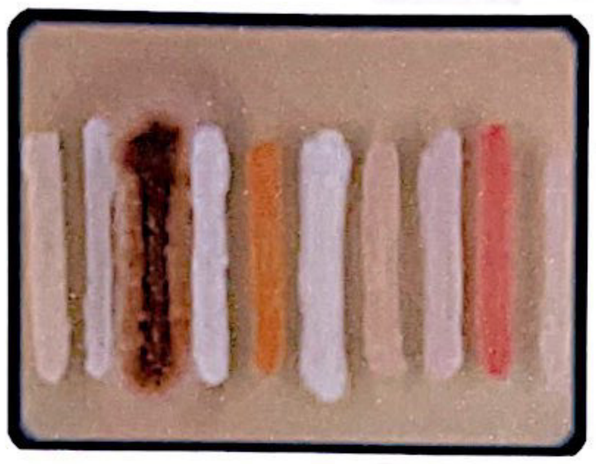
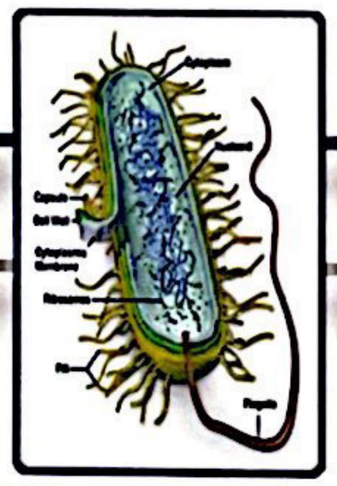
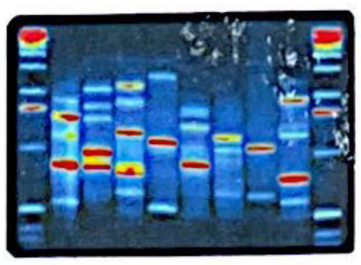
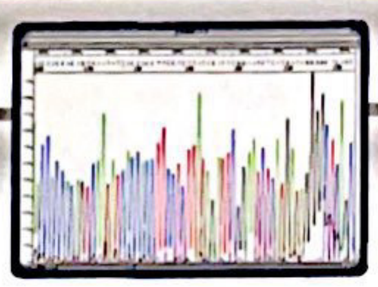
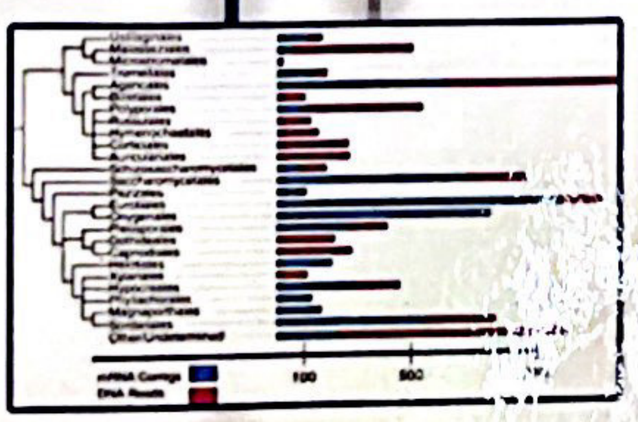
# การจำแนกชนิดและตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล









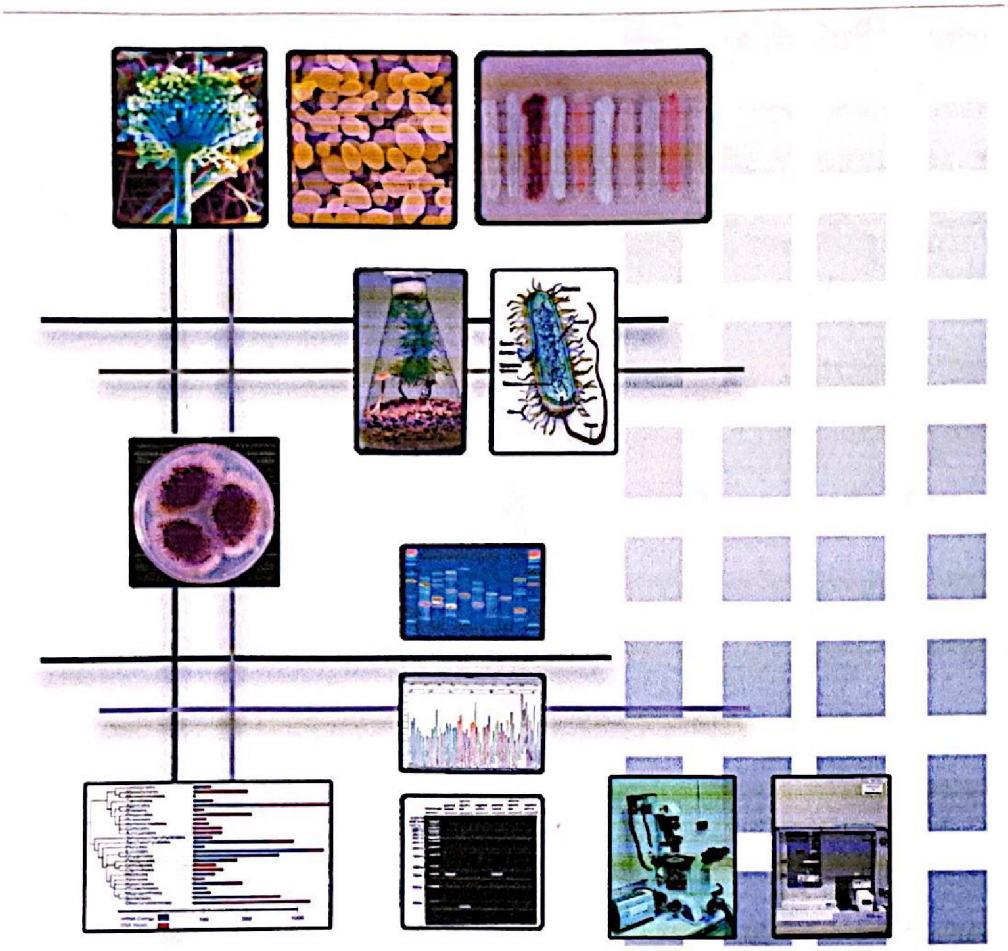


กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

# การจำแนกชนิดและตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล



เอกสารฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

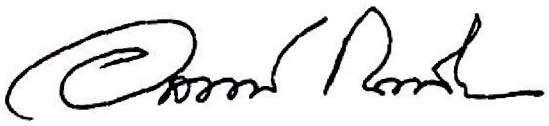
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

พ.ศ. 2555

# คำนำ

ปัจจุบันงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีบทบาทสำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาทางด้านจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในระดับโมเลกุลของสารพันธุกรรมด้วยการถอดรหัสลำดับเบสในส่วนของ ribosomal RNA ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทราบชนิดเพื่อใช้จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้มีความเที่ยงตรง แม่นยำเชื่อถือได้ การนำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก GenBank จะได้ผลการจำแนกที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

ในประเทศไทยมีหลายหน่วยงานที่มีภาระหน้าที่ในการศึกษาวิจัยและมีงานบริการด้านตรวจวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งภาครัฐและเอกชน เอกสารฉบับนี้ได้รวบรวมข้อมูล ขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติงานด้านการจัดจำแนกจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค ribosomal RNA ซึ่งจะเป็นประโยชน์และช่วยให้นักวิจัยและผู้ปฏิบัติงานด้านการจำแนกและตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ ได้ทราบถึงทฤษฎีเทคนิคปฏิบัติสมัยใหม่ และนำมาใช้เป็นคู่มือในการจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในระดับ species ได้อย่างมีประสิทธิภาพถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น



( นายอลงกรณ์ กรณ์ทอง )

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

สิงหาคม 2555

# กิตติกรรมประกาศ

เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่อง **การจำแนกชนิดและตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล** ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้ (Knowledge Management) ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตามแผนจัดการความรู้ของกรมวิชาการเกษตร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการจัดการความรู้ด้านการจำแนกชนิดและตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ให้เป็นระบบ สามารถนำมาใช้เป็นคู่มือในการปฏิบัติงานได้ อย่างมีประสิทธิภาพ

การจัดทำเอกสารฉบับนี้ สำเร็จลงด้วยความร่วมมือร่วมใจของคณะทำงานจัดการความรู้ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปี 2555 ทุกท่าน ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ รศ.ดร. สุรางค์ สุธราวุธ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ผศ. สุรีลักษณ์ รอดทอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี ที่ได้เสียสละเวลาในการเพิ่มเติมตรวจแก้ไขเอกสารฉบับนี้ให้มีเนื้อหาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และให้เกียรติมาเป็นวิทยากรในการฝึกอบรมครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนในการจัดทำเอกสารและการฝึกอบรมในครั้งนี้

คณะทำงานจัดการความรู้ ประจำปี 2555
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
31 สิงหาคม 2555

# สารบัญ

หน้า

**บทบรรยาย**

1. การตรวจสอบปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ทางการเกษตรจากผลิตภัณฑ์นำเข้า 1
2. การใช้ลำดับเบส rRNA ในการจำแนกชนิดของเห็ดโดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล NCBI 21
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไรโบโซมเพื่อการจำแนกพันธุ์ 37
4. การสกัดดีเอ็นเอ 43
5. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) 50
5. ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) 63
6. ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
   - การตรวจสอบ endophytic bacteria ในพืชที่ขึ้นเจริญอยู่ในดินเค็ม 67
   - การศึกษารวบรวมและพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการผลิตเอทานอลในมันสำปะหลัง 82

**บทปฏิบัติการ**

ขั้นตอนการจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ 95

บทปฏิบัติการที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา 97

บทปฏิบัติการที่ 2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง 100

บทปฏิบัติการที่ 3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16s rRNA gene โดยปฏิกิริยา PCR 102

บทปฏิบัติการที่ 4 การโคลนยีนบริเวณ16s rRNA gene 104

บทปฏิบัติการที่ 5 การทำ cycle sequencing และการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน 107

บทปฏิบัติการที่ 6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรม 109

บทปฏิบัติการที่ 7 การใช้ software ในการแก้ไขและจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 123

บทปฏิบัติการที่ 8 การค้นหาข้อมูลลำดับเบสใน GenBank (NCBI, EMBL) ทางอินเตอร์เน็ต 131

**ภาคผนวก** 141

# 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%$H_2O_2$ที่เตรียมไว้บนแผ่นสไลด์ ใช้ลูปกวนให้เข้ากัน หากเกิดฟองแก๊ส $O_2$แสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 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**

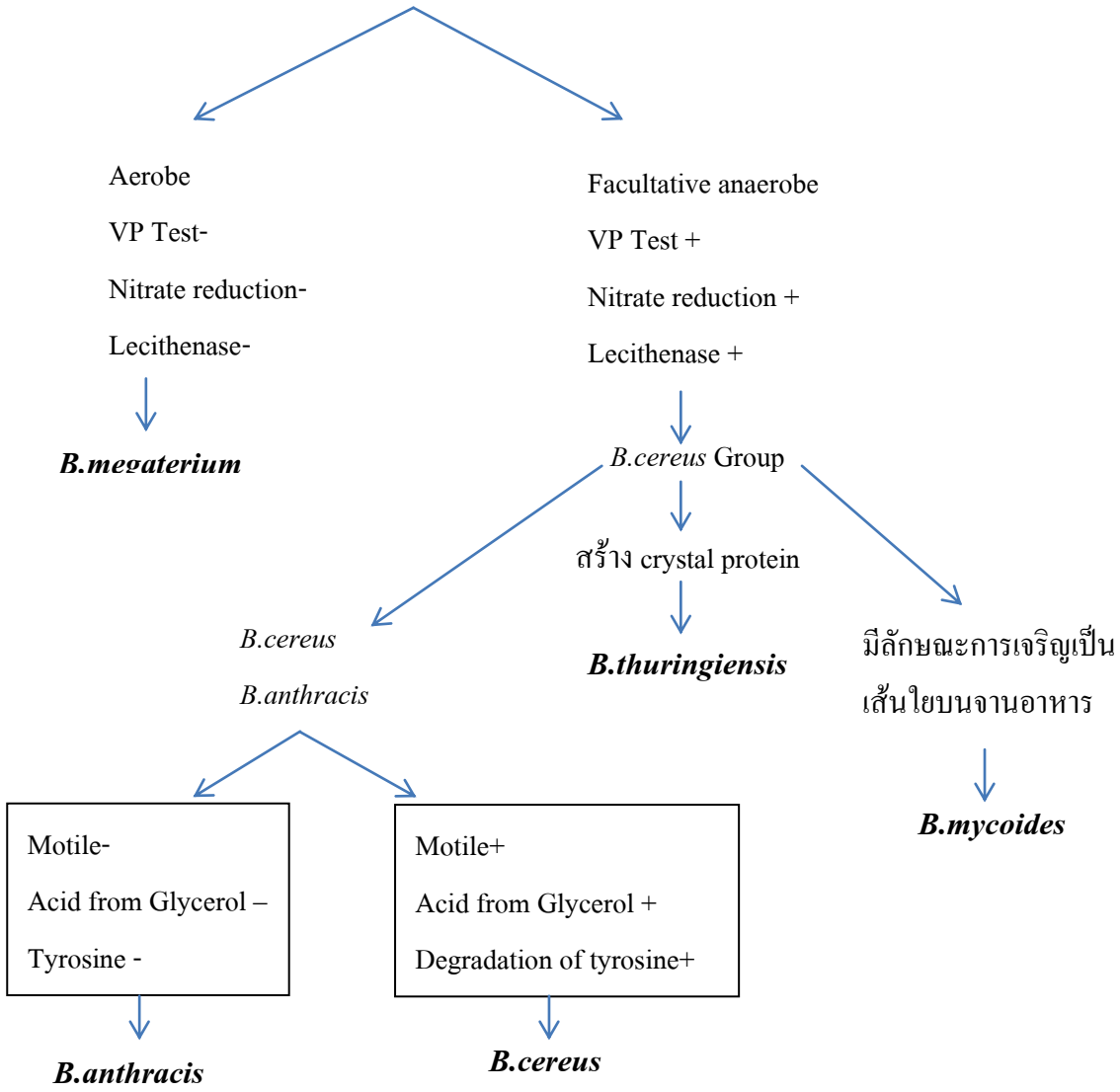
สร้างสปอร์ วงรี หรือรูปไข่ ทำให้เซลล์โป่ง เช่น *Paenibacillus polymyxa, Brevibacillus laterosporus*

**Bacillus Group III**

สร้างสปอร์กลม ทำให้เซลล์โป่ง เช่น *B.sphaericus*

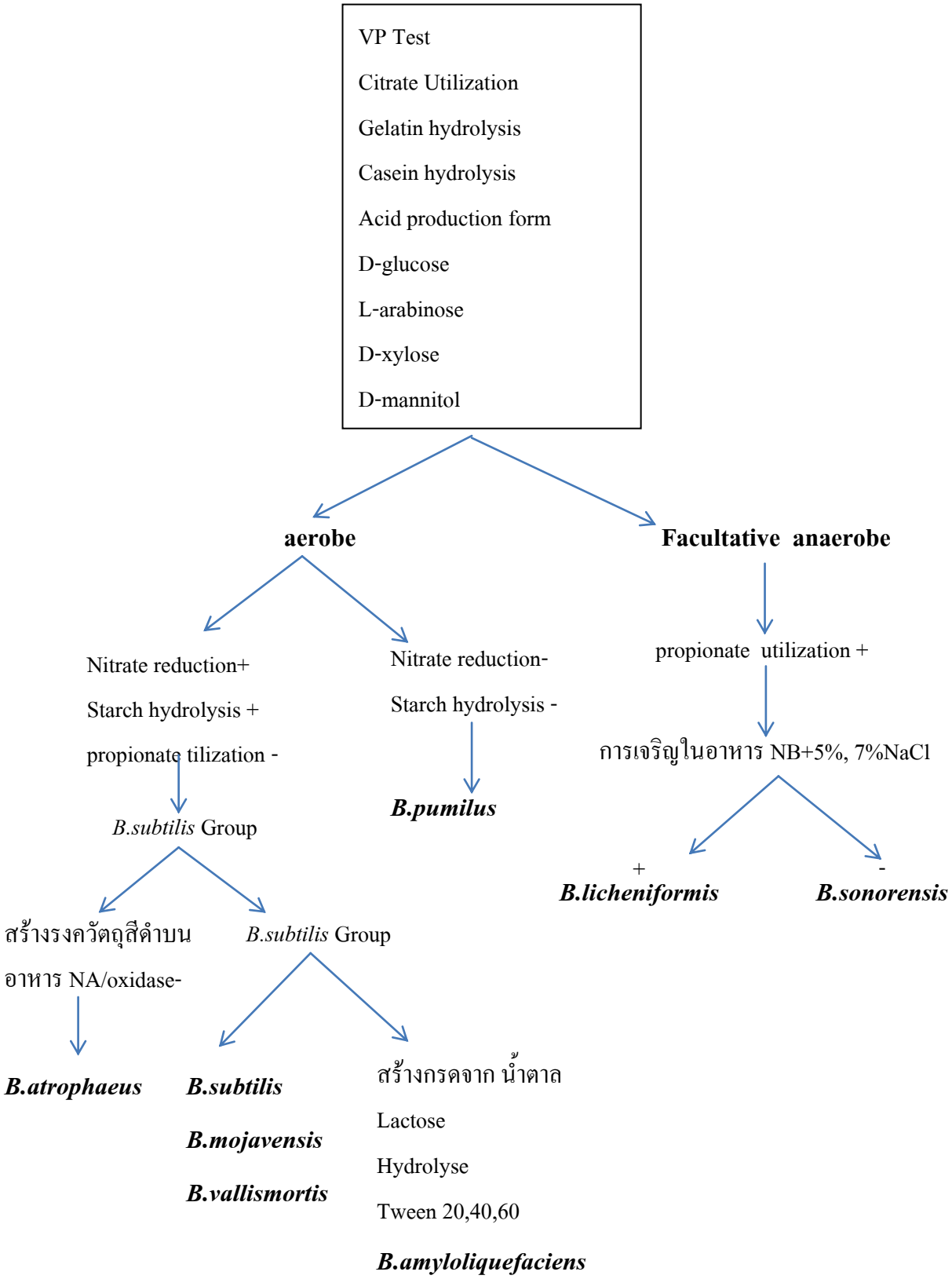
การแบ่งกลุ่มจะสามารถช่วยให้การจำแนกชนิดแคบลง เนื่องจากรูปร่างและตำแหน่งสปอร์เป็นข้อมูลประกอบที่มีในตารางการแบ่งชนิดของBacillus ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriologyทั้งใน1st edition(1986) และ 2nd edtion(2009)

**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

**วิธีการย้อม**โดยใช้สี 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*

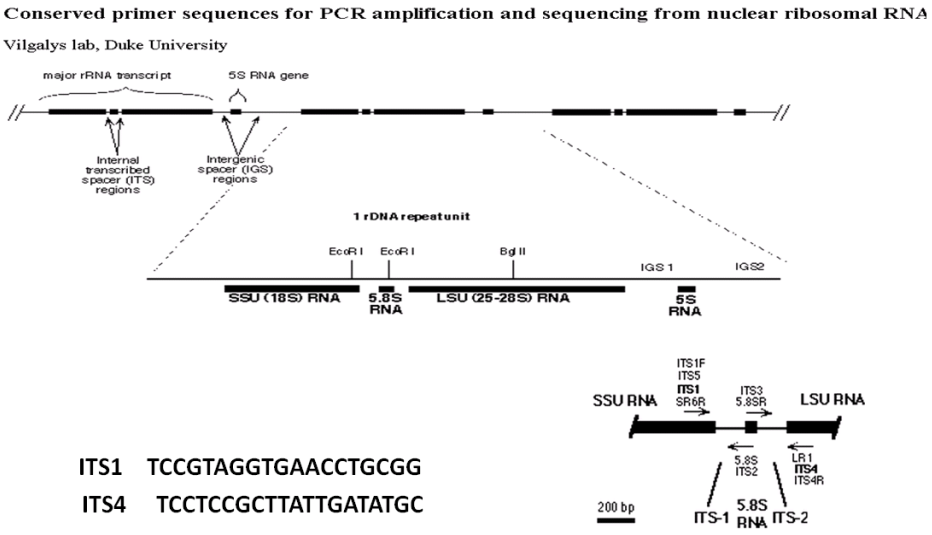
**<u>กรณีศึกษา</u> : การจำแนกชนิดเห็ด :ไม่ทราบชนิด**

**ดำเนินการดังนี้ (รายละเอียดตามบทปฏิบัติการ)**

**1.สกัดดีเอ็นเอ** จากส่วนต่างๆของเห็ดหรือจากเส้นใยเห็ด

**2. ขยายยีน rRNA** โดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพร์เมอร์ ITS1, ITS4

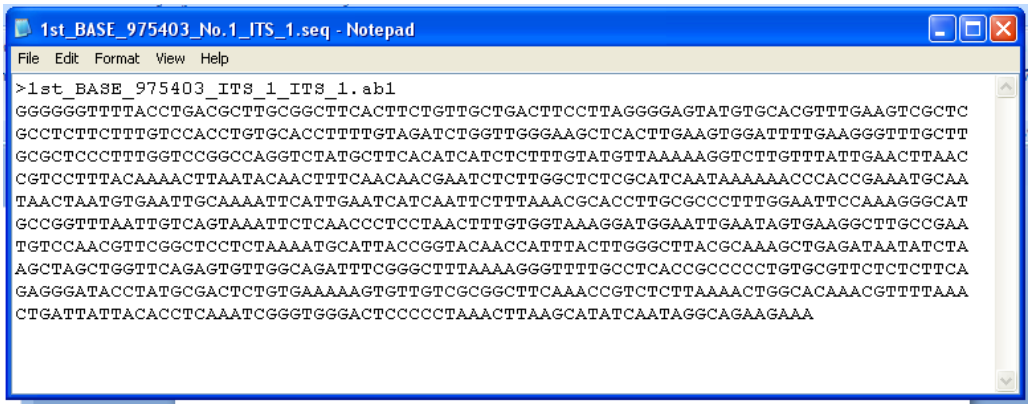
**3. ทำ cycle sequencing** เพื่อหาลำดับเบสของชิ้น DNA บริเวณ ITS1, ITS4 แล้วตรวจสอบคุณภาพของลำดับเบสที่ได้



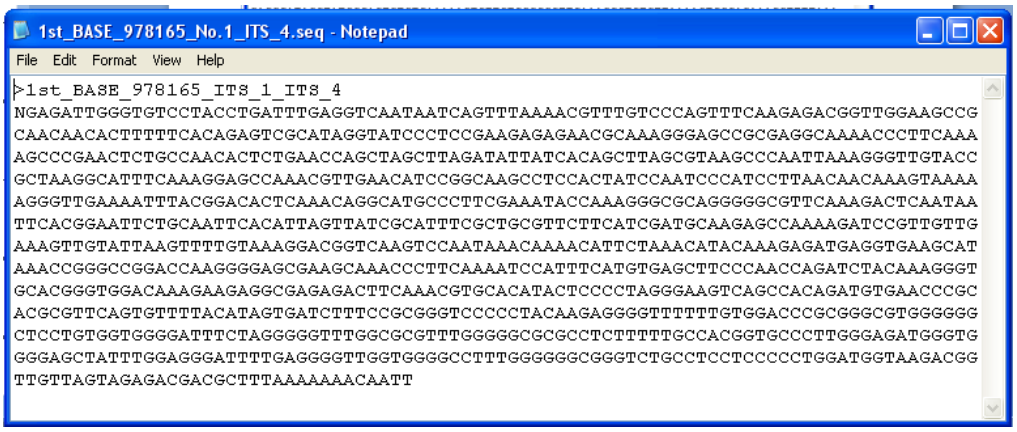
**4. การใช้ลำดับเบส rRNA ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูล**

ผลการอ่านลำดับพันธุกรรม (sequence) ได้ลำดับเบส 2 เส้น

- จาก ไพรเมอร์ forward(ITS1)




- จาก ไพรเมอร์ reverse(ITS4)

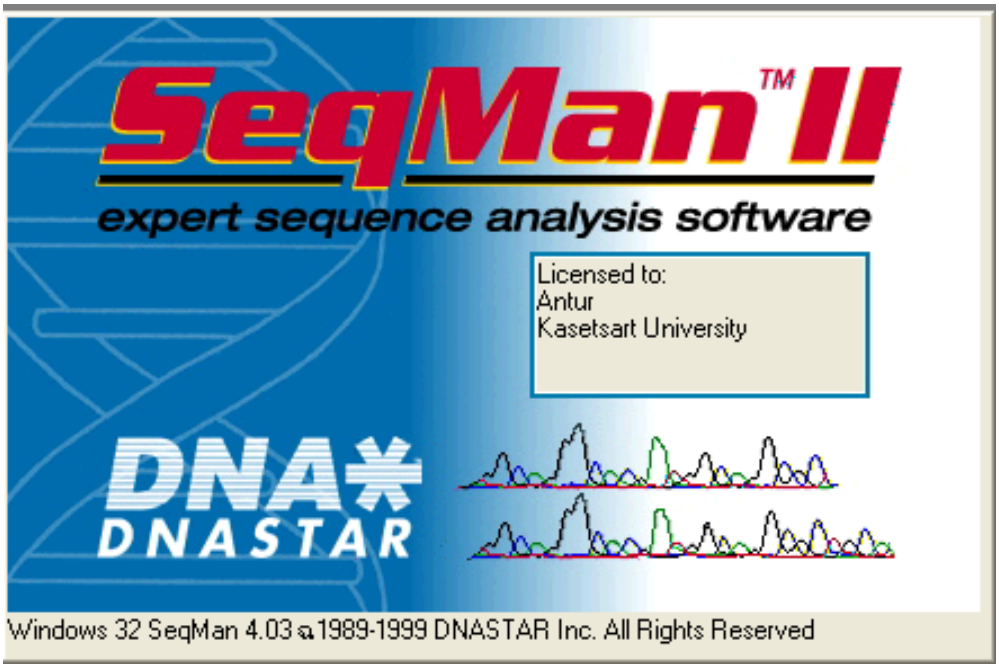



**การเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล**

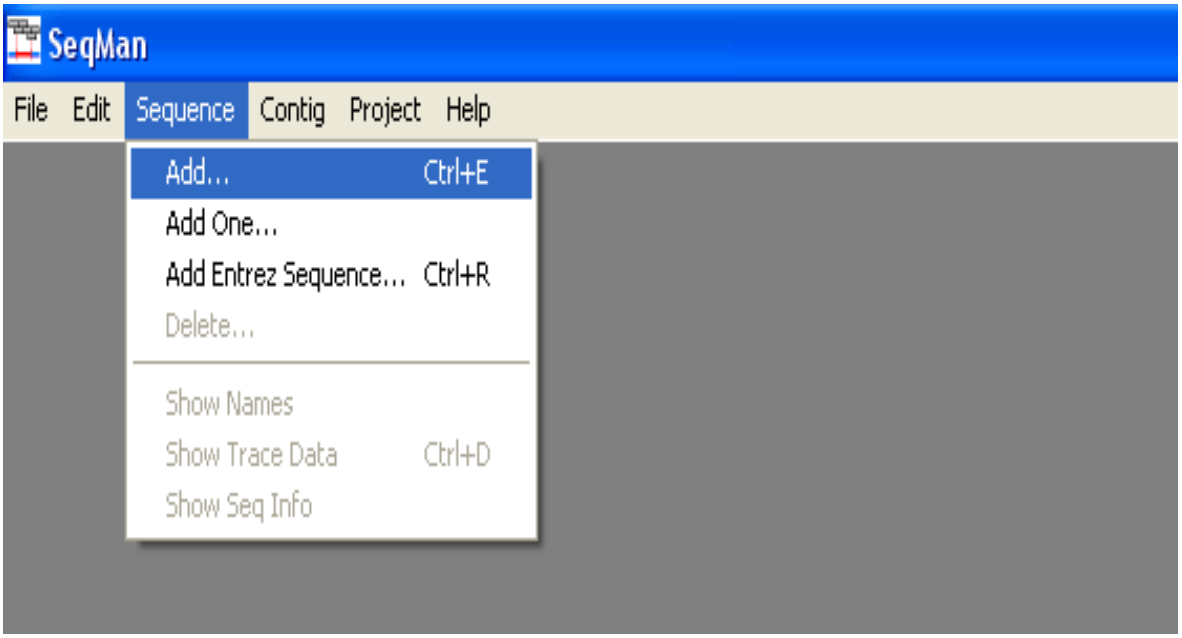
1. ใช้ลำดับเบสของ forward หรือ reverse primer ที่ได้นำไปเทียบหาชนิดของเห็ดได้เลย
2. นำลำดับเบสของ forward และ reverse primer มารวมกัน (assemble fragment) เป็นเส้นเดียวที่สมบูรณ์

