

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* จำนวน 50 ไอโซเลตที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยมีไอโซเลตดังต่อไปนี้ STTR01, STTR02, STTR03, STTR04, STTR05, STTR06, STTR07, STTR08, STTR09, STTR10, STTR11, STTR14, STTR15, STTR16, STTR17, STTR18, STTR23, STTR24, STTR25, STTR26, STTR27, STTR29, STTR31, STTR32, STTR33, STTR35, STTR37, STTR38, STTR42, SAP21194/08, SAP00433/09, SAP00444/09, SAP00445/09, SAP00564/09, SAP01571/09, SAP03057/09, SAO4202, SAP4282, SAP4570, SAP4572, SAP5447, SAP6077, SAP9184/09, MLST12, MLST13, MLST23, MLST24, MLST33, ATCC13311 และ DMST17242

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 สารเคมีและสารละลาย

Absolute ethanol (Merck, Germany)
dNTPs (Fermentus, USA)
LightCycle®480 Resolight Dye (Roche, Germany)
Magnesium chloride (Invitrogen, Brazil)
Oligonucleotide primer (1st base, Singapore)
PCR RXN buffer (Invitrogen, Brazil)
Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil)
Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)

3.2.2 ชุดทดสอบ

Genomic DNA extraction kit (Qiagen, Germany)

3.2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

LightCycle®480 Real time PCR system (Roche, Germany)

PCR Thermocycle (Corbette, Australia)

Pipette, 2, 10,20,100,200,1,000 µl (Biohit, Germany)

UV-Vis Spectrophotometer Model U-1900 (Hitachi, Japan)

Mikro 200 zentrifugen (HeHich, Germany)

Incubator (Binder, Germany)

3.3 การเตรียมดีเอ็นเอจากเชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ

เชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis ถูกสกัดดีเอ็นเอด้วย Genomic DNA Extraction Kit โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) จุด suspension ของเชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2) ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส

3) เติม GT buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4) เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นผสมนาน 5 วินาที

5) นำสารละลายในข้อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนสารละลายใสกลับหลอดทุกๆ 3 นาที

6) นำหลอดน้ำปราศจากไอออนเข้าตู้ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นตัวทำลายดีเอ็นเอ

7) เติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นส่วนผสมนาน 10 วินาที ในขั้นตอนนี้หากมีตะกอนเกิดขึ้นให้ปั่นส่วนผสมจนตะกอนแตก

8) สวม GD column ลงใน collection tube ใส่สารละลายในข้อ 7 ลงใน GD column ปิดฝานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง สวม GD column ลงใน collection tube

9) เติม W1 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง สวม GD column ลงใน collection tube

10) เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง สวม GD column ลงใน collection tube

11) นำ GD column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ย้าย GD column ใส่ใน microcentrifuge tube เติมน้ำปราศจากไอออนที่บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน column matrix

12) ทิ้งไว้ นาน 2 นาที ให้ column matrix ดูดซับน้ำปราศจากไอออนจนหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลาย DNA นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม

1) ดูดสารละลายเชื้อ *S. Typhimurium* หรือ *S. Enteritidis* ซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 3 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 – 24 ชั่วโมง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทำพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส

2) ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใสเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วนำไปต้มด้วย PCR thermocycler ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3) นำสารละลายเชื้อที่ต้มแล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใช้งานได้ทันที

3.4 การเก็บรักษาดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอจากการสกัดด้วยชุดทดสอบและการสกัดด้วยการต้มจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5 การคัดเลือกตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์

การทดสอบ *S. Typhimurium* ใช้ตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์ตามงานวิจัยของ Linstedt และคณะ (2004) ดังตาราง 3-1 สำหรับการทดสอบ *S. Enteritidis* ใช้ตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์ตามงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007) ดังตาราง 3-2

