

3.5.5.5 การศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียภายใน เมือกชีวภาพด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

3.5.5.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

นำตัวอย่างเมือกชีวภาพมา 750 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนเซลล์โดยเติม $1 \times$ TENS Buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นก็เติม Lysozyme ปริมาณ 30 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวได้มากขึ้น จากนั้นก็เติม 10 % SDS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K ปริมาณ 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นก็บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นก็เติม Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาณ 680 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาณ 600 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นก็เติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาณ 600 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดใหม่ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นก็เติม 3 M Sodium Acetate (pH 5.2) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วเติม Absolute Ethanol ปริมาณ 800 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วย 70 % Ethanol ปริมาณ 800 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นก็ทำตะกอนให้แห้งประมาณ 2-3 ชม. แล้วล้างตะกอนด้วย $1 \times$ TAE ปริมาณ 500 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น DNA Template (Kuske, Banton, Adorada, Stark, Hill and Jackson. 2011)

3.5.5.5.2 การเพิ่มปริมาณ 16 sDNA โดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำตัวอย่างที่ได้จาก 3.5.5.5.1 ปริมาณ 750 ไมโครลิตร มาปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำ MilliQ water ที่ฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1 : 200 ไมโครลิตร สำหรับการทำให้ PCR ครั้งแรก (ประกอบด้วย Taq PCR Mix Kit) ประกอบด้วย QIAGEN PCR Buffer, Deoxynucleotide Triphosphate) 12.5 ไมโครลิตร RNase Free Water 8 ไมโครลิตร 10 X CoralLoad ความเข้มข้น 2.5 ไมโครลิตร universal primer 149r และ 57f 0.5 ไมโครลิตร DNA Extract 1 ไมโครลิตร (Total Volume 25 ไมโครลิตร) จากนั้นก็

นำเข้าเครื่อง PCR โดยโปรแกรม PCR ประกอบด้วย 1) Pre-Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 2) ขั้นตอน Denaturation จะใช้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 3) ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ 4) ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที รวมทั้งหมด 30 รอบ และ 5) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นก็จะเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (Hniman et al, 2011 : 8785–8793) หลังจากนั้นก็ตรวจสอบ PCR Product ใน 1.5 % อะกาโรสเจล (Kongjan et al, 2010 : 899-908) และนำ PCR Product ดังกล่าวไปใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 โดยใช้ Primer 518r และ 357f (with 40 bp GC clamp at the 5' end; Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG, 1993) โปรแกรม PCR ประกอบด้วย 1) Pre-Denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที 2) ขั้นตอน Denaturation จะใช้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 3) ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 4) ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที รวมทั้งหมด 30 รอบ และ 5) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นก็จะเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (Hniman et al, 2011 : 8785–8793)

3.5.5.3 การศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียภายในเมือกชีวภาพ

ด้วยเทคนิค DGGE

ในเทคนิค DGGE ตามวิธีการทำของ Kongjan et al. (2010 899-908) : โดยใช้ Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) โดยใช้ PCR Product ครั้งที่ 2 วิเคราะห์บน 8% (v/v) Polyacrylamide Gels, Denaturant Gradient ที่ร้อยละ 40-70, Electrophoresis ที่ 70 โวลต์ นาน 16 ชม. ใน 0.5 % TAE buffer ที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ทำการโหลด PCR Product ที่ได้ และ DGGE Marker II Set (Nippon Gene, Tokyo, Japan) จากนั้นก็นำมาข้อมด้วย SYBR Green เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปตรวจดูด้วยเครื่อง GelDoc XR 1708170 System (Bio-Rad Laboratories, Hertfordshire, UK) จากนั้นก็ทำการตัดแถบแบนดิเอ็นที่เด่นจากเจล DGGE และทำให้บริสุทธิ์ด้วย E.Z.N.a Cycle Pure Kit แล้วนำไปตรวจสอบอีกโดยการทำ PCR อีกครั้ง โดยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ดังที่กล่าวมาข้างต้น และใช้ไพรเมอร์ Primer 357f ที่ไม่มี GC Clamp และไพรเมอร์ 518r (Reverse Primer) (Hniman et al, 2011 : 8785–8793) โปรแกรม PCR ประกอบด้วย 1) Pre-Denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที 2) ขั้นตอน Denaturation จะใช้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 3) ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

วินาที และ 4) ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที รวมทั้งหมด 25 รอบ และ 5) Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ จากนั้นก็จะเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ผลที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์อ้างอิง โดยใช้โปรแกรม SeqMatch ในฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (<http://rcp.cme.msu.edu>) และ NCBI Web Interface (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