**การทำ Assemble fragments ของลำดับเบส forward และ reverse primer**

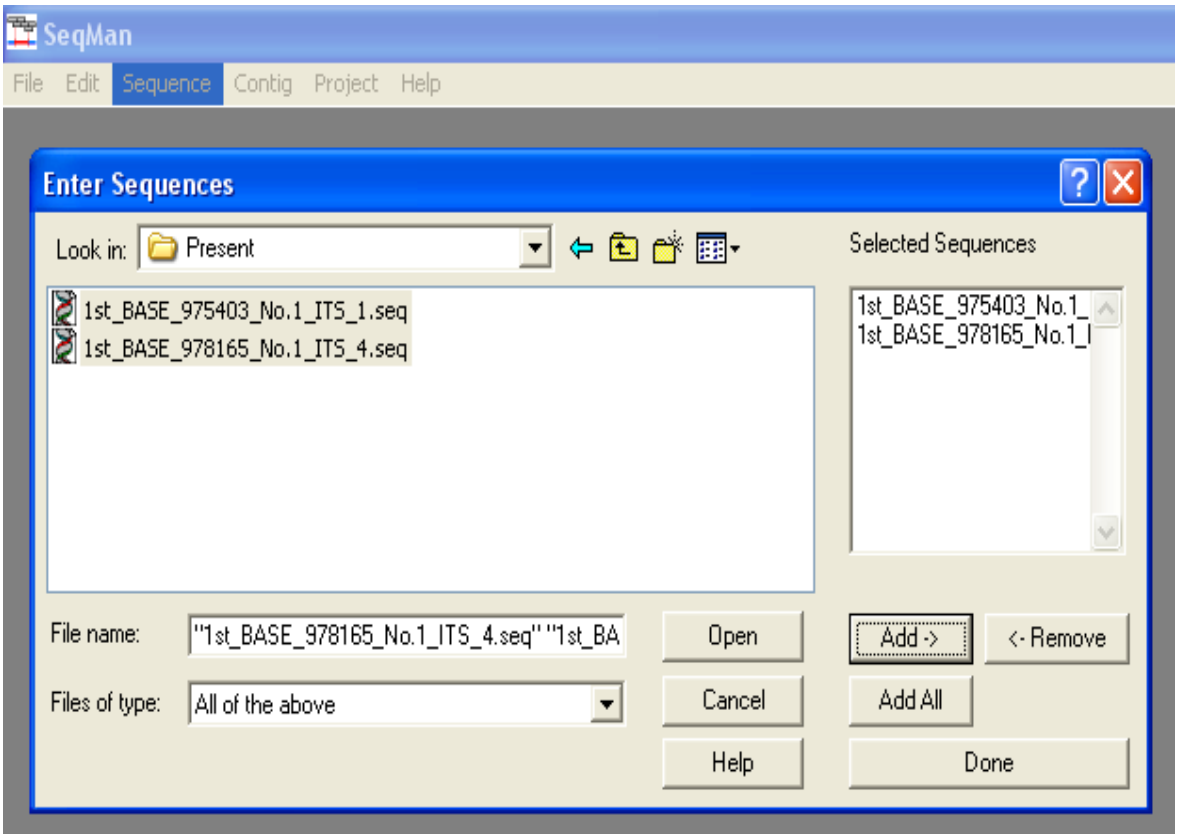
โดย โปรแกรมวิเคราะห์ลำดับเบส *SeqMan*™ II




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

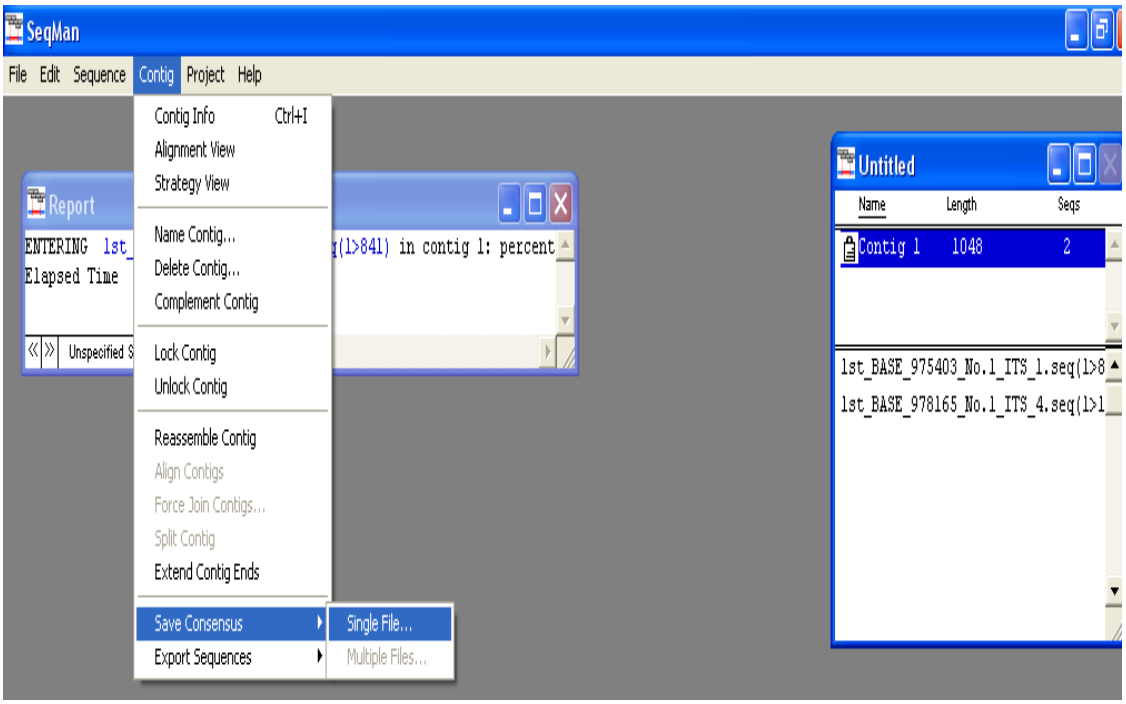


2. Enter Sequence menu เลือก file ของ sequence ทั้ง 2 ที่ต้องการนำมาต่อกันจาก folder แล้วทำการ add file ให้ปรากฏ ชื่อ file ที่ selected sequence ด้านขวามือ

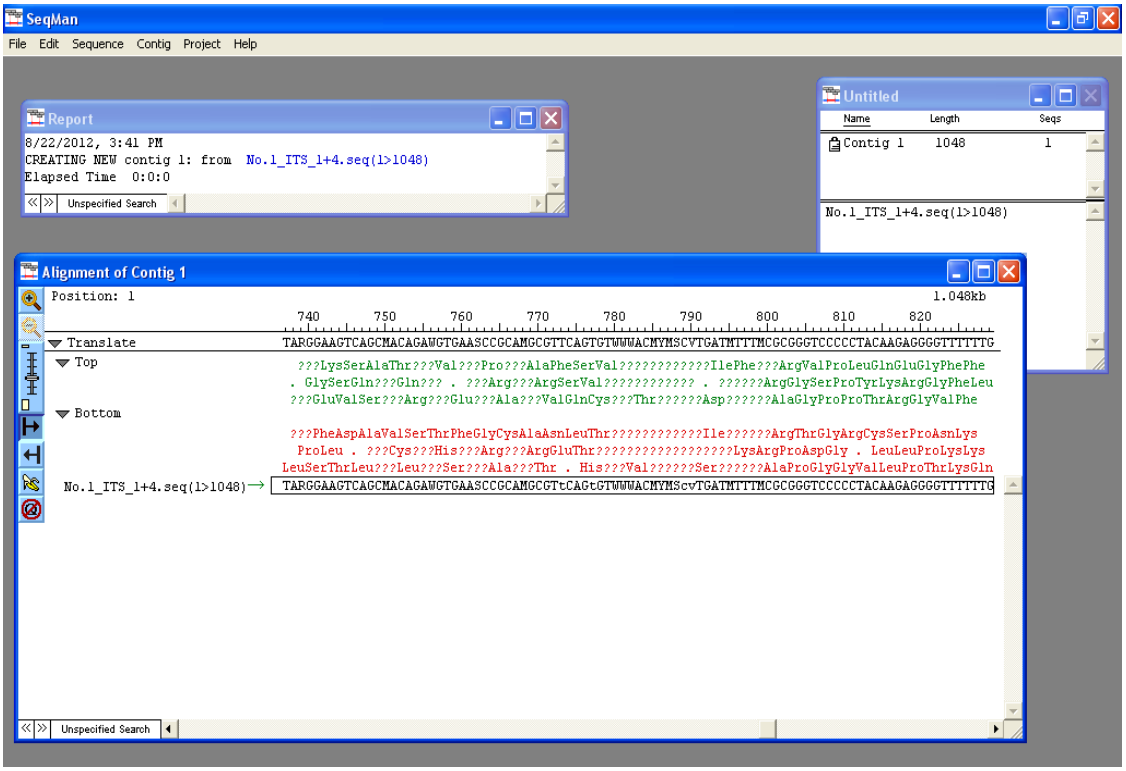



3. จากเมนูด้านล่าง เลือก Contig – Save Consensus – Single File

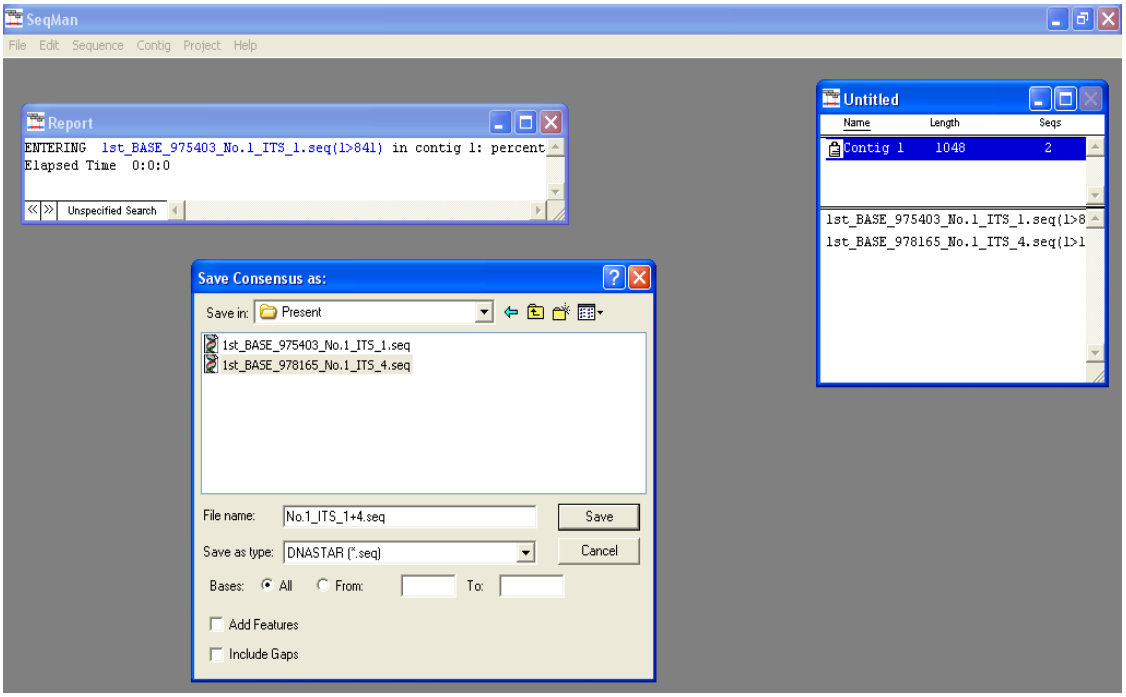
- ภาพขวามือ มี 1 Contig ขนาด 1048 bp ที่รวมมาจาก 2 Seqs.



