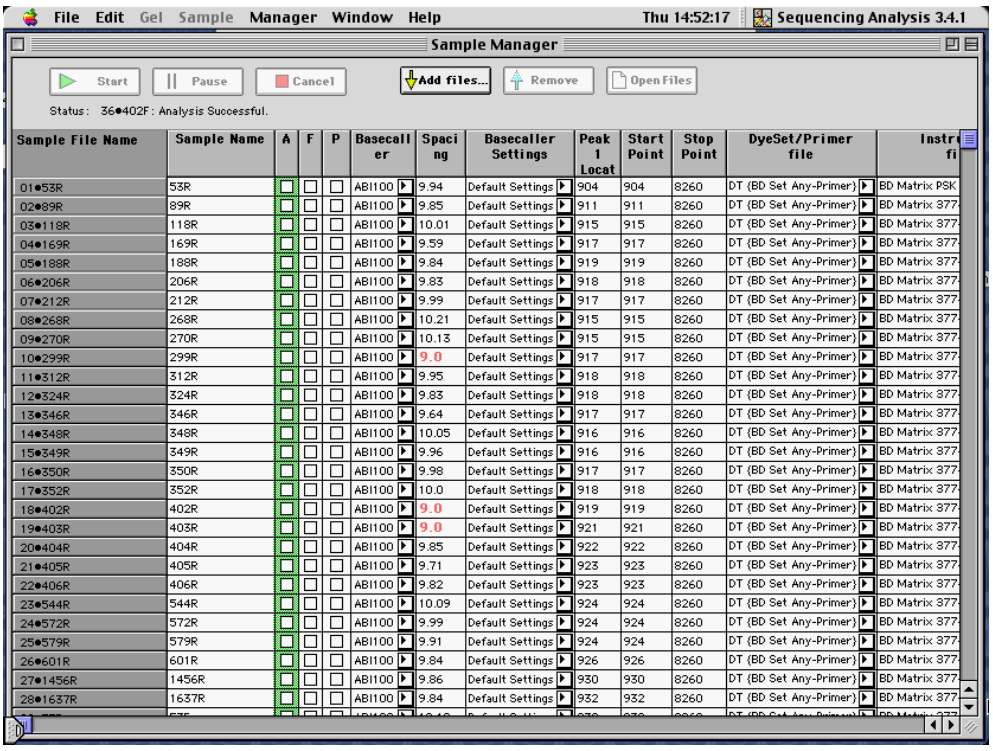
5. หลังจากจัด lane เสร็จแล้วให้ สั่ง extract lanes โดยคลิกเม้าส์ไปที่ Gel menu⟶ Extract Lanes



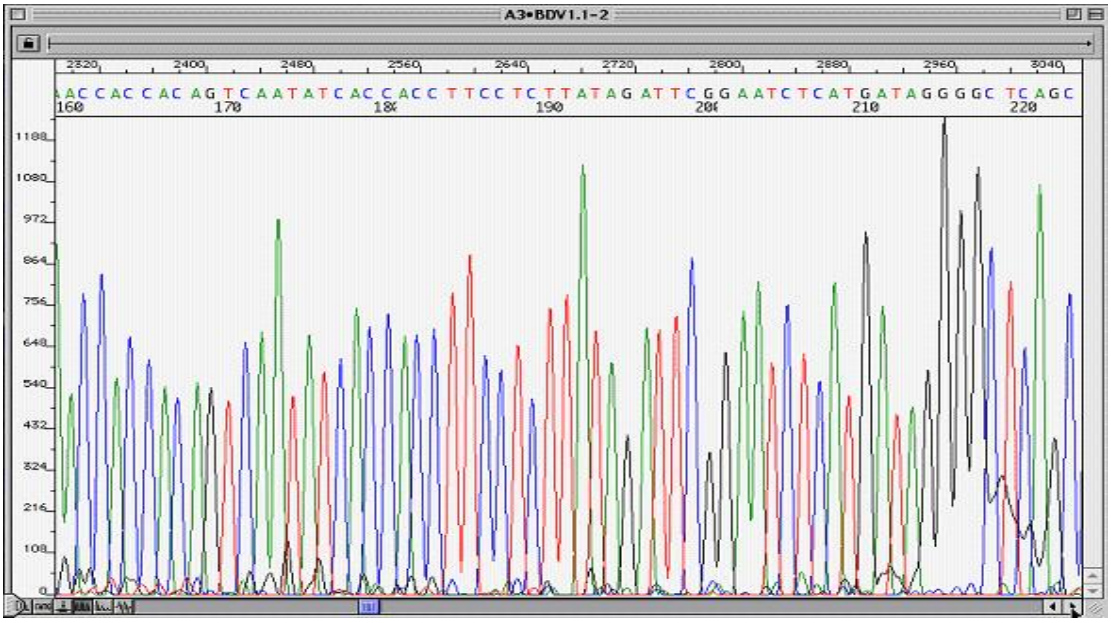
6. คลิก OK



7. รอเครื่องวิเคราะห์ผลจนกว่าจะขึ้นหน้าจอ Sample Manager ดังภาพ



8. ดับเบิ้ลคลิกตัวอย่างในช่อง Sample File Name ที่ต้องการแก้ไข จะเห็นหน้าจอ Electropherogram



9. แก้ไข Peak ที่ติด N ว่าควรเป็นเบสใด แต่ถ้าตัดสินใจไม่ได้ก็ไม่จำเป็นต้องแก้ไข กรณีถ้า 2 peak หรือ 3 peak ติดซ้อนกันในตำแหน่งเดียวไม่สามารถแยกได้ สามารถแก้ไขโดยใช้ IUB Codes แทน ตัวอย่างเช่น peak ที่ซ้อนกันด้วยลำดับเบส A หรือ G ให้ใช้รหัส R

peak ที่ซ้อนกัน 2 รหัสด้วยลำดับเบส C หรือ T ให้ใช้รหัส Y

peak ที่ซ้อนกัน 2 รหัสด้วยลำดับเบส G หรือ T ให้ใช้รหัส K

peak ที่ซ้อนกัน 2 รหัสด้วยลำดับเบส A หรือ C ให้ใช้รหัส M

peak ที่ซ้อนกัน 2 รหัสด้วยลำดับเบส G หรือ C ให้ใช้รหัส S

peak ที่ซ้อนกัน 2 รหัสด้วยลำดับเบส A หรือ T ให้ใช้รหัส W

peak ที่ซ้อนกัน 3 รหัสด้วยลำดับเบส C, G หรือ T ให้ใช้รหัส B

peak ที่ซ้อนกัน 3 รหัสด้วยลำดับเบส A, G หรือ T ให้ใช้รหัส D

peak ที่ซ้อนกัน 3 รหัสด้วยลำดับเบส A, C หรือ T ให้ใช้รหัส H

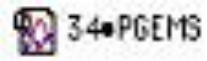
peak ที่ซ้อนกัน 3 รหัสด้วยลำดับเบส A, C หรือ G ให้ใช้รหัส V

ดังภาพ

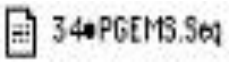
IUB CODES

A = Adenosine	R = A or G (puRine)
C = Cytidine	Y = C or T (pYrimidine)
G = Guanosine	K = G or T (Keto)
T = Thymidine	M = A or C (aMino)
B = C, G, or T	S = G or C (Strong-3H bond
D = A, G, or T	W = A or T (Weak-2H bonds
H = A, C, or T	N = aNy base
V = A, C, or G	

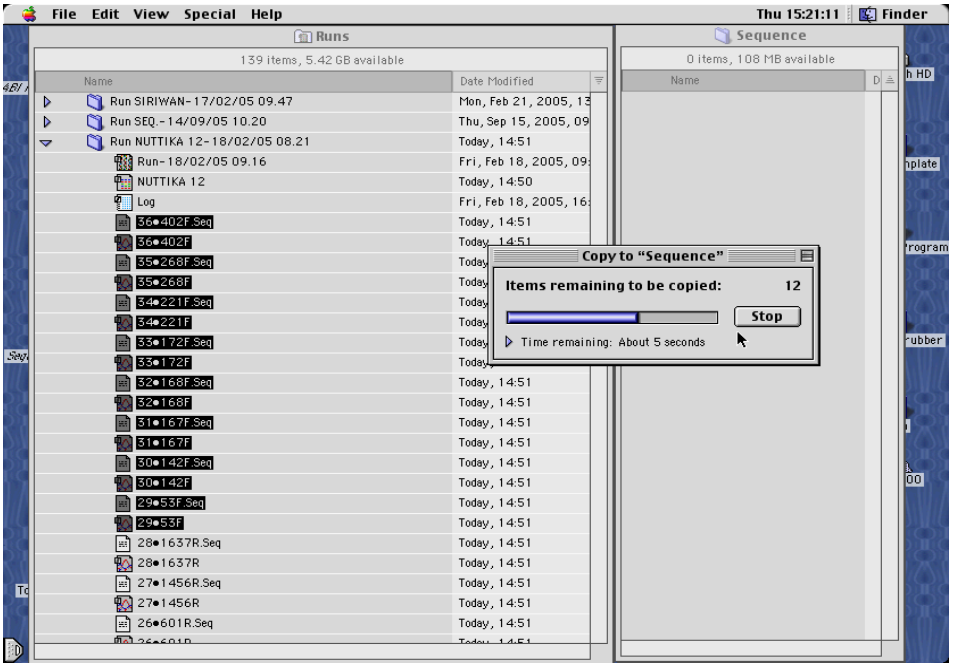
10. ถ้าแก้ไขค่า N เสร็จเรียบร้อยแล้วให้ Save file แทนที่ file เดิม
11. นำ file ที่แก้ไขแล้ว ออกจากเครื่อง สามารถ copy ใส่ลง Handy drive ได้เลย ซึ่งการเปิด file ที่แก้ไขแล้วให้คลิกเม้าส์ไปที่ไอคอน Runs alias
12. เลือก file ที่ต้องการ copy ซึ่ง 1 ตัวอย่างจะมี 2 file คือ
    - ไฟล์ Electropherogram มีลักษณะเป็น Peak ของลำดับเบสทั้ง 4 ชนิดเรียงต่อกัน ไอคอนมีลักษณะดังภาพ



    - ไฟล์ Sequence เป็นตัวอักษรของลำดับเบสทั้ง 4 ชนิดเรียงติดต่อกันตามขนาดชิ้นของดีเอ็นเอ มีนามสกุล .seq และไอคอนที่เปิดมีลักษณะดังภาพ



การ copy file ให้ลาก file ที่ต้องการลงใส่ Folder ใน Handy drive ได้ทันที ดังภาพ



บทปฏิบัติการที่ 7 : การใช้ Software ในการแก้ไขและจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

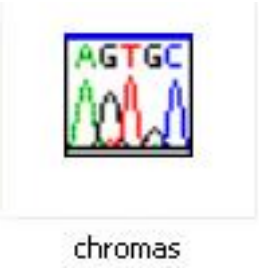
ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์มาจากเครื่อง Automate sequencer บางครั้งตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์จำเป็นต้องมีการแก้ไขข้อมูลก่อนที่จะนำไปจำแนกหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์หรือยีนของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการค้นหาซึ่ง Software ที่ใช้ในการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถเลือกใช้ได้หลายโปรแกรมขึ้นอยู่กับความสะดวกของผู้ใช้งาน ตัวอย่างเช่น โปรแกรม Chromas, Bioedit, Treecon หรือ DNA star เป็นต้น ผลวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเครื่อง Automate sequencer มีไฟล์ (File) ข้อมูลอยู่ 2 ลักษณะ ดังนี้

1. File Electropherogram มีลักษณะไอคอน ดังภาพ

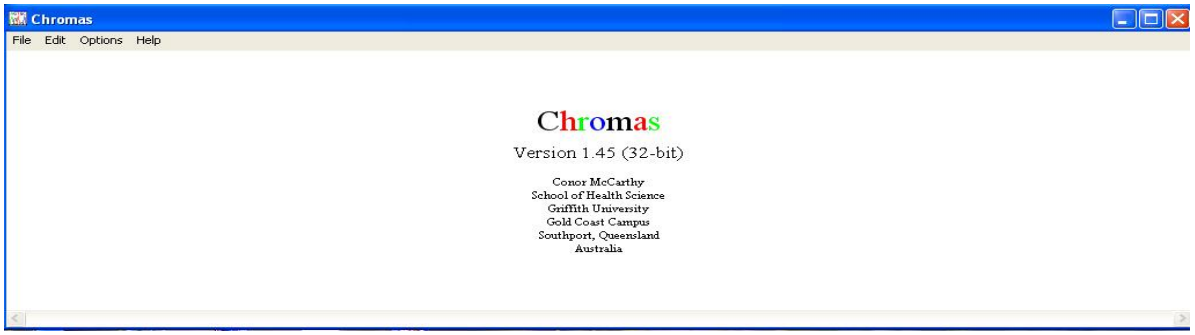
File Electropherogram มีลักษณะเป็น peak ของลำดับเบส 4 เบส (A, G, C, T) ซึ่งต้องใช้ software จากเครื่อง automate วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Sequencing Analysis ในการแก้ไขลำดับเบสที่ได้ แต่การวิเคราะห์ผลจากเครื่อง automate บางครั้งหน่วยงานที่ไม่มีเครื่อง automate เพื่อวิเคราะห์จะประสบปัญหาตรงจุดนี้ เนื่องจากโปรแกรมดังกล่าวมีลิขสิทธิ์มากับเครื่องมือและมีราคาแพงเราสามารถเลือกโปรแกรมที่สามารถเปิดไฟล์ electropherogram ได้ เช่น โปรแกรม Chromas ซึ่งวิธีการแก้ไข peak จากโปรแกรม Chromas มีวิธีการดังนี้

