

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 30 สายพันธุ์ (ดังแสดงในตารางที่ 2) ได้รับความอนุเคราะห์มาจากหน่วยงานเลปโตสไปโรซิส สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้อ้างอิงชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Aerococcus viridis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Streptococcus aureus* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรวบรวมข้อมูลทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ในเลปโตสไปราและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

การรวบรวมข้อมูลอาศัยคอมพิวเตอร์เชื่อมโยงกับเครือข่ายอินเทอร์เน็ต สืบค้นหาข้อมูลจากฐานข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ ฐานข้อมูล Pfam (Protein families database of alignments; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) PRINTS (Protein Motif fingerprint database; a protein domain database; <http://umbr.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/>) PROSITE (Database of protein families and domains; <http://www.expasy.org/prosite/>) SMART (Simple modular architecture research tool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>) และ Leptospira Database ของประเทศจีน (<http://www.chgc.sh.cn/lep/>) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีการทำนายหรือทราบแน่นอนแล้วว่าเป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR จากฐานข้อมูลดังกล่าวพบว่า มีรายงานใน *L. interrogans* ซีโรกรุป Icterohaemorrhagiae ซีโรวาร์ Lai ซึ่งมียีนที่คาดว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR จำนวน 25 ยีน โดยมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของแต่ละยีน (ดังแสดงในตารางที่ 3) จำนวนซ้ำของ LRR ในโปรตีนที่คาดว่ามาจากแต่ละยีนแตกต่างกัน ซึ่งมีตั้งแต่ 2-24 ซ้ำ (ดังแสดงในตารางที่ 4) LRR ส่วนใหญ่มีลักษณะการอนุรักษ์ ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 23 residues และจัดอยู่ในกลุ่ม typical subfamily LRR ในจำนวนนี้มีอย่างน้อย 4 ยีน ที่คาดว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อเลปโตสไปรา ได้แก่ ยีน LA2443, LA2447, LA2448 และ LA2450 ส่วนยีนที่เหลือยังไม่สามารถระบุตำแหน่งและหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้

การจัดกลุ่มยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบในเลปโตสไปรา

ทำการจัดกลุ่มทั้ง 25 ยีน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาจากทิศทางและตำแหน่งของแต่ละยีนบนโครโมโซม เพื่อความสะดวกในการศึกษาและการออกแบบไพรเมอร์ โดยที่มีจำนวน 24 ยีน อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ประกอบด้วยยีนที่อยู่บนสาย strand forward จำนวน 13 ยีน ได้แก่ ยีน LA0705, LA0873, LA1324, LA1353, LA1354, LA2964, LA2966, LA3028, LA3320, LA3321, LA3322, LA3323 และ LA3324 จำนวน 11 ยีน มีตำแหน่งอยู่บนสาย strand complementary ได้แก่ ยีน LA0701, LA1177, LA1498, LA1530, LA2443, LA2446, LA2447, LA2448, LA2450, LA2452 และ LA2862 ส่วนที่เหลืออีก 1 ยีน อยู่บนโครโมโซมที่ 2 คือ LB196 (ดังแสดงในตารางที่ 5) เนื่องจากมีข้อสังเกตได้ว่ายีนมีตำแหน่งใกล้เคียงกันเป็นกลุ่ม ๆ และสามารถนำแต่ละยีนมาทำการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม MacVectorTM 7.2.3 ด้วยการทำ multiple sequence alignment และสร้าง phylogenetic tree

ตารางที่ 2 เชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงที่ใช้ในการศึกษา