- หน้าจอจะแสดงผล



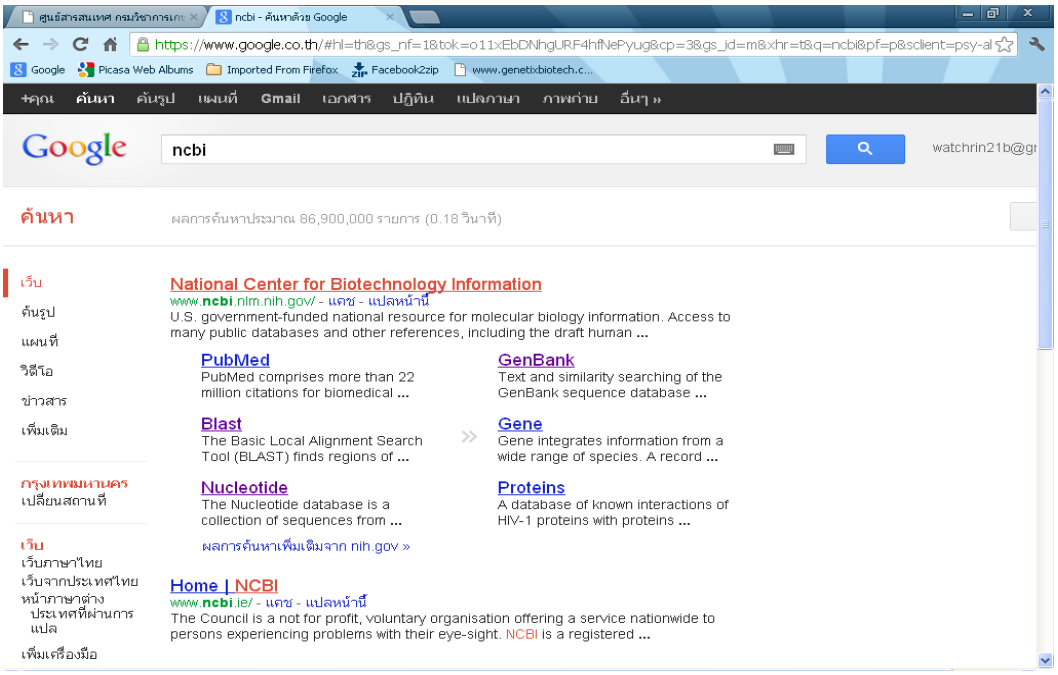

4. ทำการ save file ใหม่ที่รวม Seqs ของ ITS1+ITS4



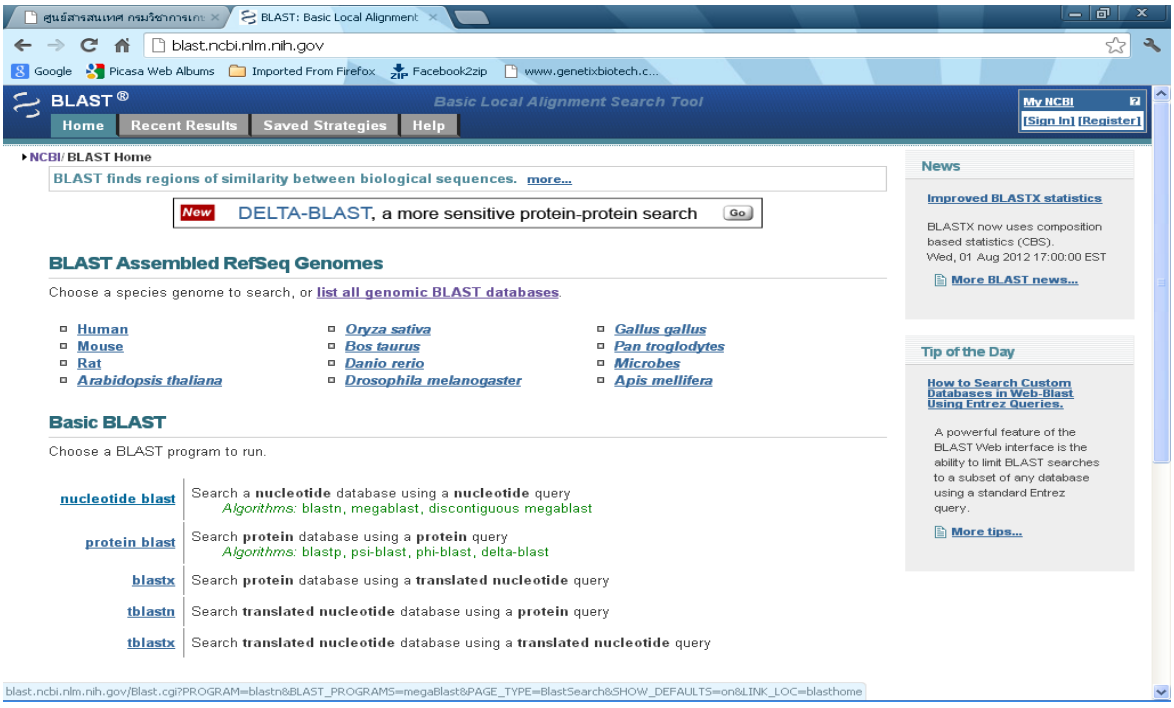
**การจำแนกชนิดของเห็ด : ไม่ทราบชนิด**

โดยเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST

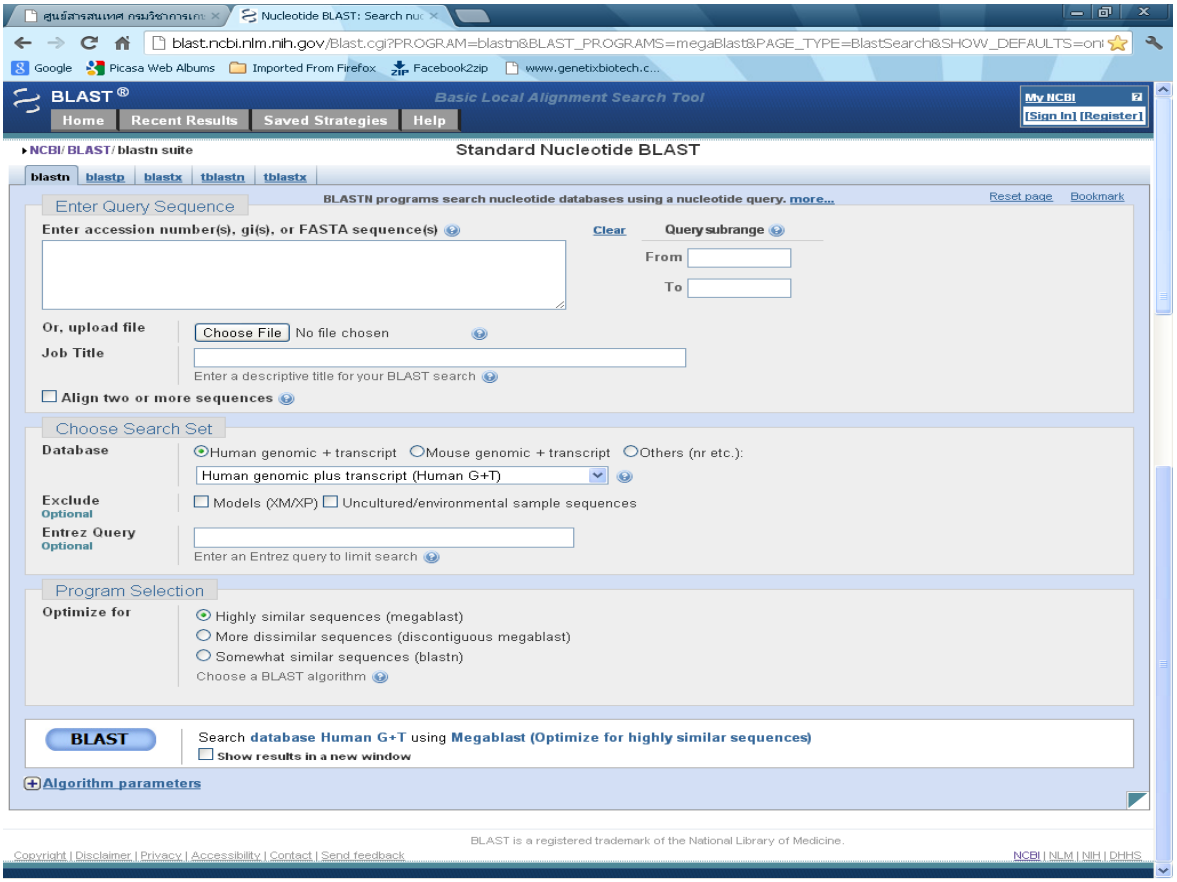
1. เข้า website ของ NCBI



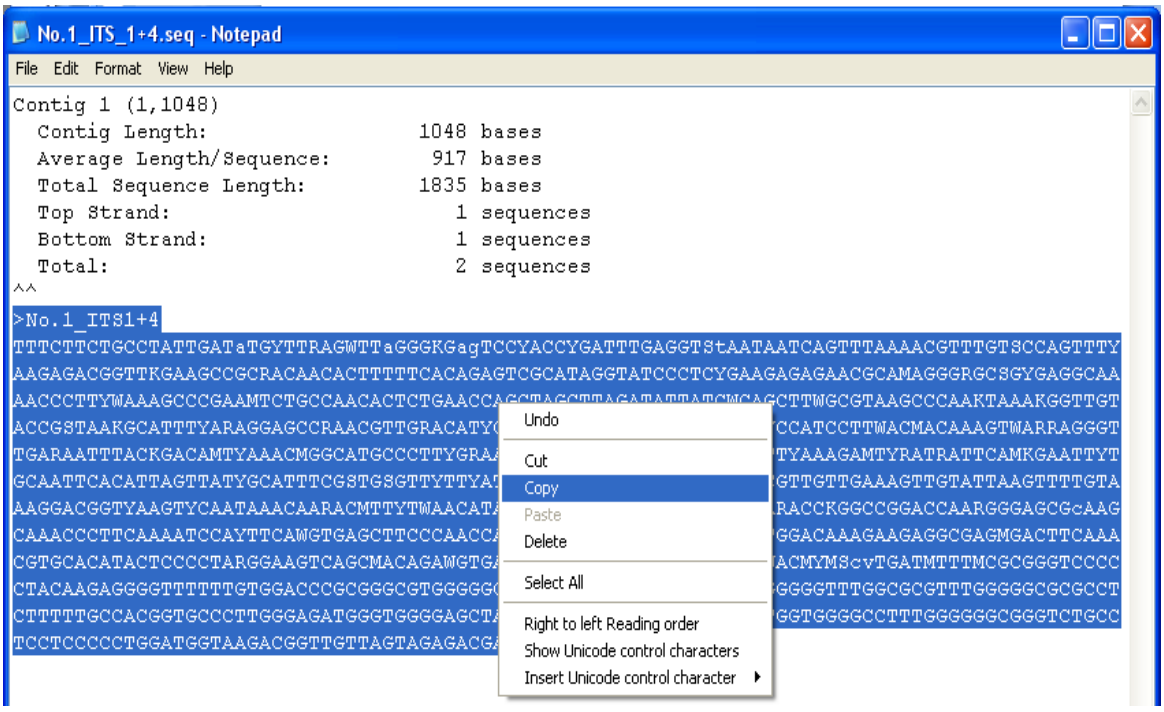

2. เลือก Nucleotide Blast



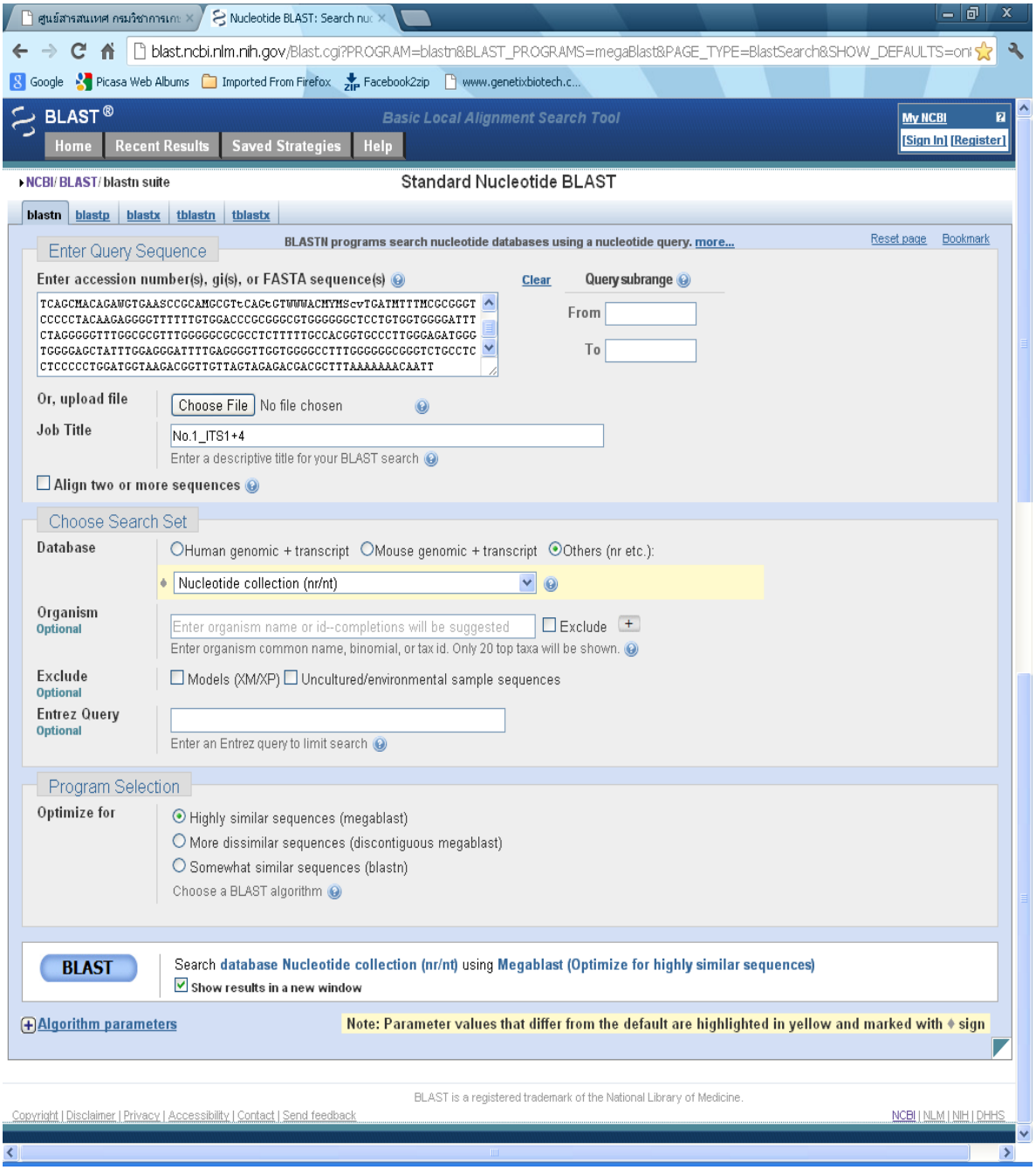
3. หน้าจอแสดงผล ดังภาพ



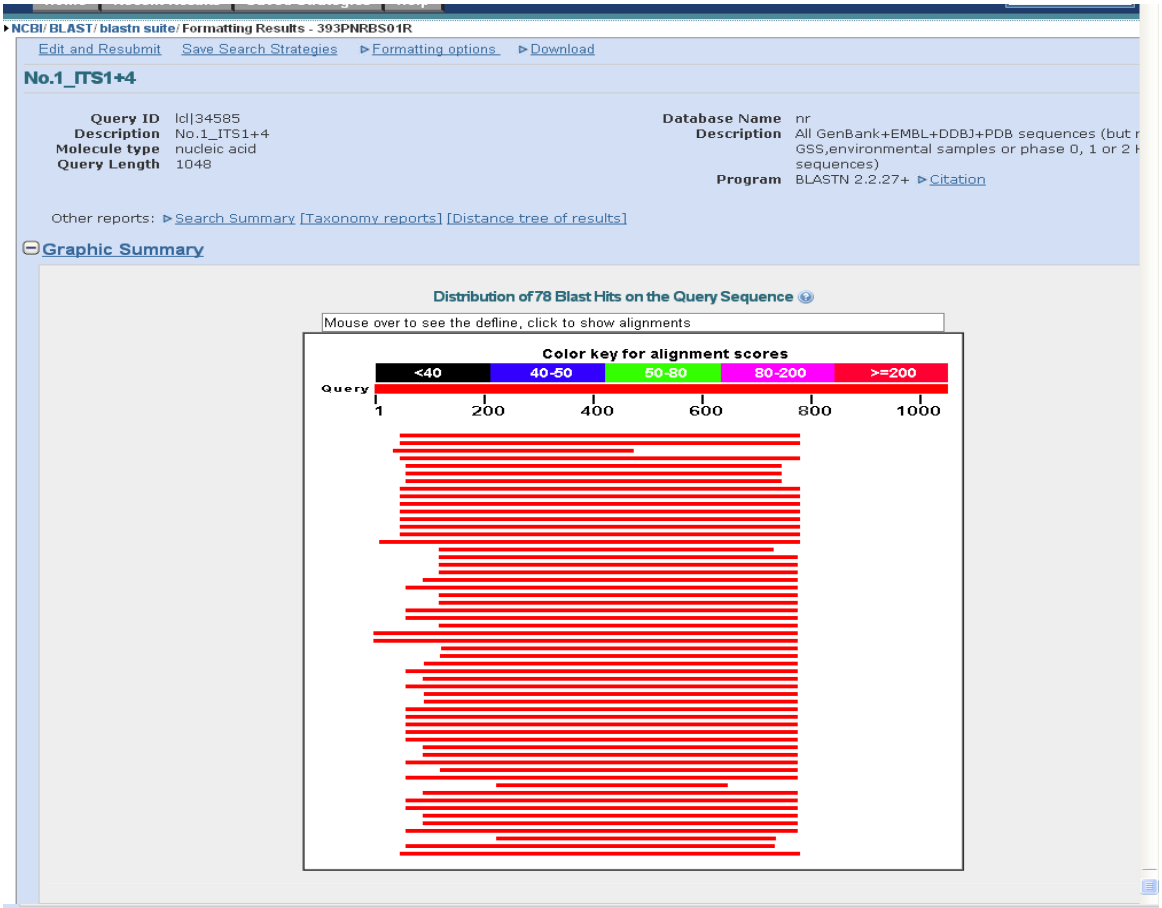

4. ทำการ copy seq. ใหม่ ที่รวมแล้ว ไป paste ไว้ที่ ช่อง Enter Query Sequence



5. ตั้งค่าต่างๆ ดังภาพ แล้ว เลือก BLAST



6. แสดงผลการค้นหา



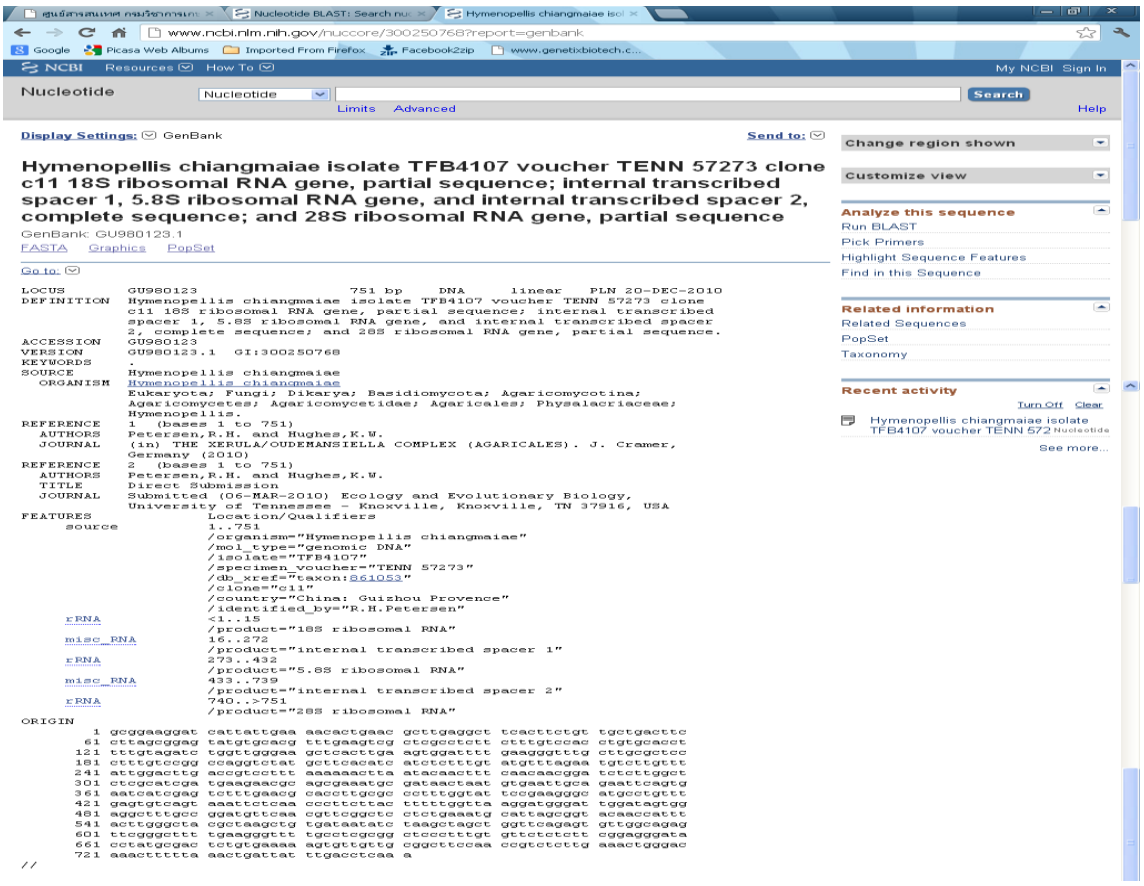

## Descriptions

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:

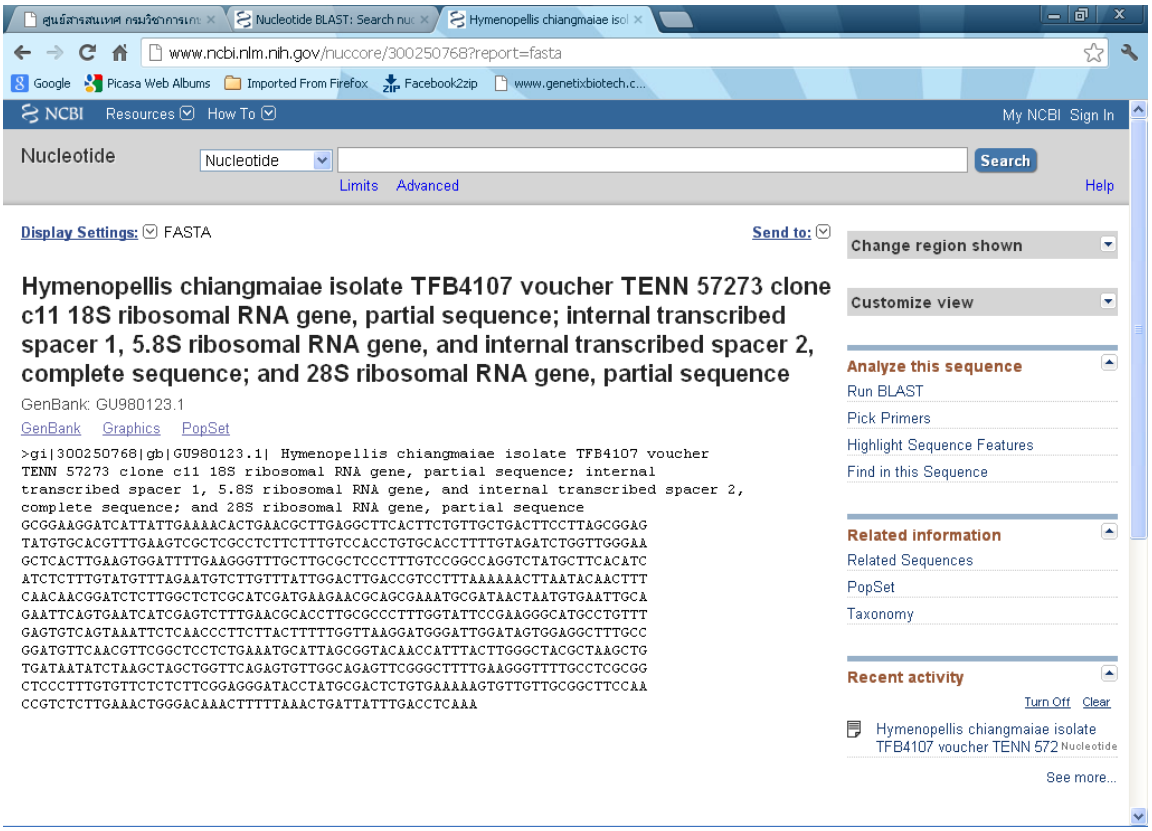
**Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone c11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence**

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 atgtttagaa tgtcttgttt
      241 attggacttg accgtccttt aaaaaacttа atacaacttt caacaacgga tctcttggct
      301 ctggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataactaat gtgaattgca gaattcagtg
      361 aatcatcgag tctttgaacg caccttgcgc cctttggtat tccgaagggc atgcctgttt
      421 gagtgtcagt aaatttctcaa ccctctttac tttttggtta aggatgggat tggatagtgg
      481 aggctttgcc ggatgttcaaa cgttcggctc ctctgaaatg catttagcgg tacaacctatt
      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:

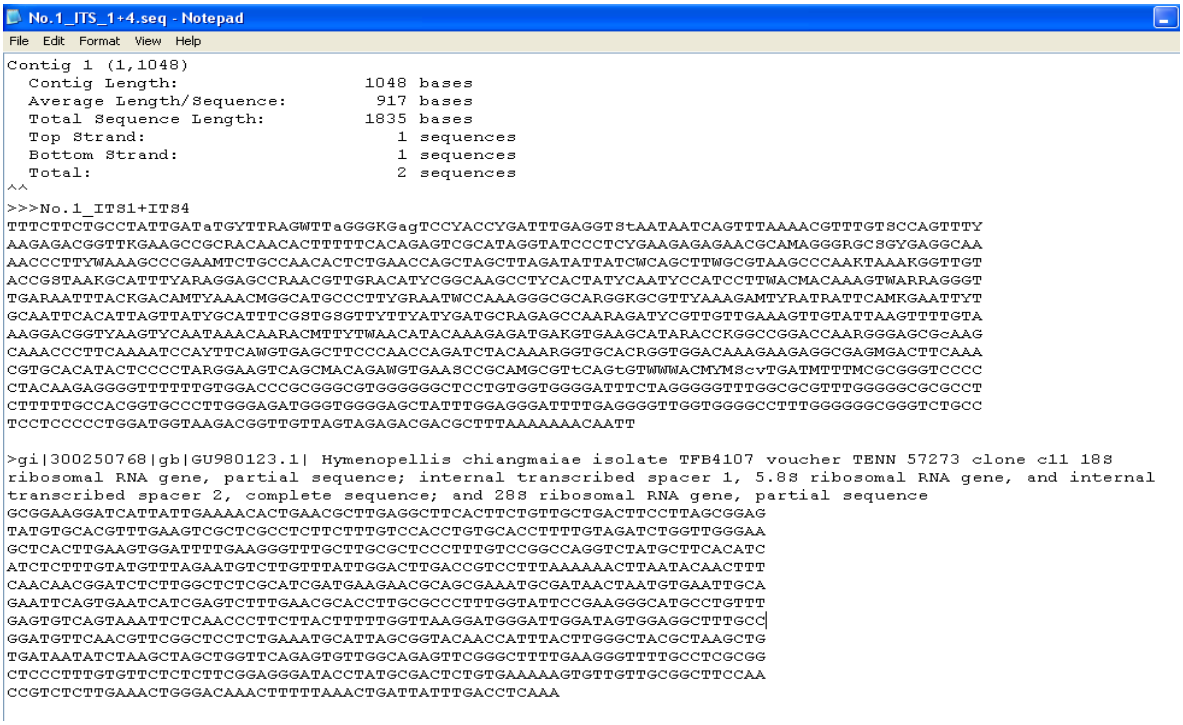
**Hymenopellis chiangmaiae isolate TFB4107 voucher TENN 57273 clone c11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence**

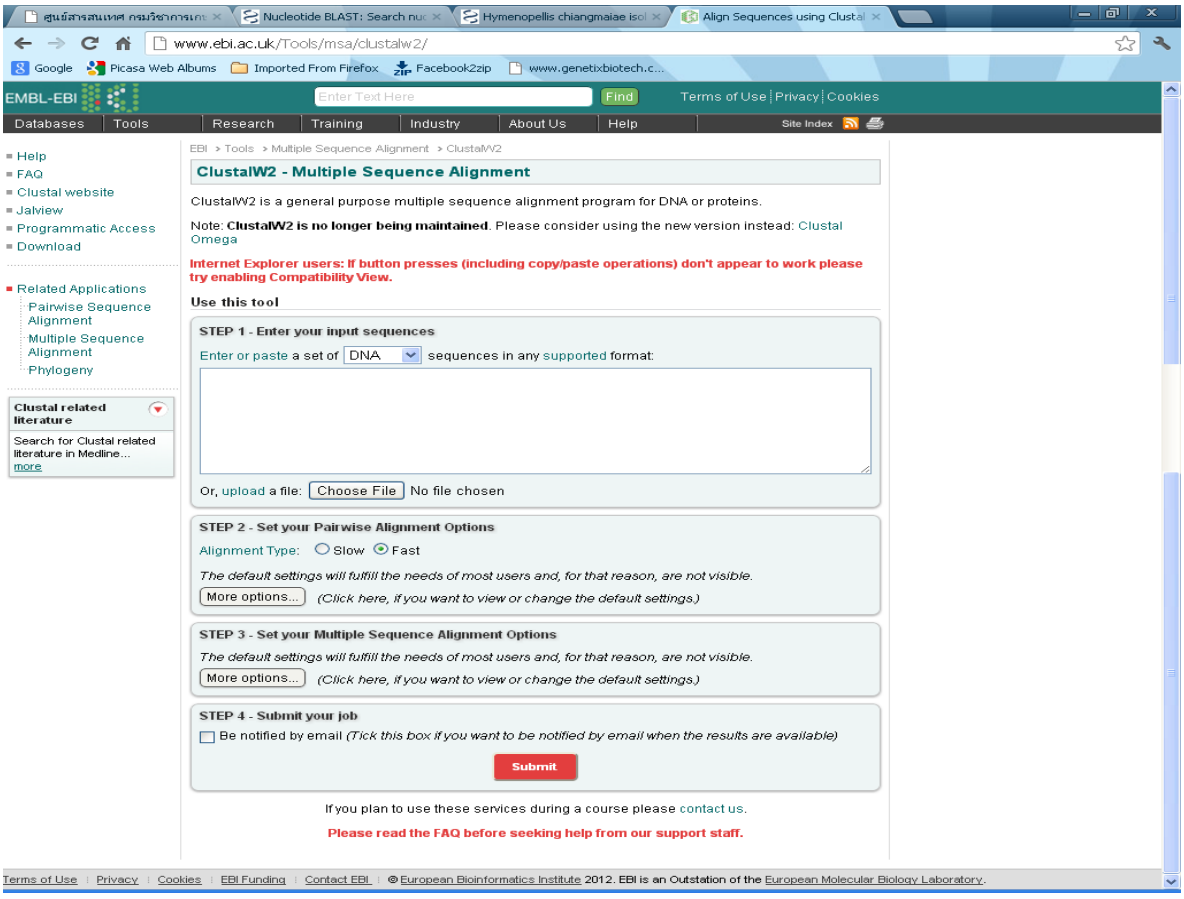
GenBank: GU980123.1

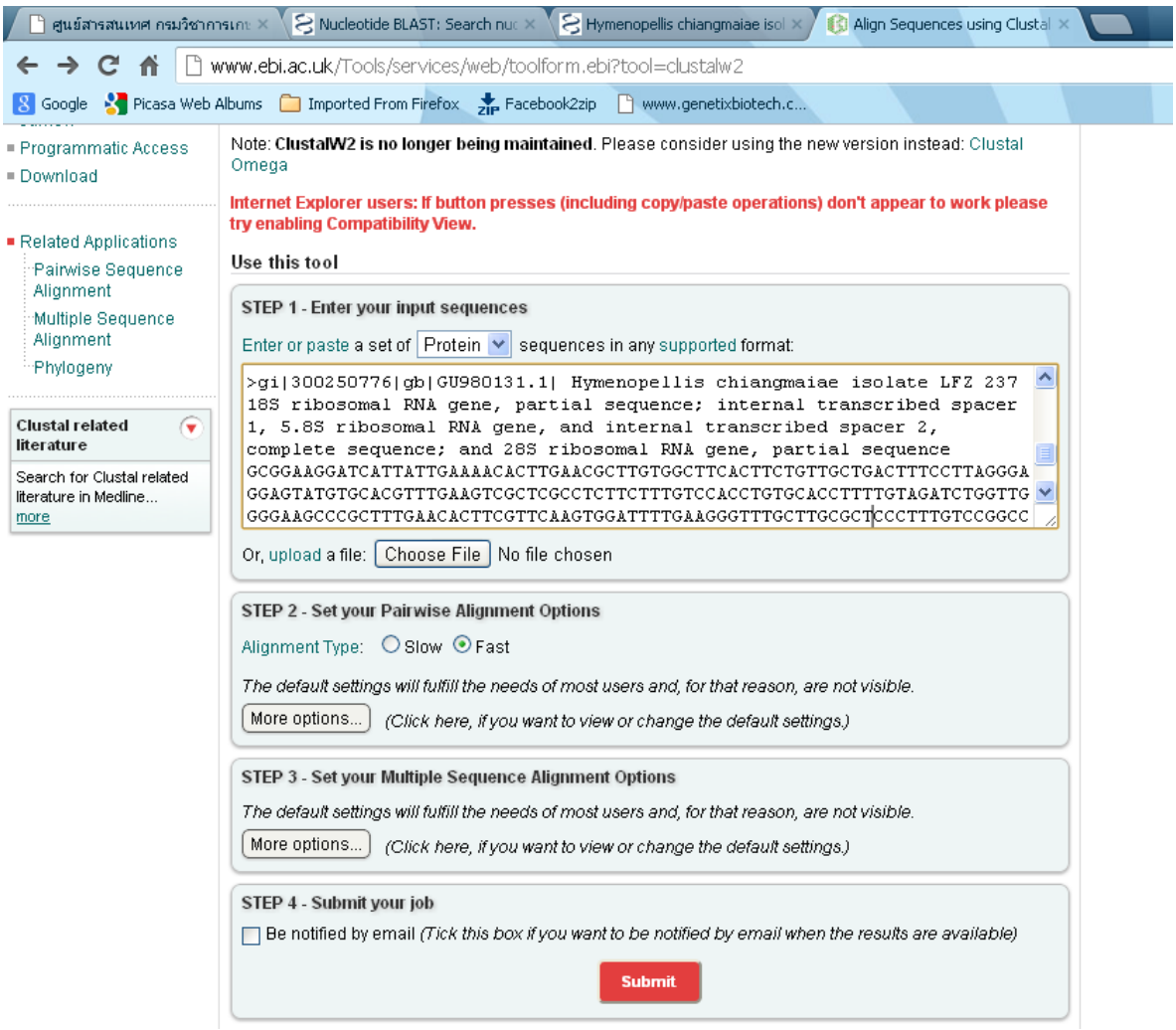
GenBank Graphics PopSet

```
>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
```

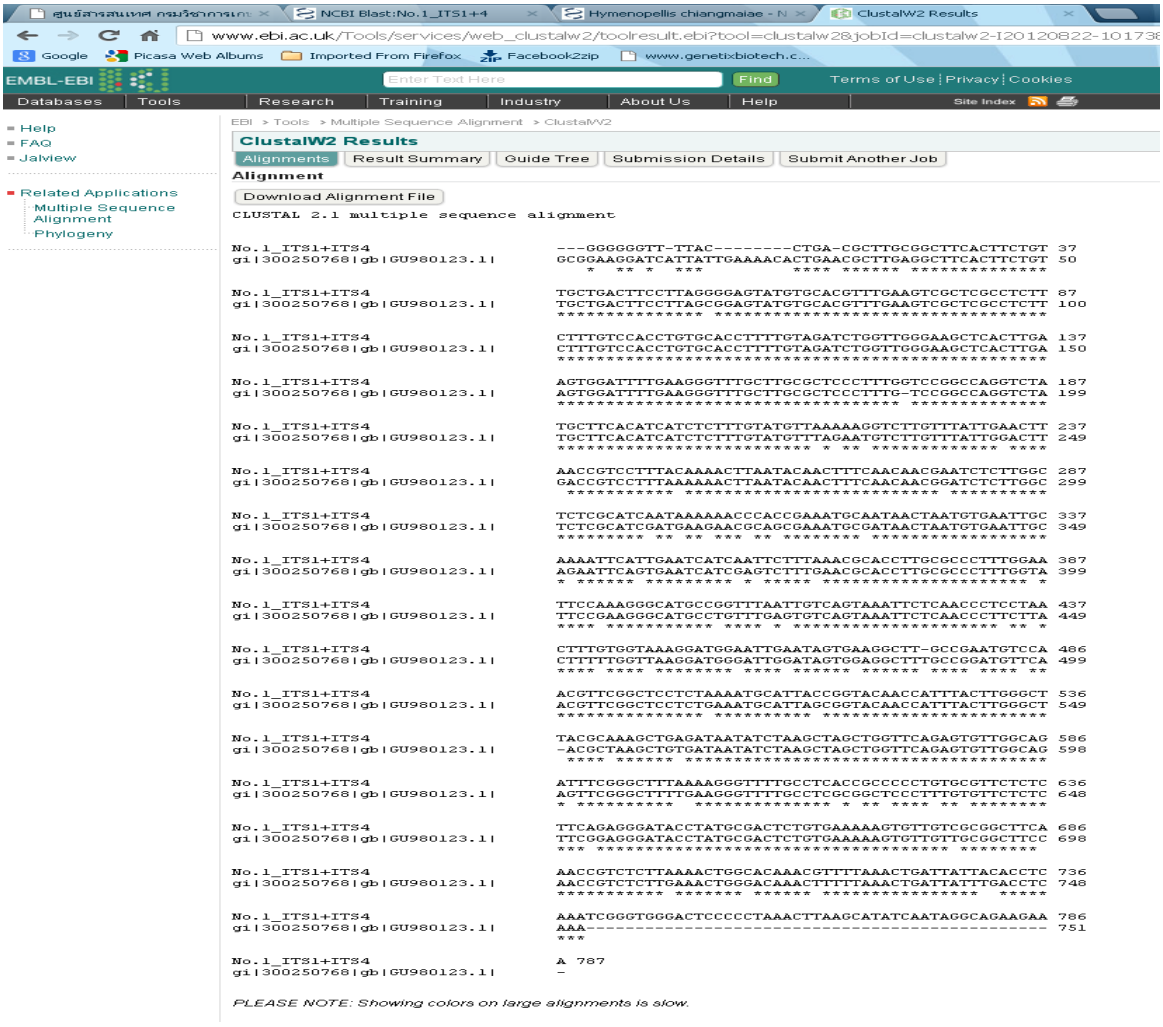
อาจลองเปรียบเทียบ Seqs. ทั้งสองโดยใช้ โปรแกรม Clastal W




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**

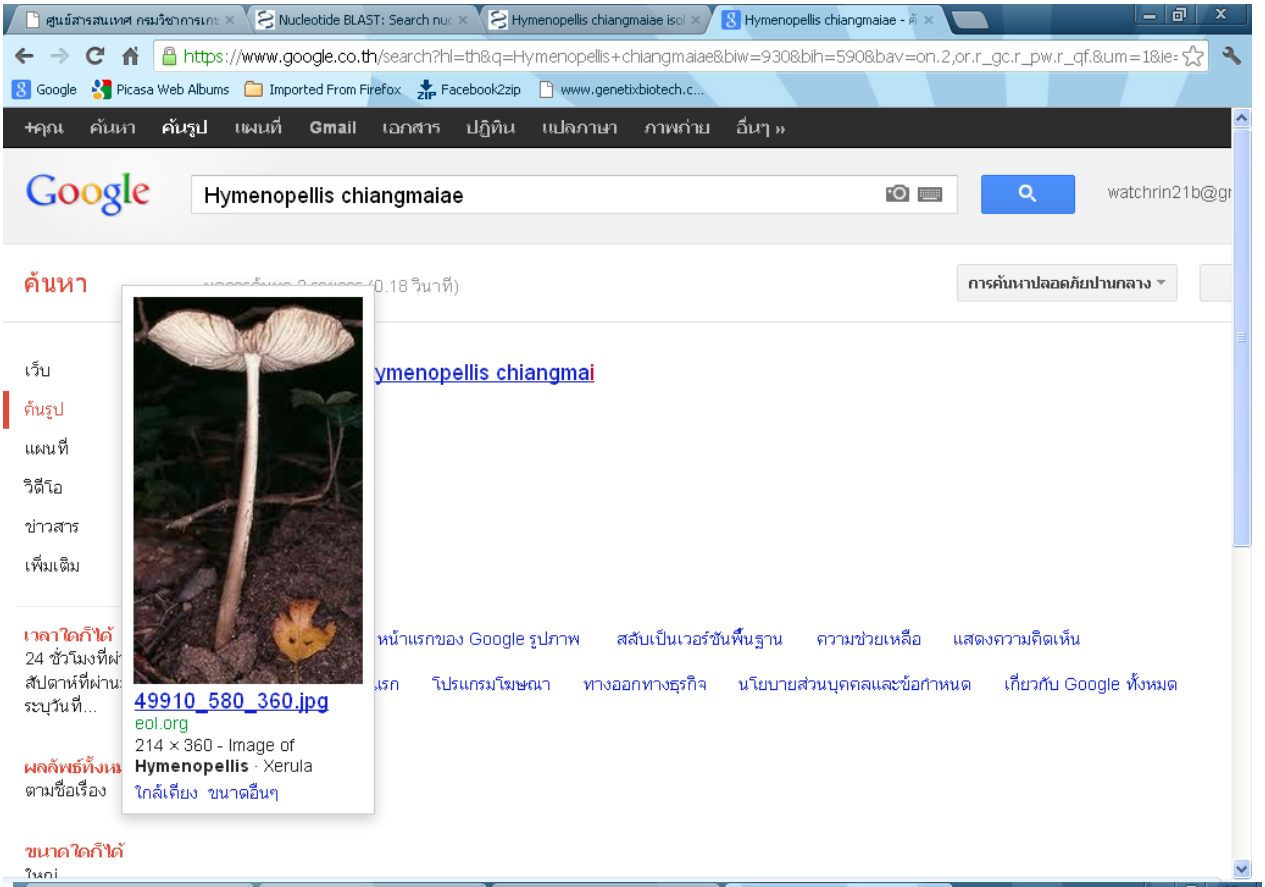
Alignments | Result Summary | Guide Tree | Submission Details | Submit Another Job