1.1 ใส่โปรแกรม Chromas ในเครื่อง computer ที่ต้องการใช้งาน

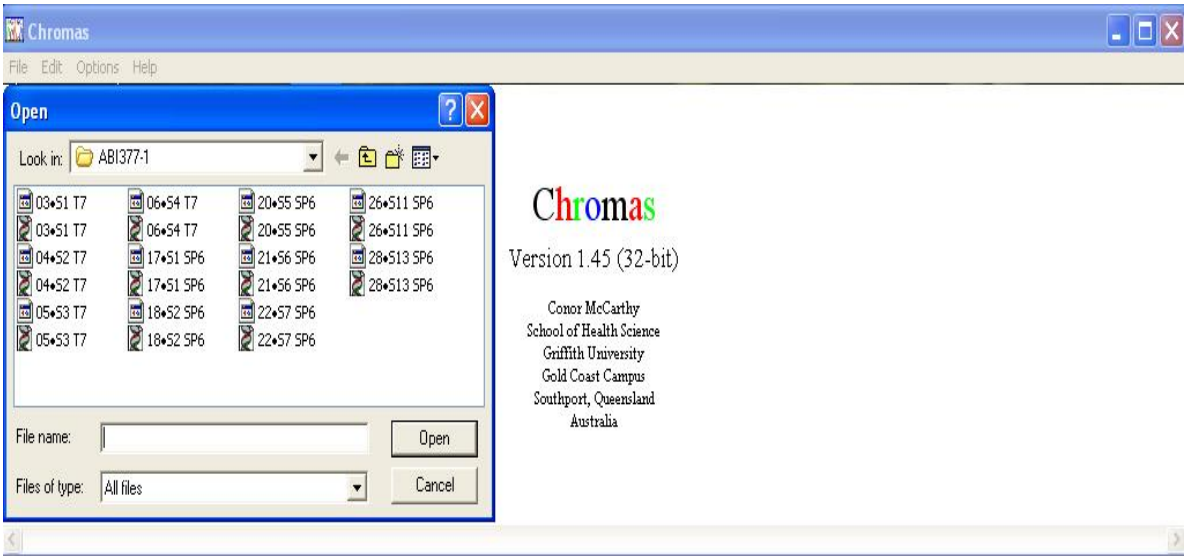
1.2 เปิดโปรแกรม Chromas หรือดับเบิ้ลคลิกไอคอน ดังภาพ



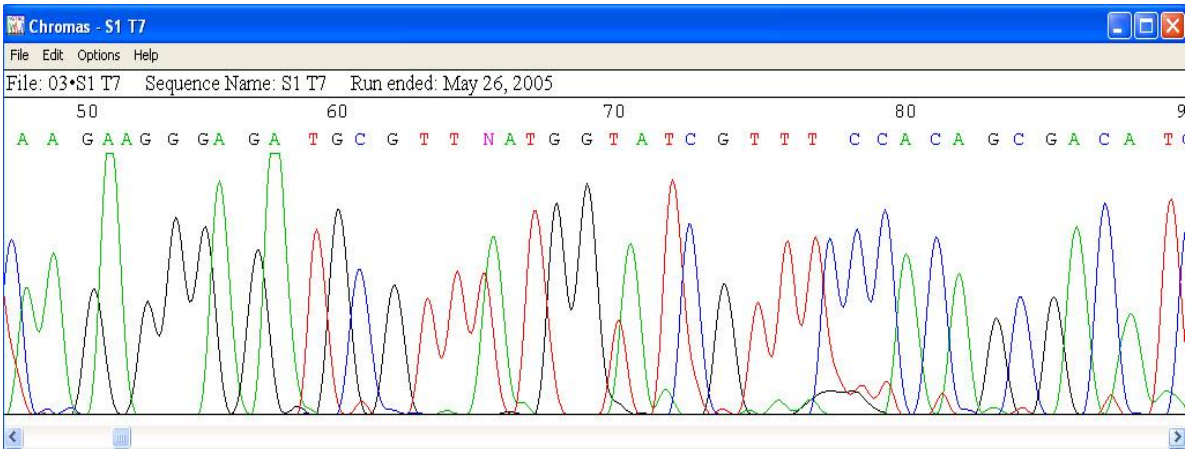
1.3 เมื่อเปิดไฟล์ Chromas แล้วจะเห็นหน้าต่าง ดังภาพ



1.4 เปิดไฟล์ electropherogram ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง โดยคลิกเม้าส์ไปที่ File menu ⟶ open ⟶เลือกไฟล์ที่ต้องการแก้ไข

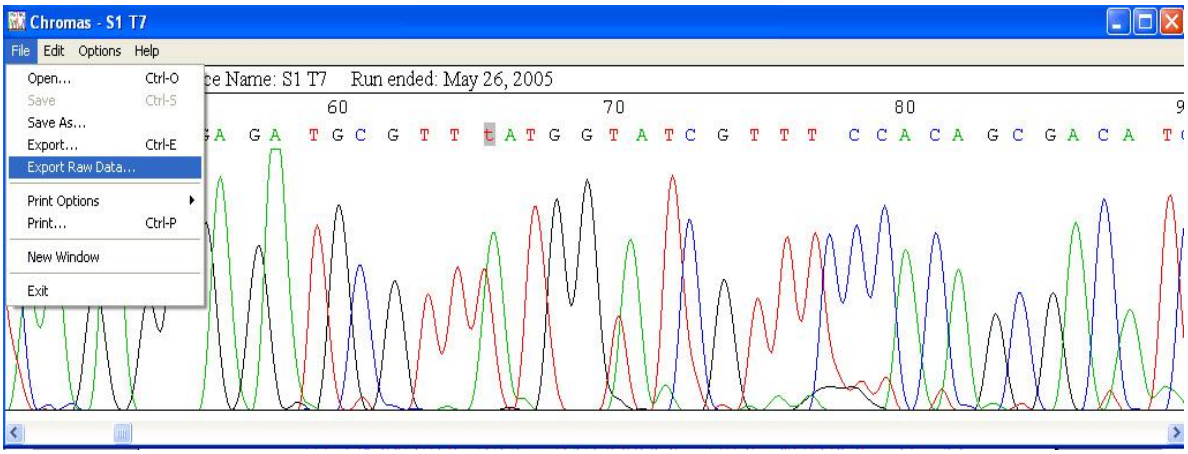


1.5 เปิดไฟล์ electropherogram จะเห็นหน้าต่างขึ้น ดังภาพ

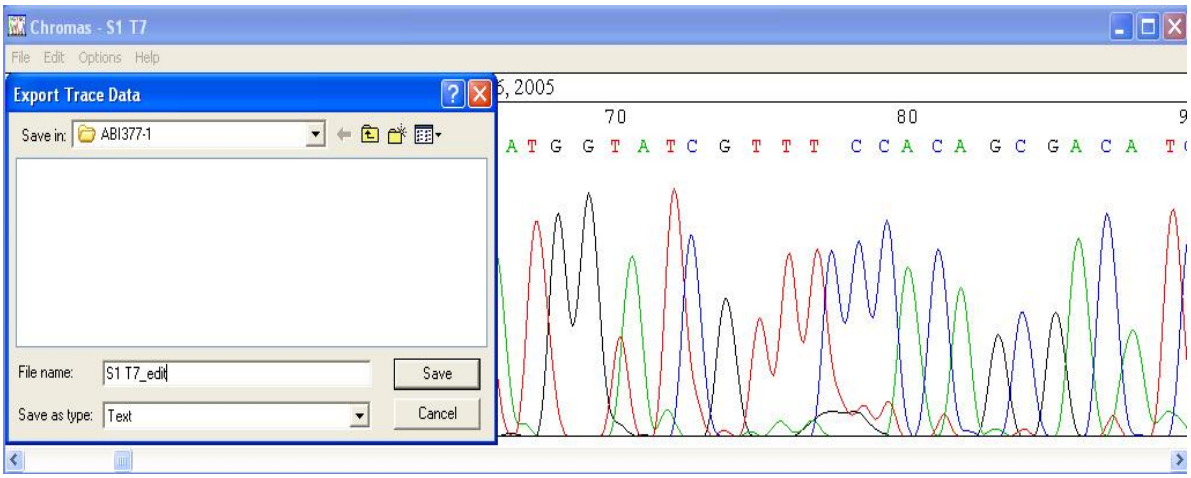


1.6 แก้ไข peak ที่ติด N และเห็นว่า peak ที่ติด N ควรเป็นเบสใด

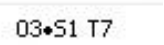
1.7 เมื่อแก้ไขค่า N เสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้ save file electropherogram ที่แก้ไขแล้ว เป็นชื่อไฟล์ใหม่ หรือ save แทนที่ไฟล์เดิม และถ้าต้องการ save เป็นแบบไฟล์ sequence ให้คลิกเม้าส์ไปที่ File menu export raw data ดังภาพ



1.8 ตั้งชื่อไฟล์ และคลิก save



2. File Sequence มีลักษณะไอคอน ดังภาพ



หลังจากแก้ไข File electropherogram และ save ไฟล์ sequence จากการแก้ไขแล้วจะได้ sequence ในรูป text file ดังภาพ

```
CGACATCGGCTCTGCTCTGGTGTTTTGCTGTGCAGCTGCAACTGCTCGAGGTCAACTGGCCGTCTG
AGATGCTCAACTCGCTCTCGTGCAAACCAACGGTTGATAAGAATAACCAGGTCATCTTAAGGGACT
GTCGGTCCGCATGGGTATTCATTGGGGCGAGCCACTCTGTGAGCCAGATCCATCACACGTCGTATG
GACTACTTCGGGCCATAATCTGAATTCGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCAC
ACCGTGTGGGGGCCGAAGCTCGCGGCCGCTGTATTCTATAGTGTCACCTAATGGGCGCACAATTCA
CTGGCCGTCGTTTT
```

เราสามารถแก้ไขลำดับเบสจาก text file โดยใช้ Software ช่วยวิเคราะห์ได้ เช่น DNAStar (LaserGene, INC, Madison) ซึ่ง Software นี้จะประกอบด้วยโปรแกรมย่อย 7 โปรแกรม ดังนี้

1.

Editseq

2.

GeneQuest

3.

MapDraw

4.

Megalign

5.

PrimerSelect

6.

Protean

7.