Genospecies	Serovar*	Strain*
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
	Bataviae	Swart
	Bratislava	Jez Bratislava
	Canicola	Houd Utrecht IV
	Djasiman	Djasiman
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Salinem
<i>L. noguchii</i>	Louisiana	LSU 1945
	Panama	CZ 214K
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	MUS 127
	Javanica	Veldrat Batavia 46
	Mini	Sari
	Sejroe	M 84
	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. santarosai</i>	Shermani	1342K
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni
	Manhao	L 105
	Sarmin	Sarmin
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C
	Grippytyphosa	Moskva V
<i>L. meyeri</i>	Ranarum	ICF
	Semaraga	Veldrat Sem.173 II
<i>L. biflexa</i>	Andamana	CH 11
	Maintenon	Maintenon
	Patoc	Patoc 1
	Saopaulo	Sao Paulo
<i>L. inadai</i>	Inadai	92152-1
	Lyme	10¶
<i>Leptonema illini</i>	-	-

* ที่มา: Yasuda *et al.* (1987)

ตารางที่ 3 ความยาวของนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของยีนที่คาดว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR แต่ละยีนของ *L. interrogans* ซีโรกรุ๊ป Icterohaemorrhagiae ซีโรวาร์ Lai

ยีน	จำนวนนิวคลีโอไทด์ของยีน	จำนวนกรดอะมิโน	ชื่อโปรตีน
LB196	527	175	Putative LRR repeat family protein
LA0701	2826	941	Leucine-rich repeat containing protein
LA0705	504	167	Leucine-rich repeat containing protein
LA0873	1272	423	Leucine-rich repeat containing protein
LA1177	168	122	Leucine-rich repeat containing protein
LA1324	654	217	Leucine-rich repeat containing protein
LA1353	531	176	Leucine-rich repeat containing protein
LA1354	300	99	Leucine-rich repeat containing protein
LA1498	843	280	Leucine-rich repeat containing protein
LA1530	501	167	Leucine-rich repeat containing protein
LA2443	1581	526	Putative outer membrane protein
LA2446	234	77	Leucine-rich repeat containing protein
LA2447	1494	498	Putative outer membrane protein
LA2448	1287	428	Putative outer membrane protein
LA2450	1899	633	Putative outer membrane protein
LA2452	870	289	Leucine-rich repeat containing protein
LA2862	867	288	Leucine-rich repeat containing protein
LA2964	1281	426	Leucine-rich repeat containing protein
LA2966	1227	408	Leucine-rich repeat containing protein
LA3028	2058	685	Leucine-rich repeat containing protein
LA3320	1134	377	Leucine-rich repeat containing protein
LA3321	1359	452	Leucine-rich repeat containing protein
LA3322	855	284	Leucine-rich repeat containing protein
LA3323	936	311	Leucine-rich repeat containing protein
LA3324	990	329	Leucine-rich repeat containing protein

ที่มา: Ren *et al.* (2003)

ตารางที่ 4 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นส่วน LRR และจำนวนซ้ำของ LRR ในโปรตีนที่คาดว่ามาจาก ยีนทั้ง 25 ยีน ที่ได้รวบรวมจากฐานข้อมูลต่าง ๆ

ยีน	ฐานข้อมูล	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งซ้ำ ¹
LB196	Pfam	2	96-117 118-139
	PRINTS	-	-
	PROSITE	-	-
	SMART	-	-
LA0701	Pfam	8	570-592 593-615 616-638 639-661 662-684 685-707 708-730 731-753
	PRINTS	2	663-676 706-719
	PROSITE	2	600-668 669-737
	SMART	1	706-729
LA0705	Pfam	3	79-101 102-124 125-152
	PRINTS	2	80-93 100-113
	PROSITE	1	63-131
	SMART	-	-
LA0873	Pfam	15	42-64 88-110 111-133 134-156 157-179 180-202 203-225 226-248 249-271 272-294 295-317 318-340 341-363 364-386 387-410
	PRINTS	2	181-194 339-352
	PROSITE	3	95-163 187-255 302 370
	SMART	1	362-385
LA1177	Pfam	2	41-62 64-85
	PRINTS	2	42-55 62-75
	PROSITE	-	-
	SMART	-	-
LA1324	Pfam	4	65-86 88-109 111-132 160-182
	PRINTS	2	66-79 132-145
	PROSITE	-	-
	SMART	-	-
LA1353	Pfam	1	130-151
	PRINTS	2	131-144 151-164
	PROSITE	-	-
	SMART	1	128-151