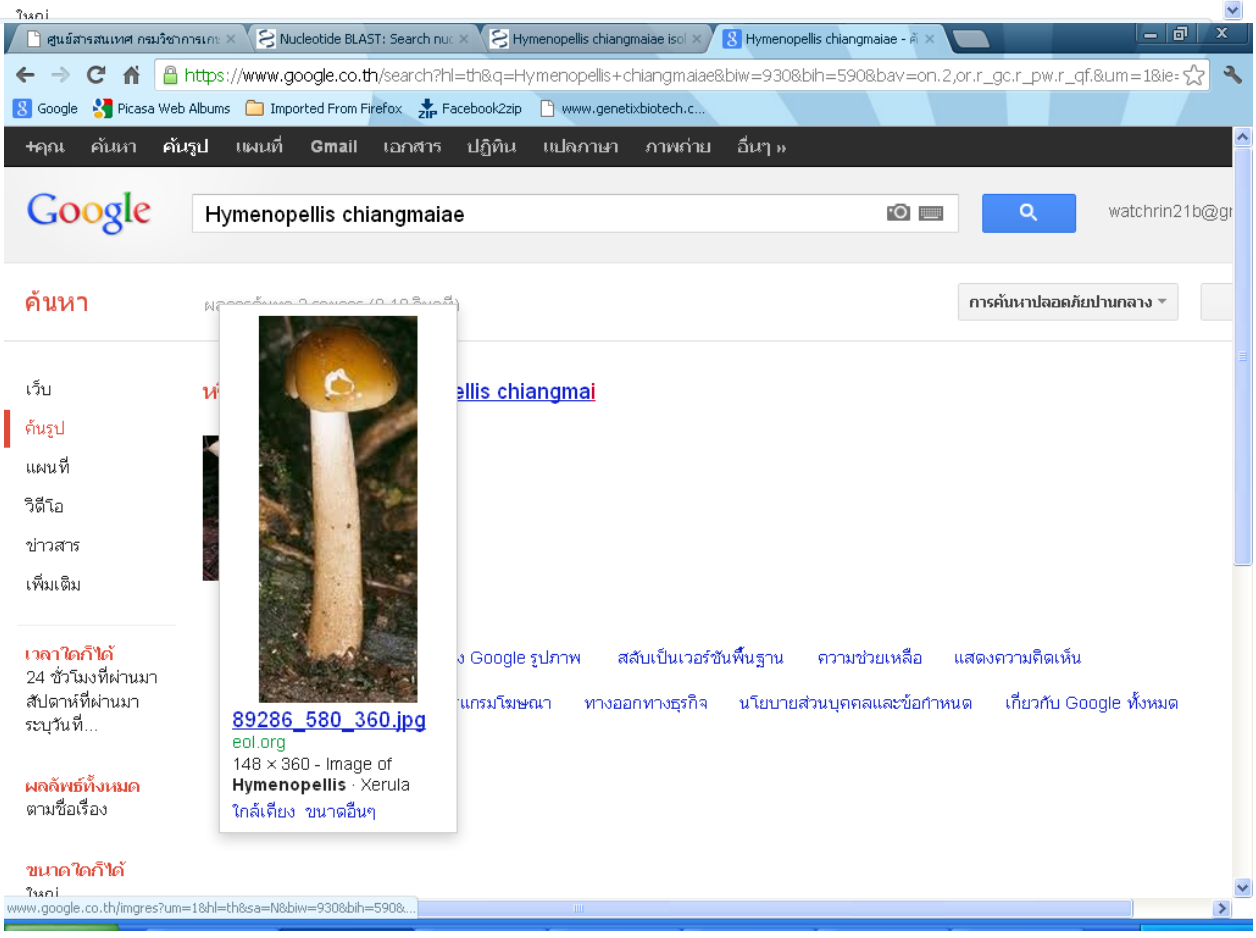
**Alignment**

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.
```

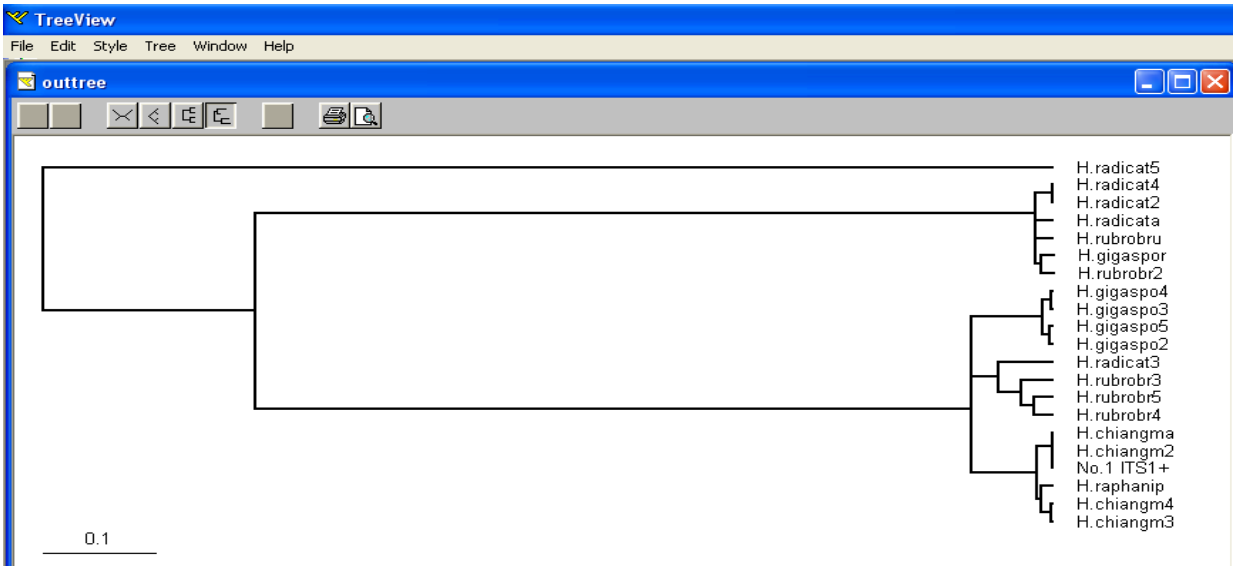
**การค้นหาข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดชนิดที่มีความใกล้เคียงทาง internet**



**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

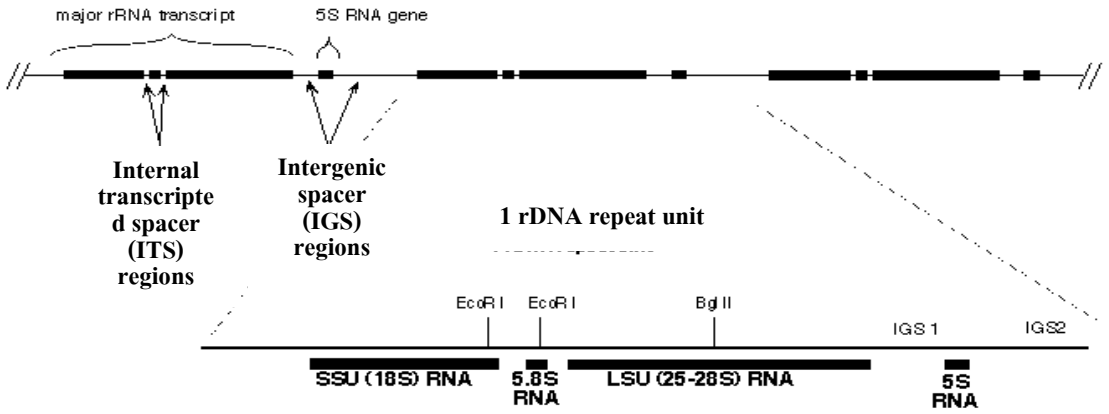
เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของของจุลินทรีย์ ได้แก่ การวิเคราะห์องค์ประกอบของเบสของ DNA (DNA base composition) คือ การวิเคราะห์หาปริมาณ G+C (GC content) โดยจุลินทรีย์ต่างชนิดจะมีปริมาณ G+C แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียมีปริมาณ G+C อยู่ระหว่าง 25-75 mol% โดยแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีส 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

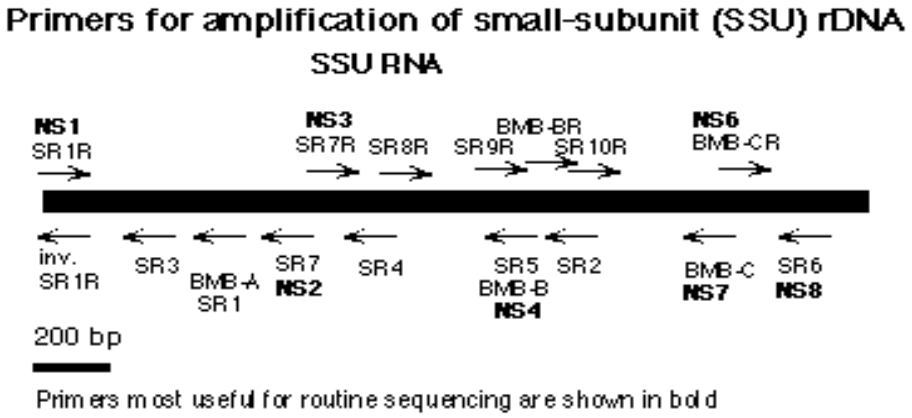
ส่วนสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตมีไรโบโซมขนาด 80*S* ประกอบด้วย large subunit และ small subunit ซึ่งมีขนาด 60*S* และ 40*S* ตามลำดับ ซึ่ง large subunit ประกอบด้วย 5*S* rRNA, 5.8*S* rRNA และ 28*S* rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 49 ชนิด สำหรับ small subunit ประกอบด้วย 18*S* rRNA รวมอยู่กับโปรตีนประมาณ 33 ชนิด (Watson *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

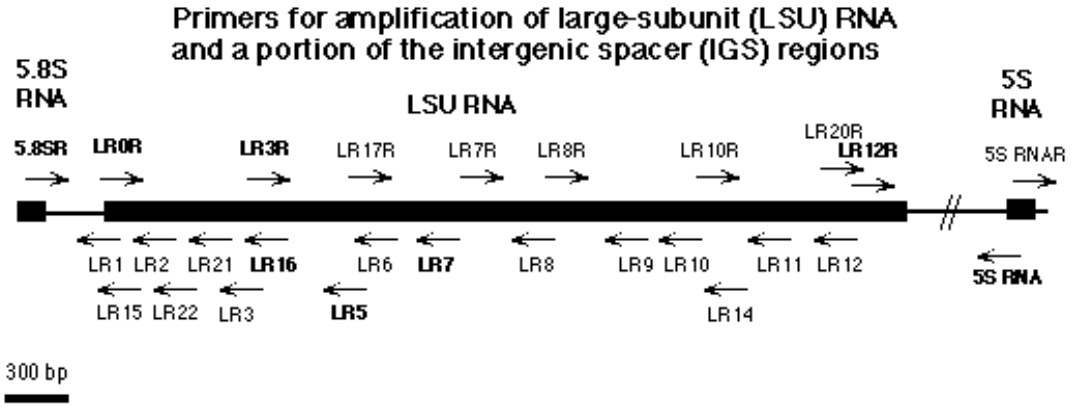
**ที่มา :** http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm

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



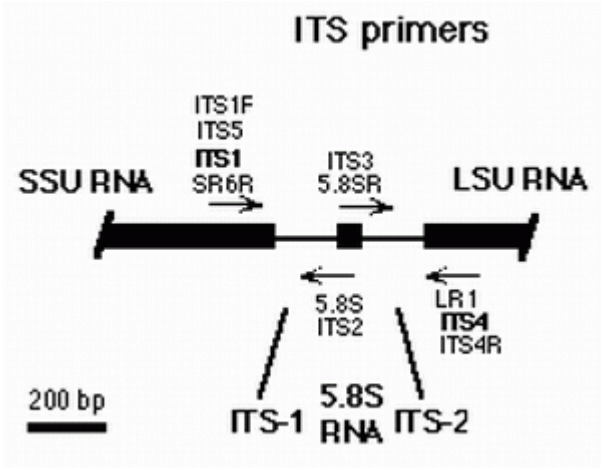

**ภาพที่ 2** ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ small subunit (SSU)

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



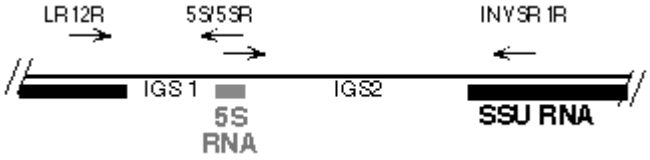

**ภาพที่ 3** ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ large subunit (LSU)

**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

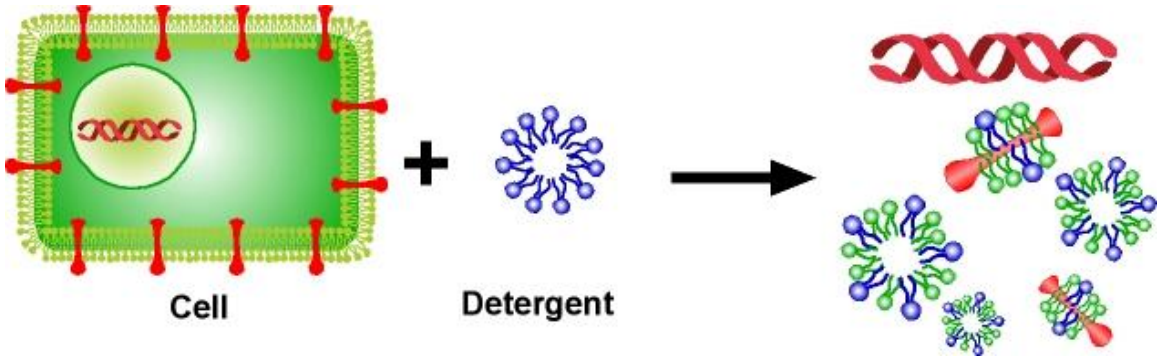
| primer name | sequence (5'->3') | comments | reference |
|---|---|---|---|
| LR12R | GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC | located within the LSU RNA (see above) | Vilgalys lab |
| invSR1R | ACTGGCAGAATCAACCAGGTA | located within the SSU RNA (positions 21-1) | Vilgalys lab |
| 5SRNA | ATCAGACGGGATGCGGT | (complementary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

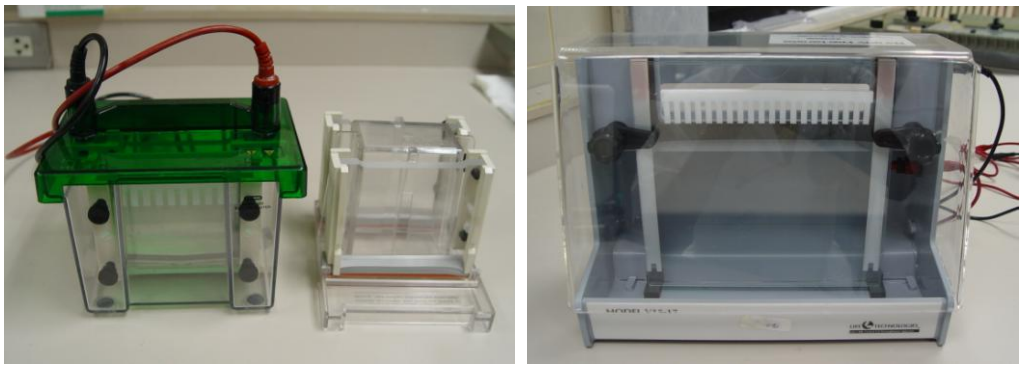
ขนาดของ gel ที่ใช้ขึ้นกับชนิดของงานที่ต้องการ ถ้าต้องการวิเคราะห์แถบ DNA น้อยแถบและขนาดของโมเลกุลต่างกันมากก็สามารถใช้ gel ขนาดเล็กได้ แต่ถ้ามีแถบที่ต้องการศึกษาและวิเคราะห์มากและขนาดใกล้เคียงกันก็อาจต้องใช้ gel ขนาดยาวขึ้น โดยเฉพาะเมื่อต้องการแยกแถบ DNA นั้นมาทำให้บริสุทธิ์

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)



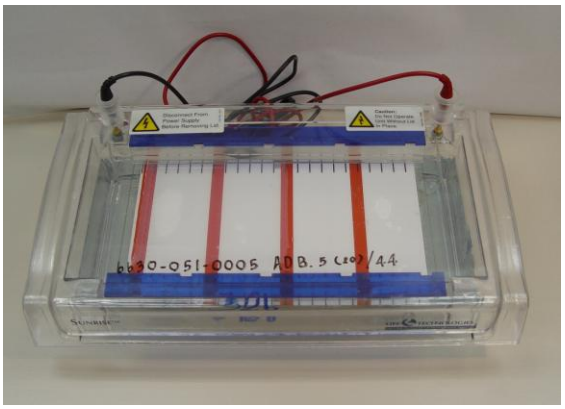
**ภาพที่** 7 เครื่อง electrophoresis แบบแนวตั้ง (Vertical)

**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

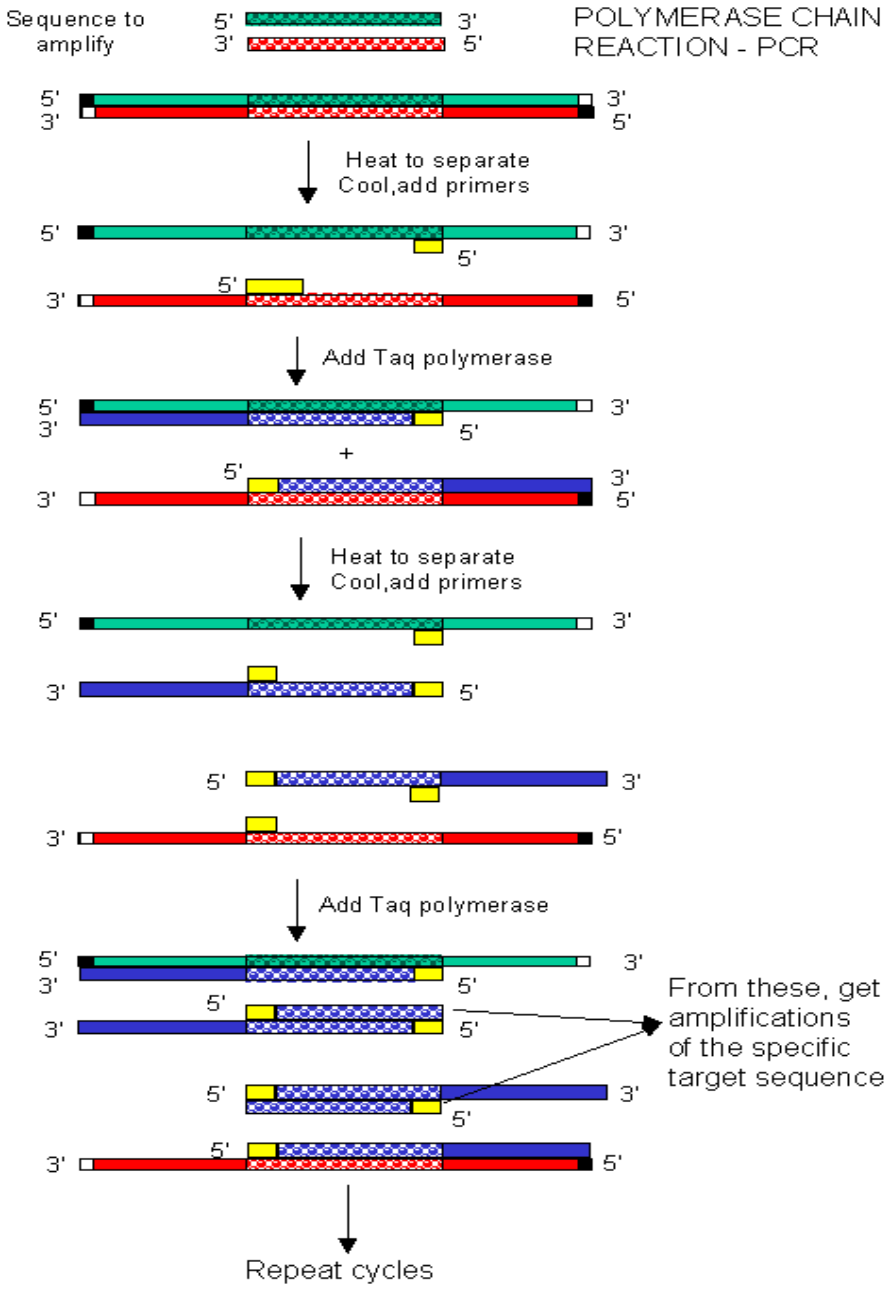
3. ใช้เป็นพื้นฐานในการตรวจหา DNA ที่ต้องการศึกษาโดยสามารถนำไปใช้ในการทำ Southern blotting หรือ PCR เป็นต้น

# 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

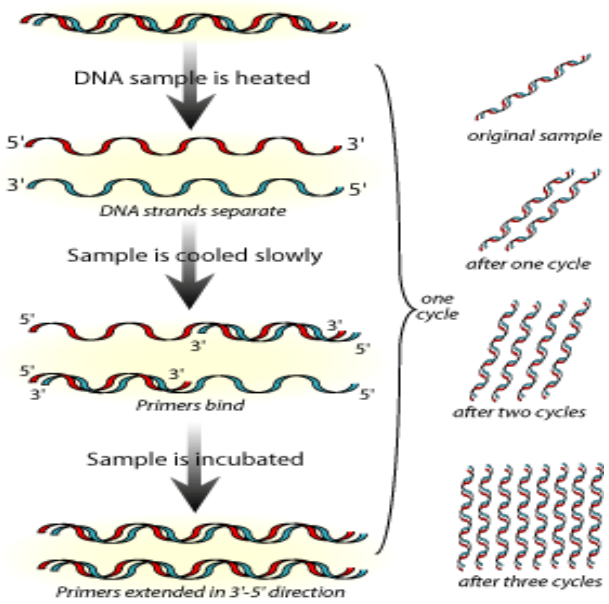
ดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) แยกเป็นสายเดี่ยวหรือเสียสภาพได้อย่างสมบูรณ์ แต่ดีเอ็นเอต้นแบบบางชนิดอาจต้องการอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อให้เกิดการแยกเป็นสายเดี่ยวที่สมบูรณ์ เช่น ดีเอ็นเอที่มีองค์ประกอบเป็น G+C สูง ควรเพิ่มเวลาหรือเพิ่มอุณหภูมิในการทำให้แยกเป็นสายเดี่ยว บางครั้งอุณหภูมิในหลอดทดลองอาจไม่สูงเท่าอุณหภูมิที่เครื่องแสดง 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 $2 \times 10^{-5}$ ในขณะที่ *Pfu* polymerase มีอัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาดเท่ากับ $1.6 \times 10^{-6}$ 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)