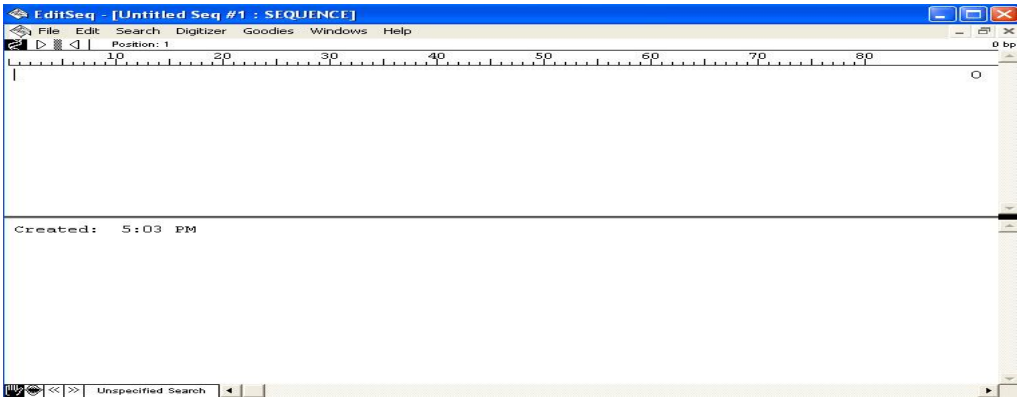
Seqman

แต่การแก้ไข text file เราจะใช้โปรแกรมที่ 1 Editseq

โดยมีวิธีการจัดการ file หรือแก้ไขข้อมูล sequence ดังนี้

1. เปิดไฟล์ Editseq โดยดับเบิ้ลคลิกไอคอน

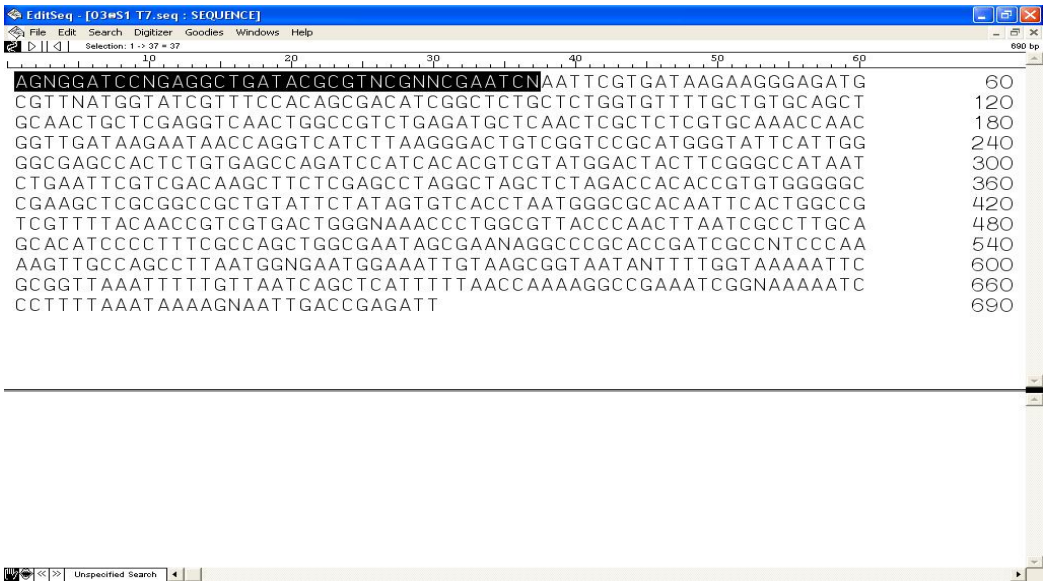
หน้าจอขึ้นดังภาพ



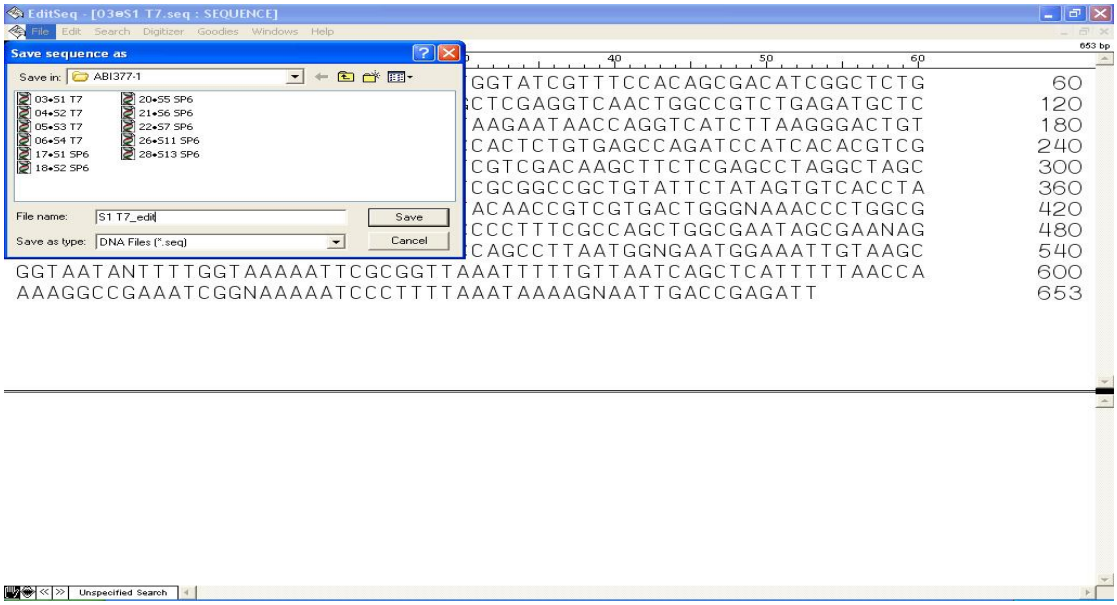
2. เปิดไฟล์ข้อมูล sequence ที่ต้องการแก้ไข โดยคลิกเม้าส์ไปที่ File menu ⟶ Open ดังภาพ

3. เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการแก้ไขและคลิก OK

4. เลือก sequence ที่ติดค่า N ในช่วงแรกออก แล้วคลิก Delete ดังภาพ



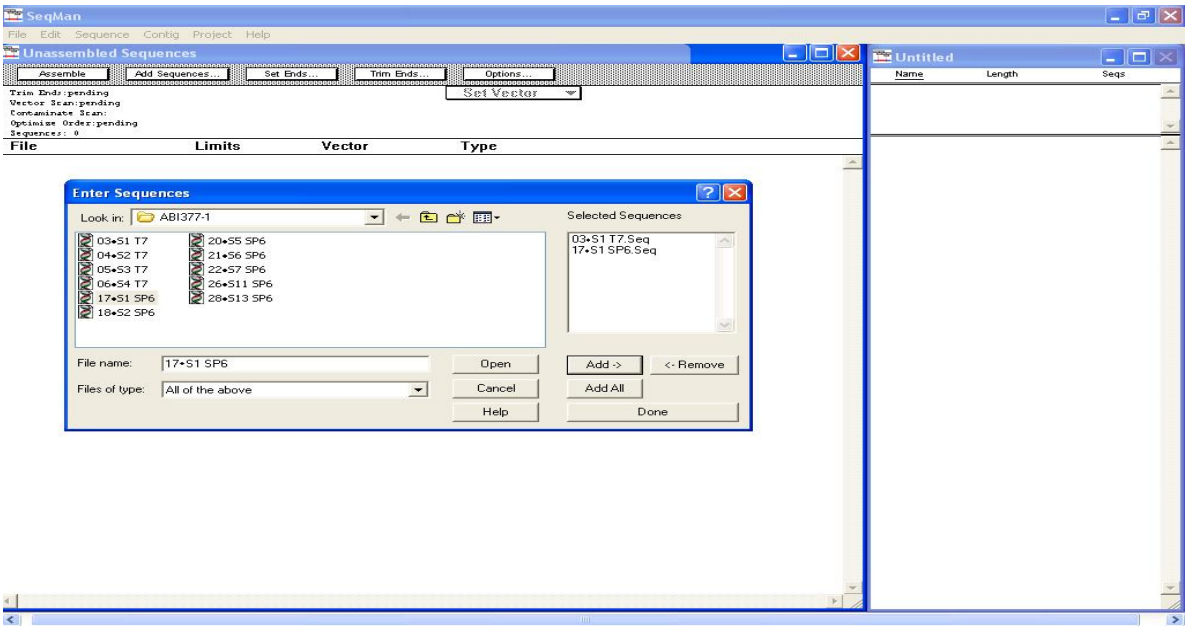
5. Save และตั้งชื่อไฟล์ใหม่หรือแทนที่ไฟล์เดิม โดยคลิกเม้าส์ไปที่ File menu ⟶save as ⟶ ตั้งชื่อไฟล์ ⟶save ดังภาพ



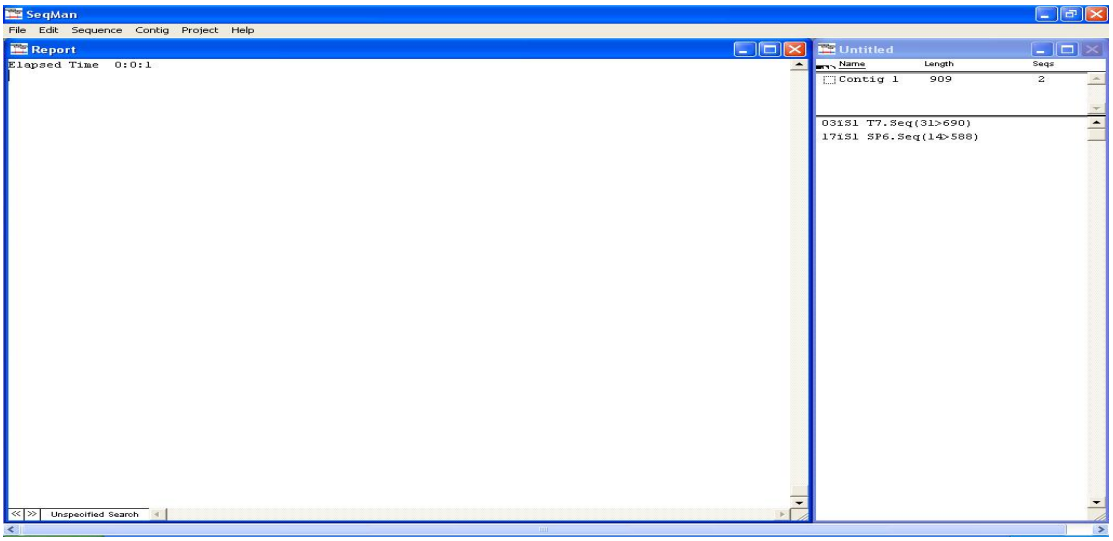
กรณีถ้ามีข้อมูล sequence ของตัวอย่างทั้งสาย forward และ reverse และต้องการต่อให้เป็นสายเดียวกัน หรือต้องการเชื่อมต่อ sequence ที่ขาดเป็นท่อน ๆ (contigs) ซึ่งได้จากการหาลำดับเบส และแต่ท่อนมีส่วน sequence เหลื่อมซ้อน (overlapped) กันอยู่ เราสามารถต่อ DNA sequence หลายๆ ท่อนรวมเป็น DNA สายยาวสายเดียวได้โดยใช้โปรแกรม SeqMan มีวิธีการดังนี้

1. ดับเบิ้ลคลิกไอคอน SeqMan เพื่อเปิดโปรแกรม

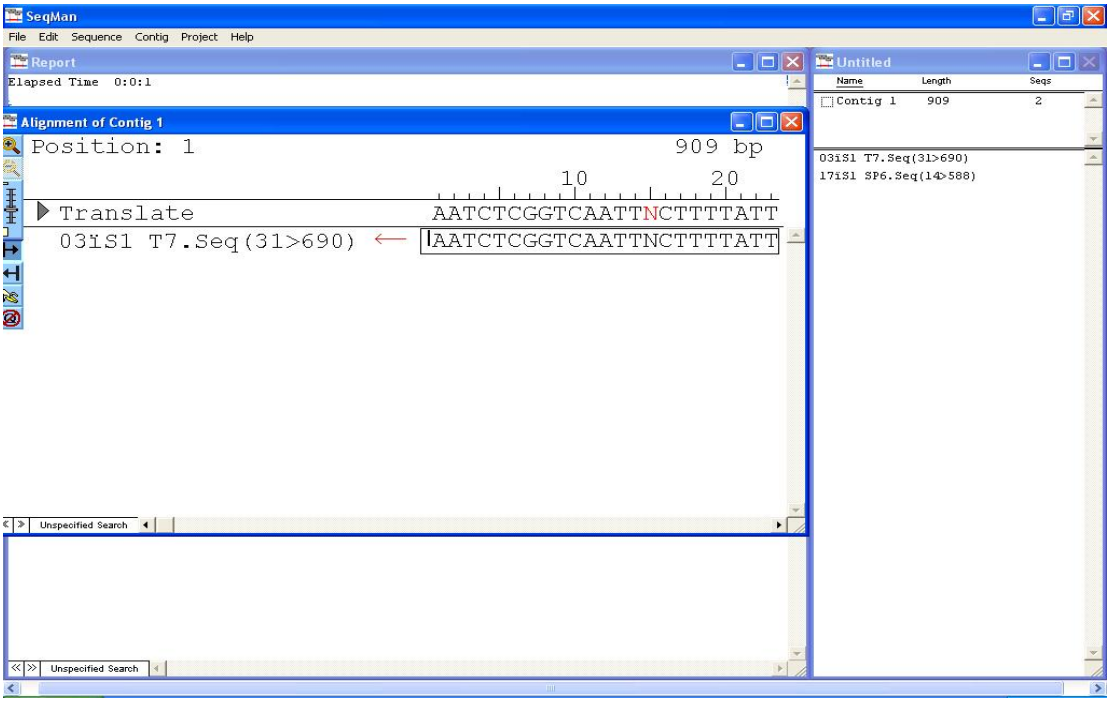
2. คลิกเม้าส์ไปที่ File munu → New → Add sequence → เลือก file ที่ต้องการให้ต่อเป็นสายเดียวกัน → Add → Done ดังภาพ



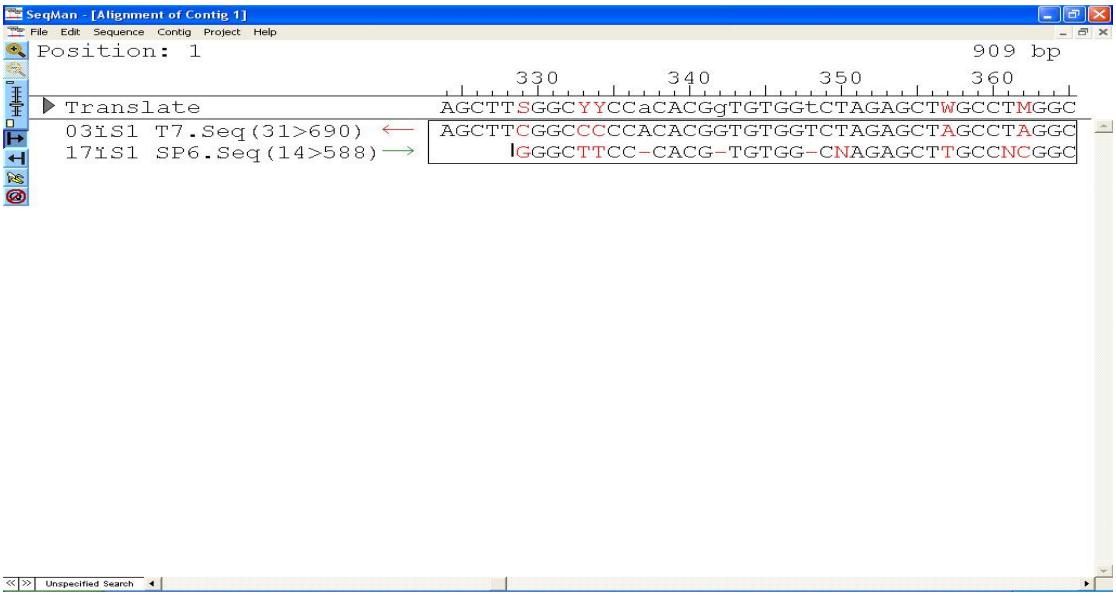
3. คลิก Assemble จะเห็นหน้าต่างขึ้นดังภาพ