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ยีน	ฐานข้อมูล	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งซ้ำ ¹
LA1354	Pfam	3	22-43 45-66 68-90
	PRINTS	2	23-36 66-79
	PROSITE	1	6-74
	SMART	1	20-42
LA1498	Pfam	1	222-243
	PRINTS	-	-
	PROSITE	-	-
	SMART	-	-
LA1530	Pfam	6	18-39 41-62 64-85 87-108 110-131 133-155
	PRINTS	2	42-55 108-121
	PROSITE	2	2-70 71-139
	SMART	1	108-131
LA2443	Pfam	13	99-120 122-143 145-166 168-189 191-212 214-235 237-258 334-355 357-378 380-402 404-425 450-471 473-494
	PRINTS	2	451-464 471-484
	PROSITE	3	106-174 198-266 434-502
	SMART	4	143-166 235-258 448-470 471-494
LA2446	Pfam	2	20-41 43-65
	PRINTS	2	21-34 41-54
	PROSITE	-	-
	SMART	1	18-41
LA2447	Pfam	14	72-94 95-117 118-140 141-163 164-186 187-209 210-232 233-255 79-301 377-399 400-422 423-445 446-468 469-491
	PRINTS	2	119-132 208-221
	PROSITE	3	102-170 171-239 407-475
	SMART	3	231-254 277-300
LA2448	Pfam	15	49-71 72-94 95-117 118-140 141-163 164-186 187-209 210-232 233-255 256-278 279-301 302-324 325-347 348-370 371-393
	PRINTS	2	165-178 208-221
	PROSITE	4	56-124 125-193 217-285 309-377
	SMART	4	93-115 139-160 162-184 208-230

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ยีน	ฐานข้อมูล	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งซ้ำ ¹
LA2450	Pfam	24	51-73 74-96 97-119 120-142 143-165 166-188
			189-211 212-234 235-257 258-280 281-303 304-326
			327-349 350-372 373-395 396-418 419-441 442-464
			465-487 488-510 511-533 534-556 557-579 580-602
	PRINTS	2	98-111 256-269
	PROSITE	6	104-172 173-241 242-310 334-402 403-471 514-609
	SMART	3	95-118 371-394 417-439
LA2452	Pfam	9	75-97 98-120 121-143 144-166 167-189 190-212
			213-235 236-258 259-282
	PRINTS	2	145-158 165-178
	PROSITE	2	105-173 197-265
	SMART	4	142-164 188-210 211-233 234-257
LA2862	Pfam	8	74-96 97-119 120-142 143-165 166-188 189-211
			212-234 235-257
	PRINTS	2	75-88 95-108
	PROSITE	2	58-126 150-218
	SMART	4	72-94 95-117 141-163 233-256
LA2964	Pfam	16	50-72 73-95 96-118 199-141 142-164 165-187
			188-210 211-233 234-253 257-279 280-302 303-325
			326-348 349-371 372-394 395-418
	PRINTS	2	304-317 347-360
	PROSITE	3	103-171 195-263 287-355
	SMART	3	140-162 232-254 301-323
LA2966	Pfam	13	53-75 99-121 122-144 145-167 168-190 216-238
			239-261 262-284 285-307 308-330 331-353 354-376
			377-400
	PRINTS	2	263-276 329-342
	PROSITE	3	83-151 223 291 315-383
	SMART	4	97-119 120-142 166-189 329-351
LA3028	Pfam	13	328-350 351-373 398-420 421-443 444-466
			467-488 489-511 535-557 558-581 582-604 605-627
			628-650 651-674
	PRINTS	2	536-549 580-593
	PROSITE	1	542-611
	SMART	1	556-579