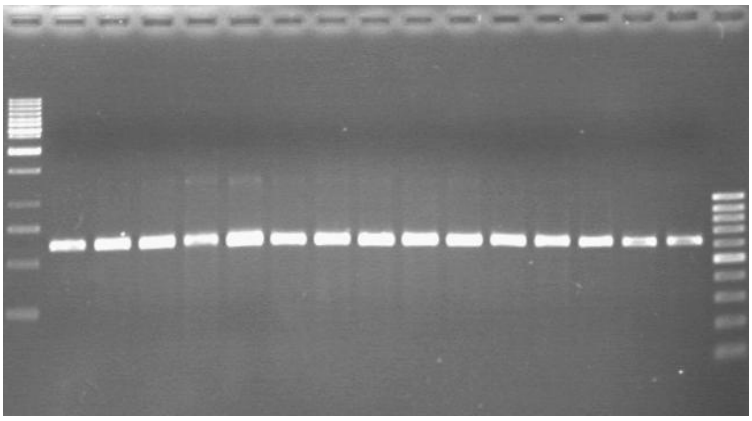
4. อัตราการเพิ่มและลดอุณหภูมิไม่ควรเกิน 3 องศาเซลเซียส ต่อวินาที และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิควรจะเร็วกว่าอัตราการลดอุณหภูมิ

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<br>- เช็ค pH โดยทั่วไป pH ที่เหมาะสมคือ 8.3 pH ที่เหมาะสมกับแต่ละปฏิกิริยา สามารถหาได้โดยเพิ่ม pH ครั้งละ 0.5 จาก 8-10<br>- ทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิ dNTP ที่เหมาะสม<br>- 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<br>- 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<br>- ทำ Touch-down หรือ Booster PCR<br>- ทำ Nested PCR<br>- เลือกไพรเมอร์ใหม่ เนื่องจากไพรเมอร์เดิมไม่จำเพาะ<br>- เพิ่มอุณหภูมิ Annealing เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบจำเพาะขึ้น<br>- ทดสอบหาความเข้มข้นของ $Mg^{+2}$ ที่เหมาะสม เช็คค่า pH<br>- ลดความเข้มข้นของไพรเมอร์ หรือลดปริมาณดีเอ็นเอพอลิเมอเรส<br>- 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

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

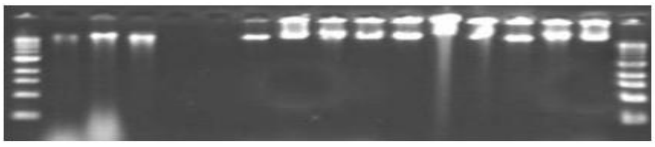
| ชื่อจุลินทรีย์ | รหัส | Maximum identity | Accession No. | Gram's Stain | ความเข้มข้นสูงสุดของเกลือที่เชื้อเจริญได้ ( % ) |
|---|---|---|---|---|---|
| *Stenotrophomonas maltophilia* | NAHalo 73 | 99% | AF417866.1 | - | 30 |
| *Halomonas elongata* strain ATCC 33173 | NAHalo 75 | 97% | AM941743.1 | - | 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

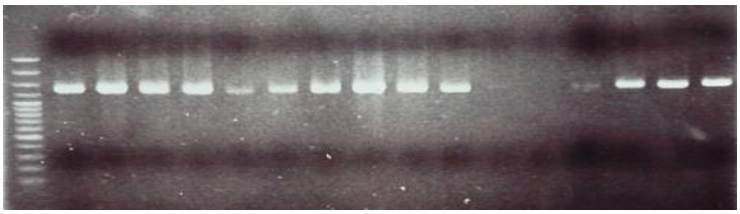
การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี SDS DNA extraction method ใช้ได้ผลดีกับ endophytic bacteria ทนเค็ม ให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์และปริมาณมาก และดีเอ็นเอที่ได้ไม่เป็นเมือกเหนียว ( รูปที่1 )



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 | ~ |

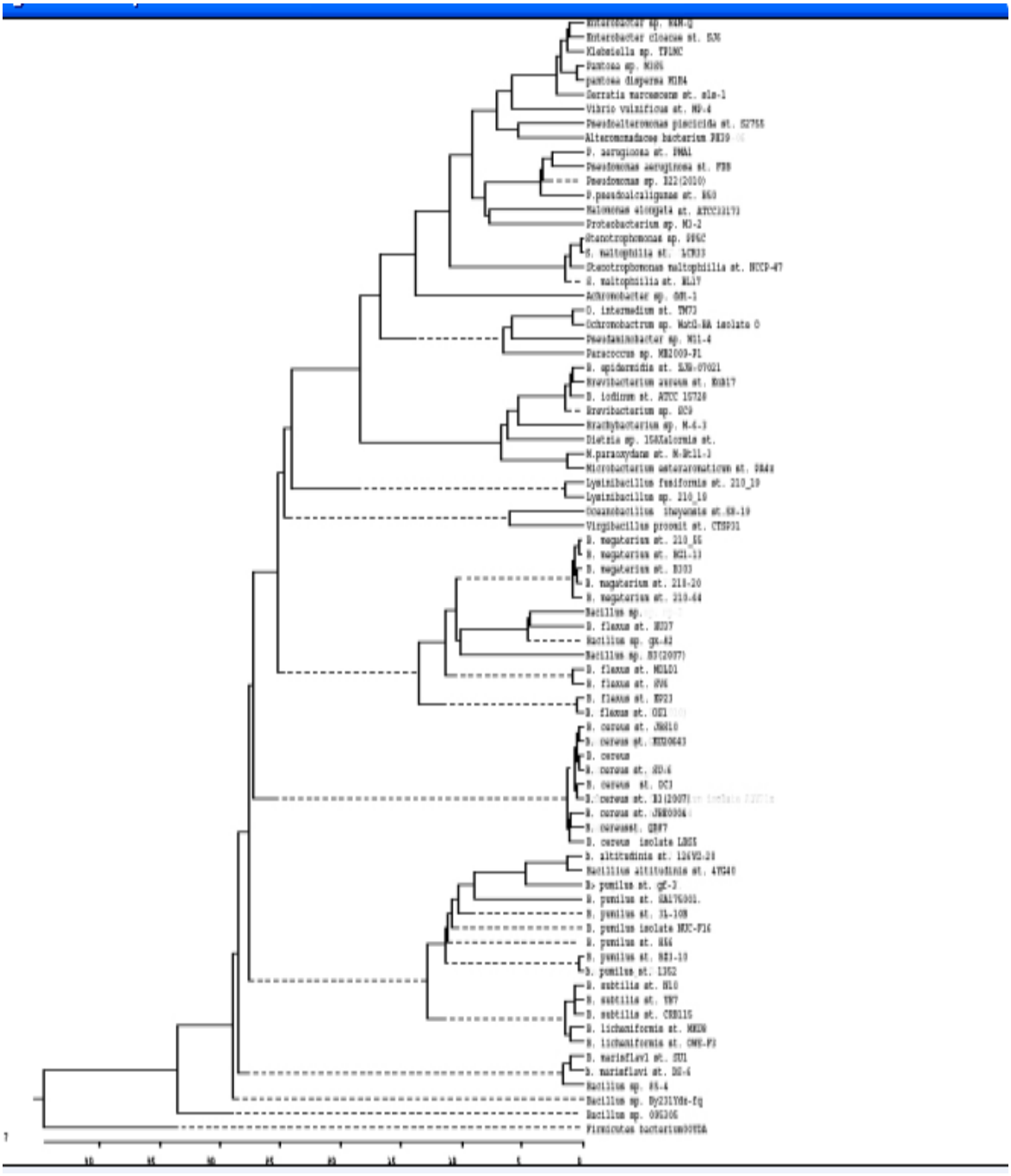


รูปที่ 2. PCR product ขนาด 1300 bp.ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S rDNA

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

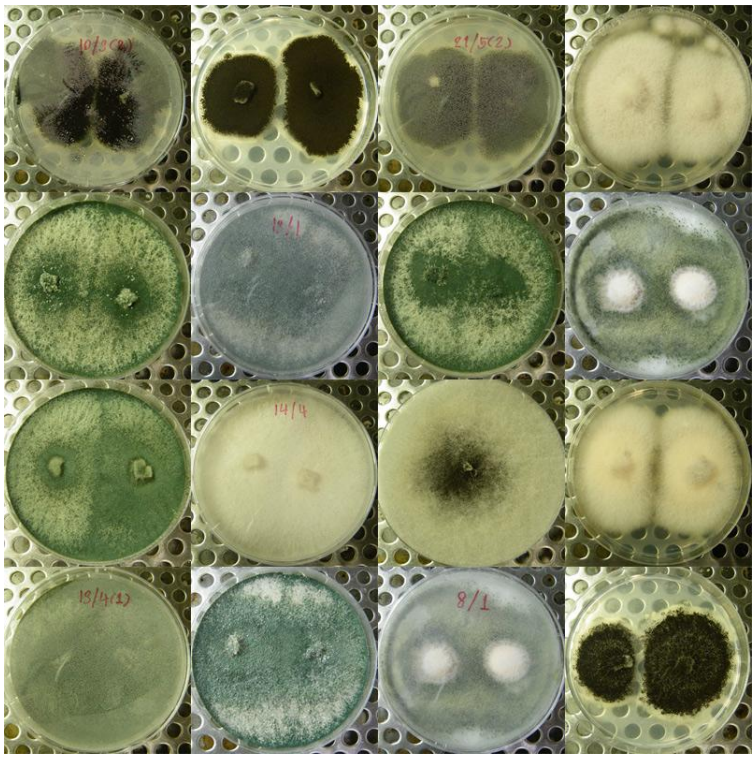
**สถานที่ดำเนินการทำการทดลอง**

ห้องปฏิบัติการกลาง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**1. การจำแนกเชื้อรา**

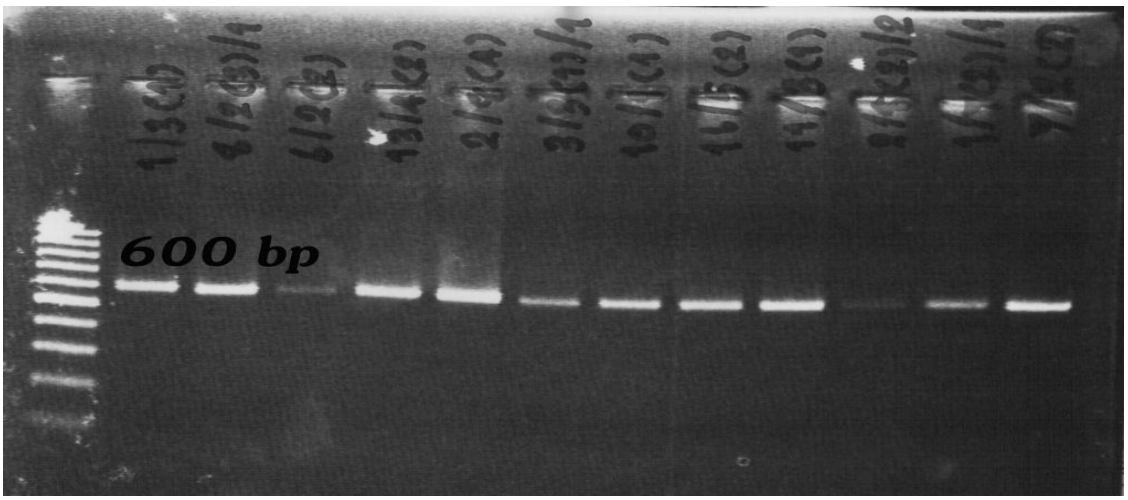
ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินที่เก็บมาได้บนชิ้นส่วนมันสำปะหลัง ที่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 58 ไอไซเลท ซึ่งได้ราที่มีคุณลักษณะต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 1



**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.

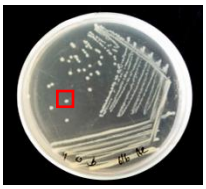
Sarawat, P.,S. Sakuanrungsirikul, A. Limsila, and W. Watananonta.2005. Cassava Breeding and Biotechnology Research at the Department of Agriculture, Thailand: The Present Status and Future Needs.Proceedings : Starch Update 2005:The 3 rd Conference on Starch Technology. 4-5 November 2005 Queen Sirikit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

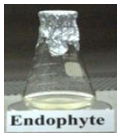
Watananonta, Watana (2005). Status of Cassava Production and Utilization in Thailand. Paper presented at workshop on “Collaborative Cassava Project Planning Meeting” at BIOTEC building, Thailand Science Park, Thailand.

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.

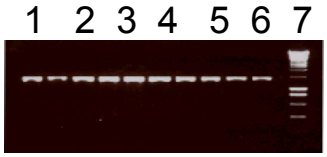


เลี้ยง




สกัด DNA

PCR (16S r RNA)




Direct Cycle Sequencing

Clone PCR Product กับ Plasmid Vector

ล้างตะกอน

เตรียมปฏิกิริยา

Transformation ไปยัง Host

เลี้ยง

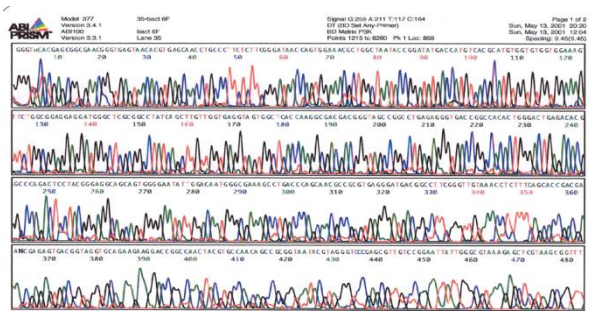
สกัด Plasmid

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 ($\alpha$)

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)**

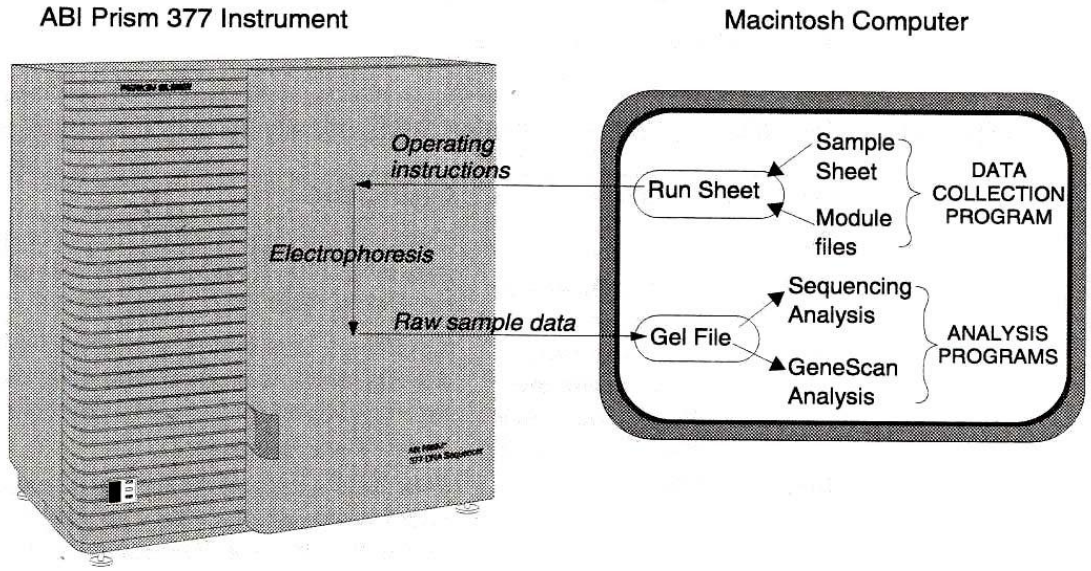
เครื่องอ่านลำดับสารพันธุกรรมที่ใช้มี 2 รุ่น คือ

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

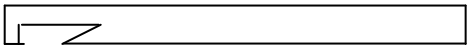
เครื่อง ABI Prism 377® DNA Sequencer ควบคุมการทำงานและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ Macintosh ซึ่งประกอบด้วยโปรแกรม 3 โปรแกรมคือ

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

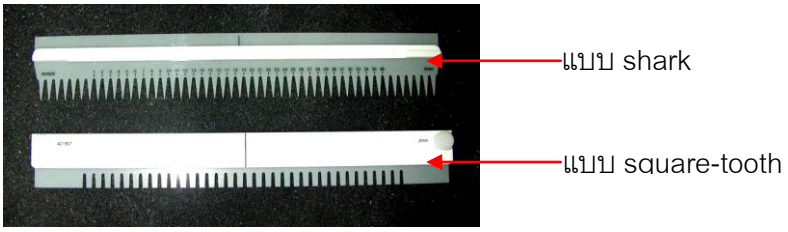
**อุปกรณ์ที่ใช้กับเครื่อง ABI Prism 377**

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<br>- 1200 scans/hr | - 4.5% 29:1 polyacrylamide<br>- 5.0% Long Ranger (concentrate or Single™ gel forms)<br>- 4.8% PAGE-PLUS | 650-800 |
| - 36-cm WTR plates<br>- 2400 scans/hr | - 4.5% 29:1 polyacrylamide | 550-700 |
| - 48-cm WTR plates<br>- 1200 scans/hr | - 4.25% 29:1 polyacrylamide<br>- 4.75% Long Ranger (concentrate or Single™ gel forms)<br>- 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>**

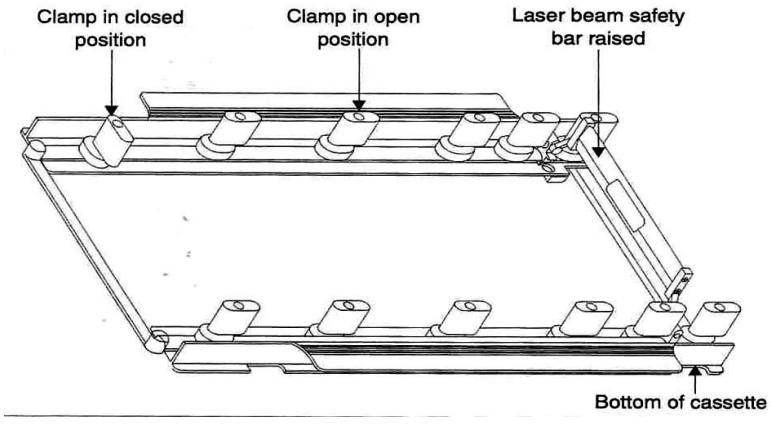
- ❖ การล้าง glass plates ต้องล้าง aclonox ออกให้หมด ไม่เช่นนั้นเมื่อ run samples จะได้ background ของ gel ที่ไม่ใช่สีดำ
- ❖ การทำความสะอาด glass plates
  - ควรใส่ถุงมือทุกขั้นตอนของการทำความสะอาด เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน fluorescent
  - หลังจาก Run ตัวอย่าง ได้ประมาณ 5-6 ครั้ง ให้ล้างด้วยน้ำอุ่นทั้งชุด

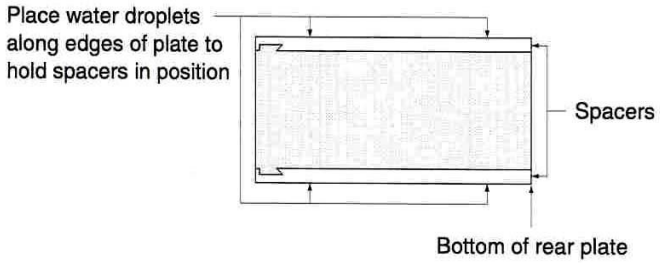
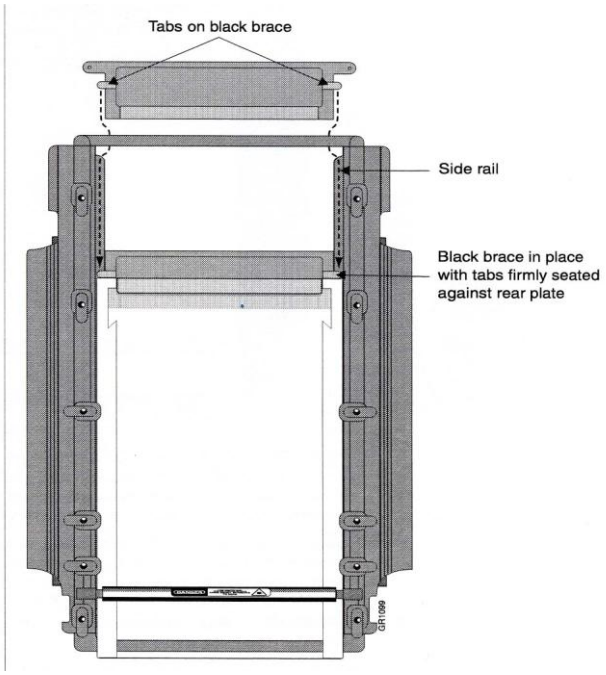
**การประกอบ Glass Plate เข้ากับ Gel Cassette**

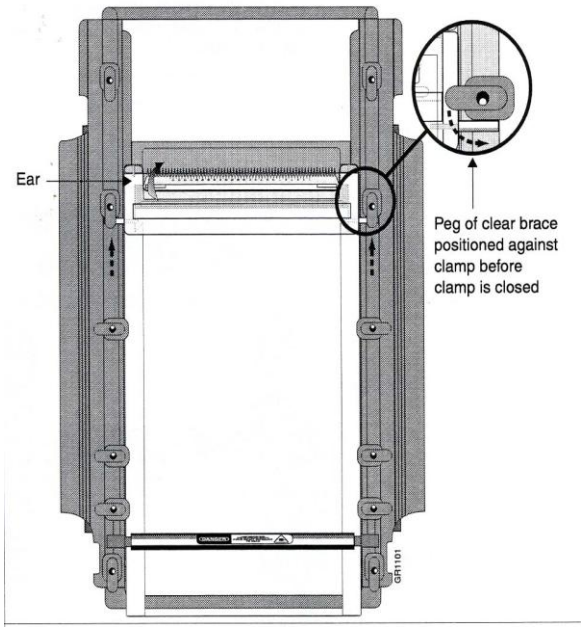
<u>ข้อควรปฏิบัติก่อนการประกอบ glass plate เข้ากับ gel cassette</u>

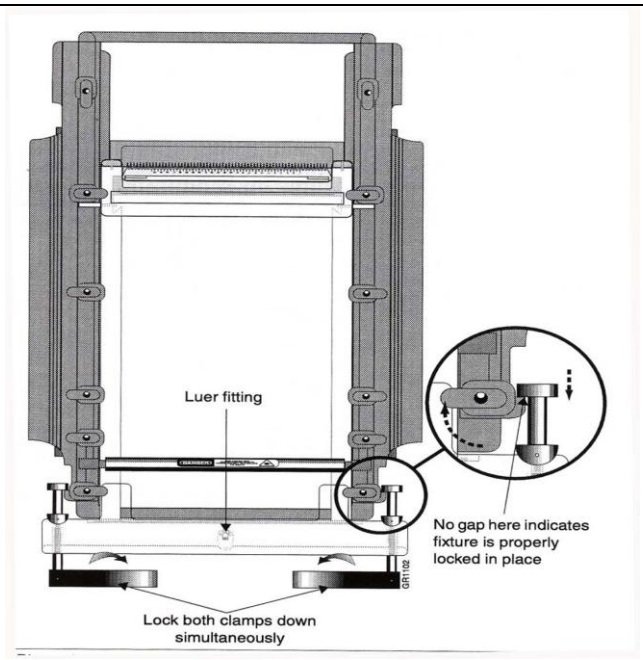
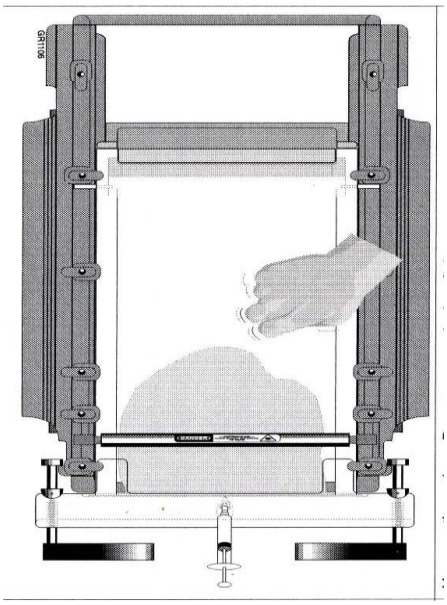
- บริเวณที่ประกอบ glass plate และ การ load gel ต้องสะอาด
- glass plate, spacers และ comb ต้องสะอาดและแห้ง
- ความยาวของ spacer ต้องมีความยาวเท่ากับความยาวของ glass plate ถ้า spacer ยาวกว่า glass plate จะทำให้ gel ที่ load เข้าไปรั่วไหลออกมา ถ้าจำเป็นอาจจะตัด spacer ให้มีความยาวเท่ากับกระจก

***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<br>  <br> |
| 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<br>  <br> |

| 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®<br>กรณีที่เป็น comb แบบ shark-tooth ให้ใส่ทางด้านเรียบ<br>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

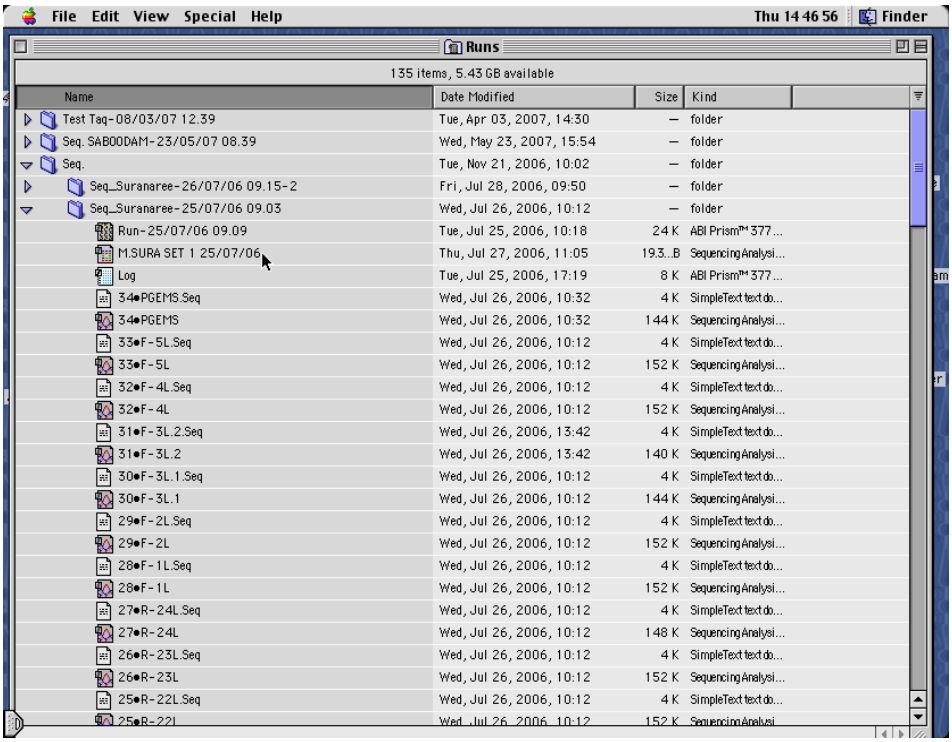
2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้พร้อมที่จะนำไป load เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

**การวิเคราะห์ผลลำดับเบสจากเครื่อง ABI PRISM 377® DNA Sequencer**

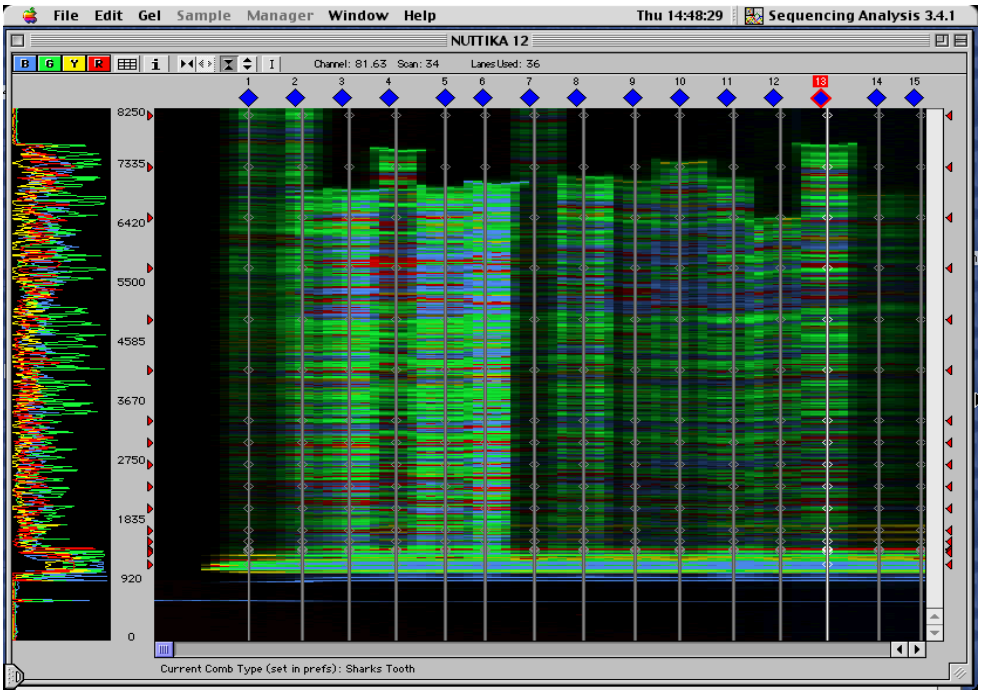
หลังจากเครื่อง Run ตัวอย่างเสร็จแล้ว ต้องทำการวิเคราะห์ผลจากเครื่อง โดยใช้ Software โปรแกรม Sequencing Analysis ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

1. ดับเบิ้ลคลิกไอคอน Runs alias บน Desktop

2. เลือก Folder ที่สั่ง Run ไปแล้วและต้องการวิเคราะห์ผล ดังภาพ

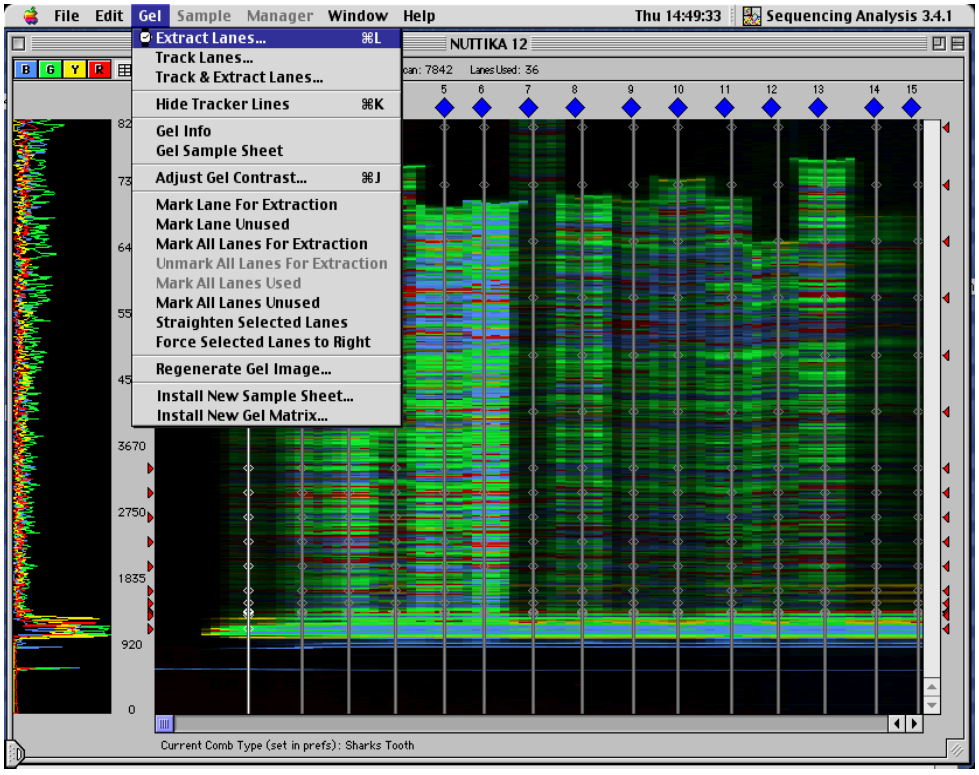


3. ดับเบิ้ลคลิก Gel file จะเห็นหน้าจอขึ้น ดังภาพ

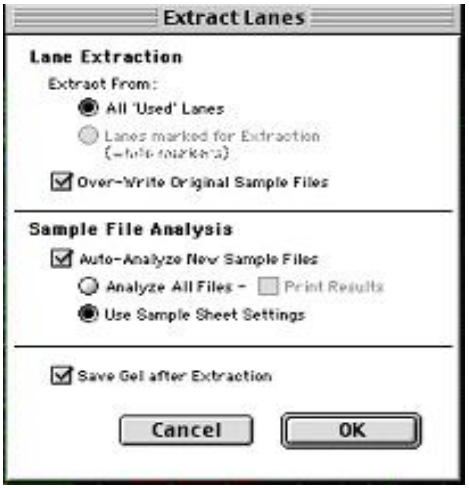



4. จัด lane ตัวอย่างที่ load ให้ตรงกับภาพ gel ที่ได้

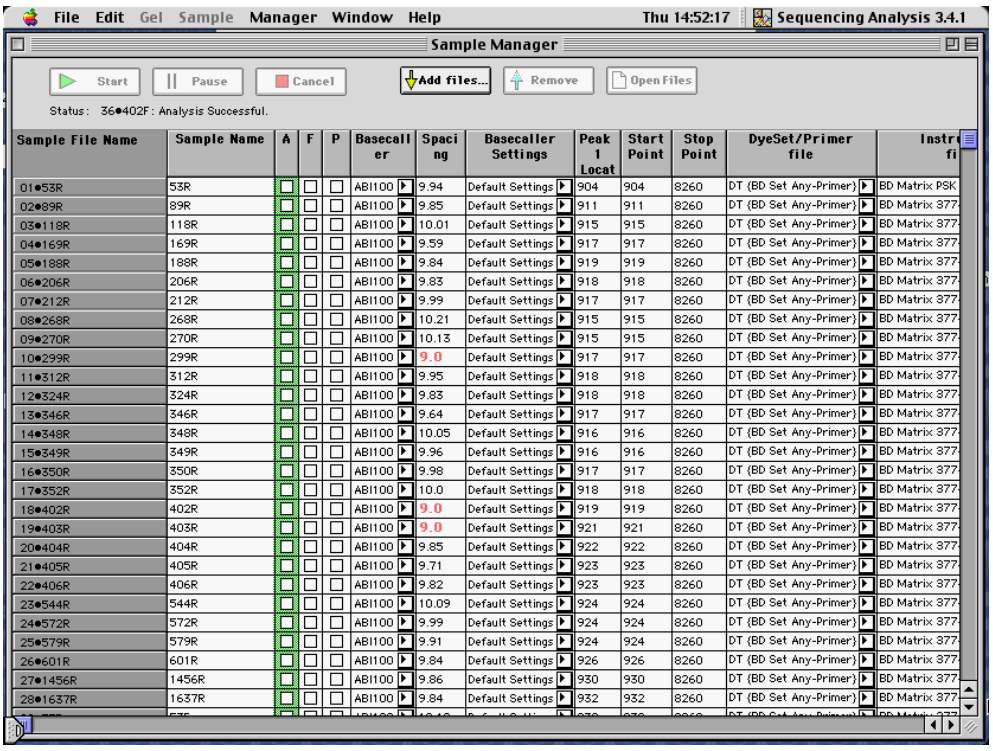
5. หลังจากจัด lane เสร็จแล้วให้ สั่ง extract lanes โดยคลิกเม้าส์ไปที่ Gel menu⟶ Extract Lanes



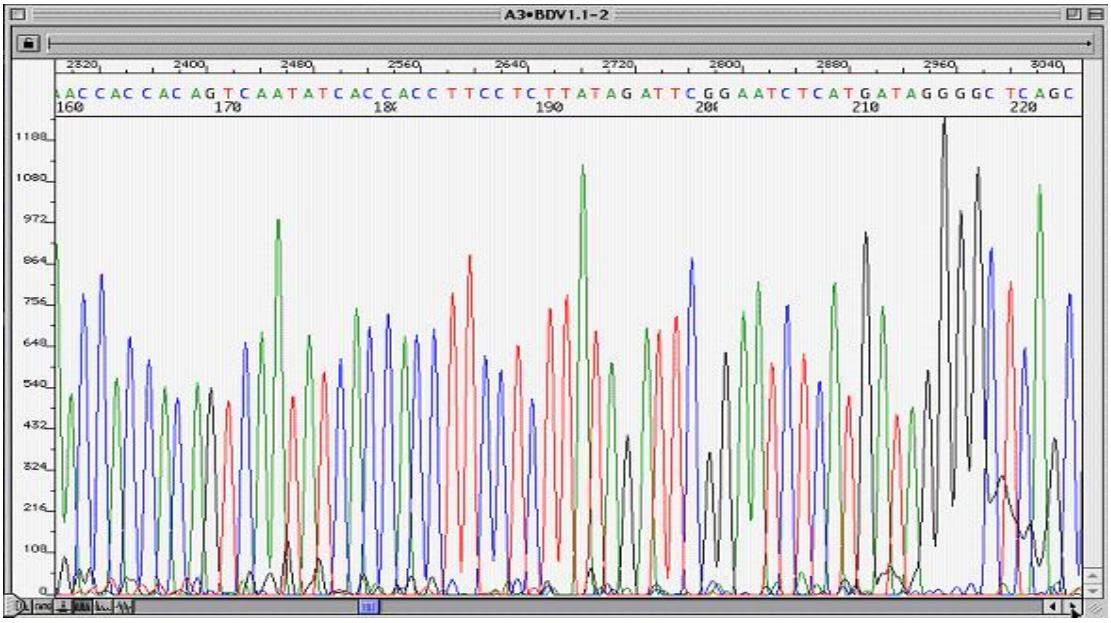
6. คลิก OK




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

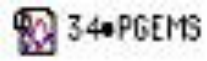
peak ที่ซ้อนกัน 3 รหัสด้วยลำดับเบส A, C หรือ G ให้ใช้รหัส V

ดังภาพ

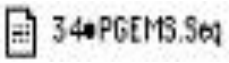
**IUB CODES**

| | |
|---|---|
| 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 | |

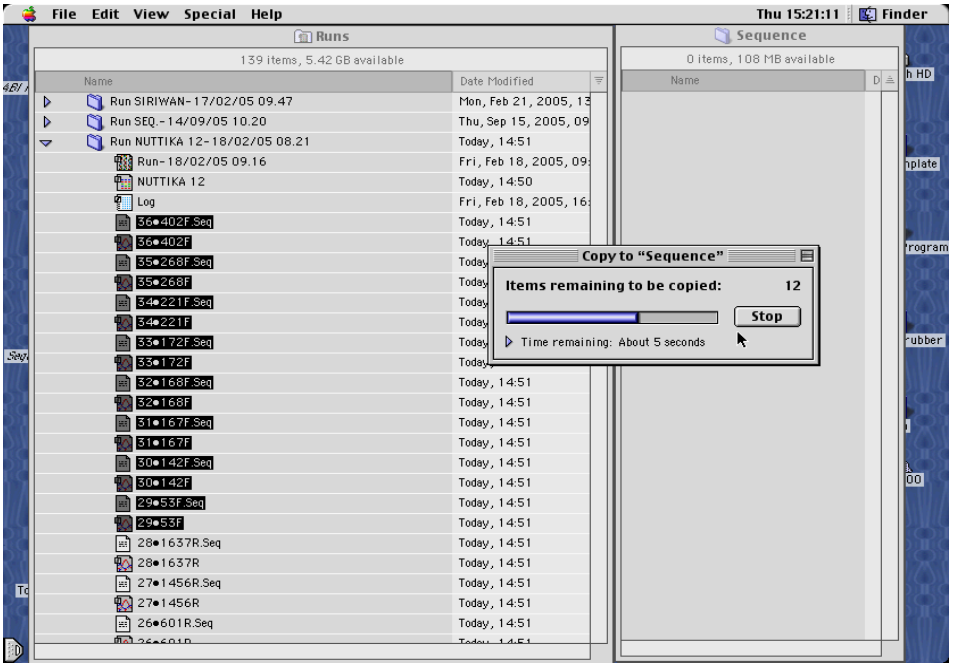
10. ถ้าแก้ไขค่า N เสร็จเรียบร้อยแล้วให้ Save file แทนที่ file เดิม