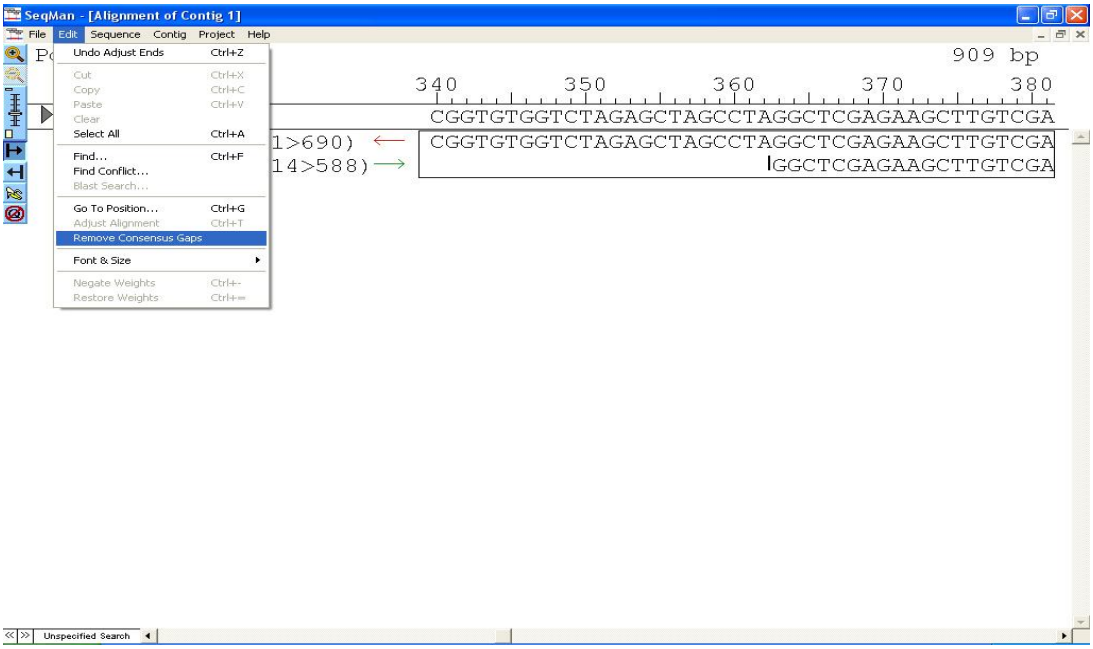
4. ดับเบิ้ลคลิก Contig 1 จะเห็นไฟล์ Alignment sequenceทั้งสองสายมารวมกัน ดังภาพ



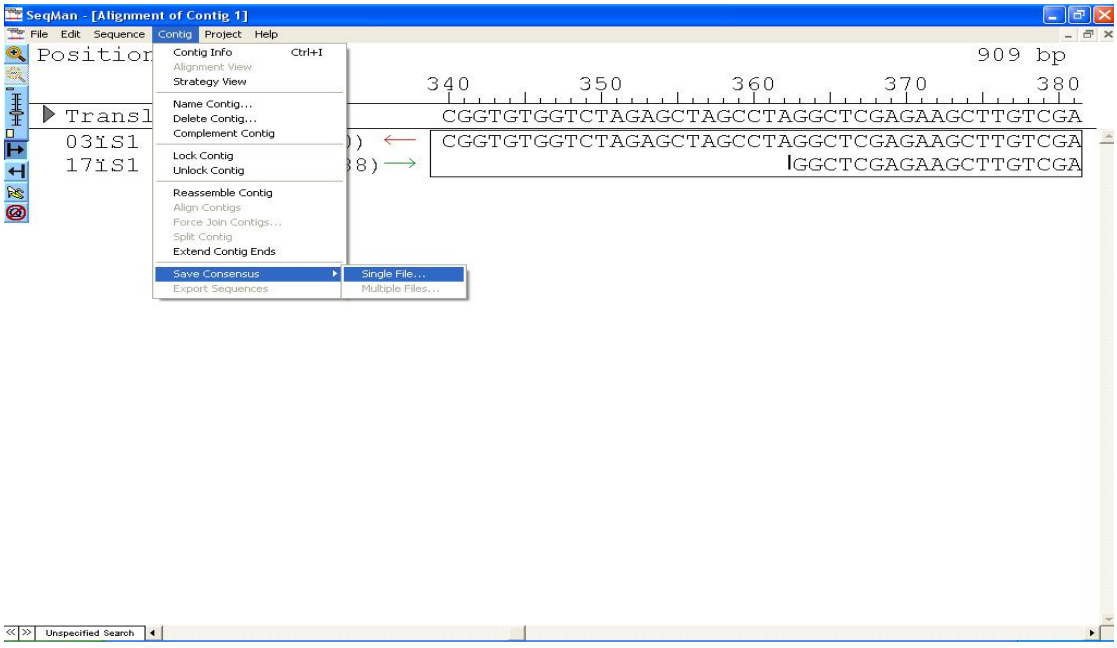
5. เลื่อนลูกศรไปทางขวาเรื่อยๆจะเห็น sequence เหลื่อมซ้อนกันอยู่ ดังภาพ



6. ให้แก้ไข sequence โดยการ Delete ส่วนที่ mismatch และที่เป็น gap ออกให้หมด โดยเข้าไปที่ Edit menu ⟶Remove Consensus Gaps



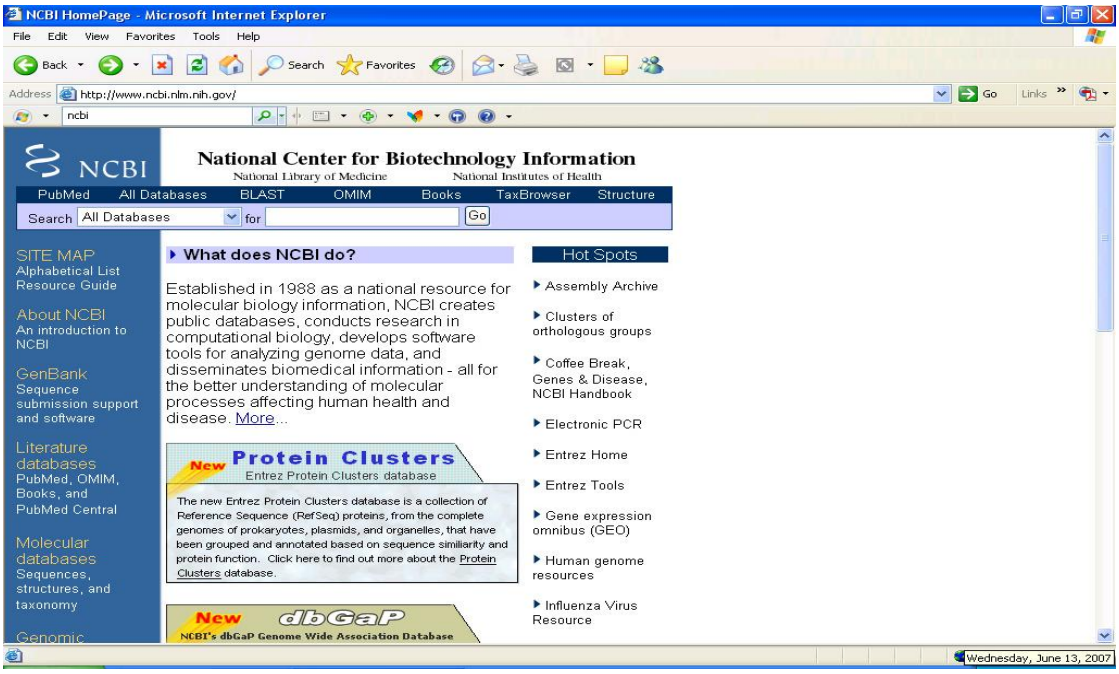
7. หลังจากแก้ไข sequence เรียบร้อยแล้ว ให้ save ไฟล์ และตั้งชื่อไฟล์ใหม่ โดยเข้าไปที่ Contig menu ⟶ save consensus ⟶single file ⟶ตั้งชื่อไฟล์ ⟶save



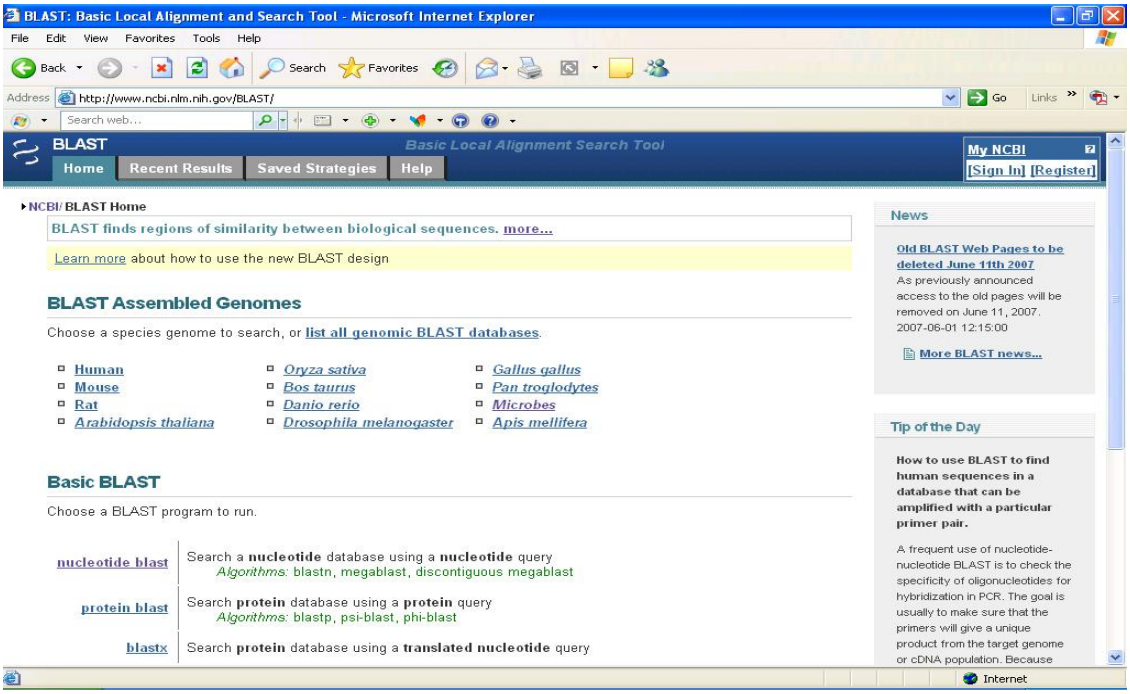
บทปฏิบัติการที่ 8 : การค้นหาข้อมูลลำดับเบสใน GeneBank (NCBI, EMBL) ทาง internet

I. การสืบค้นจากฐานข้อมูล GENBANK

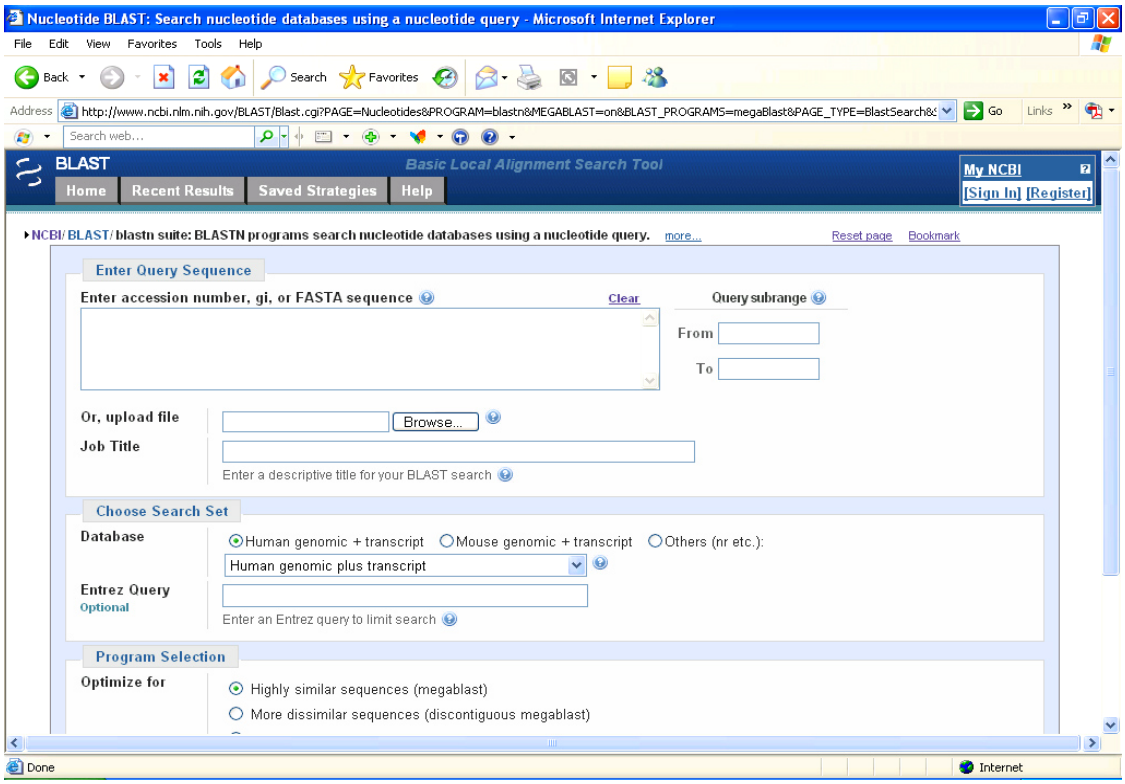
1. ให้เข้าไปที่เวปไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/