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ยีน	ฐานข้อมูล	จำนวนซ้ำ	ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งซ้ำ ¹
LA3320	Pfam	14	47-69 70-92 93-115 116-138 139-161 162-184
			185-207 208-230 231-253 254-276 277-299 300-322
			323-345 346-373
	PRINTS	2	163-176 252-265
	PROSITE	1	123-191 ²
		4	54-122 123-191 215-283 284-352
	SMART	7	68-90 114-136 160-182 206-228 252-274 275-297 298-320
LA3321	Pfam	17	49-71 72-94 95-117 118-140 141-163 164-186
			187-209 210-232 233-255 256-278 279-301 302-324
			325-347 348-370 371-393 394-416 417-440
	PRINTS	2	96-109 139-152
	PROSITE	5	56-124 125-193 217-285 286-354 355-423
	SMART	7	70-92 93-115 139-161 162-185 254-276 277-299 323-345
LA3322	Pfam	9	49-71 72-94 95-117 118-140 141-163 164-186 187-209 210-232 233-255
	PRINTS	2	96-109 116-129
	PROSITE	2	79-147 194-262
	SMART	4	70-92 185-207 208-230 231-254
LA3323	Pfam	11	50-72 73-95 96-118 119-141 142-164 165-187 188-210 211-233 234-256 257-279 280-307
	PRINTS	2	143-156 255-268
	PROSITE	3	80-148 149-217 218-286
	SMART	5	71-93 94-116 140-162 232-254 255-277
LA3324	Pfam	12	45-67 68-90 91-113 114-136 137-159 160-182 183-205 206-228 229-251 252-274 275-297 298-325
	PRINTS	2	207-220 227-240
	PROSITE	3	75-143 144-212 236-304
	SMART	6	66-88 135 157 204-226 227 249 250-272 273-295

หมายเหตุ

¹ ช่วงของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งซ้ำของ LRR โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม typical LRR subfamily ซึ่งมีจำนวนกรดอะมิโนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของ LRR ในแต่ละฐานข้อมูลแตกต่างกันบ้าง คือ ฐานข้อมูล Pfam และ SMART มีส่วนอนุรักษ์ จำนวน 23 residues ส่วนฐานข้อมูล PRINTS และ PROSITE มีส่วนอนุรักษ์จำนวน 14 และ 69 residues ตามลำดับ

² consensus sequence ที่จัดอยู่ในกลุ่ม SDS-like LRR subfamily

ตารางที่ 5 รายละเอียดตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของยีนที่คาดว่าสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ทั้ง 25 ยีน

ชื่อยีน	ชนิดของโครโมโซม : สายของยีน	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่เป็นส่วนของยีน
LB196	Chromosome: II Strand : F	189081-189608
LA0701	Chromosome: I Strand : C	708833-711658
LA0705	Chromosome: I Strand : F	715657-716160
LA0873	Chromosome: I Strand : F	872503-873774
LA1177	Chromosome: I Strand : C	1177140-1177307
LA1324	Chromosome: I Strand : F	1316403-1317056
LA1353	Chromosome: I Strand : F	1346621-1347151
LA1354	Chromosome: I Strand : F	1347226-1347525
LA1498	Chromosome: I Strand : C	1497297-1498139
LA1530	Chromosome: I Strand : C	1528407-1528910
LA2443	Chromosome: I Strand : C	2420583-2422163
LA2446	Chromosome: I Strand : C	2423710-2423943
LA2447	Chromosome: I Strand : C	2424001-2425497
LA2448	Chromosome: I Strand : C	2425568-2426854
LA2450	Chromosome: I Strand : C	2427064-2428965
LA2452	Chromosome: I Strand : C	2429175-2430044
LA2862	Chromosome: I Strand : C	2843308-2844174
LA2964	Chromosome: I Strand : F	2940924-2942204
LA2966	Chromosome: I Strand : F	2942232-2943458
LA3028	Chromosome: I Strand : F	3000858-3002915
LA3320	Chromosome: I Strand : F	3282382-3283515
LA3321	Chromosome: I Strand: F	3283718-3285076
LA3322	Chromosome: I Strand : F	3285124-3285978
LA3323	Chromosome: I Strand : F	3286182-3287117
LA3324	Chromosome: I Strand : F	3287317-3288306

การออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR

การออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็นส่วน LRR จากที่ได้รวบรวมไว้ ด้วยการทำ multiple sequence alignment โดยโปรแกรม MacVector™ 7.2.3 (ClustalW) จากข้อมูลยีน (ดังแสดงในตารางที่ 3) ตั้งค่าพารามิเตอร์ตามความเหมาะสม ผลทำให้ทราบส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการอนุรักษ์ (conserve sequence) ของแต่ละยีนในกลุ่มที่จัดแบ่งไว้ นำส่วนที่มีการอนุรักษ์มาใช้ออกแบบไพรเมอร์ให้อยู่ส่วนที่มีการอนุรักษ์ ซึ่งคาดว่าไพรเมอร์ที่ได้สามารถจับกับยีนได้อย่างจำเพาะ และจับได้มากกว่าหนึ่งยีน เป็นผลให้ได้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความหลากหลาย เกิดขึ้นเป็นลักษณะเฉพาะขึ้นในแต่ละชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา โดยที่การออกแบบไพรเมอร์นั้นจะออกแบบมาจากแต่ละยีนโดยใช้โปรแกรม MacVector™ 7.2.3 ซึ่งจะได้ไพรเมอร์หลายกลุ่ม จากนั้นนำไพรเมอร์มาทดสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อใช้ทดลองขั้นต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงก่อนการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

ทำการเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเหลว EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมฟอร์มาลิน 10% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เก็บตะกอนเชื้อโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,800 x g (Centrifuge, Heraeus sepatech 17 RS) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำตะกอนเชื้อที่ได้ไปสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ต่อได้ทันทีหรืออาจจะเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอต่อไป

การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิง

นำตะกอนของเชื้อที่เตรียมได้มาทำการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอดังวิธีต่อไปนี้

การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอโดยฟีนอล คลอโรฟอร์ม และไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

นำตะกอนเชื้อมาสกัดด้วยสารละลายไลซิง (lysing solution) ซึ่งประกอบด้วย lysis buffer (0.05 M EDTA (pH 8.5), 0.05 M Tris-HCl (pH 8.1), 0.1 M NaCl) ปริมาตร 170 ไมโครลิตรต่อปริมาณเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.5% SDS และ proteinase K ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นปรับความเข้มข้นของ SDS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% แล้วเติมสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์มและไอโซเอมิล

แอลกอฮอล์ (Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol; 24: 1: 1) ปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าแรง ๆ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,600 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนชั้น aqueous phase ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท (3 M sodium acetate; pH 5.2) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรทั้งหมด และเติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 6 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 6 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนแล้วตากให้แห้งโดยวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเพิ่มความบริสุทธิ์ของจีโนมดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้างต้น

เป็นการดัดแปลงวิธีการใช้ชุดทดสอบของ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Germany) จากวิธี blood and body fluid spin เนื่องจากจีโนมดีเอ็นเออยู่ในสภาพสารละลายอยู่แล้ว จึงข้ามขั้นตอนการเติม proteinase K โดยนำจีโนมดีเอ็นเอมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครลิตร เติม buffer AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแบบ touch spin เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงแบบ touch spin อีกครั้ง จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ทั้งหมดใส่ในหลอด spin column ปิดฝาให้เรียบร้อย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายหลอด spin column ใส่ collection tube หลอดใหม่ แล้วเติม buffer AW 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายหลอด spin column ใส่ collection tube หลอดใหม่ แล้วเติม buffer AW 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 x g เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนใสในหลอด collection tube ทิ้ง และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 20,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ย้ายหลอด spin column มาใส่ใน centrifuge tube และเติมน้ำกลั่นลงบนแผ่น filter ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อละลายจีโนมดีเอ็นเอที่ได้ จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นำสารละลายจีโนมดีเอ็นเอไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพจีโนมิคดีเอ็นเอ

คุณภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถคำนวณได้โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนระหว่างค่า OD_{260} ต่อ OD_{280} ซึ่งควรจะอยู่ในช่วง 1.8 ± 0.15 และนำค่าการวัด OD_{260} มาคำนวณหาปริมาณของจีโนมิคดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้สมการ

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ (ng/}\mu\text{l)} = 50 \times (OD_{260}) \times \text{dilution factor}$$

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล

ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในการทดลองครั้งนี้ มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.8 mM dNTPs (dATP dCTP dTTP และ dGTP), ไพรมเมอร์ (primer) แต่ละเส้นมีปริมาณ 50 พิโคโมล (pmol) โดยไพรมเมอร์ที่ใช้มีจำนวน 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 คือ Forward primer LR1 Reverse primer LR2 Reverse primer LR3 กลุ่มที่ 2 คือ Forward primer LR4 Reverse primer LR5 และกลุ่มที่ 3 คือ Forward primer LR6 Reverse primer LR7 Reverse primer LR8 (ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2) การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบผลด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 310 genetic analyzer จะใช้ Forward primer LR1 และ Forward primer LR6 ที่มีการติดฉลากบริเวณปลาย 5' ด้วย 6-FAM (6-carboxy fluorescein; Applied Biosystem, USA) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.25 U ผสมให้เข้ากันอย่างระมัดระวัง เติมจีโนมิคดีเอ็นเอปริมาณ 40 นาโนกรัม ผสมให้เข้ากันอีกครั้งในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำมาผ่านกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเครื่อง Thermocycler (Biometra[®]-UNOH, Germany) ภายใต้อุณหภูมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 รอบ และภายใต้อุณหภูมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข) จากนั้นเก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบผลด้วย 2.5% agarose gel electrophoresis หรือ ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 310 genetic analyzer

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 2.5 % agarose gel electrophoresis

การเตรียมตัวอย่างนั้นต้องนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาผสมกับสารละลายสีในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 สารละลายสี (loading dye, Formentas) ประกอบด้วย 6% glycerol ซึ่งมีหน้าที่สำหรับจับกับดีเอ็นเอไม่ให้ฟุ้งกระจายออกจากแผ่นเจล และสีใช้เพื่อติดตามระยะทางการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ซึ่งมีอยู่ 2 สี คือ bromphenol blue เทียบได้กับดีเอ็นเอขนาด 50–300 bp (base pair) และ cyene cyanol เทียบได้กับดีเอ็นเอขนาด 50 kb (kilo base pair) แล้วนำไปหยดลงในหลุมบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ตัวอย่างละ 18 ไมโครลิตร แล้วทำการแยกภายใต้ 1x TAE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60–70 นาที จากนั้นนำแผ่น agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 20–30 นาที พร้อมเขย่าเบา ๆ และตรวจสอบผลด้วยเครื่อง image analysis และ software KODAK 1D 3.5 (Eastman Kodak company, USA)

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์และสร้างเครื่องหมายโมเลกุลด้วย capillary electrophoresis (CE)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วย 6-FAM ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร มาผสมกับ Hi-Di formamide (Applied Biosystems, USA) ปริมาตร 11.5 ไมโครลิตร และ GeneScan-1000 ROX size standard (Applied Biosystems, USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ในหลอดตัวอย่างขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Genetic Analyzer 0.5 mL Sample Tubes, Applied Biosystems, USA) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็งทันที นำตัวอย่างที่ได้นี้มาหาขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ โดยใช้เครื่อง ABI PRISM[®] 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, USA) โดยวิธี denature และ โปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis (Applied Biosystems, USA) ที่การฉีดสาร (injection) 5 วินาที 15 กิโลโวลต์ เป็นเวลาตัวอย่างละ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลโดยชุดโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis

หลังจากการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 310 genetic analyzer จะได้ผลข้อมูลในลักษณะ electrophorogram (peak) ที่แสดงถึงขนาดต่าง ๆ ของผลผลิตพีซีอาร์ที่มีสีน้ำเงินและขนาดของ size standard ที่มีสีแดง (ดังแสดงในภาพที่ 10) ซึ่งจำเป็นจะต้องนำข้อมูลดิบที่ได้นี้มาวิเคราะห์เพื่อหาขนาดโดยโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis อีกครั้ง ซึ่งสามารถทำได้โดยเปิดโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis เลือก open ที่ file บนแถบเครื่องมือ จะปรากฏหน้าต่าง open existing ขึ้นมา แล้วให้เลือกเปิดที่ project จะปรากฏหน้าต่าง analysis control ซึ่งสามารถเลือก

ข้อมูลตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ได้ โดยเลือกที่ project บนแถบเครื่องมือ แล้วเลือก add sample files ซึ่งก่อนที่จะทำการวิเคราะห์จะต้องเลือกชนิดของสีที่ใช้เพื่อให้โปรแกรมจดจำ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้สี fluorescent 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ที่ถูกติดฉลากด้วยสี 6-FAM ซึ่งจะปลดปล่อยแสงสีน้ำเงินออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ ให้เลือกในช่องตัว B (สีน้ำเงิน) และใช้สี ROX ซึ่งจะปลดปล่อยแสง สีแดงในการติดฉลากที่ size standard ให้เลือกในช่องตัว R (สีแดง) หลังจากนั้นให้เลือกชนิดของ size standard และเลือกใช้พารามิเตอร์ที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ โดยในช่องพารามิเตอร์ที่เป็น analysis rang วิเคราะห์แบบ full range และในช่องที่เป็น data processing จะกำหนดให้เป็นแบบ baseline และ multicomponent และในช่อง smooth options จะเลือกเป็นแบบ light และตั้งค่า peak detection โดยตั้งค่า peak amplitude thresholds โดยกำหนดที่ B=100 และ R=100 จากนั้นเลือกวิธี size call เป็นแบบ all size และเลือก size calling method เป็นแบบ local southern method (29-539 นิวคลีโอไทด์) ทำการกำหนดค่า split peak correction เป็นแบบ left most peak แล้วจึงใช้คำสั่ง analyze จะปรากฏหน้าต่าง result control ขึ้นมา จึงตั้งค่า panel ตามจำนวนของตัวอย่างที่วิเคราะห์ และเลือกสีของตัวอย่าง ซึ่งเลือกเฉพาะสีน้ำเงินซึ่งเป็นสีของผลผลิตพีซีอาร์ โดยแต่ละ panel จะเลือกสีเพียง 1 ตัวอย่าง เพื่อให้แสดงผลเฉพาะตัวอย่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ หลังจากนั้นจึงใช้คำสั่ง display โปรแกรมก็จะแสดงผลที่ได้ ซึ่งจะมีการบอกทั้งขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ความสูงและความกว้างของ peak ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อไปได้ด้วยโปรแกรม Genotyper[®] 2.0

การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลโดยชุดโปรแกรม Genotyper[®] 2.0