11. นำ file ที่แก้ไขแล้ว ออกจากเครื่อง สามารถ copy ใส่ลง Handy drive ได้เลย ซึ่งการเปิด file ที่แก้ไขแล้วให้คลิกเม้าส์ไปที่ไอคอน Runs alias
12. เลือก file ที่ต้องการ copy ซึ่ง 1 ตัวอย่างจะมี 2 file คือ
    - ไฟล์ Electropherogram มีลักษณะเป็น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

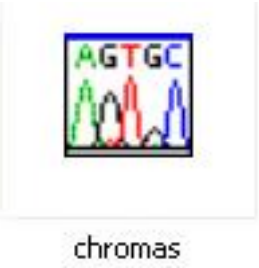
ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์มาจากเครื่อง Automate sequencer บางครั้งตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์จำเป็นต้องมีการแก้ไขข้อมูลก่อนที่จะนำไปจำแนกหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์หรือยีนของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการค้นหาซึ่ง Software ที่ใช้ในการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถเลือกใช้ได้หลายโปรแกรมขึ้นอยู่กับความสะดวกของผู้ใช้งาน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

1. File Electropherogram มีลักษณะไอคอน ดังภาพ

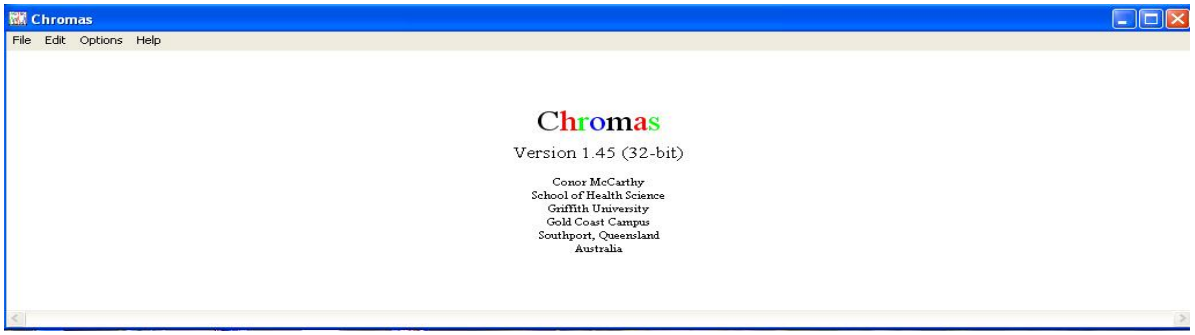
File Electropherogram มีลักษณะเป็น peak ของลำดับเบส 4 เบส (A, G, C, T) ซึ่งต้องใช้ software จากเครื่อง automate วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Sequencing Analysis ในการแก้ไขลำดับเบสที่ได้ แต่การวิเคราะห์ผลจากเครื่อง automate บางครั้งหน่วยงานที่ไม่มีเครื่อง automate เพื่อวิเคราะห์จะประสบปัญหาตรงจุดนี้ เนื่องจากโปรแกรมดังกล่าวมีลิขสิทธิ์มากับเครื่องมือและมีราคาแพงเราสามาร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

1.1 ใส่โปรแกรม Chromas ในเครื่อง computer ที่ต้องการใช้งาน

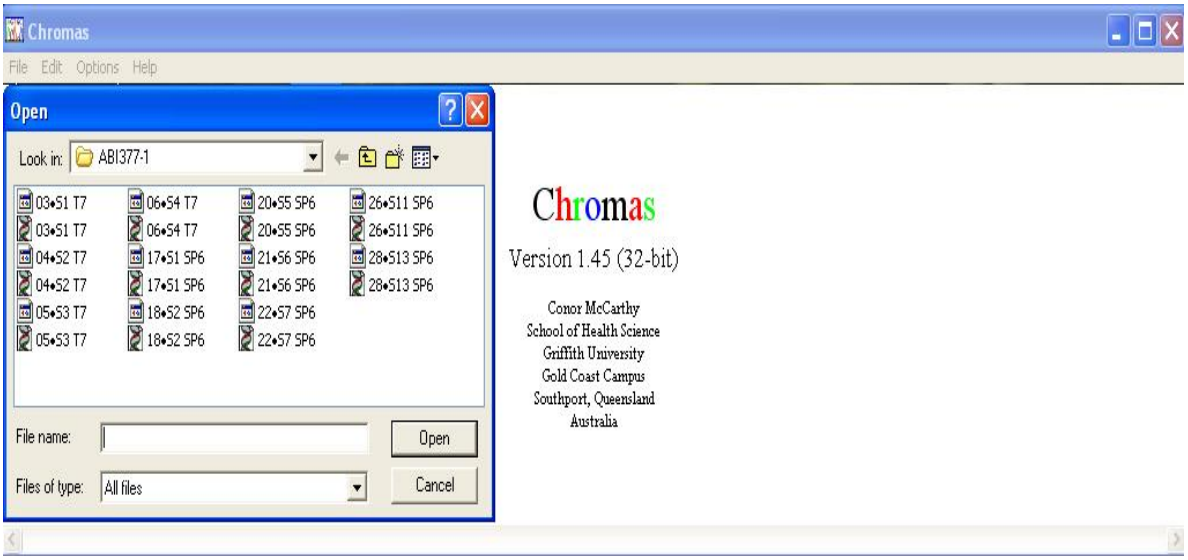
1.2 เปิดโปรแกรม Chromas หรือดับเบิ้ลคลิกไอคอน ดังภาพ



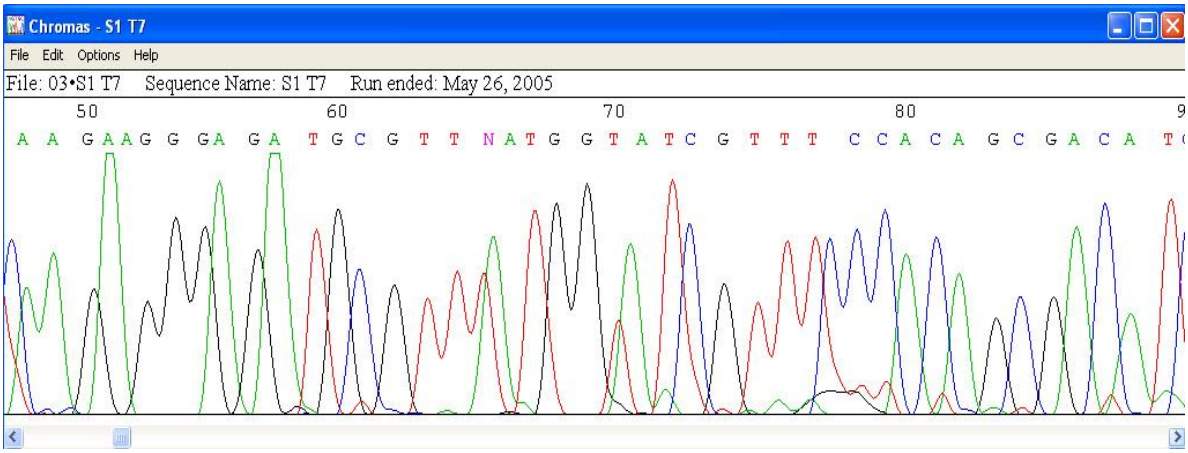

1.3 เมื่อเปิดไฟล์ Chromas แล้วจะเห็นหน้าต่าง ดังภาพ



1.4 เปิดไฟล์ electropherogram ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง โดยคลิกเม้าส์ไปที่ File menu ⟶ open ⟶เลือกไฟล์ที่ต้องการแก้ไข

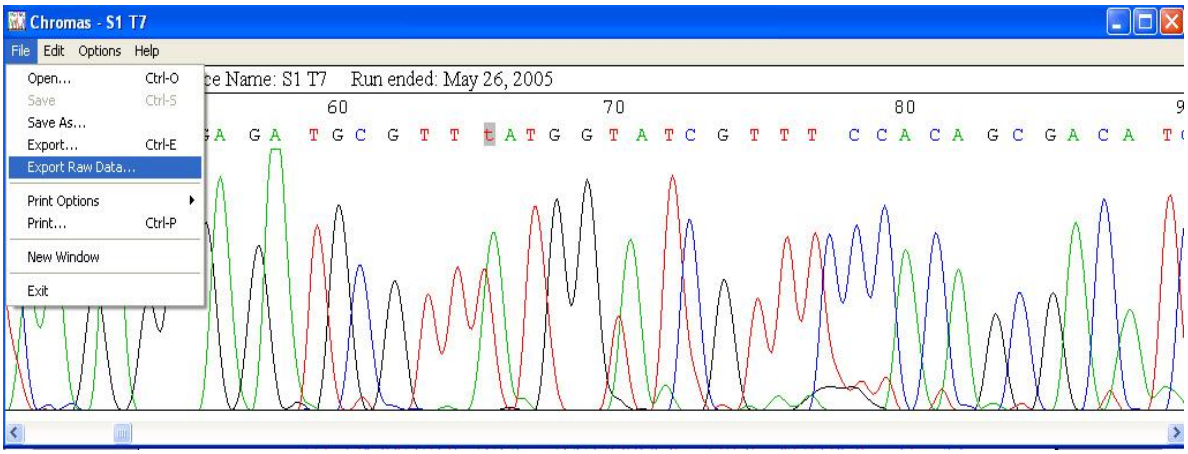



1.5 เปิดไฟล์ electropherogram จะเห็นหน้าต่างขึ้น ดังภาพ

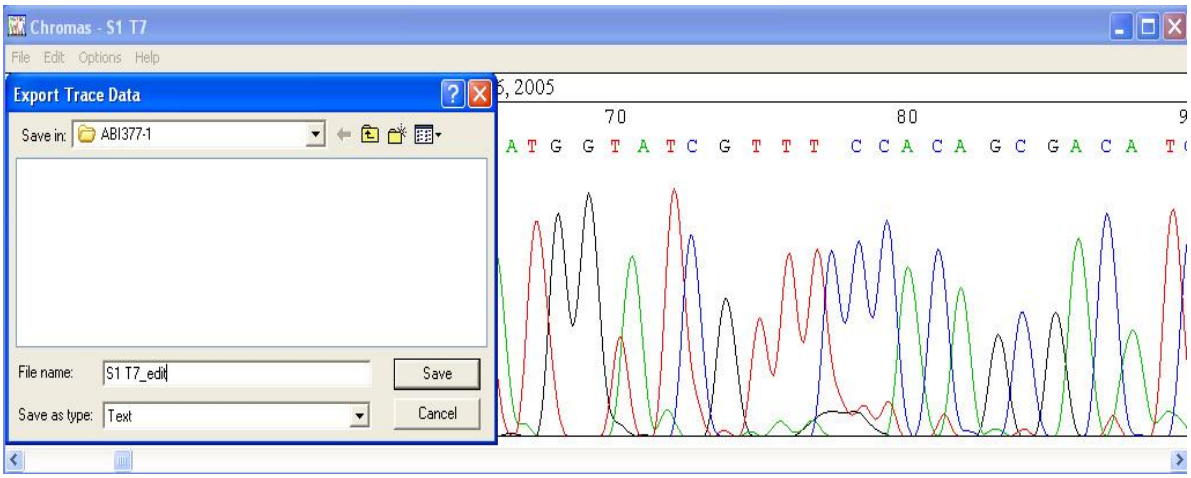



1.6 แก้ไข peak ที่ติด N และเห็นว่า peak ที่ติด N ควรเป็นเบสใด

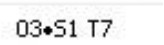
1.7 เมื่อแก้ไขค่า N เสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้ save file electropherogram ที่แก้ไขแล้ว เป็นชื่อไฟล์ใหม่ หรือ save แทนที่ไฟล์เดิม และถ้าต้องการ save เป็นแบบไฟล์ sequence ให้คลิกเม้าส์ไปที่ File menu export raw data ดังภาพ



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.

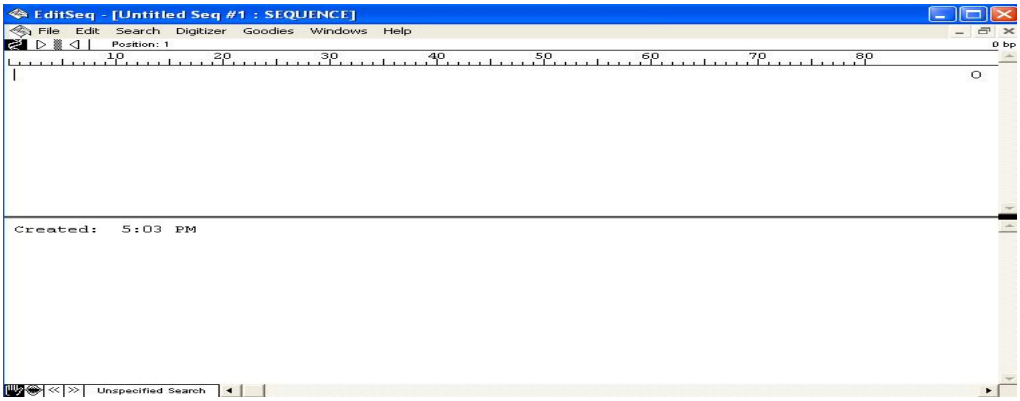
Seqman

แต่การแก้ไข text file เราจะใช้โปรแกรมที่ 1 Editseq

โดยมีวิธีการจัดการ file หรือแก้ไขข้อมูล sequence ดังนี้

1. เปิดไฟล์ Editseq โดยดับเบิ้ลคลิกไอคอน

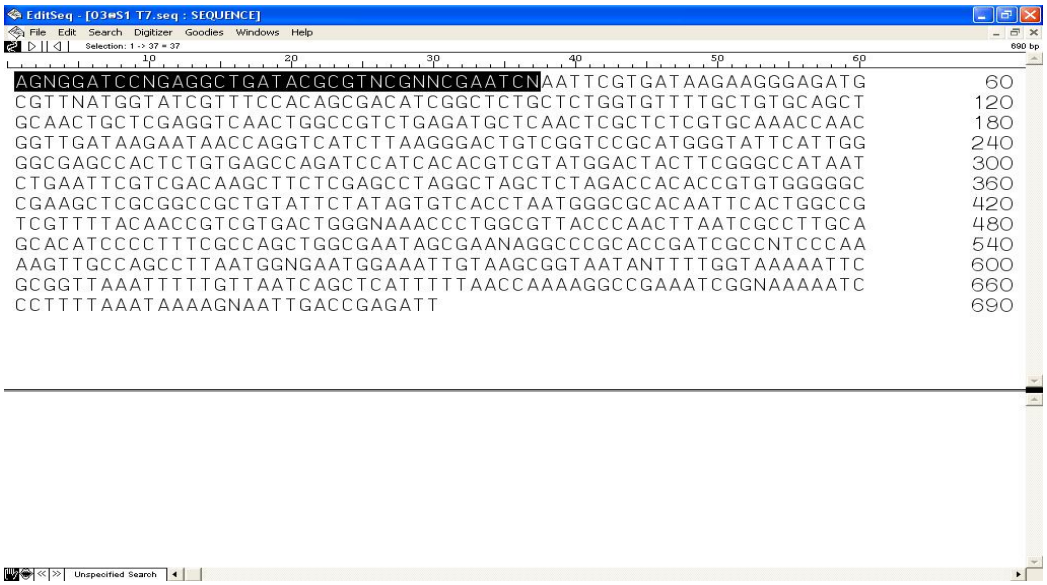
หน้าจอขึ้นดังภาพ



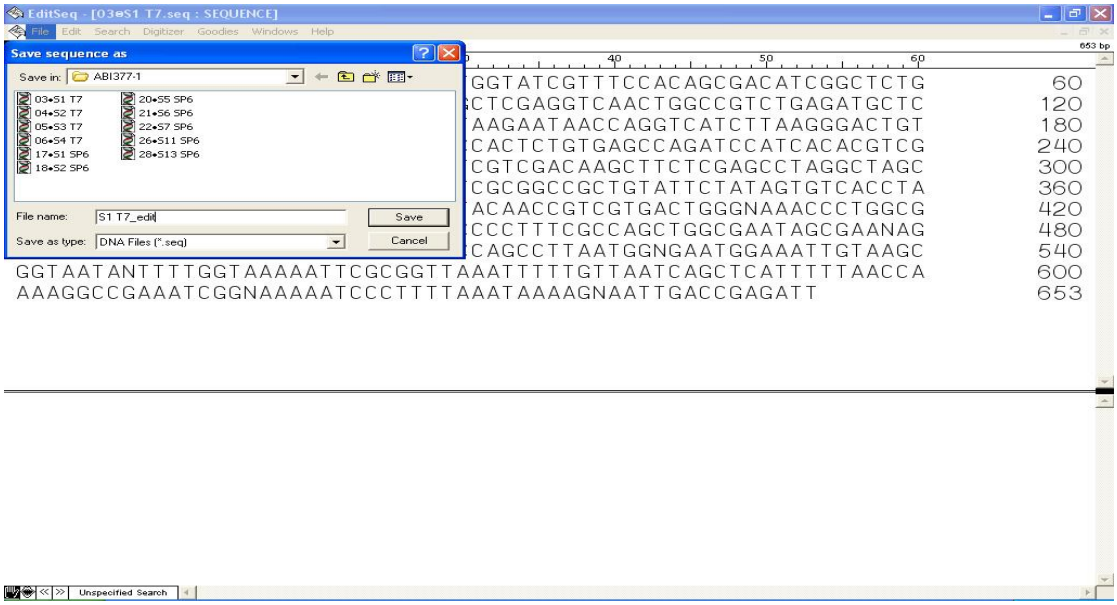

2. เปิดไฟล์ข้อมูล sequence ที่ต้องการแก้ไข โดยคลิกเม้าส์ไปที่ File menu ⟶ Open ดังภาพ

3. เลือกไฟล์ข้อมูลที่ต้องการแก้ไขและคลิก OK

4. เลือก sequence ที่ติดค่า N ในช่วงแรกออก แล้วคลิก Delete ดังภาพ



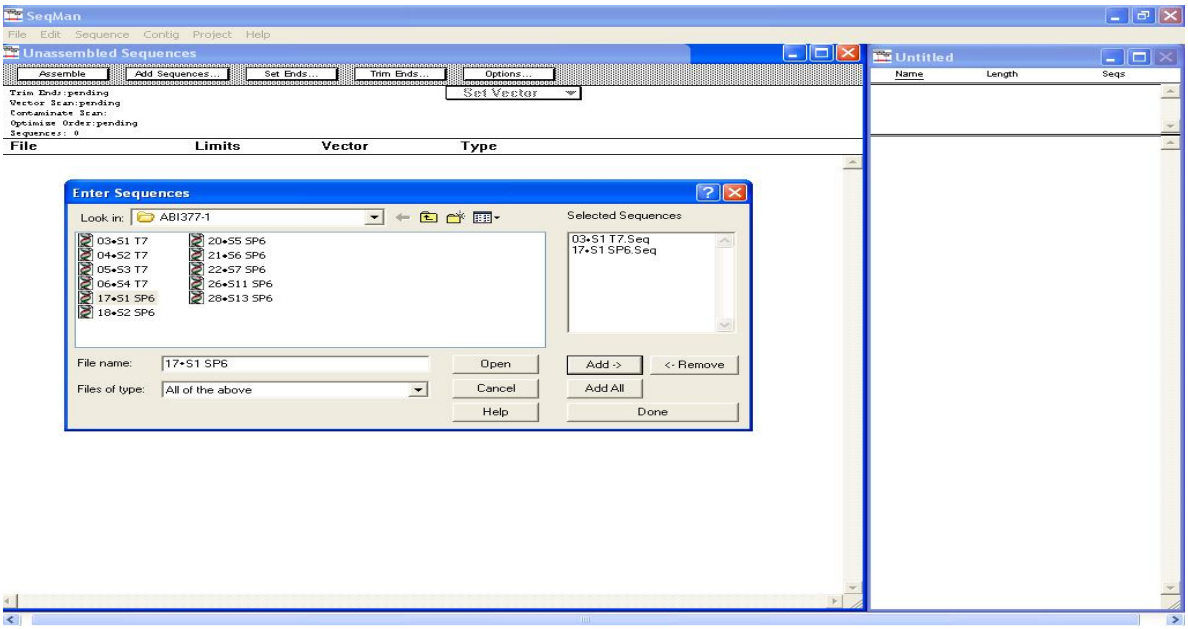

5. Save และตั้งชื่อไฟล์ใหม่หรือแทนที่ไฟล์เดิม โดยคลิกเม้าส์ไปที่ File menu ⟶save as ⟶ ตั้งชื่อไฟล์ ⟶save ดังภาพ



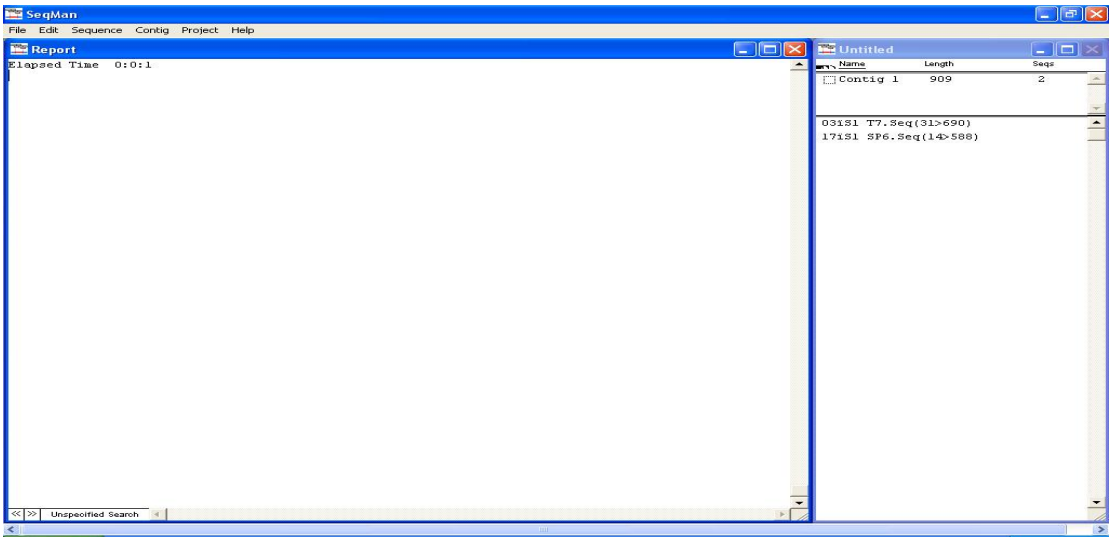
กรณีถ้ามีข้อมูล sequence ของตัวอย่างทั้งสาย forward และ reverse และต้องการต่อให้เป็นสายเดียวกัน หรือต้องการเชื่อมต่อ sequence ที่ขาดเป็นท่อน ๆ (contigs) ซึ่งได้จากการหาลำดับเบส และแต่ท่อนมีส่วน sequence เหลื่อมซ้อน (overlapped) กันอยู่ เราสามารถต่อ DNA sequence หลายๆ ท่อนรวมเป็น DNA สายยาวสายเดียวได้โดยใช้โปรแกรม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

1. ดับเบิ้ลคลิกไอคอน SeqMan เพื่อเปิดโปรแกรม

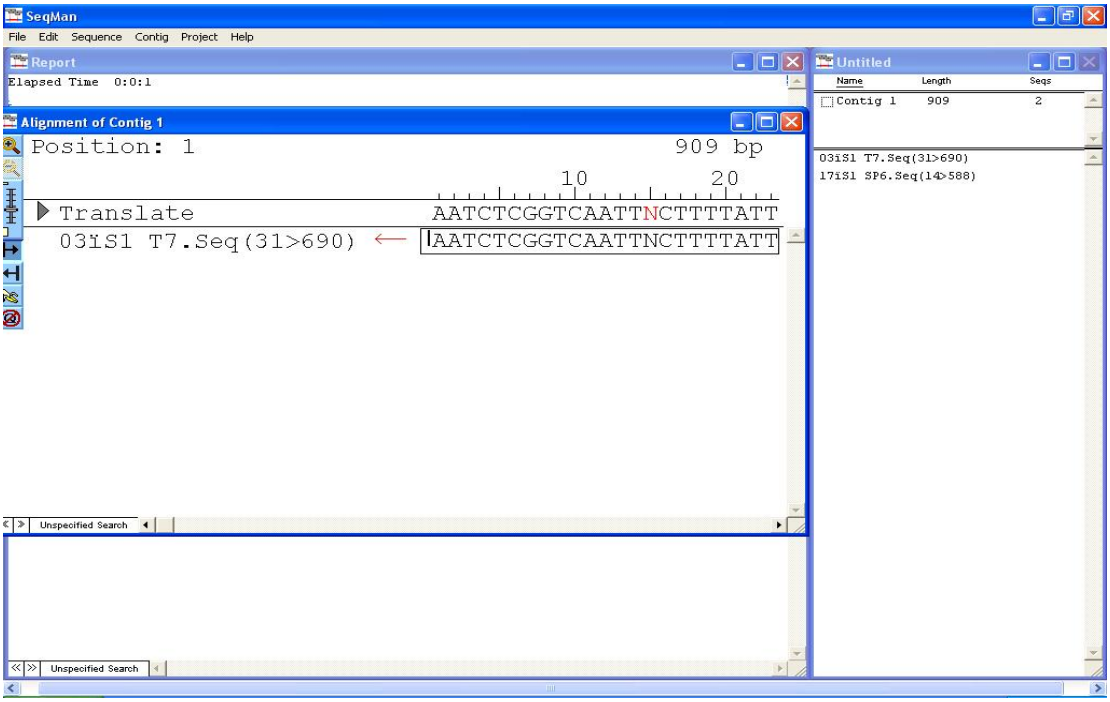
2. คลิกเม้าส์ไปที่ File munu → New → Add sequence → เลือก file ที่ต้องการให้ต่อเป็นสายเดียวกัน → Add → Done ดังภาพ