ตาราง 3-1 ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค MLVA ของ *S. Typhimurium*

| Locus | Primer | Primer Sequence (5' - 3') | Repeat Length |
|-------|---------|---------------------------|---------------|
| STTR3 | FORWARD | CCCCTAAGCCCGATAATGG | 33 |
| | REVERSE | TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA | |
| STTR5 | FORWARD | ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT | 6 |
| | REVERSE | GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT | |
| STTR6 | FORWARD | TCGGGCATGCGTTGAAA | 6 |
| | REVERSE | CTGGTGGGGAGAATGACTGG | |
| STTR9 | FORWARD | AGAGGCGCTGCGATTGACGATA | 9 |
| | REVERSE | CATTTTCCACAGCGGCAGTTTTTC | |



ตาราง3-2 ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค MLVA ของ S. Enteritidis

| Locus | Primer | Primer Sequence (5'- 3') | Repeat Length |
|-------|---------|----------------------------|---------------|
| SE1 | FORWARD | AGACGTGGCAAGGAACAGTAG | 7 |
| | REVERSE | CCAGCCATCCATACCAAGAC | |
| SE2 | FORWARD | CTTCGGATTATACCTGGATTG | 7 |
| | REVERSE | TGGACGGAGGCGATAG | |
| SE5 | FORWARD | CGGGAACCACCATCAC | 6 |
| | REVERSE | CAGGCCGAACAGCAGGAT | |
| SE9 | FORWARD | CGTAGCCAATCAGATTCATCCC | 9 |
| | REVERSE | GCGTTTGAAACGGGGGTGTGGCGCTG | |

3.6 ข้อมูล repeat units ของเชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของตำแหน่งเป้าหมายด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE

ข้อมูล repeat units ของเชื้อ S. Typhimurium และ S. Enteritidis ได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของตำแหน่งเป้าหมายด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE โดยส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Genescan (ABI, USA) ที่บริษัท Applied Biosystems

3.7 สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ S. Typhimurium และ S. Enteritidis ด้วยเทคนิค MLVA และ High resolution melting (HRM)

3.7.1 S. Typhimurium

สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตัดแปลงจากสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในงานวิจัยของ Linstedt และคณะ (2004)

1) ตัวอย่างดีเอ็นเอของ S. Typhimurium จากข้อ 3.3 ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ (ตาราง3-1) มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

| | | |
|------------------------------|-------|-----------|
| 10x PCRRXN buffer | 2.00 | ไมโครลิตร |
| 10 mM dNTP Mix | 0.40 | ไมโครลิตร |
| 50 mM MgCl ₂ | 0.48 | ไมโครลิตร |
| 10 µM Forward Primer | 0.40 | ไมโครลิตร |
| 10 µM Reverse Primer | 0.40 | ไมโครลิตร |
| 5U Taq DNA Polymerase | 0.20 | ไมโครลิตร |
| LightCycle®480 Resolight Dye | 0.20 | ไมโครลิตร |
| ddH ₂ O | 14.92 | ไมโครลิตร |
| สารละลายดีเอ็นเอ | 1.00 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรรวม | 20.00 | ไมโครลิตร |

2) ตั้งโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

| | | | | |
|------|--------------|-----------------|----|--------|
| รอบ1 | denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 10 | นาที |
| รอบ2 | denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 20 | วินาที |
| | annealing | 58 องศาเซลเซียส | 30 | วินาที |
| | extension | 72 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |

3) สภาวะในการทำ HRM

ตั้งโปรแกรมสำหรับ HRM acquisition ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

Duplex formation

| | | | |
|--------------|-----------------|---|------|
| heating | 95 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |
| cooling down | 40 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |

HRM

| | | | |
|---------|----------------------|------------------------|--------|
| heating | 70 – 99 องศาเซลเซียส | 25 acquisitions / 1 °C | |
| cooling | 40 องศาเซลเซียส | 30 | วินาที |

4) การวิเคราะห์ข้อมูล HRM

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480

Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.7.2 S. Enteritidis

สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตัดแปลงจากสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007)