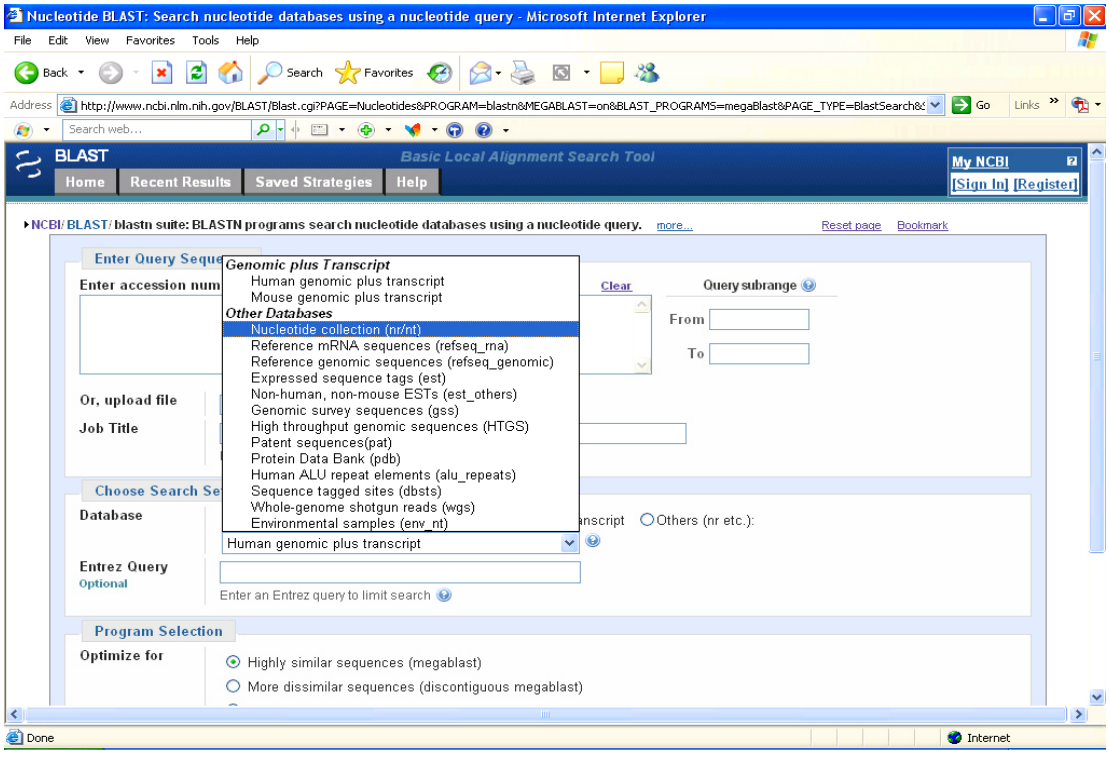
2. ต้องการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส ให้คลิกเม้าส์ไปที่ BLAST



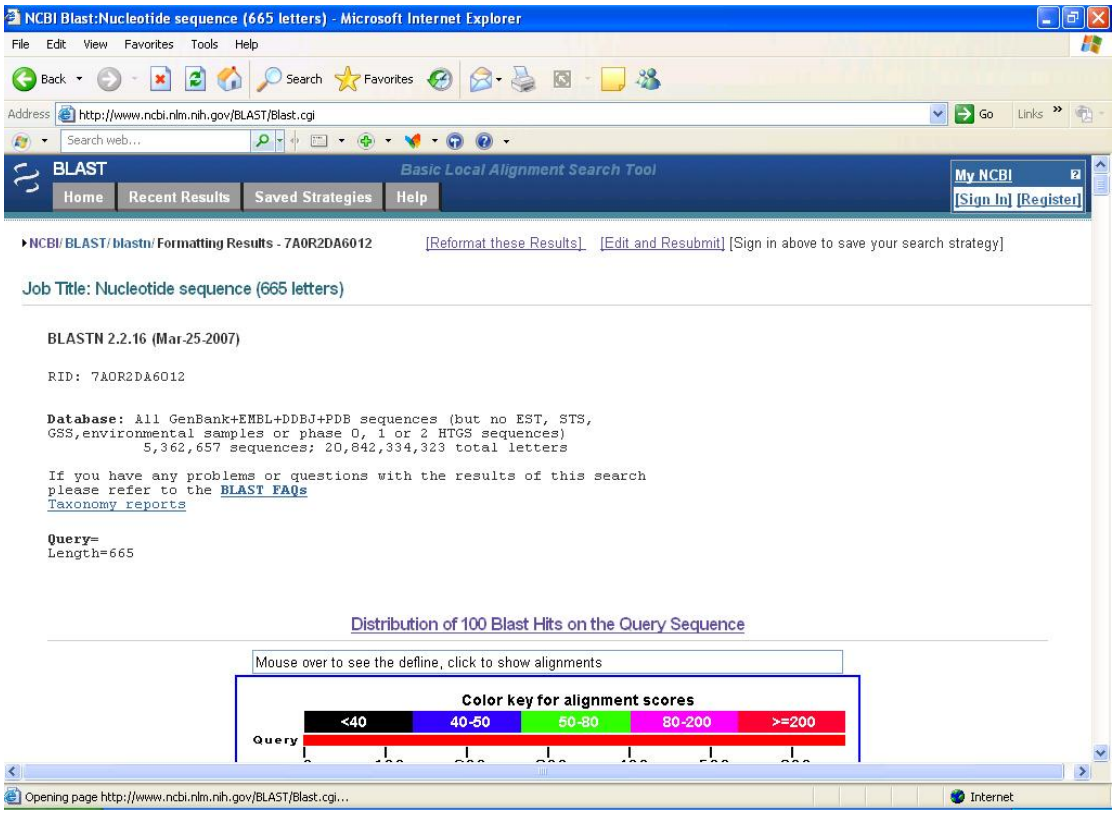
3. เลือก nucleotide blast จะเห็นหน้าจอขึ้นดังภาพ



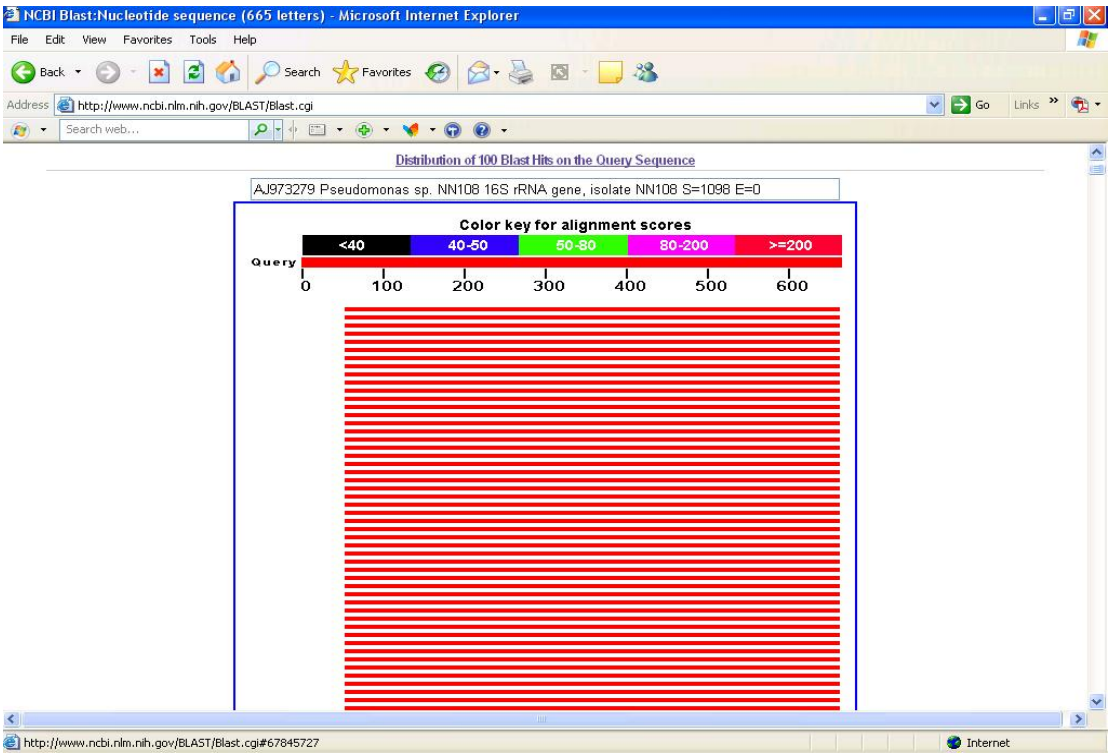
4. คลิก Browse และเลือก Sequence ที่ต้องการเปรียบเทียบ จากนั้นเลือกฐาน Database เป็น Nucleotide collection (nr/nt)



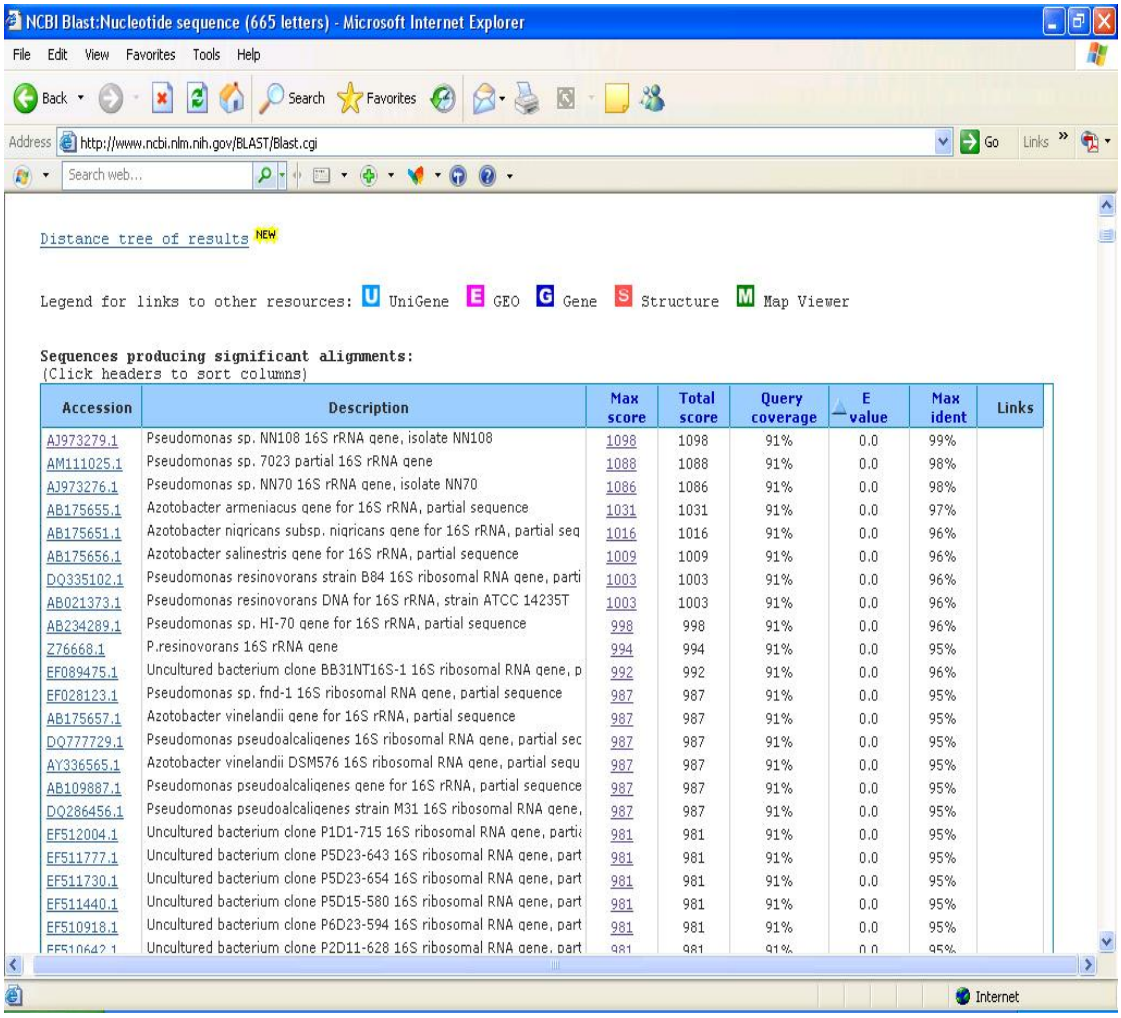
5. คลิก BLAST รอสักครู่ จะเห็นหน้าจอขึ้นดังภาพ