โปรแกรม Genotyper[®] 2.0 สามารถใส่ตัวเลขขนาดของ peak ใน electrophorogram ได้ โดยเปิดโปรแกรม Genotyper[®] 2.0 จากนั้นเลือกเมนู file บนแถบเครื่องมือ และเลือกใช้คำสั่ง import GeneScan file (s) ก็จะมีหน้าต่างใหม่ขึ้นมาเพื่อให้เลือกข้อมูล GeneScan file ซึ่งสามารถเลือกได้มากกว่า 1 file แล้วใช้คำสั่ง import เพื่อนำข้อมูลจากโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis เข้ามาสู่โปรแกรม Genotyper[®] 2.0 จากนั้นเลือกชนิดของสีที่ใช้ในการทดลองซึ่งในที่นี้หมายถึงสีของผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดังนั้นจึงเลือกที่เมนู B จะปรากฏรูป electrophorogram ของตัวอย่างที่เลือกนำมาวิเคราะห์ จากนั้นจึงเลือกที่สัญลักษณ์ “~” ที่อยู่ในแถบเครื่องมือบริเวณด้านขวาของหน้าต่าง ซึ่งจะปรากฏหน้าต่าง plot ขึ้นมา จากนั้นจึงใช้เมนู analysis บนแถบเครื่องมือและเลือกคำสั่ง label peak โดยกำหนดให้เป็นแบบ size in base pair แล้วกด OK โปรแกรมก็จะติดฉลากขนาดของแต่ละ peak และสามารถใช้คำสั่งอื่น ๆ ได้อีกในการแก้ไขการติดฉลากให้มีความถูกต้อง

การสร้าง phylogenic tree จากเครื่องหมายโมเลกุลด้วยโปรแกรม MacVector™ 7.2.3

ข้อมูลขนาดผลผลิตพีซีอาร์จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์ได้ด้วยโปรแกรม MacVector™ 7.2.3 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการแปลงให้อยู่ในรูปรหัสตัวอักษรภาษาอังกฤษ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ ซึ่งได้กำหนดรหัสไว้ดังต่อไปนี้ คือ ตำแหน่งที่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น มี peak ที่สูงกว่าหรือเท่ากับค่า amplitude threshold ที่กำหนดไว้ และสามารถวิเคราะห์ขนาดได้จากโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 analysis กำหนดให้มีรหัสเป็นตัวอักษร A และตำแหน่งที่ไม่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น ไม่มี peak เกิดขึ้นแทนด้วยตัวอักษร L เมื่อได้ข้อมูลเป็นลำดับรหัสที่ได้กำหนดไว้แล้ว จะต้องบันทึกข้อมูลให้อยู่ในรูปแบบของ MacVector™ 7.2.3 ทำได้โดยการเปิดโปรแกรมขึ้นมา ที่เมนู file เลือกช่องที่เป็น new จะปรากฏหน้าต่างใหม่ขึ้นมา จากนั้นใส่ข้อมูลรหัสที่ได้ลงไป และทำการบันทึกข้อมูล โดยบันทึกข้อมูลของแต่ละตัวอย่างแยกกัน ซึ่งแต่ละ file จะหมายถึงเชื้อแต่ละชนิด จากนั้นก็จะทำการวิเคราะห์ข้อมูล โดยเปิด file ข้อมูลของตัวอย่างทั้งหมดที่จะทำการวิเคราะห์ขึ้นมาพร้อมกัน แล้วเลือกเมนู analysis จากแถบเครื่องมือ จะปรากฏเมนูของรูปแบบวิธีที่จะใช้ในการวิเคราะห์ เลือกที่เมนู clustalW alignment โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) จะปรากฏหน้าต่าง analysis ขึ้นมา แล้วเปลี่ยนคำสั่งในช่องให้เป็น multiple alignment ในเมนูที่เป็น matrix ให้เลือกเป็นแบบ identity หลังจากนั้นให้กด OK จะปรากฏหน้าต่าง alignment views ขึ้นมาแล้วจึงให้เลือกวิธีที่ใช้ในการแสดงผลจากช่อง picture display โดยทำเครื่องหมายที่ช่อง guide tree แล้วกด OK ก็จะแสดงผลการวิเคราะห์ออกมาในรูปแบบ phylogenic tree