1) ตัวอย่างดีเอ็นเอของ S. Enteritidis จากข้อ 3.1 ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรมอร์จำนวน 4 คู่ (ตาราง 3-2) มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

| | | |
|------------------------------|-------|-----------|
| 10x PCRRXN buffer | 2.00 | ไมโครลิตร |
| 10 mM dNTP Mix | 0.40 | ไมโครลิตร |
| 50 mM MgCl ₂ | 0.80 | ไมโครลิตร |
| 10 µM Forward Primer | 0.30 | ไมโครลิตร |
| 10 µM Reverse Primer | 0.30 | ไมโครลิตร |
| 5U Taq DNA Polymerase | 0.20 | ไมโครลิตร |
| LightCycle®480 Resolight Dye | 0.20 | ไมโครลิตร |
| ddH ₂ O | 14.80 | ไมโครลิตร |
| สารละลายดีเอ็นเอ | 1.00 | ไมโครลิตร |
| ปริมาตรรวม | 20.00 | ไมโครลิตร |

2) ตั้งโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

| | | | | |
|------|--------------|-----------------|----|--------|
| รอบ1 | denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 10 | นาที |
| รอบ2 | denaturation | 95 องศาเซลเซียส | 20 | วินาที |
| | annealing | 60 องศาเซลเซียส | 30 | วินาที |
| | extension | 72 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |

3) สภาวะในการทำ HRM

ตั้งโปรแกรมสำหรับ HRM acquisition ภายใต้เงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้

Duplex formation

| | | | |
|--------------|-----------------|---|------|
| heating | 95 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |
| cooling down | 40 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |

HRM

| | | | |
|---------|----------------------|------------------------|--------|
| heating | 75 – 99 องศาเซลเซียส | 25 acquisitions / 1 °C | |
| cooling | 40 องศาเซลเซียส | 30 | วินาที |

4) การวิเคราะห์ข้อมูล HRM

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative melting plots เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.8 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย

เชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ถูกคัดเลือกจากข้อมูล repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR 4 ตำแหน่งด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE (จากข้อ 3.6) โดยคัดเลือกไอโซเลทซึ่งมีข้อมูล repeat units ต่างกันมาวิเคราะห์ความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมาย ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

1) เชื้อ S. Typhimurium หรือ S. Enteritidis ซึ่งมี repeat units ต่างกันถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบตามขั้นตอนในข้อ 3.3.1

2) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 1) ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ดังตารางที่ 3-1 สำหรับทดสอบ S. Typhimurium และตารางที่ 3-2 สำหรับทดสอบ S. Enteritidis โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทดสอบตามหัวข้อ 3.7

3) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) เพื่อดูลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น สำหรับตำแหน่งเป้าหมายที่สามารถแยกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ได้ ไอโซเลทซึ่งเป็นตัวแทนของอัลลีลนั้นจะถูกคัดเลือกเป็น internal control ต่อไป

3.9 การพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *S. Enteritidis*

ในกรณีที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ได้ ไพรมเมอร์จะถูกออกแบบใหม่โดยออกแบบให้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ VNTR ตำแหน่งที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile ได้ ให้มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สั้นขึ้นเพื่อเพิ่มขีดความสามารถของเทคนิค HRM

- 1) หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งเป้าหมายที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ในฐานะข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST
- 2) ออกแบบไพรมเมอร์ใหม่ด้วยโปรแกรม primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 1) โดยการออกแบบไพรมเมอร์ใหม่นั้นต้องครอบคลุมบริเวณ VNTR เดิมแต่ให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสั้นขึ้นภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- 3) นำไพรมเมอร์ที่ออกแบบใหม่ไปตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงกับฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST
- 4) วิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยใช้สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทดสอบตามหัวข้อ 3.7 แต่เปลี่ยนไพรมเมอร์เป็นไพรมเมอร์ที่ออกแบบใหม่ และวิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) เพื่อคุณลักษณะและความแตกต่างของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.10 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