6. เลื่อน score bar ลงมาจะเห็นผลการเปรียบเทียบ sequence ของสีที่ได้ ดังภาพ

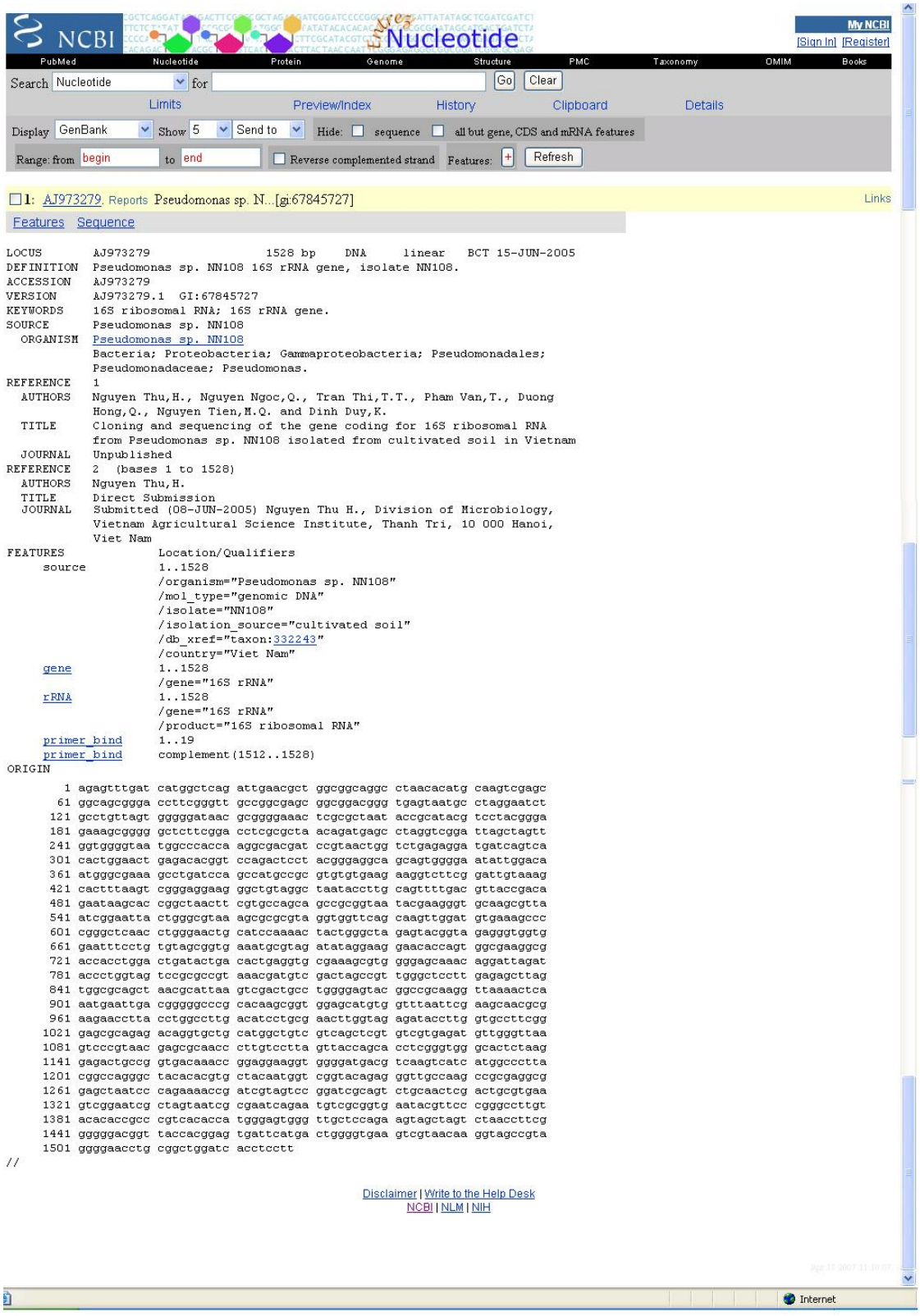


7. เลื่อน score bar ลงมาอีกจะเห็นผลของชนิดจุลินทรีย์ที่ได้เปรียบเทียบกับ GenBank ดังภาพ



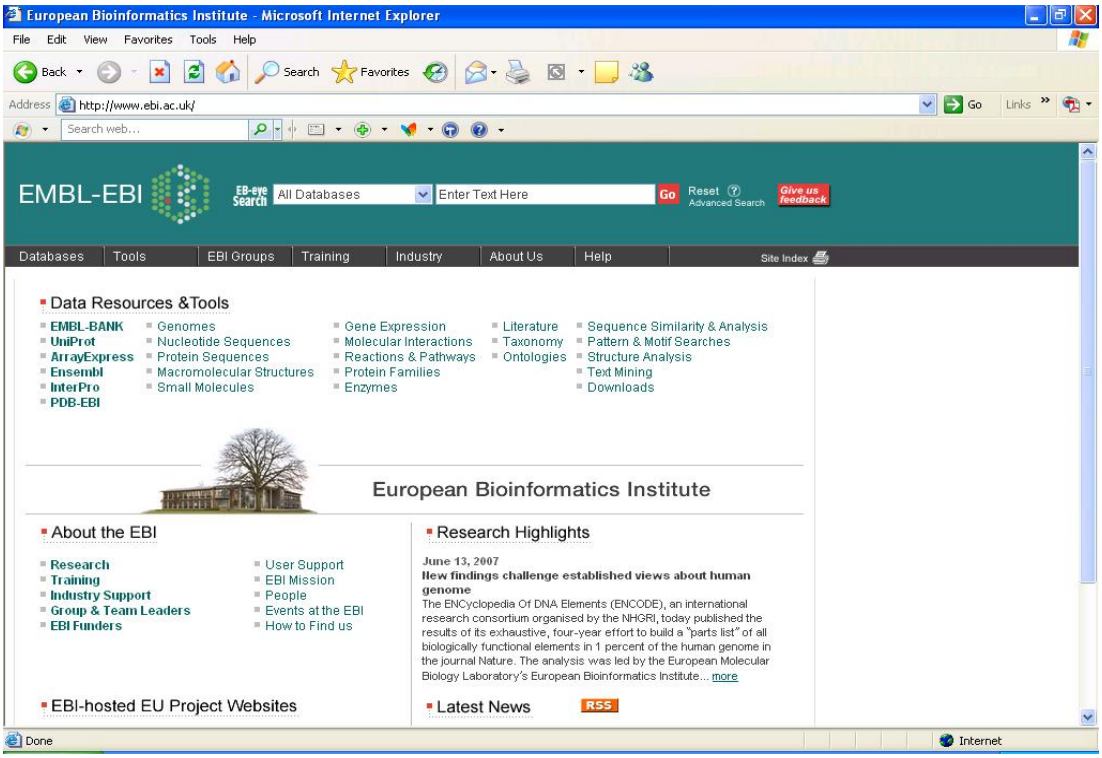
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AJ973279.1	Pseudomonas sp. NN108 16S rRNA gene, isolate NN108	1098	1098	91%	0.0	99%	
AM111025.1	Pseudomonas sp. 7023 partial 16S rRNA gene	1088	1088	91%	0.0	98%	
AJ973276.1	Pseudomonas sp. NN70 16S rRNA gene, isolate NN70	1086	1086	91%	0.0	98%	
AB175655.1	Azotobacter armeniacus gene for 16S rRNA, partial sequence	1031	1031	91%	0.0	97%	
AB175651.1	Azotobacter nigricans subsp. nigricans gene for 16S rRNA, partial seq	1016	1016	91%	0.0	96%	
AB175656.1	Azotobacter salinestris gene for 16S rRNA, partial sequence	1009	1009	91%	0.0	96%	
DQ335102.1	Pseudomonas resinovorans strain B84 16S ribosomal RNA gene, parti	1003	1003	91%	0.0	96%	
AB021373.1	Pseudomonas resinovorans DNA for 16S rRNA, strain ATCC 14235T	1003	1003	91%	0.0	96%	
AB234289.1	Pseudomonas sp. HI-70 gene for 16S rRNA, partial sequence	998	998	91%	0.0	96%	
Z76668.1	P.resinovorans 16S rRNA gene	994	994	91%	0.0	95%	
EF089475.1	Uncultured bacterium clone BB31NT16S-1 16S ribosomal RNA gene, p	992	992	91%	0.0	96%	
EF028123.1	Pseudomonas sp. fnd-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	987	987	91%	0.0	95%	
AB175657.1	Azotobacter vinelandii gene for 16S rRNA, partial sequence	987	987	91%	0.0	95%	
DQ777729.1	Pseudomonas pseudoalcaligenes 16S ribosomal RNA gene, partial sec	987	987	91%	0.0	95%	
AY336565.1	Azotobacter vinelandii DSM576 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	987	987	91%	0.0	95%	
AB109887.1	Pseudomonas pseudoalcaligenes gene for 16S rRNA, partial sequence	987	987	91%	0.0	95%	
DQ286456.1	Pseudomonas pseudoalcaligenes strain M31 16S ribosomal RNA gene,	987	987	91%	0.0	95%	
EF512004.1	Uncultured bacterium clone P1D1-715 16S ribosomal RNA gene, parti	981	981	91%	0.0	95%	
EF511777.1	Uncultured bacterium clone P5D23-643 16S ribosomal RNA gene, part	981	981	91%	0.0	95%	
EF511730.1	Uncultured bacterium clone P5D23-654 16S ribosomal RNA gene, part	981	981	91%	0.0	95%	
EF511440.1	Uncultured bacterium clone P5D15-580 16S ribosomal RNA gene, part	981	981	91%	0.0	95%	
EF510918.1	Uncultured bacterium clone P6D23-594 16S ribosomal RNA gene, part	981	981	91%	0.0	95%	
EF510642.1	Uncultured bacterium clone P2D11-628 16S ribosomal RNA gene, part	981	981	91%	0.0	95%	

8. คลิกเม้าส์ไปที่ Accession ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุด จะเห็นหน้าจอขึ้น ดังภาพ

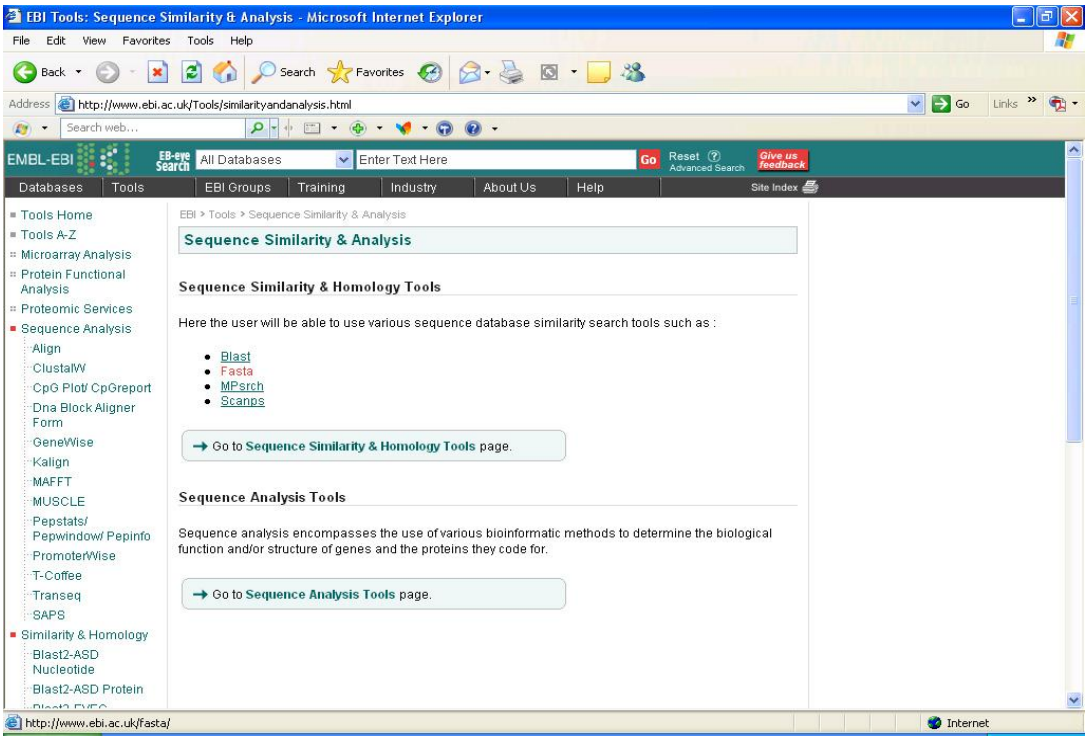


II. การสืบค้นจากฐานข้อมูล EMBL

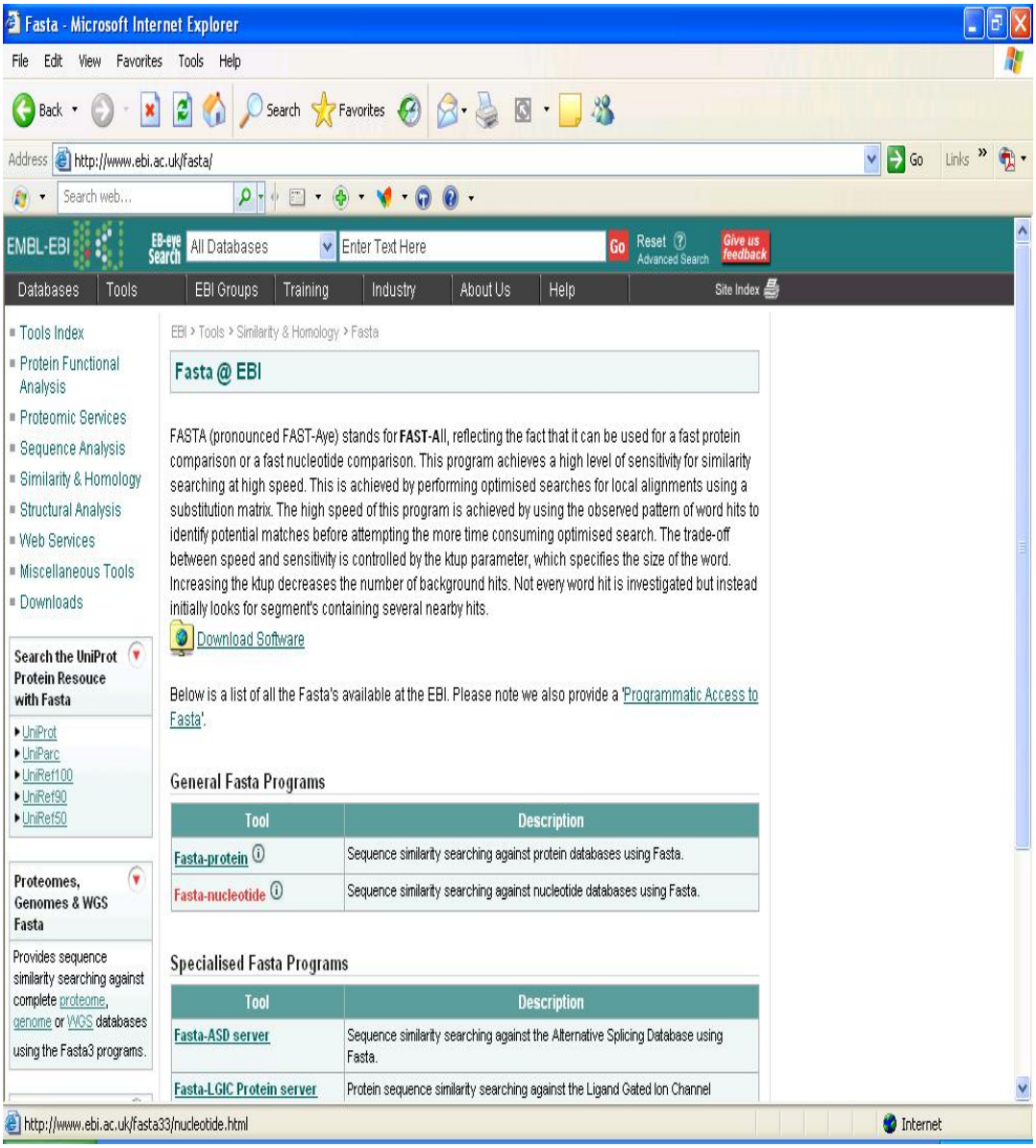
1. ให้เข้าไปที่เวปไซต์ http://www.ebi.ac.uk/