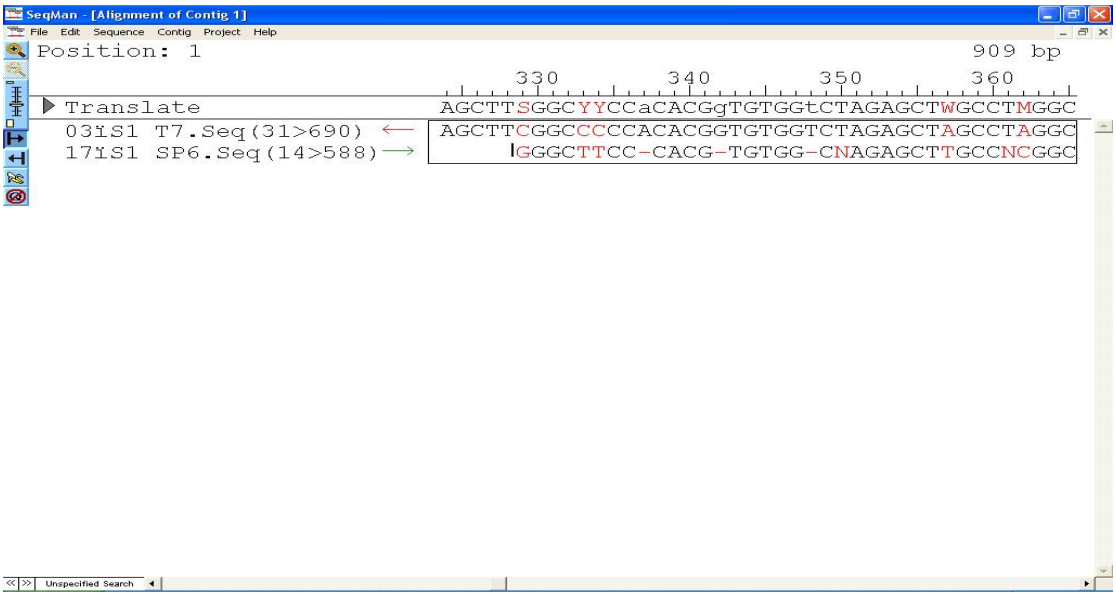

3. คลิก Assemble จะเห็นหน้าต่างขึ้นดังภาพ



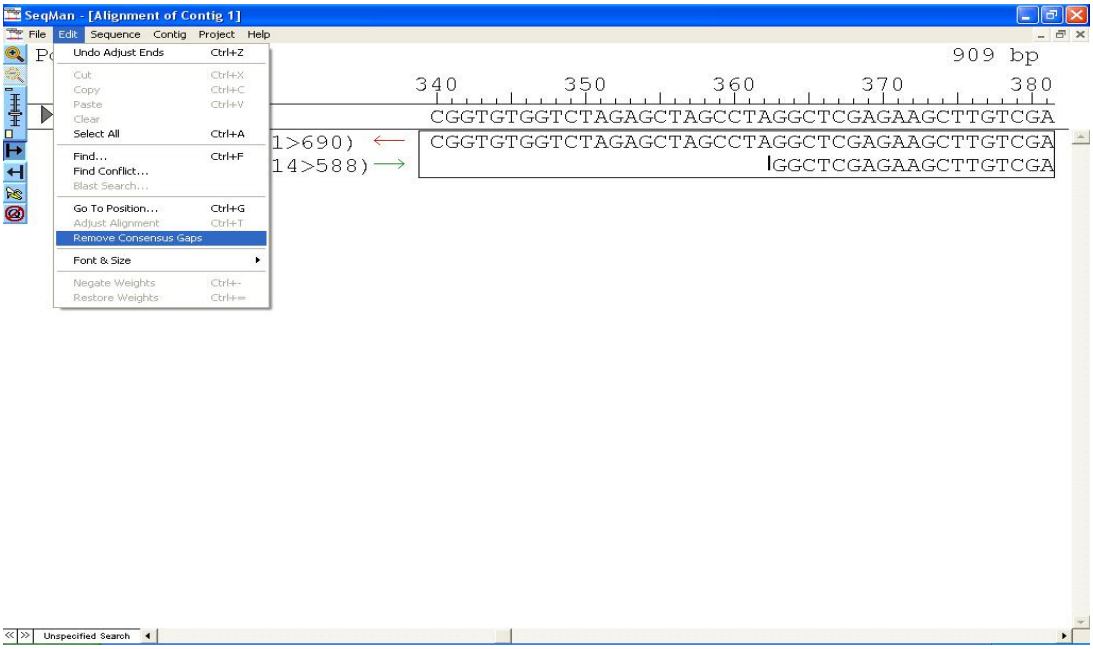
4. ดับเบิ้ลคลิก Contig 1 จะเห็นไฟล์ Alignment sequenceทั้งสองสายมารวมกัน ดังภาพ



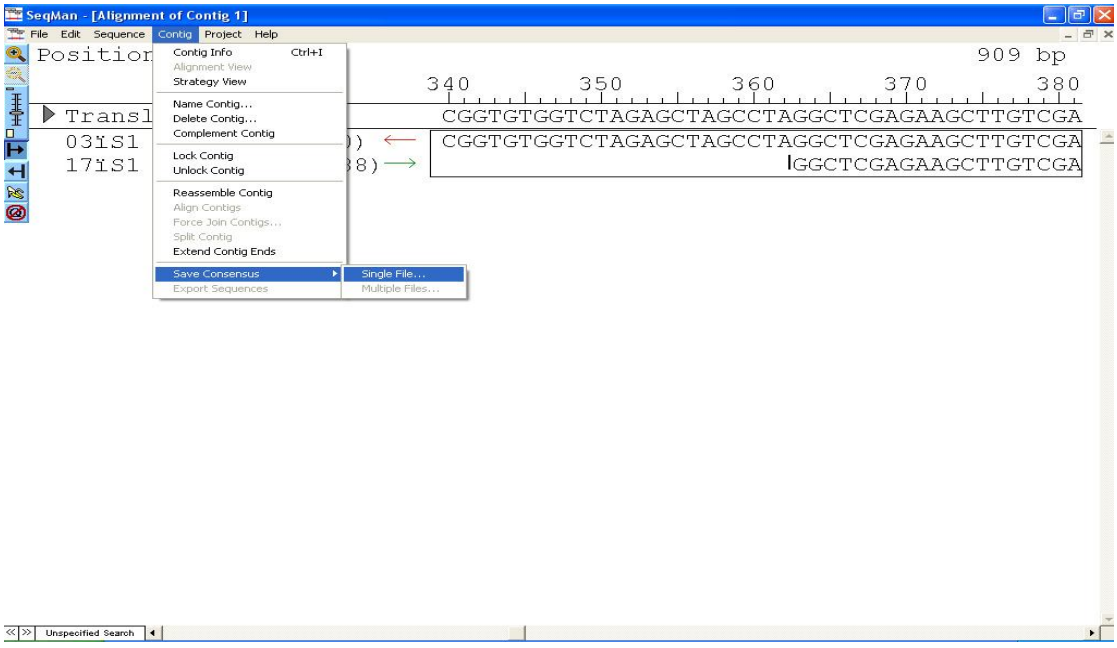

5. เลื่อนลูกศรไปทางขวาเรื่อยๆจะเห็น sequence เหลื่อมซ้อนกันอยู่ ดังภาพ



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



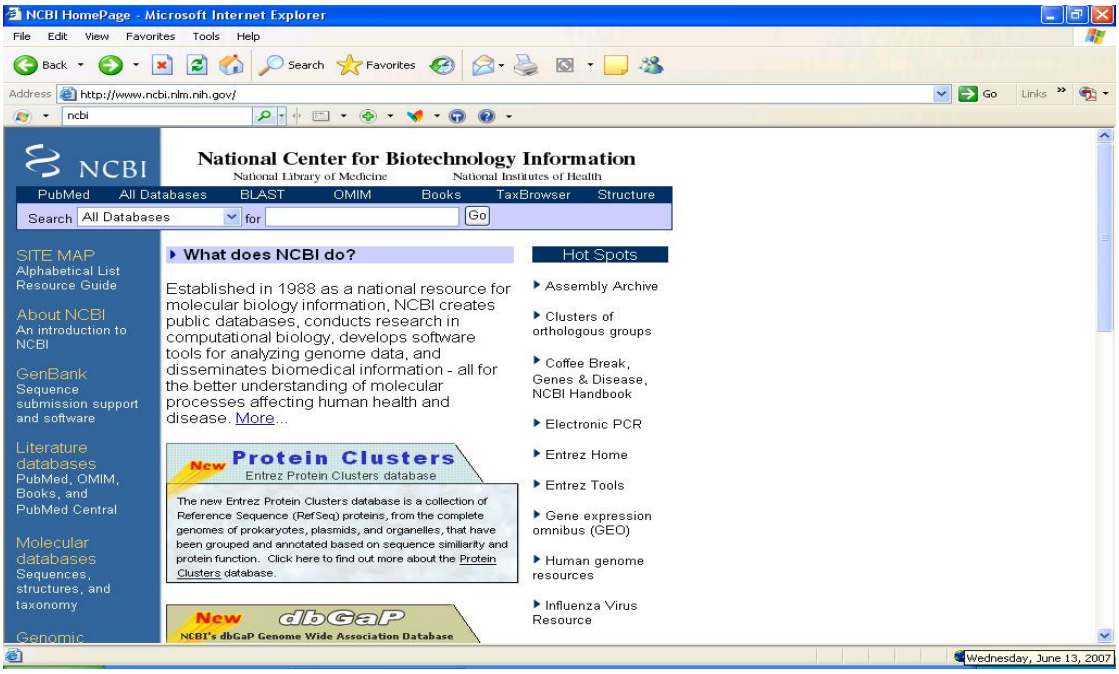

7. หลังจากแก้ไข sequence เรียบร้อยแล้ว ให้ save ไฟล์ และตั้งชื่อไฟล์ใหม่ โดยเข้าไปที่ Contig menu ⟶ save consensus ⟶single file ⟶ตั้งชื่อไฟล์ ⟶save



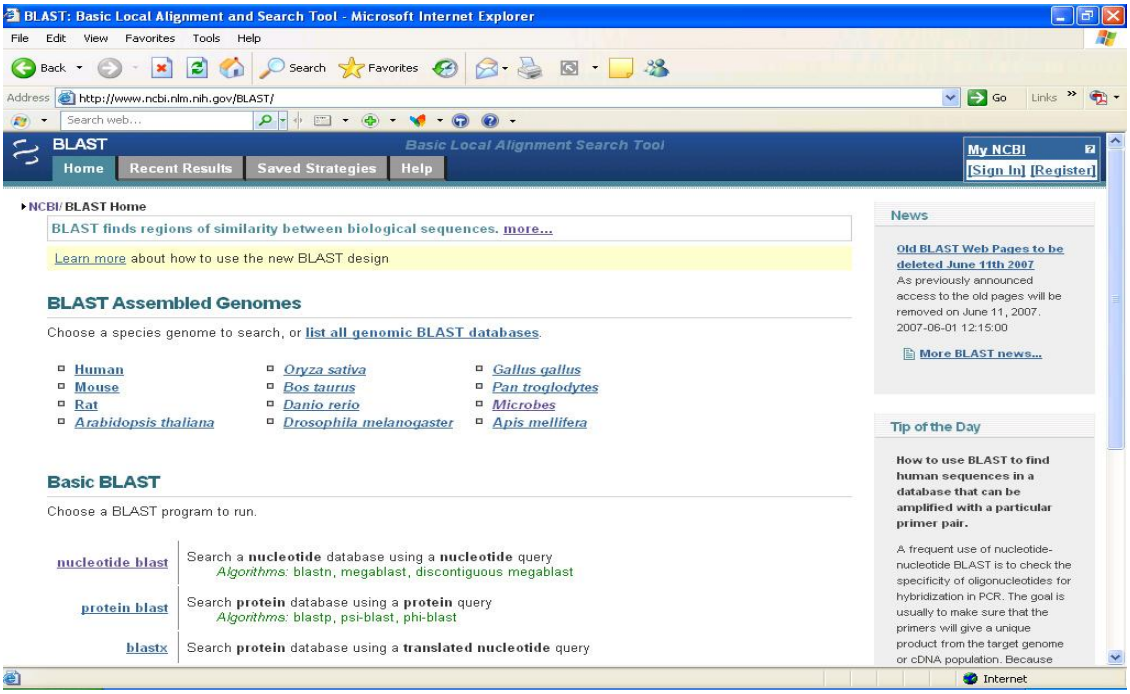
# บทปฏิบัติการที่ 8 : การค้นหาข้อมูลลำดับเบสใน GeneBank (NCBI, EMBL) ทาง internet

## I. การสืบค้นจากฐานข้อมูล GENBANK

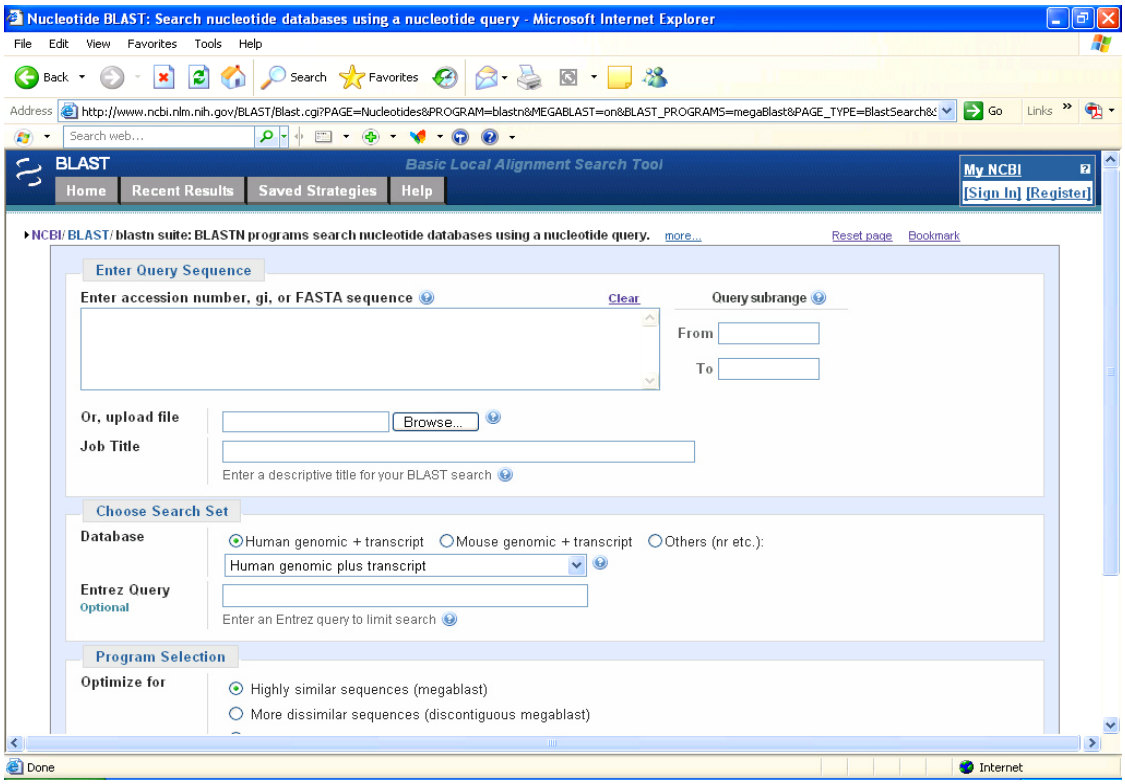
1. ให้เข้าไปที่เวปไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/



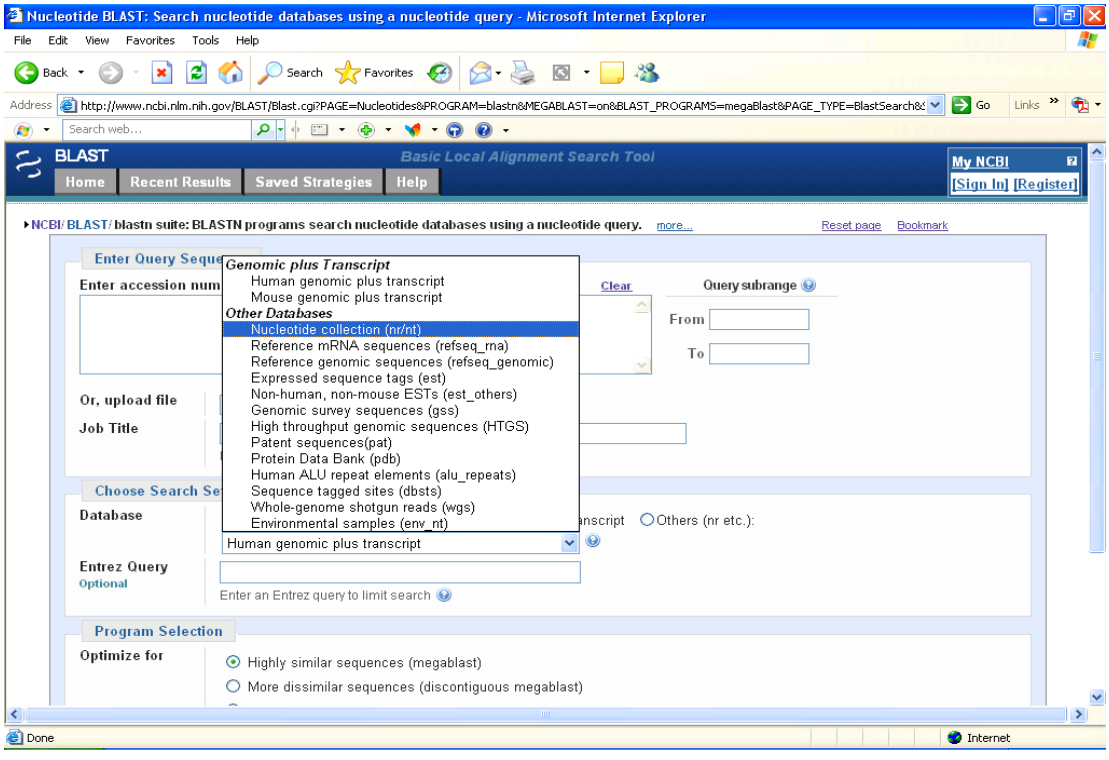

2. ต้องการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส ให้คลิกเม้าส์ไปที่ BLAST



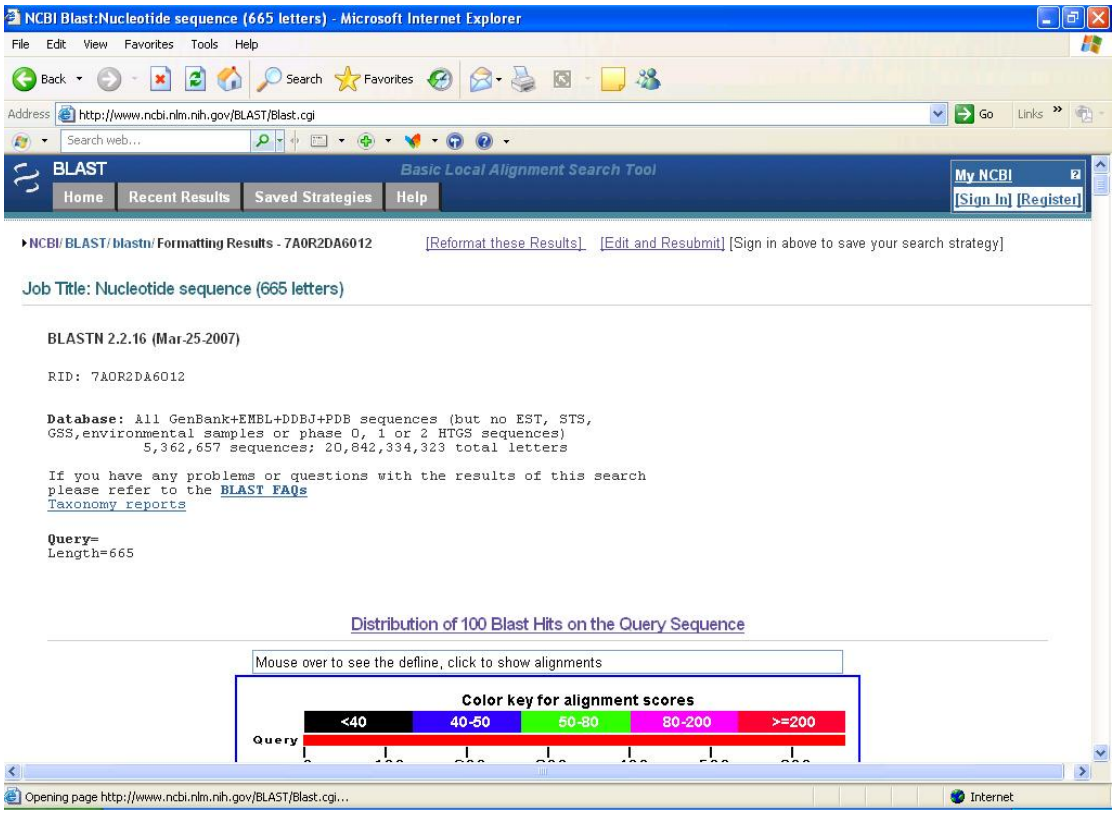
3. เลือก nucleotide blast จะเห็นหน้าจอขึ้นดังภาพ



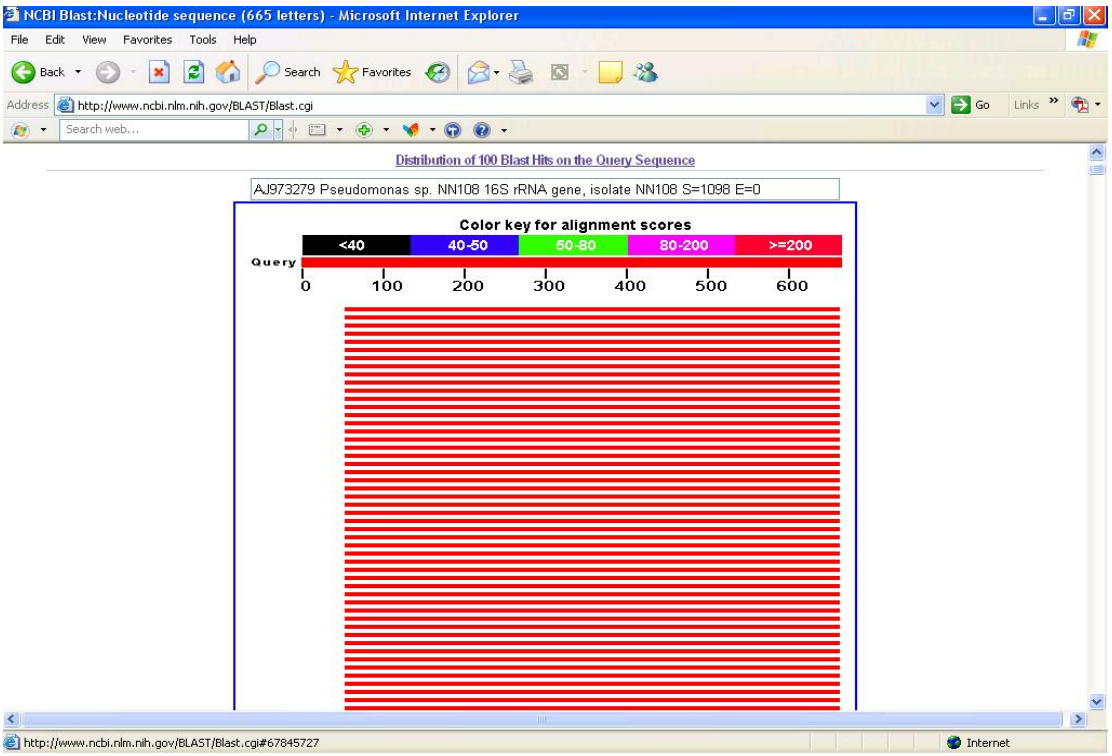

4. คลิก Browse และเลือก Sequence ที่ต้องการเปรียบเทียบ จากนั้นเลือกฐาน Database เป็น Nucleotide collection (nr/nt)



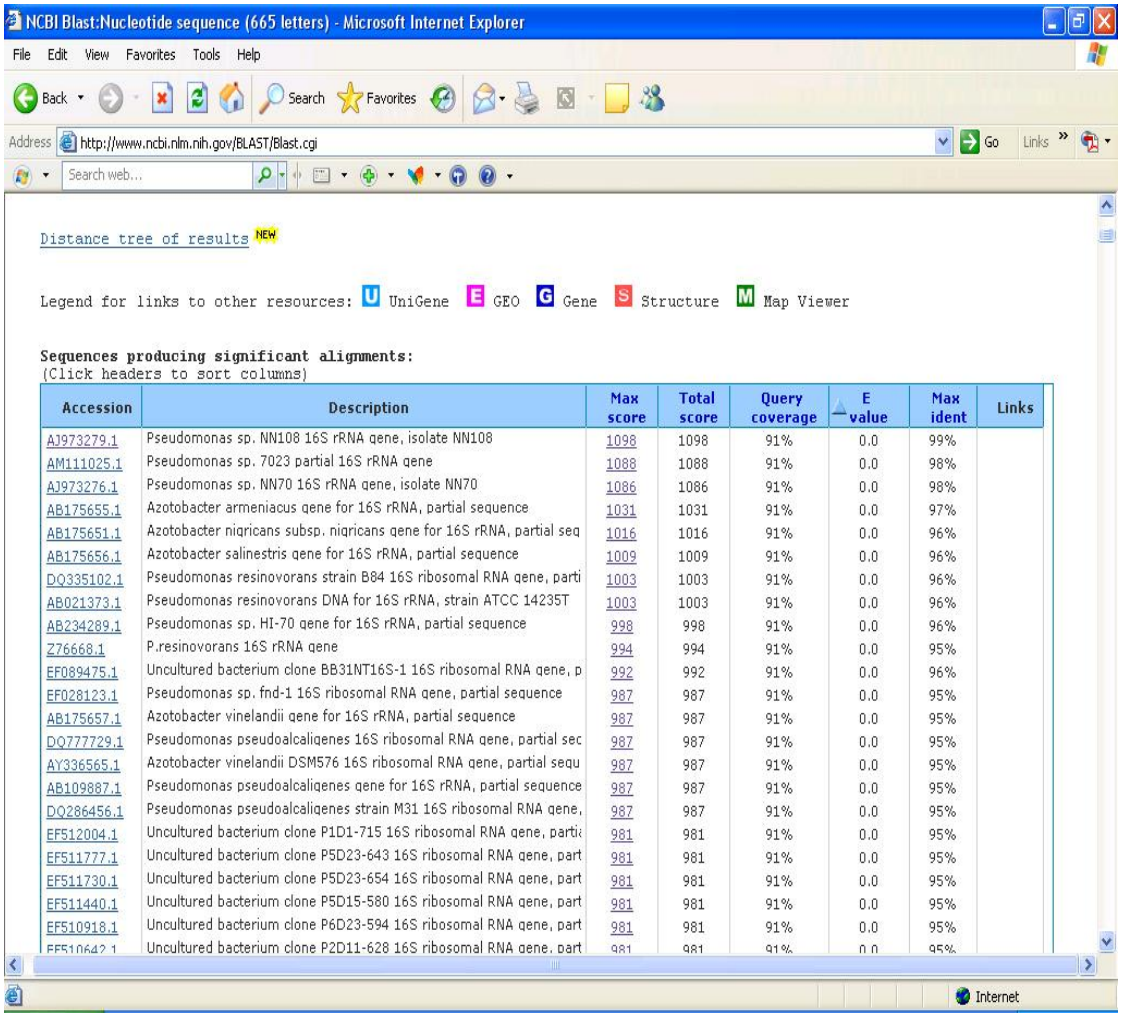
5. คลิก BLAST รอสักครู่ จะเห็นหน้าจอขึ้นดังภาพ




6. เลื่อน score bar ลงมาจะเห็นผลการเปรียบเทียบ sequence ของสีที่ได้ ดังภาพ

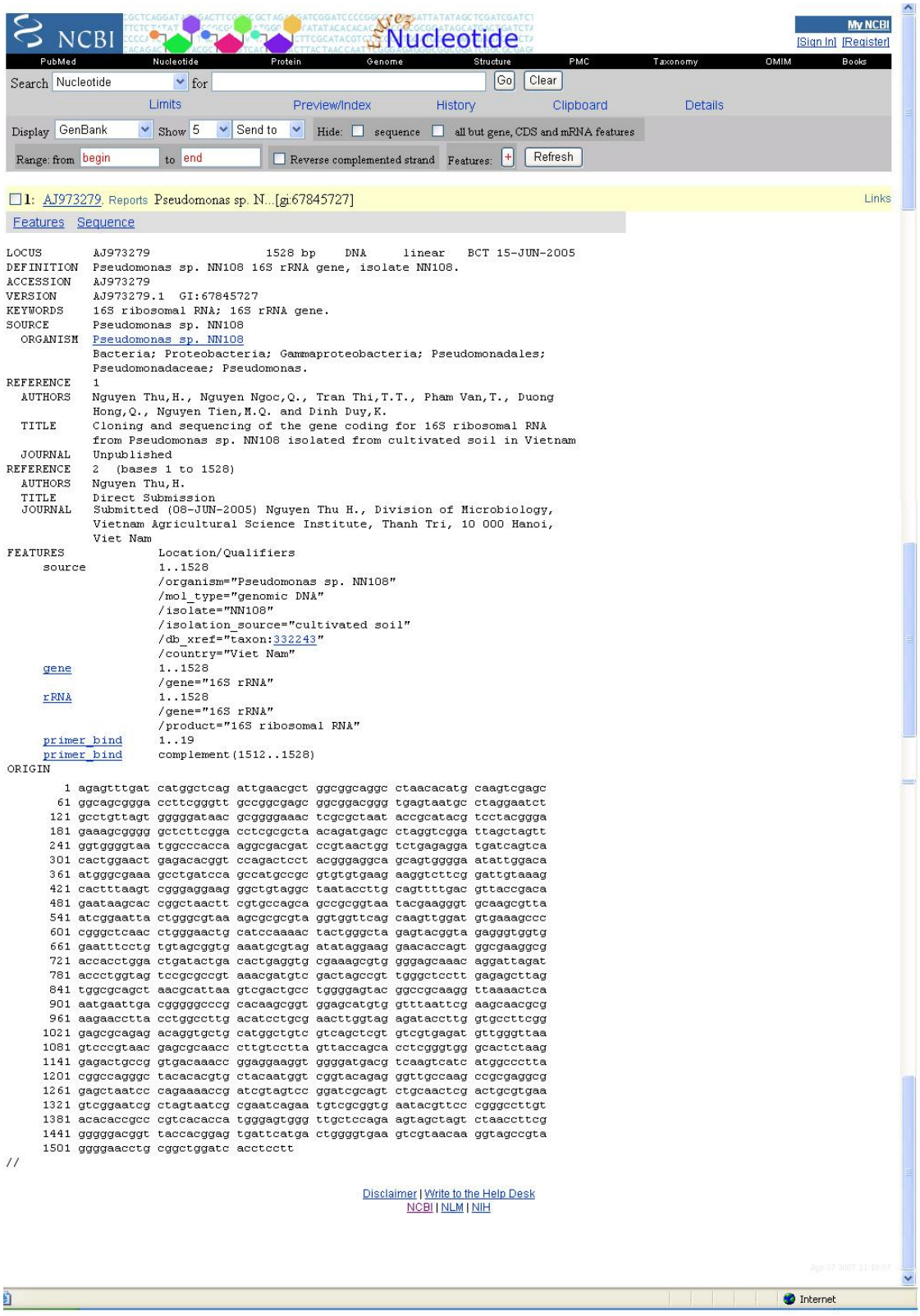


7. เลื่อน score bar ลงมาอีกจะเห็นผลของชนิดจุลินทรีย์ที่ได้เปรียบเทียบกับ GenBank ดังภาพ



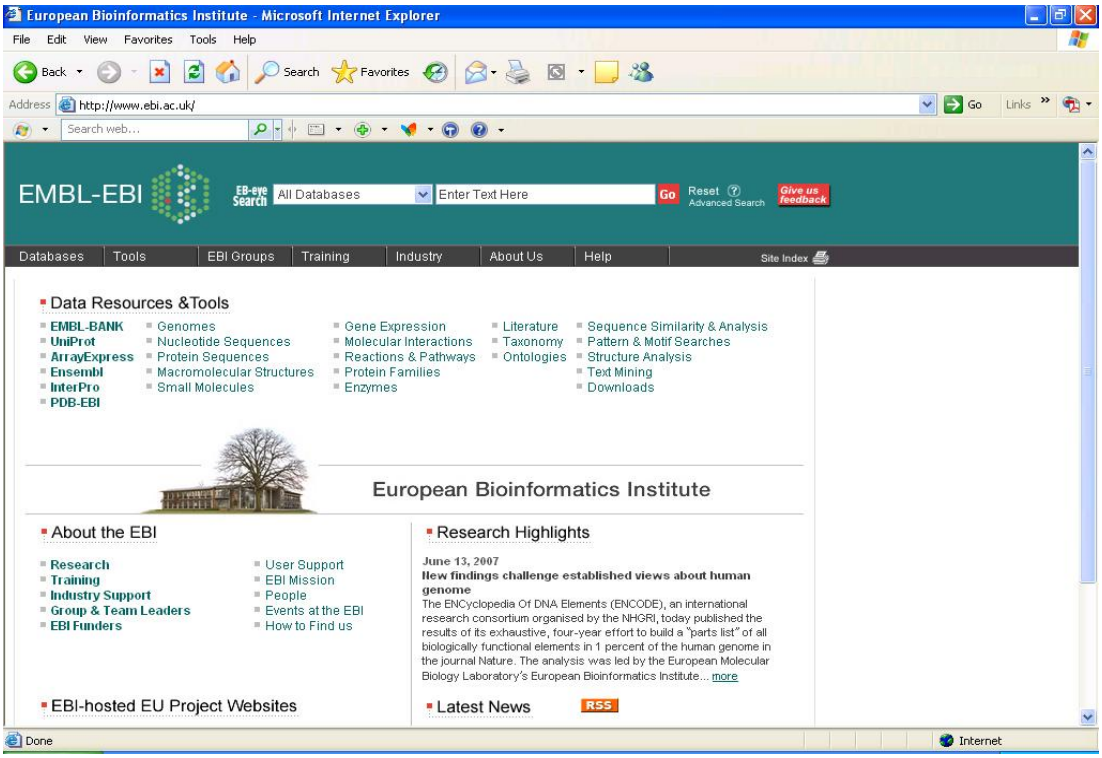

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident | Links |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AJ973279.1 | Pseudomonas sp. NN108 16S rRNA gene, isolate NN108 | 1098 | 1098 | 91% | 0.0 | 99% | |
| AM111025.1 | Pseudomonas sp. 7023 partial 16S rRNA gene | 1088 | 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

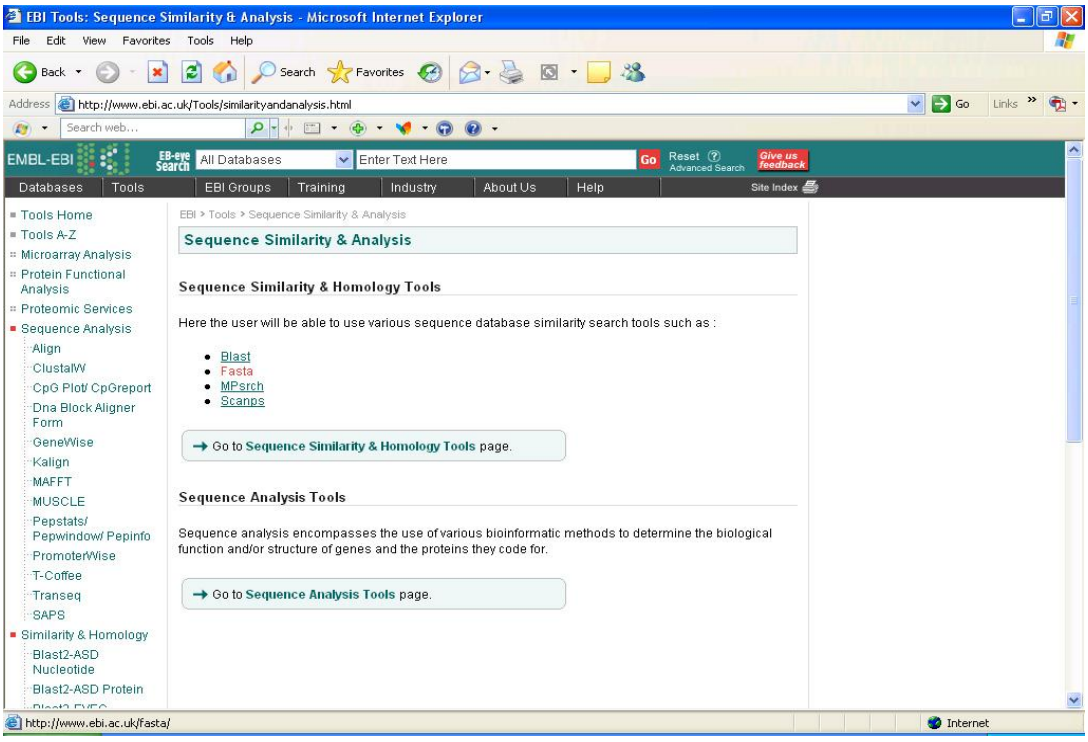


## II. การสืบค้นจากฐานข้อมูล EMBL

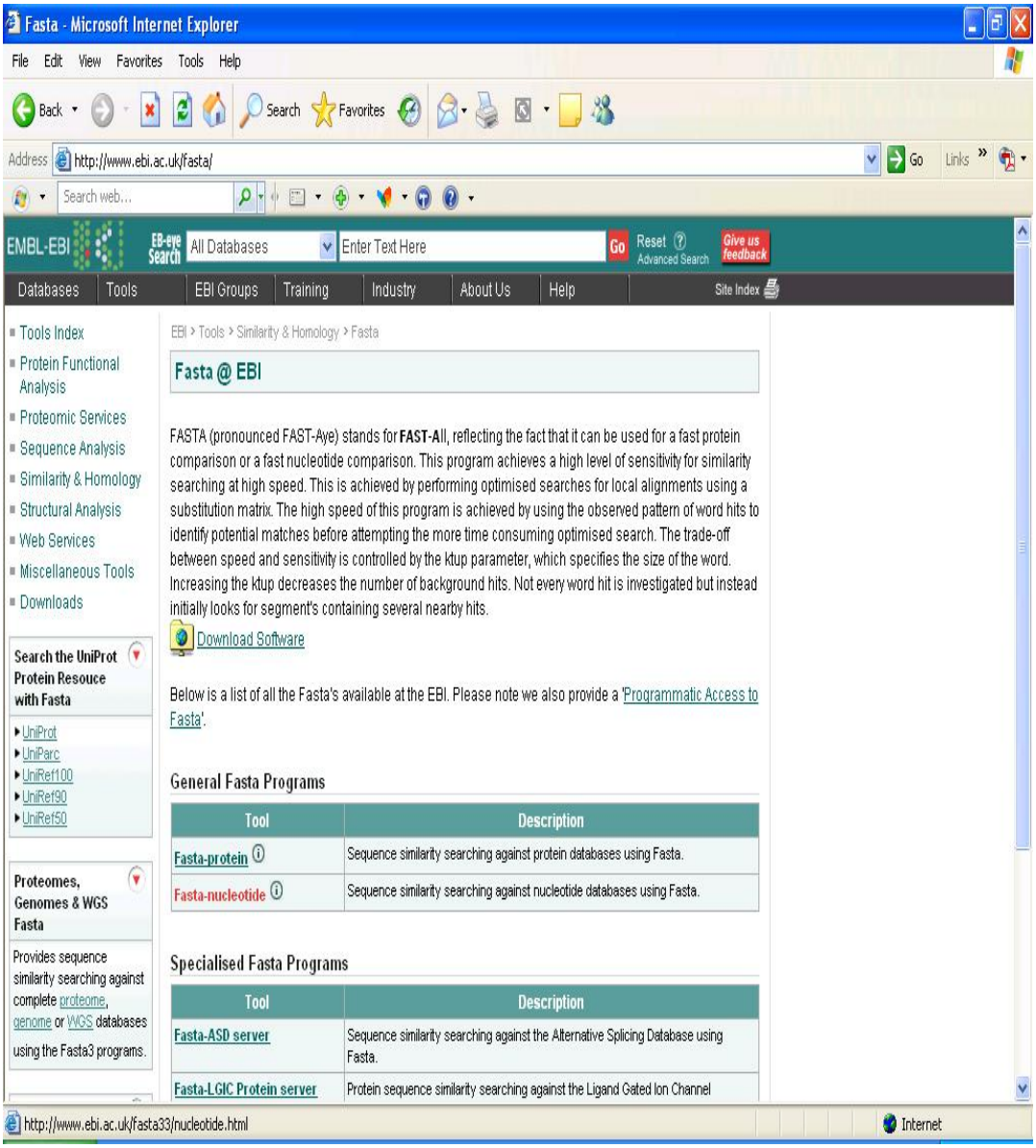
1. ให้เข้าไปที่เวปไซต์ http://www.ebi.ac.uk/




2. คลิกเม้าส์ไปที่ Sequence Similarity & Analysis จะเห็นหน้าจอขึ้น ดังภาพ



3. คลิก Fasta ⟶ เลือก Fata nucleotide

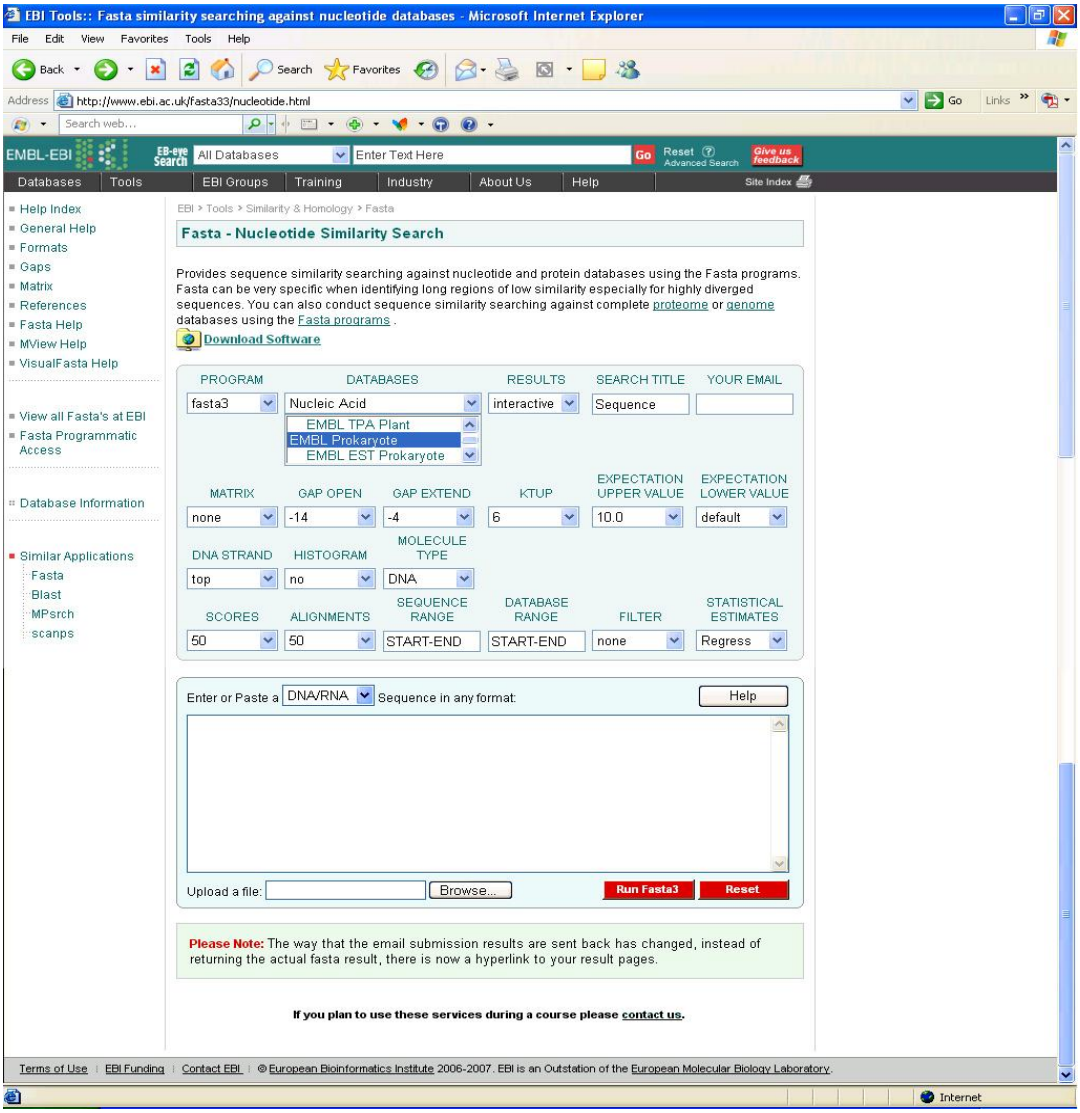



4. เลือก - DATABASE ⟶ Nucleic Acid / EMBL Procaryote

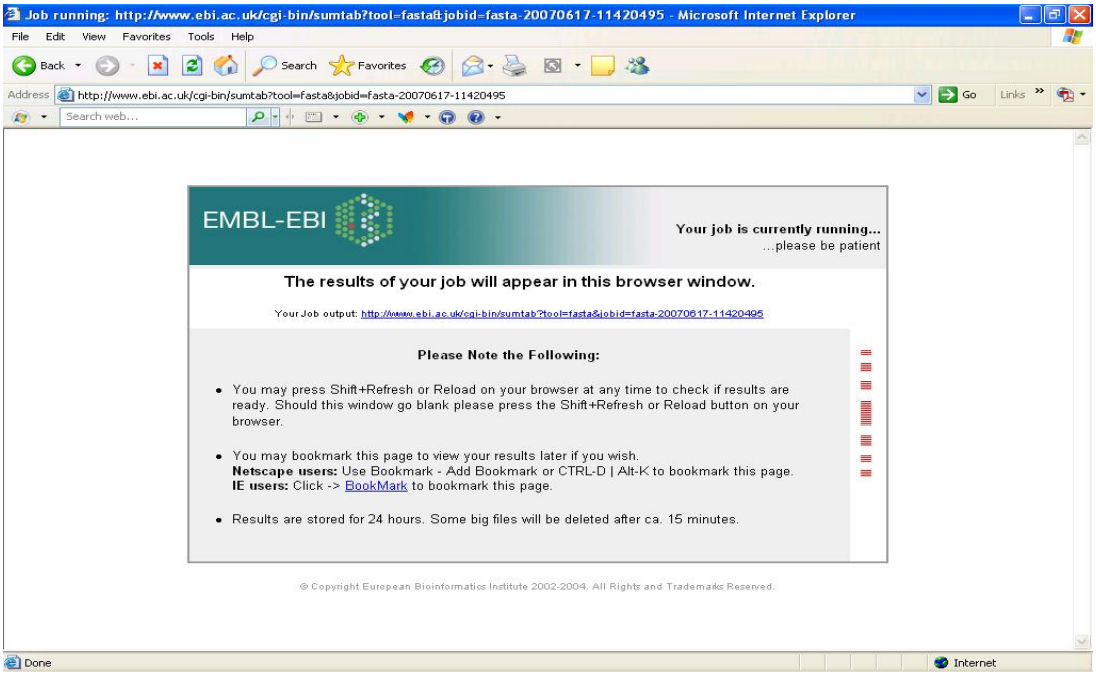
- RESULTS ⟶ interactive
- DNA STRAND ⟶ top (สาย Forward) , bottom (สาย Reverse)

both (สาย Forward และ Reverse รวมกันแล้ว)

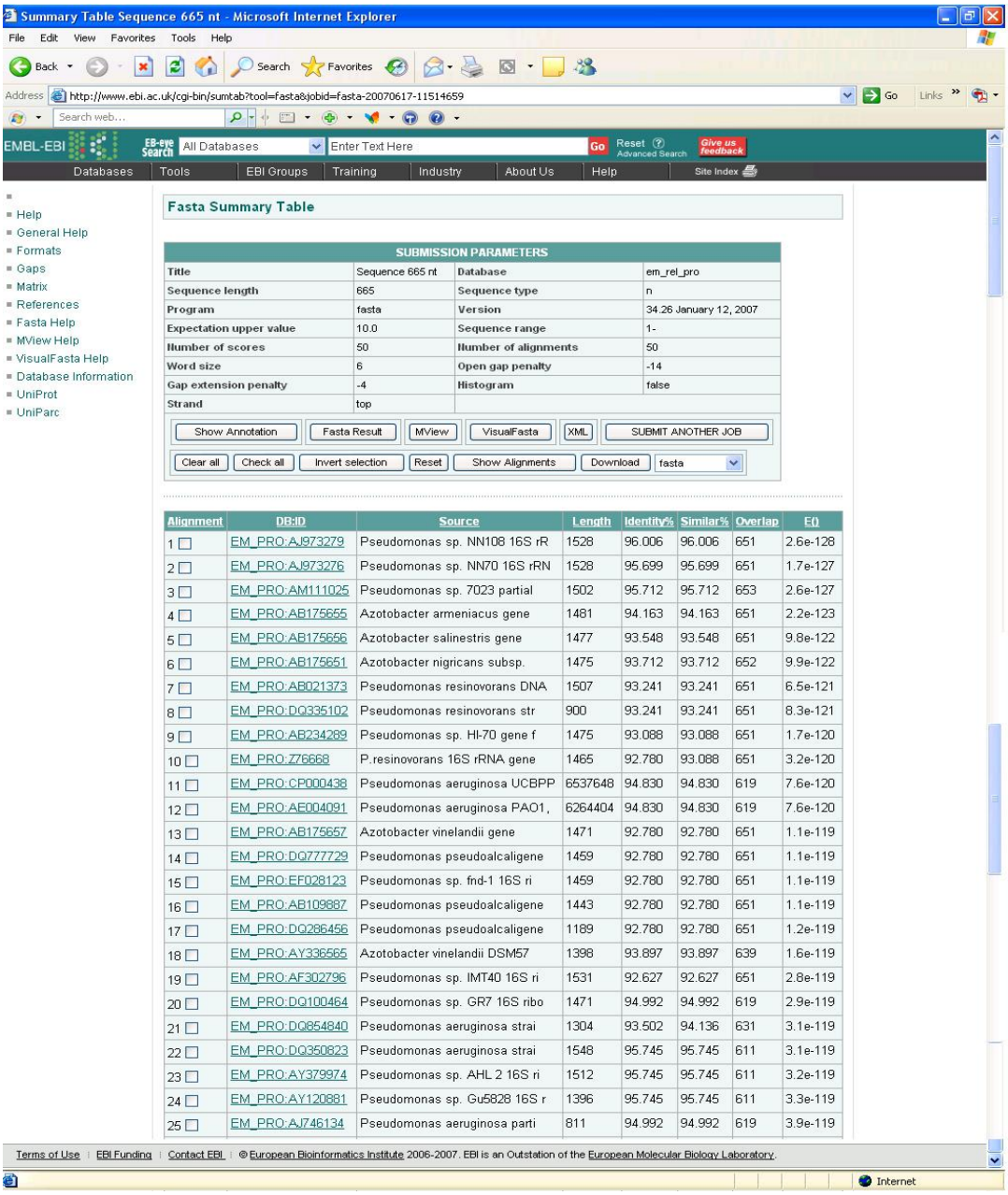
- Browse ข้อมูล sequence ที่ต้องการวิเคราะห์ หรือ copy sequence และ paste ในช่องว่าง
- คลิก Run Fasta3




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

# คณะจัดการความรู้

# สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

## (KM Teams สทช.)

| | | |
|---|---|---|
| นายอลงกรณ์ กรณ์ทอง | ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ | ที่ปรึกษา |
| นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ | ผอ.กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร | ประธานคณะทำงาน |
| นางชยานิจ ดิษฐบรรจง | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ | คณะทำงาน |
| นางสาวมัทนา ศรีหัตถกรรม | นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ | คณะทำงาน |
| นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ | คณะทำงาน |
| นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ | คณะทำงาน |
| นางสุภาวดี ง้อเหรียญ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ | คณะทำงาน |
| นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ | นักวิชาการเกษตรชำนาญการ | คณะทำงาน |
| นางสาวภรณี สว่างศรี | นักวิชาการโรคพืชชำนาญการ | คณะทำงาน |