3.10.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.8 โดยคัดเลือกจากข้อมูล repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่ง ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE (จากข้อ 3.6) ซึ่งตัวอย่างดีเอ็นเอนี้จะใช้ในการทดสอบตามหัวข้อ 3.10.2 และ 3.10.3

3.10.2 การประเมินความแม่นยำ (precision)

การประเมินความแม่นยำของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จะพิจารณาจาก 2 กรณี ได้แก่ ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) และความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility)

3.10.2.1 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) ดัดแปลงจากวิธีของ Norambuena และคณะ ในปี 2009 (Norambuena et al., 2009) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วยความแตกต่างของ melting profile ในการทดสอบครั้งเดียวกัน ภายในวันเดียวกันและผู้ทดลองคนเดียว

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3.10.1 ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM คัดเลือกตัวแทนของอัลลีลอย่างน้อย 2 อัลลีลในแต่ละตำแหน่งเป้าหมายมาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7

2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.10.2.2 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) ดัดแปลงจากวิธีของ Norambuena และคณะ ในปี 2009 (Norambuena et al., 2009) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วยความแตกต่างของ melting profile ซึ่งกระทำในวันที่ต่างกัน

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 3.10.1 ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM คัดเลือกตัวแทนของอัลลีลอย่างน้อย 2 อัลลีลในแต่ละตำแหน่งเป้าหมายมาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7

2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative melting plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการทดลองวันที่หนึ่งและวันที่สอง

3.10.3 ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness)

คือความสามารถของเทคนิคทดสอบที่จะไม่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับอิทธิพลจาก

ปัจจัยต่างๆ โดยเลือกทดสอบ 2 ปัจจัยเพื่อดูเสถียรภาพของเทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM ได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอ และ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

3.10.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอของ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.10.1 และ ตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งถูกสกัดด้วยวิธีการต้มตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3.2 ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ เทคนิค HRM โดยเลือกวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยความแตกต่างของ melting profile ที่ตำแหน่ง STTR9 วิเคราะห์ 2 อัลลีล ซึ่งมี repeat units เท่ากับ 3 และ 4 repeat units โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7.1

2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของแต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.10.3.2 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ

1) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอของ *S. Typhimurium* จากข้อ 3.10.1 ด้วย เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยเลือกวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย ความแตกต่างของ melting profile ที่ตำแหน่ง STTR 9 วิเคราะห์ 2 อัลลีล ซึ่งมี repeat units เท่ากับ 3 และ 4 repeat units แปรระดับความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัม ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยมีสภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการทำ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามหัวข้อ 3.7.1

2) การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูล melting profile ด้วยซอฟต์แวร์ LightCycler®480 Gene Scanning software version 1.5 (Roche, Germany) โดยพิจารณาจาก Derivative plots เพื่อดูลักษณะและตำแหน่งของ melting peak ของ แต่ละอัลลีลที่เกิดขึ้น

3.11 การเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

1) เชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 ตัวอย่างถูกคัดเลือกจากข้อมูล repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ VNTR ทั้ง 4 ยีนเป้าหมาย ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE (จากข้อ 3.6) นำมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนในหัวข้อ 3.3.2

2) ทดสอบตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 1) ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยมีสถานะและส่วนผสมของสารเคมีและการวิเคราะห์ผล HRM ตามหัวข้อ 3.6 รวมถึงไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกเป็น internal control จากหัวข้อ 3.7

3) การวิเคราะห์ผล

พิจารณา melting profile ที่เกิดขึ้นจากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ถ้า melting peak ของตัวอย่างตกอยู่กลุ่มเดียวกับ internal control ของแต่ละอัลลีลได้ให้ถือว่าตัวอย่างนั้นมี repeat units เท่ากับไอโซเลทซึ่งเป็น internal control นั้น ทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การจำแนกความแตกต่างของขนาด VNTR ด้วยเทคนิค CE กับการจำแนกความแตกต่างของขนาด VNTR ด้วยเทคนิค HRM โดยดูความถูกต้องของการแปรผล repeat units จาก melting profile