2. คลิกเม้าส์ไปที่ Sequence Similarity & Analysis จะเห็นหน้าจอขึ้น ดังภาพ



3. คลิก Fasta ⟶ เลือก Fata nucleotide

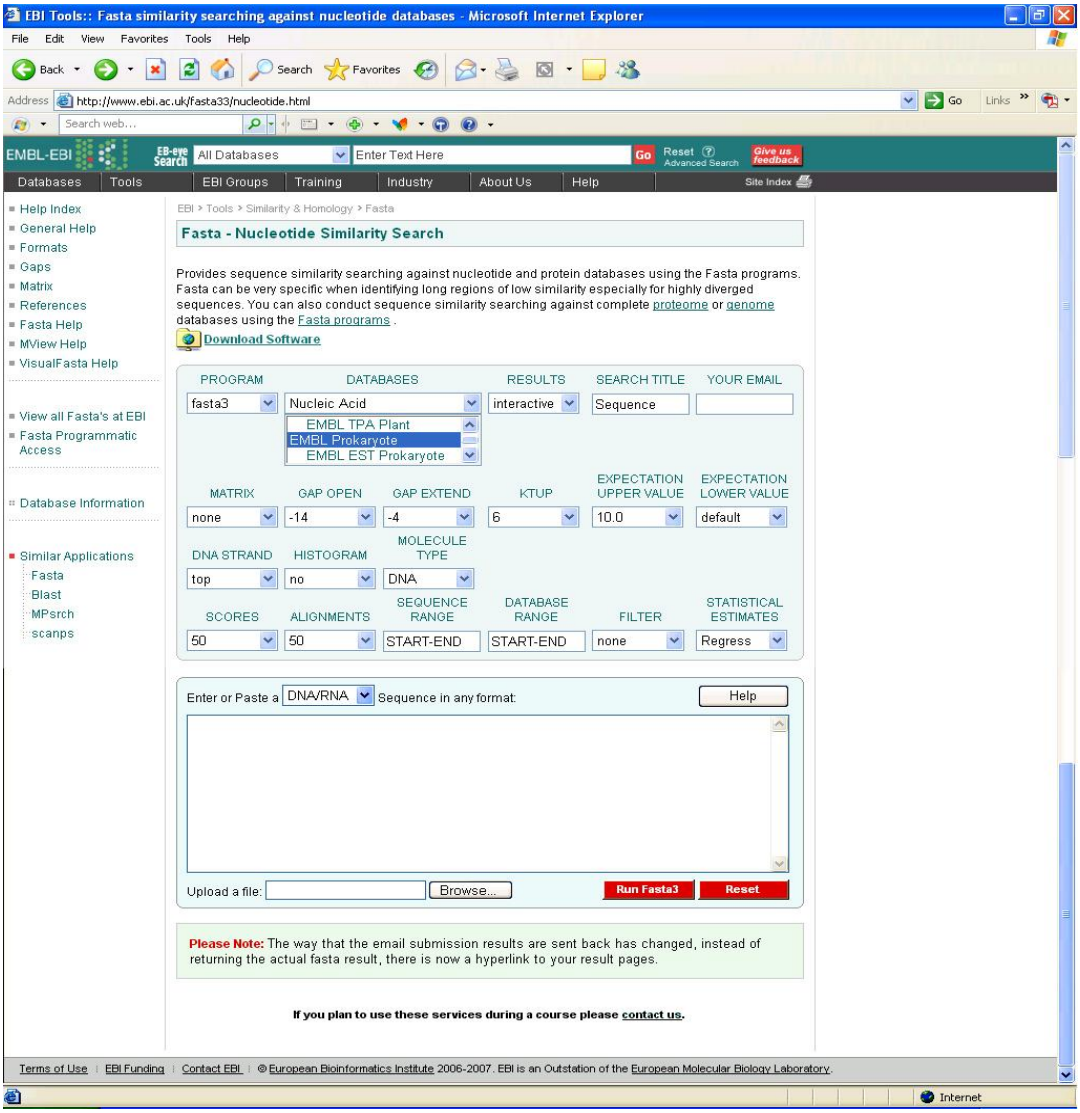


4. เลือก - DATABASE ⟶ Nucleic Acid / EMBL Procaryote

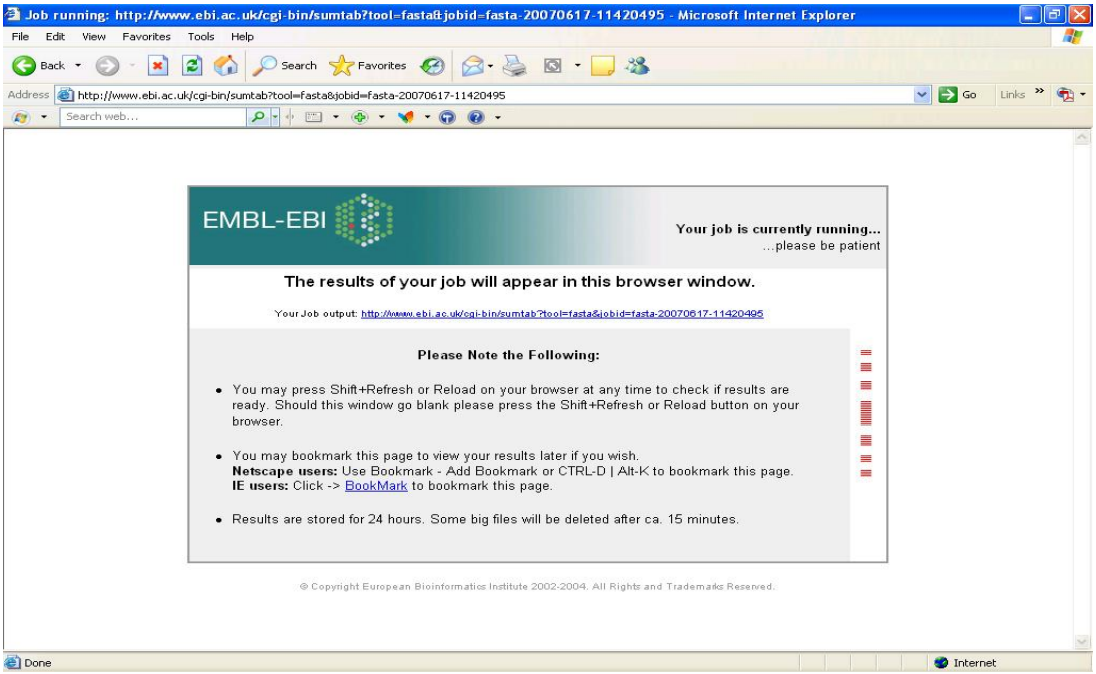
- RESULTS ⟶ interactive
- DNA STRAND ⟶ top (สาย Forward) , bottom (สาย Reverse)

both (สาย Forward และ Reverse รวมกันแล้ว)

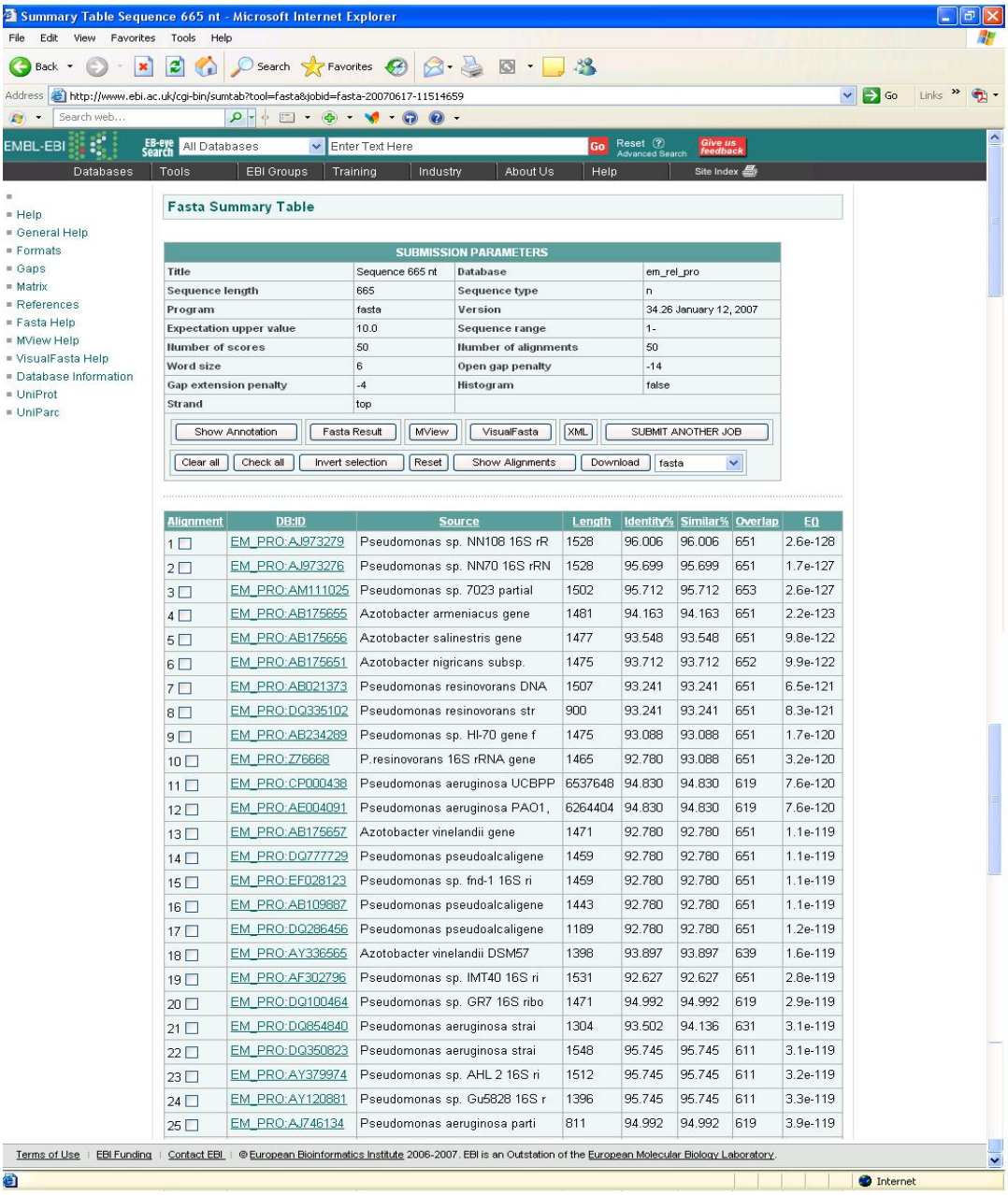
- Browse ข้อมูล sequence ที่ต้องการวิเคราะห์ หรือ copy sequence และ paste ในช่องว่าง
- คลิก Run Fasta3



5. รอสักครู่ หน้าจอจะขึ้น ดังภาพ



6. ผลการสืบค้นชนิดจุลินทรีย์ ดังภาพ



ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Potato dextrose agar (PDA)

เตรียม 1,000 ml

Potato	200	g
Dextrose	20	g
Agar	20	g
เติมน้ำให้ครบ	1,000	ml

Potato dextrose broth (PDB)

เตรียม 1,000 ml

Potato	200	g
Dextrose	20	g
เติมน้ำให้ครบ	1,000	ml

Luria-Bertani (LB) medium

เตรียม 1,000 ml

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	5	g
เติมน้ำให้ครบ	1,000	ml

TE buffer

เตรียม 100 ml

2 M Tris-HCl pH 8.0	500	µl
0.5 M EDTA pH 8.0	200	µl
เติมน้ำให้ครบ	100	ml

10% SDS

เตรียม 100 ml

SDS	10	g
น้ำ	100	ml

chloroform : isoamyl alcohol (24:1)

เตรียม 250 ml

chloroform	240	ml
isoamyl alcohol	10	ml

5M NaCl

เตรียม 1,000 ml

NaCl	292.2	g

เติมน้ำให้ครบ 1,000 ml

3M NaOAc (pH 5.2)

เตรียม 1,000 ml

Sodium acetate trihydraet	408.1	g
น้ำ	750	ml

ปรับค่า pH 5.2

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1,000 ml

2XCTAB

เตรียม 200 ml

NaCl	16.36	g
CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)	4	g
2M Tris-HCl (pH 8.0)	10	ml
0.5M EDTA	8	ml
PVP-40	2	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 200 ml

Washing solution

เตรียม 100 ml

NH_4OAc	0.077	g
น้ำ	30	ml
Absolute ethanol	70	ml

10XTBE buffer

เตรียม 1 ลิตร

Tris-base	108	g
Boric acid	55	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	ml

6 X Loading buffer (for agarose gel)

เตรียม 10 ml

bromophenol blue	0.025	g
xylene cyanol	0.025	g

glycerol	3	ml
น้ำ	7	ml

Ethidium bromide

เตรียมความเข้มข้น 10 mg/ ml

Ethidium bromide	1	g
น้ำ	100	ml

หน่วยวัดและสัญลักษณ์ที่ควรทราบ

Factor	Prefix	Symbol
10^{-1}	deci	d
10^{-2}	centi	c
10^{-3}	mili	m
10^{-6}	micro	mu, μ
10^{-9}	nano	n
10^{-12}	pico	p
10^{-15}	femto	f

2. การจัดการห้องปฏิบัติการและสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีวโมเลกุล

การจัดการห้องปฏิบัติการจุลชีวโมเลกุล เริ่มต้นตั้งแต่การแบ่งพื้นที่ใช้งานและเครื่องมือ โดยทั่วไปมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. การปฏิบัติงานสะดวก โดยแบ่งตามพื้นที่ใช้งานตามลำดับก่อนหลังของงาน หรือตาม work flow หรือแบ่งพื้นที่ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

2. ลดการปนเปื้อน นอกจากงานเลี้ยงเชื้อรา/แบคทีเรีย ที่ต้องใช้วิธี aseptic techniques อย่างดีแล้ว และการทำงานขั้นตอน Polymerase chain reaction (PCR) หรืออีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เรียกง่าย ๆ ว่าเป็นเทคนิคการขยายยีนในหลอดทดลอง ที่มีความไวสูงมาก เนื่องจากมีความไวสูงมากนั้นเอง จึงเป็นทั้งข้อดี และข้อด้อย กล่าวคือ เทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวน DNAเป้าหมาย (target DNA) ที่ตั้งต้นเพียงไม่กี่โมเลกุล ไปเป็นล้านๆ โมเลกุลได้ ฉะนั้นการปนเปื้อนในขั้นตอนเพียงเล็กน้อยอาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) การเกิดข้อผิดพลาดดังกล่าวอาจมีสาเหตุจากการปนเปื้อนระหว่างตัวอย่าง (cross contamination) ได้แก่การเลี้ยงเชื้ออาจมีเชื้ออื่นขึ้นปะปน การเตรียมหรือแยกสกัดDNA หรือสารเคมีปนเปื้อนจากตัวอย่างเดิม นอกจากนั้นยังมีการปนเปื้อนจาก carry-over contamination เกิดจากการปนเปื้อนของ amplified product หรือที่เรียก amplicon ที่เกิดจากละออง (aerosol) ของ amplicon ของงานเดิม ที่หลงเหลือปะปนกับอากาศ ที่เกิดจากการปั่นหลอดแล้วเปิดฝาหลอดของ pipette หรือ aerosol ที่ค้างอยู่ในท่อ pipette หรือการปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวโต๊ะปฏิบัติการ เครื่องมือ ถุงมือ และระบบปรับอากาศในห้องปฏิบัติการ การหาแหล่งแพร่กระจายของ aerosol ที่ทำให้เกิด false positive อาจทำได้ยาก ฉะนั้นจึงควรมีวิธีจัดการห้องปฏิบัติการอย่างถูกต้องเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนและการวิเคราะห์ผลผิดพลาด

3. ความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติ งานจุลชีวโมเลกุลจำเป็นต้องใช้สารหลายชนิดที่เป็นอันตรายสูง จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวังอย่างสูงและถูกวิธี อาทิ สารที่มีไอระเหย ควรปฏิบัติงานในตู้ดูดควันเท่านั้น เช่น การใช้ chloroform หรือกรดต่าง ๆ การชั่งสารที่เป็นผงควรอยู่ในห้องชั่งสารและมี mask ปิดปาก/จมูก การใช้ Ethidium bromide ที่เป็นสารก่อมะเร็ง ย้อมDNA ควรแบ่งพื้นที่ไว้แยกต่างหาก มีอุปกรณ์เฉพาะไม่ปะปนกับอุปกรณ์ของงานอื่น ๆ ต้องสวมถุงมือก่อนใช้และถอดถุงมือออกทันที เมื่อทำงานเสร็จเพื่อจะได้ไม่นำถุงมือที่มีการปนเปื้อนไปจับอุปกรณ์อื่น ๆ อีกเป็นต้น การตรวจดู DNA ภายใต้แสง UV ควรมีอุปกรณ์ป้องกันแสง UV สัมผัส ตา ใบหน้า และผิวหนังโดยตรง เป็นต้น

การแบ่งพื้นที่ก่อนและหลังทำ PCR

การจัดแบ่งพื้นที่สำหรับงานจุลชีวโมเลกุล จำเป็นต้องเป็นสัดส่วนเพื่อลดปัญหาการปนเปื้อน เพื่อให้ได้ผลสมบูรณ์ควรแยกวัสดุอุปกรณ์เครื่องใช้ของแต่ละบริเวณออกจากกันอย่างเด็ดขาดเพราะถ้าแบ่งพื้นที่ใช้งานแต่ใช้เครื่องมือร่วมกันยกไปยกมาจะทำให้การป้องกันปัญหาปนเปื้อนไม่ได้ผล พื้นที่ต่างๆ ที่กล่าวถึงได้แก่

1. พื้นที่ก่อนทำ PCR

- บริเวณเตรียมตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างใบพืชต่าง ๆ เป็นบริเวณพักตัวอย่างก่อนชั่งตวงวัด แบ่ง หรือบด คลุกเคล้าตัวอย่างให้เข้ากัน หรือกรณีเป็นใบพืชควรตัดทำความสะอาดให้พอใช้ ไม่ควรนำเข้าห้องแยกสกัดทันที เพราะอาจมี ไร แมลง ฯลฯ ปะปนกับตัวอย่าง

- บริเวณ เลี้ยงเชื้อหรือห้องเลี้ยงเชื้อ

- บริเวณสกัดDNA

- บริเวณ ชั่งสาร เตรียม stock solution ต่าง ๆ

2. บริเวณเตรียมปฏิกิริยา PCR ควรเป็นพื้นที่สะอาดที่สุด ไม่มี amplicon ปะปนอยู่ ก่อนทำ PCR ควรเช็ดบริเวณโต๊ะ ด้วย 70% ethanol ทุกครั้ง กรณีทำ Real time PCR ควรเตรียมปฏิกิริยาในตู้ปลอดเชื้อ

3. บริเวณหลังทำ PCR ได้แก่

- บริเวณที่แยก DNAด้วย electrophoresis

- บริเวณย้อม DNA ด้วย Ethidium bromide ซึ่งรวมถึงบริเวณที่ตรวจสอบแถบของ DNA ด้วย gel documentation ซึ่งต้องทำตามข้อกำหนดความปลอดภัย

- บริเวณเก็บกากวัสดุสารพิษ เช่น เก็บ chloroform ที่ใช้แล้วในขวดแก้ว ปิดสนิทไว้ใน Hood พร้อมตัดป้ายที่ขวดให้เรียบร้อย สารละลาย Ethidium bromide ก็ดำเนินการเช่นเดียวกัน

บริเวณซักล้างและนึ่งฆ่าเชื้อ

วิธีการอื่น ๆ ที่สามารถลดการปนเปื้อนของการทำ PCR

- การใช้ pipette อัตโนมัติใช้ดูดถ่ายสารละลายต่าง ๆ อาจมีละออง DNA ปนเปื้อนตามบริเวณปลายด้าม pipette หรือบริเวณท่อด้านใน สามารถเป็นแหล่งแพร่กระจายการปนเปื้อนได้ สามารถแก้ไขได้ด้วยการจัดแบ่งแยกpipetteของแต่ละงานในแต่ละพื้นที่เช่นแบ่งแยกpipetteสำหรับดูดสารหรือpipette ที่ใช้สกัด DNA ออกจาก pipette ที่เตรียมปฏิกิริยา PCR หรือให้ใช้ aerosol resistant tip ที่มีไส้กรองอยู่ภายในซึ่งช่วยป้องกันการปนเปื้อนของ aerosol ขณะทำ PCRได้ดี หรือนำ tip ธรรมดามาใส่สำลีเข้าไปไว้เป็นไส้กรอง ก็ใช้ได้ผลดีเช่นกัน

- แบ่งน้ำยาต่าง ๆ ใส่หลอดเล็ก เมื่อเตรียมน้ำยาต่าง ๆ เสร็จแล้ว หรือสารสำหรับทำ PCR เช่น Primer ต่าง ๆ ควรมีการแบ่งใส่ขวดหรือหลอดเล็ก (aliquots) หลายๆขวด ก่อนนำไปเก็บและขยับมาไว้คราวละขวด วิธีนี้ช่วยลดการปนเปื้อนเมื่อปิด-เปิดน้ำยาหลาย ๆ ครั้ง เมื่อสงสัยว่าอาจมีการปนเปื้อนให้ทิ้งน้ำยาขวดนั้นทันที DNAที่สกัดเสร็จแล้วต้องการเก็บก็ควรแบ่งใส่ขวดเล็ก นอกจากลดโอกาสการปนเปื้อนแล้วยังช่วยให้DNAไม่เสียสภาพเร็ว เนื่องจากการ freeze-thaw หลาย ๆ ครั้งด้วย

- ทำความสะอาดบริเวณพื้นที่เตรียม PCR พบว่าสารละลาย 10% Sodium hypochlorite มีประสิทธิภาพในการกำจัด amplicon ต่าง ๆ ได้ดี เช่นเดียวกับการใช้แสง UV

ข้อควรระวังเรื่องความปลอดภัย ในห้องปฏิบัติการจุลชีวโมเลกุล

1. สารละลาย chloroform-isoamyl alcohol, phenol และสารละลายที่เข้มข้นสูงของ B-mereaptocthand (2.2 % หรือมากกว่า) ที่ใช้ในการสกัด DNA มีพิษต่อทางเดินหายใจควรปฏิบัติงานภายในตู้ดูดควัน

2. Acrylamide และ bisacrylamide มีพิษต่อระบบประสาทสามารถซึมเข้าสู่ร่างกายทางการสัมผัส จึงควรใส่ถุงมือทุกครั้งไม่ควรทำให้ปนเปื้อนบริเวณพื้นที่ปฏิบัติงาน

3. Ethidium bromide สำหรับใช้ย้อม DNA เป็นสารก่อมะเร็งให้สวมถุงมือทุกครั้งเมื่อต้องใช้สารนี้

4. แสง UV สามารถทำให้เกิดมะเร็งและทำลายผิวหนัง เนื้อเยื่อบุดวงตา ควรสวมแว่นตาและเสื้อผ้าสำหรับป้องกัน ขณะทำงานดูภาพ DNA ควรปิดแสง UV ทันทีหลังใช้งานเสร็จ เพราะแสง UV ที่เปิดไว้นาน ๆ อาจทำให้เกิด OZONE ที่เป็นพิษขึ้นได้ การเก็บและกำจัดสารที่ใช้แล้ว (waste) จากข้อ 1-3 ดังกล่าวข้างต้น ต้องทำตามคำแนะนำเพื่อไม่ให้ปนเปื้อนต่อสิ่งแวดล้อม

กฎของความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ

1. ห้ามกิน ดื่ม และสูบบุหรี่ในห้องปฏิบัติการ

2. สวมเสื้อกราวตลอดเวลาทำงานในห้องปฏิบัติการเพื่อให้แน่ใจว่าสารละลายหรือสารเคมีชนิดต่างๆ จะไม่ติดอยู่ที่เสื้อผ้า ผิวหนังของท่าน และเสื้อกราวยังช่วยป้องกันท่านและเสื้อผ้าจากสารเคมีต่างๆ

3. นำสิ่งที่เกี่ยวข้องกับห้องปฏิบัติการเท่านั้นเข้าไปในพื้นที่ห้องปฏิบัติงาน เช่น สมุดจดบันทึกการปฏิบัติงาน ปากกา คู่มือปฏิบัติการ

4. ควรใส่ถุงมือ และระมัดระวังเมื่อเตรียมสาร Ethidium bromide ซึ่งเป็นสารพวก carcinogen (สารก่อกลายพันธุ์)

5. ต้องติดป้าย ขวด/ห่อ สารเคมี สารละลาย ที่เตรียมทุกครั้ง พร้อมวันที่ และชื่อผู้เตรียม

6. สิ่งที่ต้องจำไว้เสมอ แสง UV มีอันตรายต่อสายตา ควรใส่แว่นตาสำหรับกันแสงหรือหน้ากาก

7. อุปกรณ์ส่วนใหญ่ในห้องปฏิบัติการมีความละเอียดอ่อนและราคาแพง ควรศึกษาวิธีการให้ถูกต้องและใช้อย่างระมัดระวังและทำความสะอาดเก็บให้เรียบร้อยเมื่อใช้เสร็จแล้ว

8. ภายหลังปฏิบัติงานเสร็จแล้ว ควรล้างมือให้สะอาดก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ

9. ทำความสะอาดทันทีเมื่อมีสารเคมีหยด/ตกหล่นบริเวณพื้นที่ปฏิบัติการ

10. เมื่อมีอุบัติเหตุหรือได้รับบาดเจ็บควรทำการปฐมพยาบาลแล้วแจ้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทันที