

ผลการทดลอง

การจัดกลุ่มยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบในเลปโตสไปรา

ยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบในเลปโตสไปรา มีทั้งหมด 25 ยีน สามารถจัดกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 5 ยีน คือ ยีน LA3320, LA3321, LA3322, LA3323 และ LA3324 ซึ่งมีระยะห่างระหว่างยีน LA3320 กับ LA3321, ยีน LA3321 กับ LA3322, ยีน LA3322 กับ LA3323 และ ยีน LA3323 กับ LA3324 เท่ากับ 203, 48, 204 และ 200 คู่เบส ตามลำดับ กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 ยีน คือ ยีน LA2964 และ LA2966 มีระยะห่างระหว่างกันเท่ากับ 28 คู่เบส กลุ่มที่ 3 มีจำนวน 6 ยีน คือ ยีน LA2443, LA2446, LA2447, LA2448, LA2450 และ LA2452 ซึ่งมีระยะห่างระหว่างยีน LA2443 กับ LA2446, ยีน LA2446 กับ LA2447, ยีน LA2447 กับ LA2448, ยีน LA2448 กับ LA2450 และ ยีน LA2450 กับ LA2452 เท่ากับ 1547, 58, 71, 210 และ 2321 คู่เบส ตามลำดับ กลุ่มที่ 4 มีจำนวน 2 ยีน คือ ยีน LA1353 และ LA1354 ซึ่งมีระยะห่างระหว่างกันเท่ากับ 75 คู่เบส และกลุ่มสุดท้ายกลุ่มที่ 5 มีจำนวนทั้งหมด 10 ยีน คือ ยีน LA0701, LA0705, LA0873, LA1177, LA1324, LA1498, LA1530, LA2862, LA3028 และ LB196 ยีนในกลุ่มนี้เป็นยีนที่มีระยะห่างระหว่างกันมากกว่ายีนในกลุ่มอื่น ๆ (มากกว่า 3000 คู่เบส) และมีทิศทางยีนแตกต่างกันภาพที่ 2 แสดงการจัดตำแหน่งของยีนในแต่ละกลุ่ม

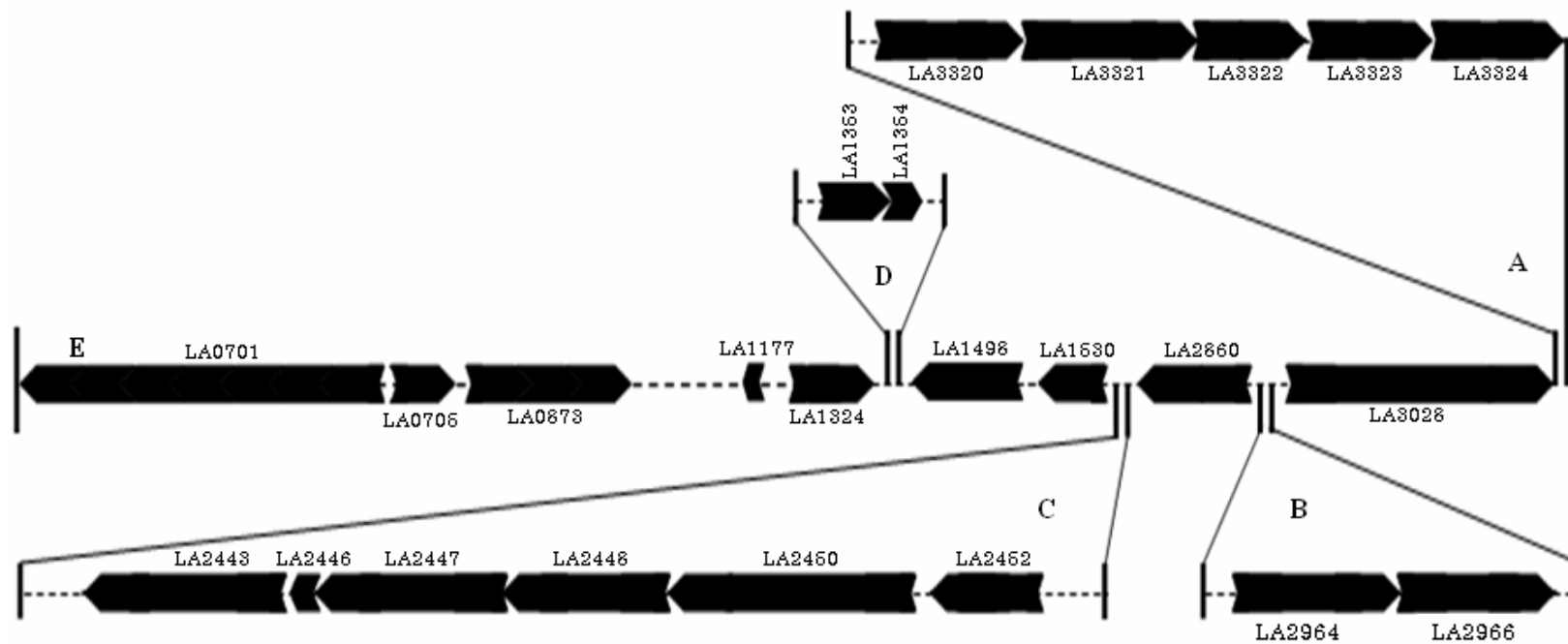
ยีนกลุ่มที่ 1 มีตำแหน่งแทรกอยู่ในบริเวณทางด้านปลาย 3' ของยีน LA3028

ยีนกลุ่มที่ 2 มีตำแหน่งระหว่างยีน LA2860 กับ LA3028

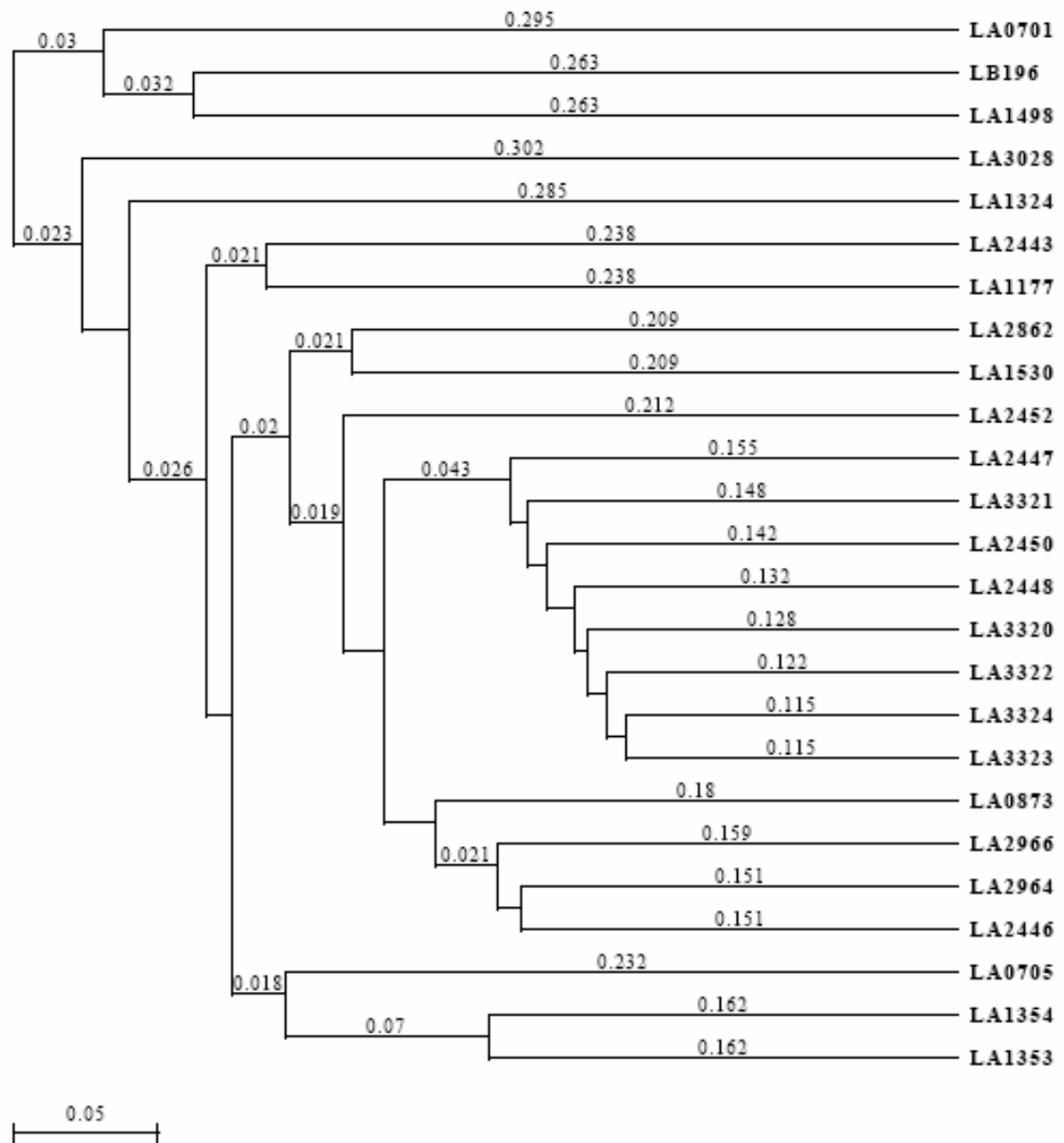
ยีนกลุ่มที่ 3 มีตำแหน่งระหว่างยีน LA2860 กับ LA1530

ยีนกลุ่มที่ 4 มีตำแหน่งระหว่างยีน LA1324 กับ LA1498

ผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 25 ยีน โดยการทำ multiple sequence alignment และสร้าง phylogenetic tree ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่ายีนในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 4 มีความเหมือน และได้รับจัดกลุ่มรวมอยู่ด้วยกัน ในขณะที่ยีนในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีความเหมือนน้อย แต่ก็ยังจัดอยู่ใกล้กัน



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของยีนที่คาดว่าสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR แต่ละยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ตามกลุ่มที่ได้จัดแบ่ง โดยที่ A คือ ยีนในกลุ่มที่ 1 B คือ ยีนในกลุ่มที่ 2 C คือ ยีนในกลุ่มที่ 3 D คือ ยีนในกลุ่มที่ 4 และ E คือ ยีนในกลุ่มที่ 5 ซึ่งทิศทางของลูกศรหมายถึงทิศทางของยีน และอัตราส่วนความยาวของยีน 1 เซนติเมตร ต่อ 500 คู่เบส



ภาพที่ 3 การทำ phylogenetic tree แบบวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม ClustalW version 1.4 ของยีนที่คาดว่าเป็ยีนที่สร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR ทั้ง 25 ยีน

การออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่ได้รับการทำนายว่าควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วน LRR

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในส่วนที่เป็นตำแหน่ง LRR ในยีนแต่ละกลุ่มที่แบ่งได้ มาทำ multiple sequence alignment เพื่อหาส่วนที่มีการอนุรักษ์และนำมาใช้ประกอบกับการออกแบบไพรเมอร์ที่ต้องการของยีนในกลุ่มที่ 1, กลุ่มที่ 2, กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 พบว่ามีตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ โดยที่ยีนในกลุ่มที่ 1, กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 สามารถที่จะนำส่วนที่มีการอนุรักษ์มาออกแบบไพรเมอร์ได้ ในขณะที่ยีนในกลุ่มที่ 4 มีส่วนที่มีการอนุรักษ์ แต่ไม่สามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ให้มีผลผลิตพีซีอาร์ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ได้ เพราะเป็นบริเวณช่วงสั้น ๆ ประมาณ 100 คู่เบส (ยีนในกลุ่มนี้มีจำนวนซ้ำ 2-3 ซ้ำเท่านั้น) ส่วนยีนในกลุ่มที่ 5 ซึ่งเป็นกลุ่มที่แต่ละยีนมีความแตกต่างกันทั้งขนาดและส่วนที่มีการอนุรักษ์ ดังนั้นจึงไม่ได้นำยีนในกลุ่มนี้มาออกแบบไพรเมอร์ จำนวนไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากกลุ่มที่ 1, กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยบริเวณที่มีการอนุรักษ์ของยีนในแต่ละกลุ่ม และบริเวณที่เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ ดังแสดงในภาพที่ 4-ภาพที่ 7

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 3 กลุ่ม กับยีนในแต่ละกลุ่มที่ได้นำมาออกแบบโดยโปรแกรม MacVector™ 7.2.3 พบว่าไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 1 (LR1 LR2 LR3) คาดว่าให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่เป็น major PCR product เท่ากับ 479, 65, 316, 341 และ 385 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตที่มาจากยีน LA3320, LA3321, LA3322, LA3323 และ LA3324 ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์กลุ่มที่ 2 (LR4 LR5) คาดว่าให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่เป็น major PCR product เท่ากับ 771 และ 777 คู่เบส ซึ่งผลผลิตที่มาจากยีน LA2964 และ LA2966 ตามลำดับ ส่วนที่เหลือไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 (LR6 LR7 LR8) คาดว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่เป็น major PCR product เท่ากับ 516 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตที่มาจากยีน LA2447, LA2448 และ LA2450 ส่วนขนาดผลผลิตพีซีอาร์อื่น ๆ ที่คาดว่าเป็น minor PCR product ของไพรเมอร์ในกลุ่มต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm (°C)
1	Forward primer LR1	5'-CGTTGGATTTGGGTAGTAACC-3'	50.5
	Reverse primer LR2	5'-CAAGTTCTTCAGTTGTCCGATT-3'	50.3
	Reverse primer LR3	5'-TGTGGAAGAGTTGTGAGTTGG-3'	49.9
2	Forward primer LR4	5'-CAACTCGCTACTCTACCAGAAG-3'	48.2
	Reverse primer LR5	5'-CGATAGAAGTGGGTTGTTATGC-3'	50.9
3	Forward primer LR6	5'-CGAGTTTTGGATTTGAGTGG-3'	49.7
	Reverse primer LR7	5'-TGTGAGTTGGTTATCGCTC-3'	45.4
	Reverse primer LR8	5'-TGTGAGTTGATTCTCACTC-3'	38.5

ตารางที่ 7 ตำแหน่งจับของไพรเมอร์และขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดว่าจะได้ในแต่ละยีน

กลุ่มที่	ยีน	ขนาดผลผลิต พีซีอาร์ ที่คาดว่าจะได้ (คู่เบส) และตำแหน่งของยีนที่ถูกไพรเมอร์จับได้
1	LA3320	479 (494-972) 134 (839-972) 203 (770-972)
	LA3321	65 (1052-1116) 134 (1052-1185)
	LA3322	316 (362-677) 454 (224-677) 178 (224-401)
	LA3323	314 (434-774) 134 (434-567) 410 (434-843)
	LA3324	385 (212-596) 247 (212-458) 454 (212-665)
2	LA2964	771 (454-1224)
	LA2966	777 (394-1170)
3	LA2443	-
	LA2446	-
	LA2447	516 (5-520)
	LA2448	516 (5-520) 585 (5-589) 654 (5-658)
	LA2450	516 (5-520) 654 (5-658) 1026 (5-1210)
	LA2452	-

```

LA3324 ...438 CCAACTTACAACCTCTTCCTAAGGAAATCGAGCAATTGAAGAACTTGCAAA
LA3323 ...384 CCAACTTACAACCTCTTCCACAAGAAATTTGGACAACCTACAGAACCTTGCAAT
LA3322 ...313 TCAACTTAAAACCCCTTCTAAGGAAATCGGAAAACTACAGAACCTTGAAAT
LA3321 ...796 CCAACTCACAACCTCTCCGAAAGAAATCGGACAACCTACAGAATTTACAAC
LA3320 ...483 CCAATTGCAACTTTTCTAAGAAATTTGGACAACCTACAGAATTTAAAAG
*** *LR1* * * * *LR3* * * * *
LA3324 CTTTGTATTTGGGTAATAACCGACTTACAACCTTTCCGAAAGAAATCGAA
LA3323 CGTTGGATTTGAGTACTAACCGACTCACAACCTCTTCCACAAGAAATTTGGA
LA3322 CGTTGGATTTGGGTAGCAACCAACTCACAATCCTTCCAAAGGAAATCGGA
LA3321 GGTGATTTTGCATCAAAACCAACTCACAACCTCTCCGAAAGAAATCGGA
LA3320 TGTGTTTGTGAATAATAACCAATCACAATCTTCCCAACGAAATCGCA
*** * * * *
LA3324 CAATTGAAGAAATTTGCAATTGTTGTATTTATATGATAACCAACTCACAGT
LA3323 CATCTACAGAATTTGCAAGATTTGTATTTGGTTTCTAACCAACTCACAAT
LA3322 CAACTACAGAATTTGCAAAATTTGAATTTATGGAATAATCAACTTAAAC
LA3321 CAGCTACAGAATTTACAAGAGCTCTGTTTAGATGAGAATCAACTCACGAC
LA3320 AAATAAAAAAGCTACAATACTTATATTTAAGCGACAATCAACTCATAAC
* * * * *
LA3324 TCTTCCACAAGAAATAAAACAACTGAAAAATTTACAATTGTTGGATTTAA
LA3323 TCTTCTAACGAAATCGGACAATTAAAGAACTTGCAACCGTTGAATTTGC
LA3322 TCTTCTAAGGAAATTTGGACAATTACAGAACTTGCAAAAAATGAATTTAG
LA3321 TCTTCCGAAAGAAATCGAGCAATTACAAAACCTTACGAGTCTTGATTTGG
LA3320 CCTTCCGAAAGAAATAGAGCAATTGAAGAACTTGCAACCGTTGGATTTGA
***** * * * *
LA3324 GTTATAACCAACTCAAACTCTTCTAAGGAAATCGAGCAATTGAAGAAC
LA3323 GTAATAACCGACTCACTACTCTTCTAAGAAATTTAGGCAACTACAGAAT
LA3322 ATAAAAACAGGCTCAATACACTTCTAATGAAATTTGGACAACCTACAGAAT
LA3321 ATAATAACCAACTCACGACTCTTCCGAAAGAAGTCTACGGCTACAGAGC
LA3320 GTTATAACCAACTTACAATACTTCTAAGGAAGTCGGACAATTAGAAAAT
* * * * *
LA3324 TTGCAAGAGTTGAATTTGGGTTATAACCAACTCACAGTTCTTCTAAGGA
LA3323 TTGAAATCGTTGGATTGCGTTCTAACCAACTTACTACTTTTCTAAGGA
LA3322 TTGGAATCGTTGTATTTGAATTATAACCAACTCACTATACTTCCAAAAGA
LA3321 TTGCAAGTGTGTTGGCTTTGGGTAGTAACCGACTCTCAACCTTCCGAAAGA
LA3320 TTGCAACCGTTGGATTTGCGTAATAACCAACTCAAACTCTTCCGAAAGA
*** * * * *
LA3324 AATCGAGCAATTGAAGAACTTGCAAAACATTATATTTGGGTTATAACCAAC
LA3323 AATCGAGCAATTGAAGAAATTTGCAAGTTTGGATTGTTGGGTTCTAACCAAC
LA3322 AATTGGACAACCTACAGAATTTGGAATCGTTGTATTTGAATTATAACCAAC
LA3321 AATCGGACAATTGCAGAACTTGCAAGTGTGTTGGGTTGATTAGTAACCAAC
LA3320 AATAGAGCAATTGAAGAACTTACAAACGTTGTTTTGAATAATAACCAAC
*** * * * *
LA3324 TCACTACTCTTCCGAAAGAAATTTGGACAACCTACAGAATTTGAAAGTGTG
LA3323 TCACTACTCTTCCAGAGGGAATCGGACAATTGAAGAACTTGCAACATTG
LA3322 TCACAATGCTTCCACAAGAAATTTGGACAACCTACAGAATTTGGAAGGGTTG
LA3321 TCACGACTCTTCCGAAAGAAATCGGACAATTACAGAACCTTGCAAGAGCTC
LA3320 TCACAATACTTCCACAAGAAATCGGAAAACTGAAGAAATTTGTTATGGTTG
**** * * * *
LA3324 TTTTGAATAATAACCAACTCACTACTCTTCCGAAAGAAATCGGACAAC
LA3323 GATTTGGATTCTAACCAACTTACAACCTCTTCCACAAGAAATCGGACAAC
LA3322 TATCTGAAATATAATCAACTCACAACCTTCTAAGAAATTTGGACGACT
LA3321 TGTTTGGATGAGAATCAACTCACAACCTTCTAAGGAAATCAGGCAACT
LA3320 AGTTTGGTTTATAACCAACTCACTACTCTTCTAAGGAAATCGGACAAT
* * * * *
LA3324 GAAGAACTTGCAAGAAATGTTATTTAAACAACAATCAACTCTCAATCGAAG 937...
LA3323 ACAGAATTTGCAAGAAATGTTTTTAAACAACAATCAACTCTCATCCCAAG 983...
LA3322 ACAGAATTTGAAAGGTTGTATCTGAAATATAATCAATTCTCATCCCAAG 812...
LA3321 GAAAAATTTACAAGAGTTGCATTTGATTTGAATCCTCTCATCCCAAG 1295...
LA3320 GAAGAACTTACAAACATTGTATTTAAACAACAACCAATCTCATCCCAAG 1082...
* * * * *

```

ภาพที่ 4 การทำ multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วน LRR ของยีนในกลุ่มที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยยีน LA3320, LA3321, LA3322, LA3323 และ LA3324 โดยที่เครื่องหมาย * แสดงถึงส่วนที่มีการอนุรักษ์ และตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของไพรเมอร์

LR4

```

LA2966 ...298 AATAATCAACTCACTACTCTTCCAGAAGAAATCGGAAAACCTACAAATCT
LA2964 ...449 CATAACCAACTCGCAACTCTACCAGAAGACATCGAACAATTACAAAGATT
      *****
LA2966 ACAAAGAGTTGAATTTATTTGTTAATCGACTTAACATCCTTCCAAAGGAAA
LA2964 ACAAACATTGTATTTGGGTCTATAACCAATTTAACTCTATTCTCAAAGAGA
      *****
LA2966 TCGGACGACTACAAAATTTACAAGAGTTATATTTGTCTCTTAATCGGCTT
LA2964 TTGGACAATTACAAAATTTAGAATCATTAGGTTTGGATCATAATCAACTT
      *****
LA2966 ACAATCCTTCCAGAAGAAATTGGACAATTAGAGAGTTTACGAAAGTTGAG
LA2964 AACGTCCTTCCCAAAGAAATTGGACAACCTCGAAATTTAGAATCATTAGG
      *****
LA2966 TTTGGGTGGTAAGAATAAGCCATTACGATTCTTCCAAAAGAAATCACGC
LA2964 TTTGGATC-----ATAACCAACTTAACGTCCTTCCCAAAGAAATTGGAC
      *****
LA2966 AGCTTCAGAATTTACAAGAGTTGCATTTGAAATTTAACCGGCTCACGGTC
LA2964 AACTTCAAATTTACAAATATTACATTTGCGTAATAACCAACTCACAAC
      *****
LA2966 CTTCCCAAAGAAATTGGACAACCTTCAAATTTGCGGATATTAGATTTGTA
LA2964 CTTCCCAAAGAAATCGGGCAGCTTCAGAATTTACAAAAGTTACTTTTAAA
      *****
LA2966 TCAAAACCGACTCACGATTCTTCCGAAAGAAATTGGACAACCTCAAATTT
LA2964 TAAAAACAACTCACAACCTCTTCCCAAAGAAATTGGTCAGCTTCAGAATT
      *****
LA2966 TACTAGTATTGGATTTGTCTGGTAACCACTTACAATCTTCCGAAAGAA
LA2964 TACAAAAGTTGAAATTTGTATGAAAACCAACTTACAACCTTCCGAAAGAG
      *****
LA2966 ATCACACAACCTCAGAATTTACAAGAATTGAATTTGGAATACAATCGATT
LA2964 ATTGGACAACCTACAAAATTTACAAGAGTTGGATTTAGATGGTAACCACT
      *****
LA2966 CGAAGCTTTTCCAAAAGAAATCACACAGTTTCAGAATTTACAAGTGTGTTG
LA2964 CACAACCTCTACCAGAAAACATCGGACAATTACAGAGGTTACAAACGTTGT
      *****
LA2966 ATTTGTATCAAAACCGACTCACGACTCTTCCAAAAGAAATTGGACAATTG
LA2964 ATTTGGGTAATAATCAACTTAACCTTCTTCCAAATAAAGTAGAACAATA
      *****
LA2966 CAGAATTTACAAAAGTTGCATTTGAGTAGAAACCAACTTACGACTCTTCC
LA2964 CAAAATTTAGAATCATTAGATCTGGAGCATAACCAACTTAACGCCCTTCC
      *****
LA2966 GAAAGAGATTGGACGATTGCAAAAGTTAGAATCATTGGGTTTGGATCATA
LA2964 CAAAGAAATTGGAAAATTGCAAAAGTTGCAAAACCTGAATTTGAAATATA
      *****
LA2966 ATCAACTGCGACTCTTCCCGAGGAGATCAACCAACTAAAGAACTTAAAA
LA2964 ATCAACTGCGACTCTTCCCGAGGAGATCAACCAACTAAAGAACTTAAAA
      *****
LA2966 AAGTTGTATTTGCATAACAACCCACTTCTATCGGAAAAAATAGAAAGAAT 1188...
LA2964 AAGTTGTATTTGCATAACAACCCACTTCCATCGGAAAAAATAGAAAGAAT 1242...
      *****

```

ภาพที่ 5 การทำ multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วน LRR ของยีนในกลุ่มที่ 2 ซึ่งประกอบด้วยยีน LA2964 และ LA2966 โดยที่เครื่องหมาย * แสดงถึงส่วนที่มีการอนุรักษ์ และตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของไพรเมอร์

LR6

```

LA2450 ...151 AATGTTGAGTTTTGAATTTGAGTGGACAAAATTTACACAACCTTCCTAA
LA2448 ...145 AATGTTGAGTTTTGGATTTGAGTGGACAAAATTTACACAACCTTCCTAA
LA2447 ...145 GATGTTGAGTTTTGAATTTGAGTGGAGAAAACTCACAGCTCTCCCAA
*****
LA2450 GGAAATTGAACAACTAAAGAATTTACAGGAATTAGATTTAGGTGATAACC
LA2448 GGAAATTGAACAACTGAAGAACTTGCAAAAGTTGTATTTATTTGATAACC
LA2447 AGAAATCGGACAGCTGAAGAAATTTACAAGAGTTGAATTTAAAAATGGAACC
*****
LA2450 AACTCGCACTTTTCTGCGTAATAGTAGAGTTACAGAAGTTAGAAAGT
LA2448 GACTCAAACTCTTCTAAGGAAATCGGACAATTGAAAAATTTGCAAGAG
LA2447 TACTCACAGTTCTTCCAAAGGAAATTTGGACAACCTGGAGAATTTACAGGAA
*****
LA2450 TTGGATTTTATCTGAGAACCGGCTTGTAATGCTTCCTAACGAAATAGGGCG
LA2448 TTGAATTTGAGTAGTAACCAACTCACGATACCTTCCTAAAGAAATCGGAAA
LA2447 TTAGATTTTACGTGATAACCAACTCGCACTTTTCTGCGTAATAGTAGA
**
LA2450 GTTACAAAATTTACAAGAGTTGGGTTTGTATAAAAACAACTTATTACTT
LA2448 ACTGGAAAATTTACAAGAGTTGGATTTATATGATAACAGACTCAAGATTC
LA2447 GTTACAGAAGTTAGAAAGTTTGGATTTATCTGAGAACCGACTCATAATAC
*
LA2450 TTCCAAAGGAAATCGGGCAATTACAGAATTTACAAACATTGAATTTGCAG
LA2448 TTCTATCGAAATCGGAAATTTACAAAATTTGCAAACTTATATTTAAGT
LA2447 TTCTAACGAAATAGGACGGCTACAGAATTTACAAGATTTGGGTTTGTAT
*****
LA2450 GATAACCACTCGCGACTCTTCTGTGCAAAATAGGACAACCTACAGAATTT
LA2448 AGTAACCACTGACAACTCTTCTAGGGAAAGCGGAAATCGGAGAATTT
LA2447 AAAAAACAACTTACTACTTTTCCAAAGGAAATAGGGCAGTTACAGAATTT
*****
LA2450 AGAAAAGTTGAATTTGCGGAAGAATCGACTCACAGTTCTTCCAAAGGAAA
LA2448 GCAAGAGTTGAATTTAAGTGATAATCAACTCACAACTCTTCCAAAGGAAA
LA2447 ACAAAGTTATGGTTATCTGAGAACCGACTCACAGCACTTCCAAAGGAAA
*****
LA2450 TAGGACAATTACAGAATTTACAAACATTGAATTTGCAGGATAACCAACTC
LA2448 TTGGACAACCTACAGAATTTACAAACGTTGAATTTGAAGAGTAATCAACTT
LA2447 TTGGTCAATTGAAGAATTTACAAACATTGGATTTGCAGGATAACCAATTC
*
LA2450 GCGACTCTTCTGTGCAAAATCGGACAACCTACAGAATTTGCAAACTGTTGGG
LA2448 ACAACTCTTTTAAAGAAATAGAACAAATTGAAGAATTTACAAACGTTGAA
LA2447 ACGATACTTCCAAAGAAATAGGACAATTACAGAATTTACAAACATTGAA
*
LR7 LR8
LA2450 TTTGAGTGAGATCAACTCACAACTTTCTAAGGAAATCGGACAGCTGG
LA2448 TTTGAGCGATAACCAACTCACAACTCTTCCAATTGAAATCGGAAAACCTAC
LA2447 TTTGAGCGATAACCAACTCGCAACTCTTCTGTGCAAAATCGGACAACCTAC
*****
LA2450 AAAATTTACAGAGTTGAATTTAAATGGAACCGACTCACAGCACTTCCA
LA2448 AAAATTTGCATACGTTGAATTTGAGCGATAACCAACTCACAACTCTTCCA
LA2447 AGAATTTACAGAGTTGTATTTGCGGAATAACCGACTCACAGCTTTTCCA
*
LA2450 AAGGAAATCGGACAATTGAAAAATTTAGAAAATTTGGAGTTGAGTGAGAA 801...
LA2448 ATTGAAATCGGAAAACCTACAAAATTTGCATACGTTGAATTTGAGCGATAA 795...
LA2447 AAGGAAATAGGACAACCTACAGAATTTGCAAAATGTTATGTTACCTGAAAA 795...
*

```

ภาพที่ 6 การทำ multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วน LRR ของยีนในกลุ่มที่ 3 ซึ่งประกอบด้วยยีน LA2443, LA2446, LA2447, LA2448, LA2450 และ LA2452 โดยที่เครื่องหมาย * แสดงถึงส่วนที่มีการอนุรักษ์ และตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้เป็นส่วนของไพรเมอร์

การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิง

จากการสกัดจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้สารฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24: 1: 1) และนำจีโนมที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพ และหาปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) พบว่าจีโนมดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณอยู่ในช่วง 52.5–535 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งถือว่าปริมาณมากพอสมควร แต่เมื่อตรวจสอบคุณภาพหรือค่าความบริสุทธิ์ของจีโนมดีเอ็นเอ พบว่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260} ต่อ OD_{280} มีค่าอยู่ในช่วง 1.0–1.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจีโนมดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์น้อย อาจปนเปื้อนสารแมคโครโมเลกุลอื่น ๆ ที่อาจจะมีผลต่อการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไปได้ จึงได้นำจีโนมดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยชุดการสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA mini kit (QIAGEN GbmH, Germany) แล้วจึงนำจีโนมดีเอ็นเอดังกล่าวมาตรวจสอบคุณภาพอีกครั้ง พบว่าจีโนมดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้นกว่าเดิม มีค่า OD_{260} ต่อ OD_{280} อยู่ในช่วง 1.8–2.0 แต่มีข้อสังเกตว่าจีโนมดีเอ็นเอมีปริมาณลดลงเหลือ 1–19.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ลดลงกว่าเดิมประมาณ 25–50 เท่า

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 2.5 % agarose gel electrophoresis

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อทดสอบไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบได้ทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 3) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 2.5% agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Kodak 1 D^R scientific image analysis (Eastman Kodak Company, USA) พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 เกิดแถบดีเอ็นเอจาง ๆ ในตัวอย่างเชื้อซีโรวาร Bataviae และ Canicola แต่เชื้อตัวอย่างเลปโตสไปราอ้างอิงชนิดอื่นที่นำมาทดสอบไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นชัดเจน (มีลักษณะเป็นปื้น) ดังแสดงในภาพที่ 8 ขณะที่ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 2 ไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในทุกตัวอย่างเลปโตสไปราอ้างอิงที่นำมาทดสอบ ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 พบว่าตัวอย่างเลปโตสไปราอ้างอิงที่นำมาทดสอบจำนวน 13 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นชนิดก่อโรค ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วงระหว่าง 100–600 คู่เบส ได้แก่ ซีโรวาร Bratislava, Autumnalis, Bataviae, Djasman, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Louisiana, Mini, Sejroe, Celledoni และ Cynopteri ส่วนที่เหลืออีก 11 สายพันธุ์ ทั้งเชื้อก่อโรคและไม่ก่อโรคไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 9

```

LA1354 ...64 AATTTAAAGAGTTGAATTTAGAGAACAATTCACCTACGACAATTCCTAA
LA1353 ...319 GATGTTGTTATTTCTGCATTGTAACGGTCAAGGATTTAAAAATCTTCGAG
          * * *          * * * * * * * * * * * * * * * *

LA1354      AGAAATCGGAAACTACAAAATTTAAATGGTTGCGTTTAGGGAGCAATT
LA1353      ACAATCGGAAATCTACAAAATTTAACAGAGTTGAATTTAGGGAGCAATT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

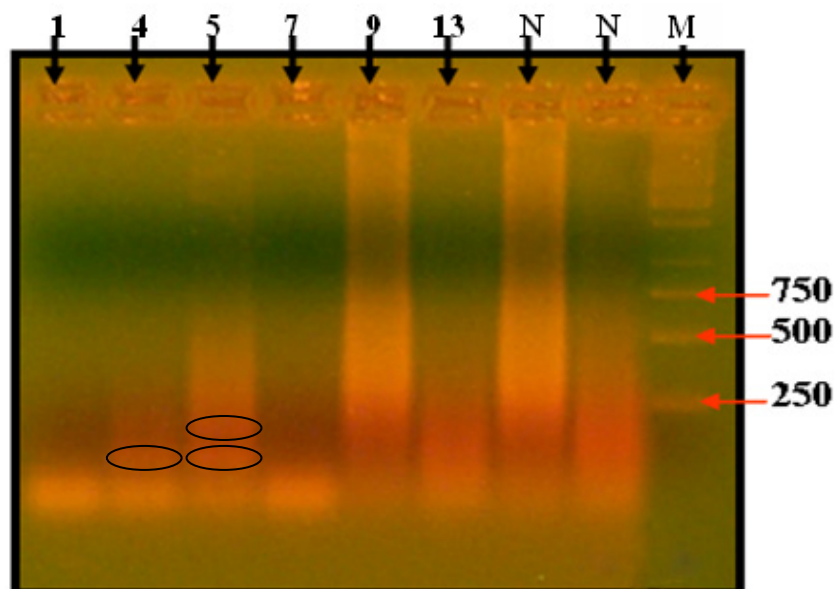
LA1354      CACTTACGACGCTTCCAAAAGAAATCGGAAACTACGGAATTTAAAGAG
LA1353      CACTTACGACAGTTCTTAAAGAAATCGGTGCGCTACGC          457...
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

LA1354      TTGGATTTGAGTTGGAATTCCTTTTCGGTCAAAGAGAAAAAGAGAATTG
LA1353

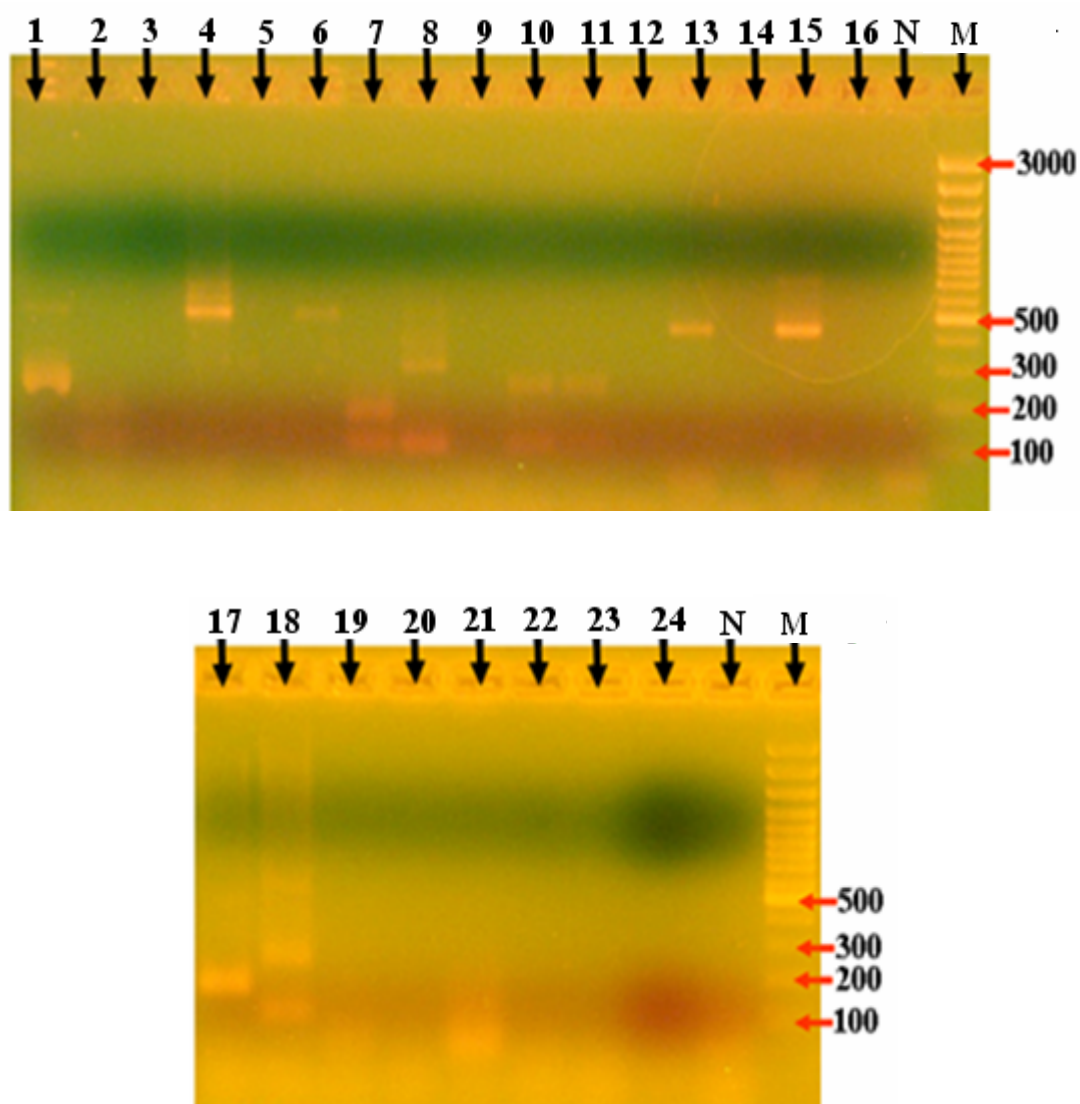
LA1354      AAAGTTACTTCCAAAATGTTCT 286...
LA1353

```

ภาพที่ 7 การทำ multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วน LRR ของยีนในกลุ่มที่ 4 ซึ่งประกอบด้วยยีน LA1533 และ LA1534 โดยที่เครื่องหมาย * แสดงถึงส่วนที่มีการอนุรักษ์



ภาพที่ 8 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์ กลุ่มที่ 1 โดย 2.5% agarose gel electrophoresis หมายเลข 1; Bratislava, 4; Bataviae, 5; Canicola, 7; Cynopteri, 9; Grippotyphosa, 13; Louisiana, N; negative (H₂O) และ M; 1 kb marker



ภาพที่ 9 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 โดย 2.5% agarose gel electrophoresis
 หมายเลข 1; Bratislava, 2; Autumnalis, 3; Ballum, 4; Bataviae, 5; Canicola, 6; Celledoni,
 7; Cynopteri, 8; Djasiman, 9; Grippytyphosa, 10; Hebdomadis, 11; Icterohaemorrhagiae,
 12; Javanica, 13; Louisiana, 14; Manhao, 15; Mini, 16; Panama, 17; Pomona,
 18; Pyrogenes, 19; Ranarum, 20; Sarmin, 21; Sejroe, 22; Shermani, 23; Tarassovi,
 24; Patoc, N; negative (H₂O) และ M; 100 bp marker

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์และการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลด้วย capillary electrophoresis

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธี capillary electrophoresis มีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้หาเครื่องหมายโมเลกุล เนื่องจากให้ข้อมูลที่ละเอียดมากกว่าการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis และบอกข้อมูลทั้งขนาดและปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 10 จากการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 กลุ่ม ด้วย agarose gel electrophoresis สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 เพื่อนำมาใช้ศึกษาต่อด้วยวิธี capillary electrophoresis โดยนำไพรเมอร์ทั้ง 2 กลุ่มนี้ มาติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสซิน (6-FAM) แล้วนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ก็ยังทดสอบในตัวอย่างเชื้อชนิดอื่น ได้แก่ *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus* และ *A. viridis* เพื่อเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้น

ผลการตรวจสอบจากการใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 พบว่าให้ผลผลิตพีซีอาร์ในตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราบางสายพันธุ์เท่านั้น โดยเฉพาะสายพันธุ์ *L. interrogans* และ *L. kirschneri* เกิดผลผลิตพีซีอาร์ชัดเจนกว่าสายพันธุ์ก่อโรคชนิดอื่น ๆ ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นชัดเจนเป็น peak หลัก ได้แก่ ขนาด 105, 132 และ 177 คู่เบส ส่วนสายพันธุ์ไม่ก่อโรค คือ *L. biflexa* และ *L. inadai* และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคบางชนิดไม่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 11 ความหลากหลายของเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้มีไม่มากนัก

สำหรับผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 โดยภาพรวมแล้วมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก (ไม่เกิน 600 คู่เบส) ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นบ่อย (common peak) ในเลปโตสไปราชนิดที่ก่อโรคที่ใช้เป็นอ้างอิงได้แก่ peak ที่มีขนาด 86, 98, 99, 170 และ 239 คู่เบส ส่วนในกลุ่มไม่ก่อโรคไม่พบว่ามีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น (ยกเว้นซีโรวาร์ Maintenon) และสามารถจัดแบ่งกลุ่มเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงโดยอาศัยจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้นได้ 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

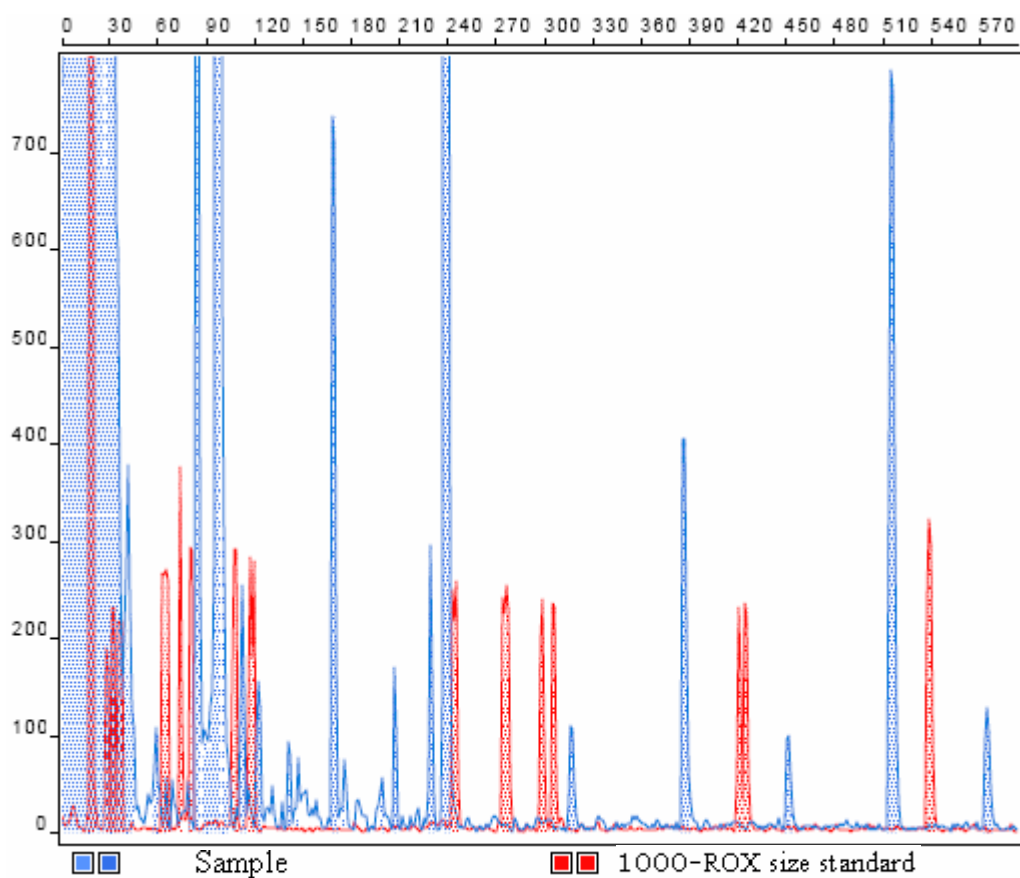
กลุ่มเชื้อที่ 1 เป็นกลุ่มเชื้อที่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลากหลาย (มากกว่า 5 ขนาด) โดยทั้งหมดเป็นเชื้อในกลุ่มก่อโรค และมีรายงานการระบาดเกิดขึ้นบ่อยครั้ง ได้แก่ *L. interrogans* (ซีโรวาร์ Autumnalis, Bataviae, Canicola, Djasiman, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona และ Pyrogenes), *L. nugochii* (ซีโรวาร์ Panama), *L. borgpetersenii* (ซีโรวาร์ Mini), *L. weilii* (ซีโรวาร์ Manhao) และ *L. kirschneri* (ซีโรวาร์ Cynopteri และ Grippotyphosa) ซึ่งเชื้อในกลุ่มนี้มี common peak ขนาด 86, 98, 99, 170 และ 239 คู่เบส คิดเป็นร้อยละ 69.2, 92.3, 92.3 และ 76.9 ตามลำดับ

นอกจากนี้แล้ว เมื่อพิจารณาเชื้อในกลุ่มนี้โดยเฉพาะจีโนสปีชีส์ *L. interrogans* พบว่า นอกจาก common peak ที่เกิดขึ้นแล้วยังมี peak อื่น ๆ ที่เกิดขึ้นที่มีความจำเพาะต่อจีโนสปีชีส์ คือ peak ขนาด 90, 95, 102, 113, 114 และ 230 คู่เบส ส่วนจีโนสปีชีส์ *L. kirschneri* พบว่า ทั้งซีโรวาร์ Cynopteri และ Grippotyphosa มีขนาดของ peak แตกต่างกันแต่ก็มี common peak ขนาด 98 และ 99 คู่เบส เหมือนกัน และมี peak ที่มีความจำเพาะต่อจีโนสปีชีส์ขนาด 138 คู่เบส โดยที่ลักษณะของ peak ขนาด ผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นของเชื้อในกลุ่มนี้ ดังแสดงในภาพที่ 12

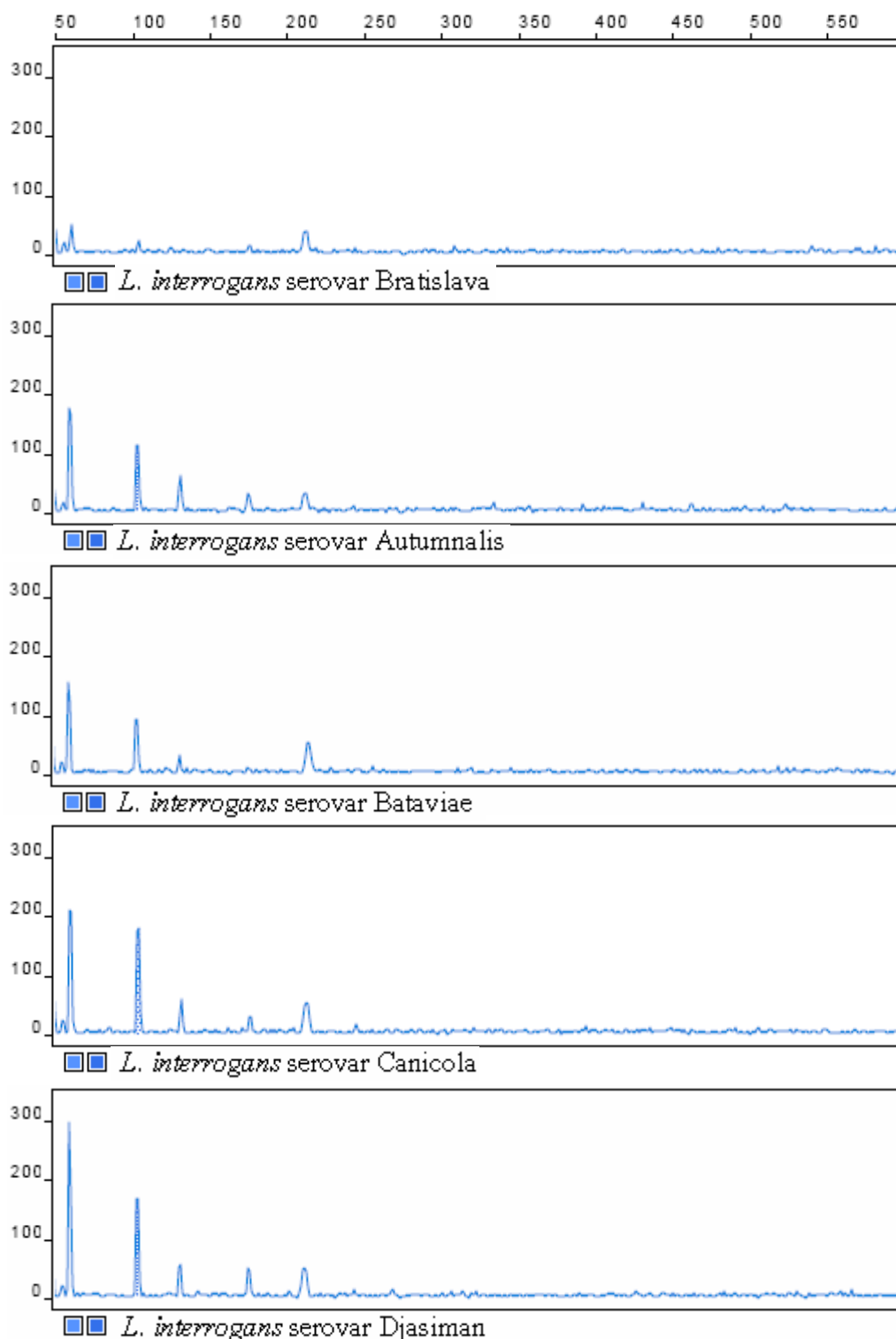
กลุ่มเชื้อที่ 2 เป็นกลุ่มเชื้อที่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นปานกลางหรือน้อย (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 ขนาด) ซึ่งสมาชิกในกลุ่มนี้เป็นเชื้อกลุ่มที่ก่อโรค ที่ค่อนข้างจะมีปัญหาในการจัดกลุ่มและ เป็นเชื้อที่ไม่ได้มีการรายงานการระบาดบ่อยครั้ง ประกอบด้วยเชื้อ *L. interrogans* (ซีโรวาร์ Bratislava), *L. nugochii* (ซีโรวาร์ Louisiana), *L. borgpetersenii* (ซีโรวาร์ Ballum, Javanica และ Tarassovi), *L. santarosai* (ซีโรวาร์ Shermani), *L. weilii* (ซีโรวาร์ Celledoni), *L. meyeri* (ซีโรวาร์ Ranarum และ Semaraga) และ *L. biflexa* (ซีโรวาร์ Maintenon) โดยที่ยังคงพบ common peak ขนาด 98 และ 99 คู่เบส เกิดขึ้น 50 และ 40% ตามลำดับ โดยมี peak อื่น ๆ ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 13

กลุ่มเชื้อที่ 3 เป็นกลุ่มเชื้อที่ไม่พบผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่มไม่ก่อโรค ได้แก่ *L. biflexa* (ซีโรวาร์ Andamana, Patoc และ Saopaulo), *L. inadai* (ซีโรวาร์ Inadai และ Lyme) และ *Leptonema illini* แต่สิ่งที่น่าสนใจ ในส่วนของเชื้อกลุ่มก่อโรค คือ *L. borgpetersenii* (ซีโรวาร์ Sejroe) และ *L. weilii* (ซีโรวาร์ Sarmin) พบว่าไม่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นด้วย

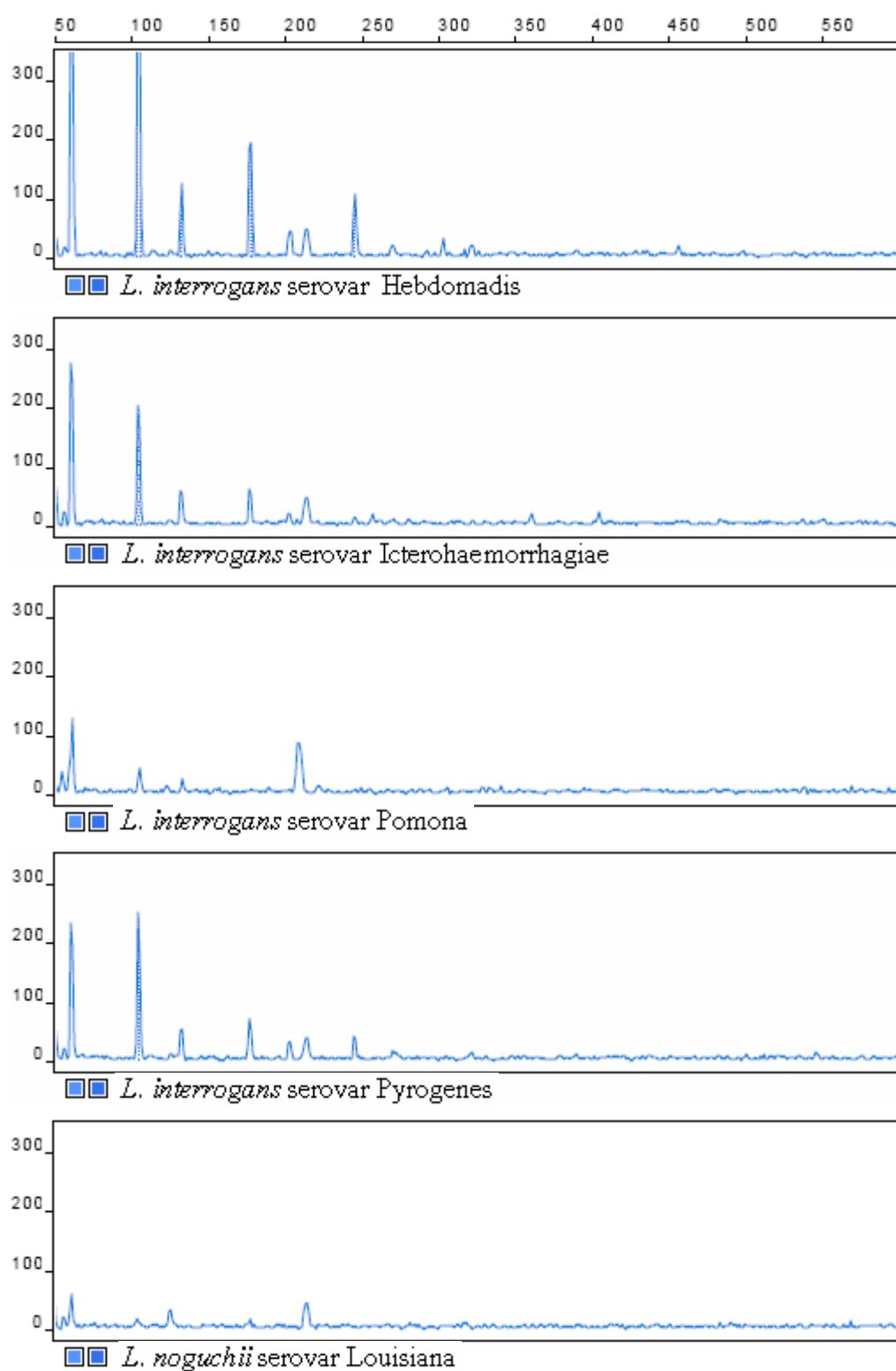
เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 เกิดขึ้นน้อยและไม่มีความหลากหลายของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 ดังแสดงในภาพที่ 14 ดังนั้นจึงได้เลือกศึกษาเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์และเครื่องหมายโมเลกุล เฉพาะที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 เปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลจากเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Icterohamorrhagiae กับเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ โดยใช้ไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 เชื้อแบคทีเรียที่นำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ *A. viridis*, *E. coli*, *Salmonella* sp. และ *S. aureas* พบว่ามีความหลากหลายของผลผลิตพีซีอาร์และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และจำนวนซ้ำที่เป็นรหัสสำหรับสร้างส่วนที่เป็น LRR ของยีนที่มีในเชื้อแบคทีเรียต่างสปีชีส์มีความแตกต่างกันด้วย ดังแสดงในภาพที่ 15



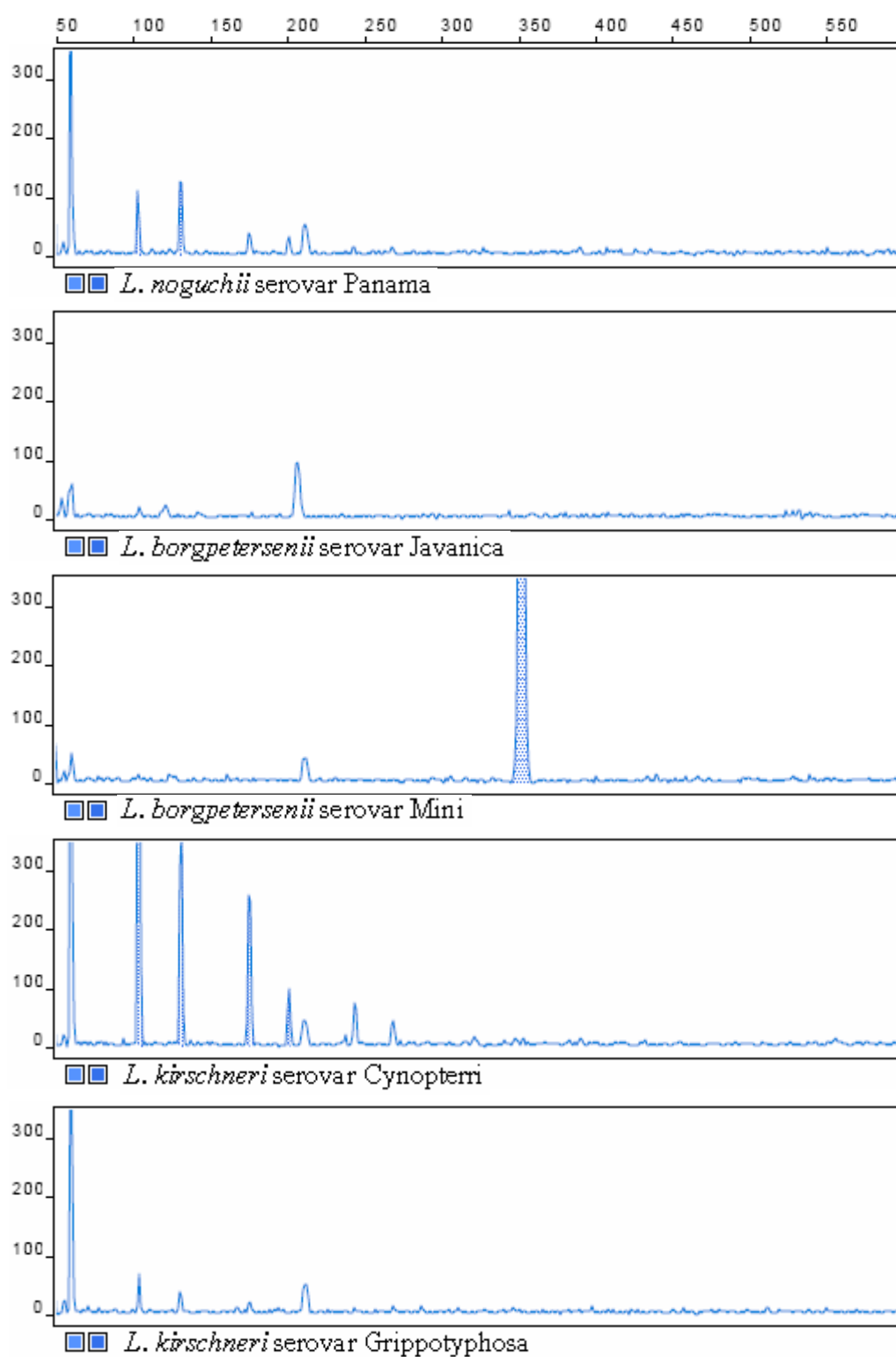
ภาพที่ 10 ตัวอย่างขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี capillary electrophoresis แสดงโดยโปรแกรม GeneScan[®] 2.1 โดยเส้นกราฟสีแดง คือ ขนาดต่างๆของ 1000-ROX size standard และเส้นกราฟสีน้ำเงิน คือ ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ แขน X แสดงถึงขนาดของซินติเอนเอ ซึ่งเคลื่อนที่ได้บน POP-4 และแกน Y แสดงถึงความเข้มข้นของ fluorescence ที่วัดได้ โดยพื้นที่ใต้กราฟหมายถึงปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้



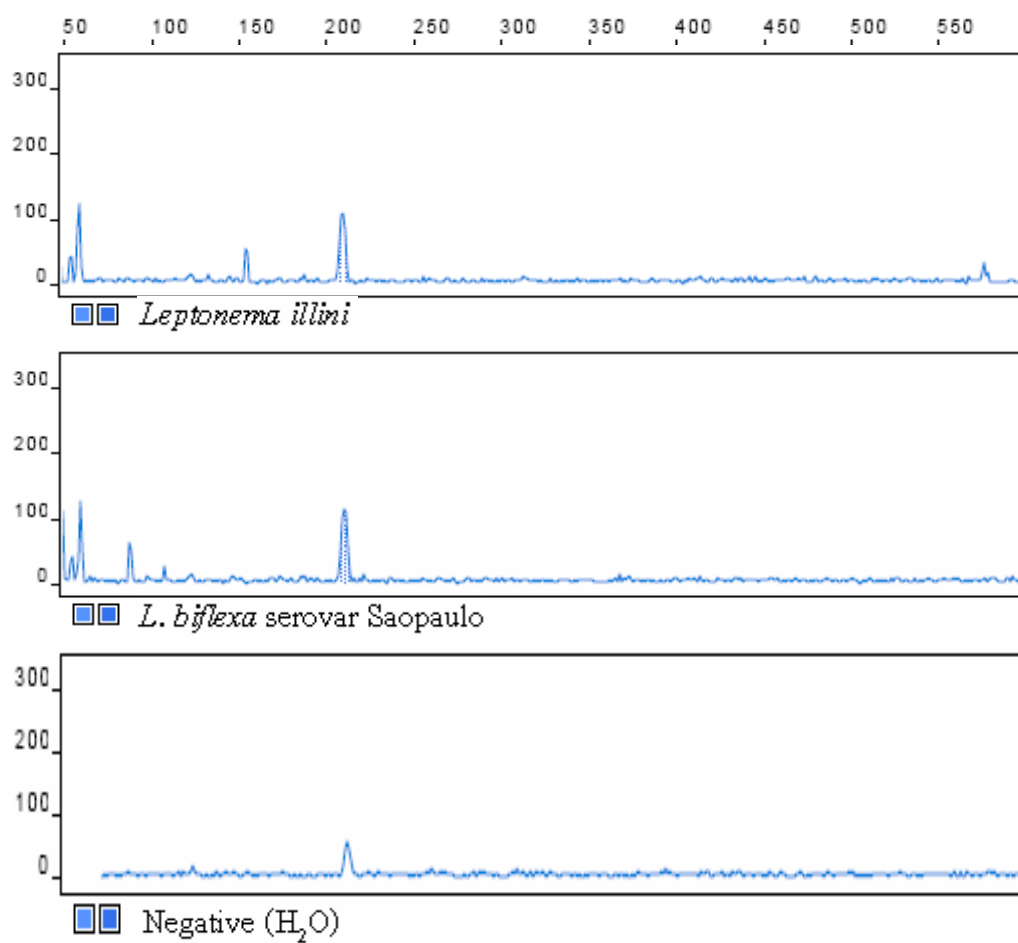
ภาพที่ 11 ขนาดผลผลิตฟลูออโรและเครื่องหมายโมเลกุลจากไฟรเมอร์กลุ่มที่ 1 ต่อตัวอย่างเชื้อ เลปโตสไปราสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยที่ แกน X แสดงถึงขนาดของขึ้นดีเอ็นเอ และ แกน Y แสดงถึงความเข้มข้นของ fluorescence ที่วัดได้



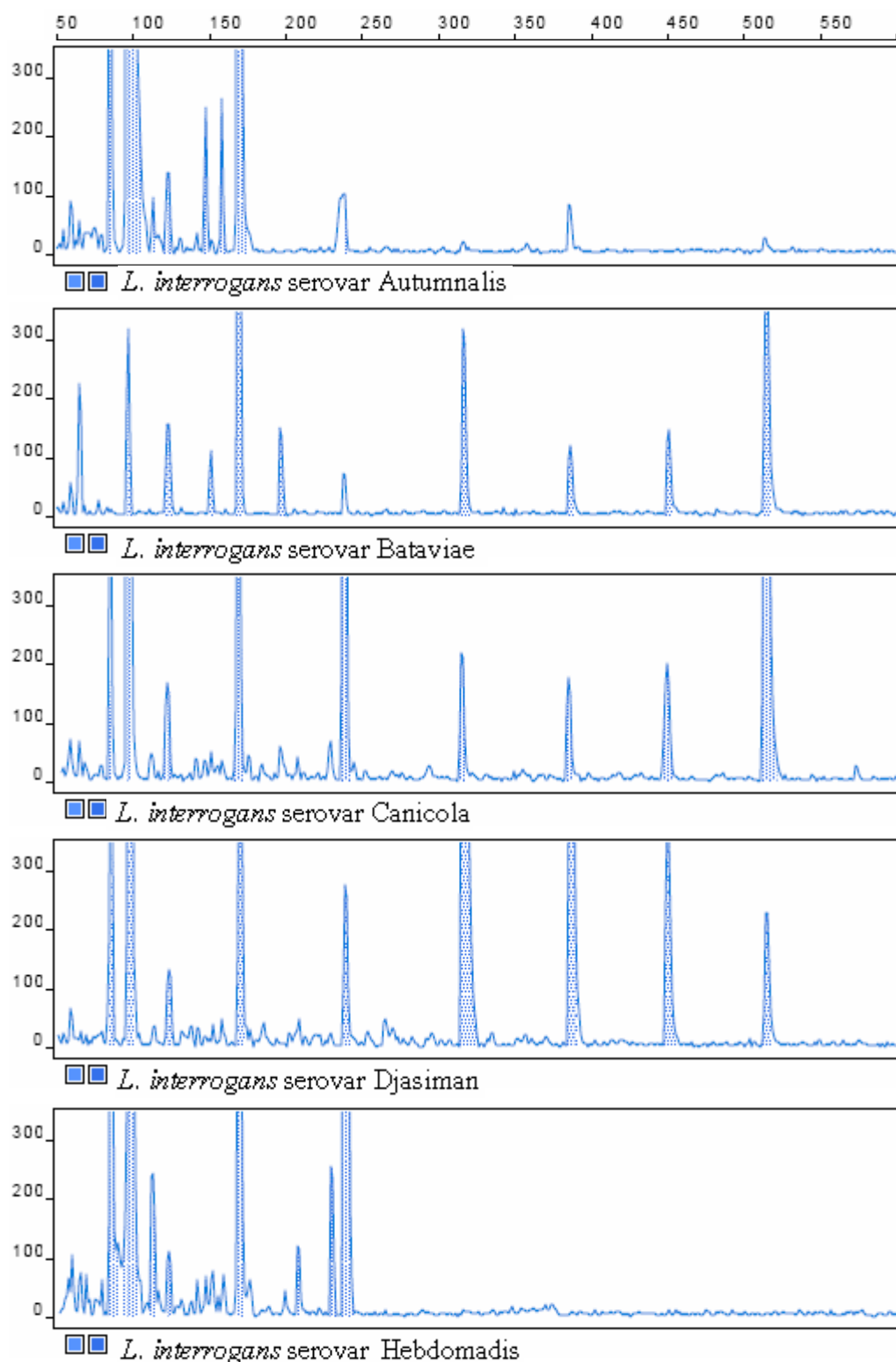
ภาพที่ 11 (ต่อ)



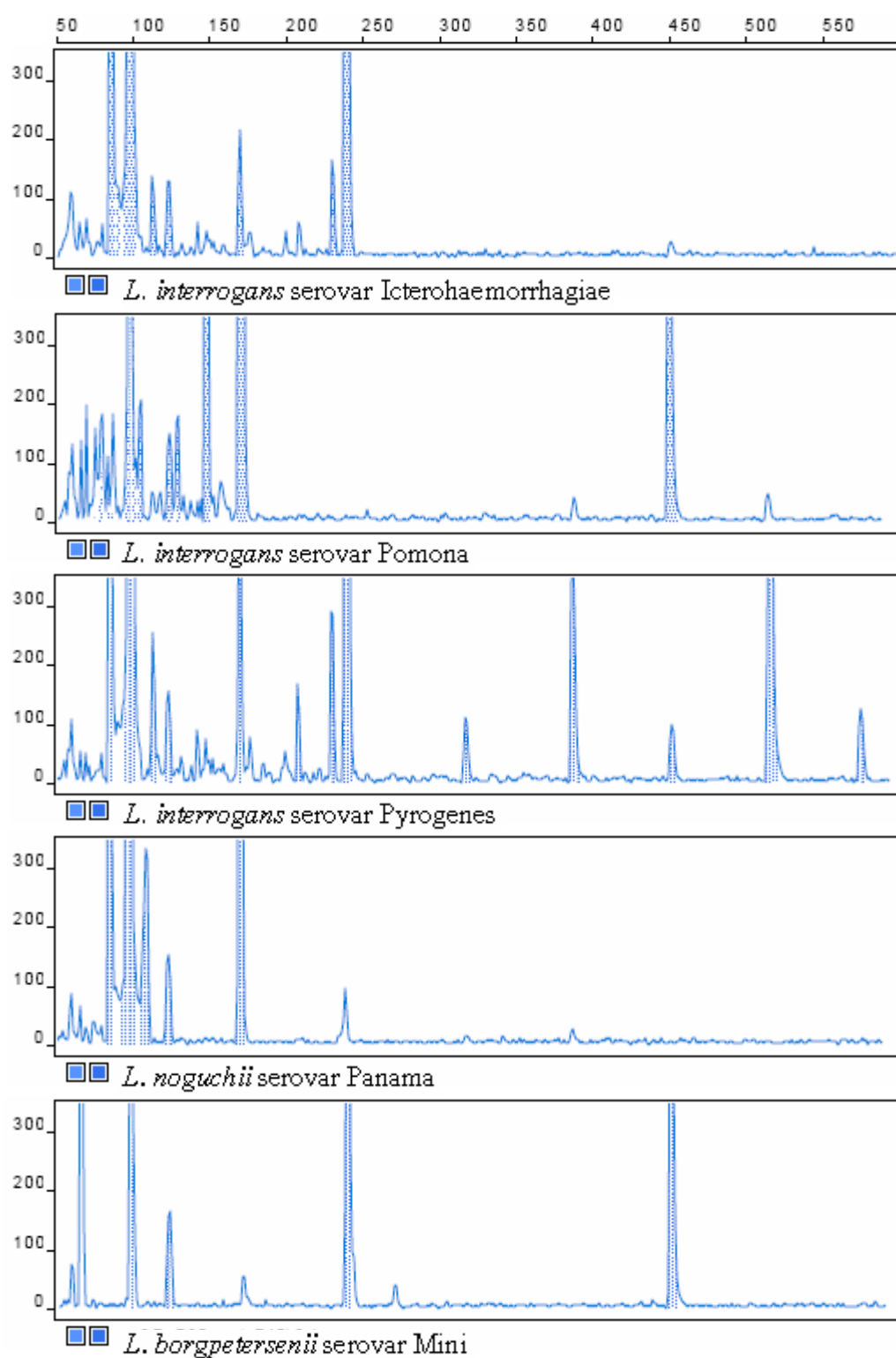
ภาพที่ 11 (ต่อ)



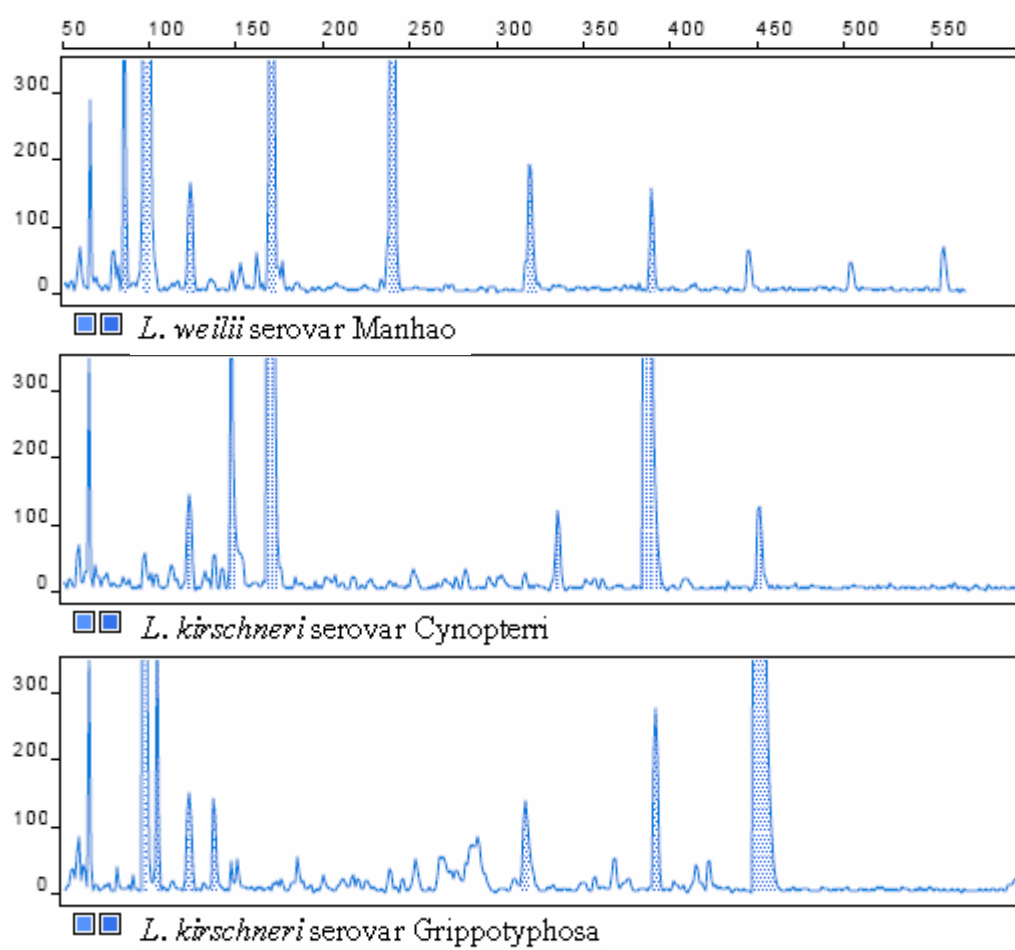
ภาพที่ 11 (ต่อ)



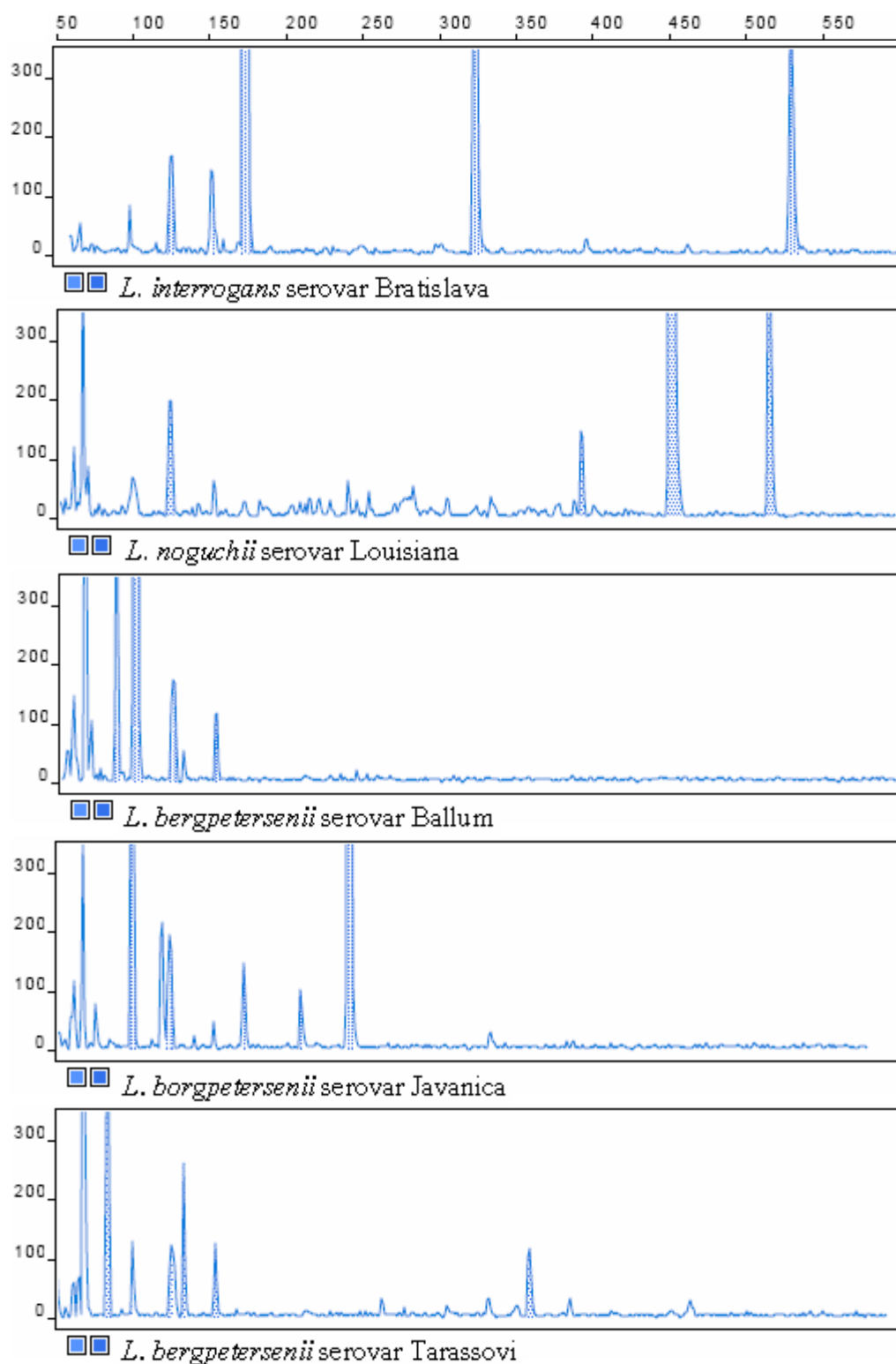
ภาพที่ 12 ขนาดผลผลิตฟลูออโรสและเครื่องหมายโมเลกุลของไฟรเมอร์กลุ่มที่ 3 ของตัวอย่างเชื้อ เลปโตสไปราอังกิซีโรวารต่าง ๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 1 ซึ่งมีผลผลิตฟลูออโรสเกิดขึ้น หลากหลาย โดยที่ แกน X แสดงถึงขนาดของคลื่นดีเอ็นเอ และแกน Y แสดงถึงความเข้ม ของ fluorescence ที่วัดได้



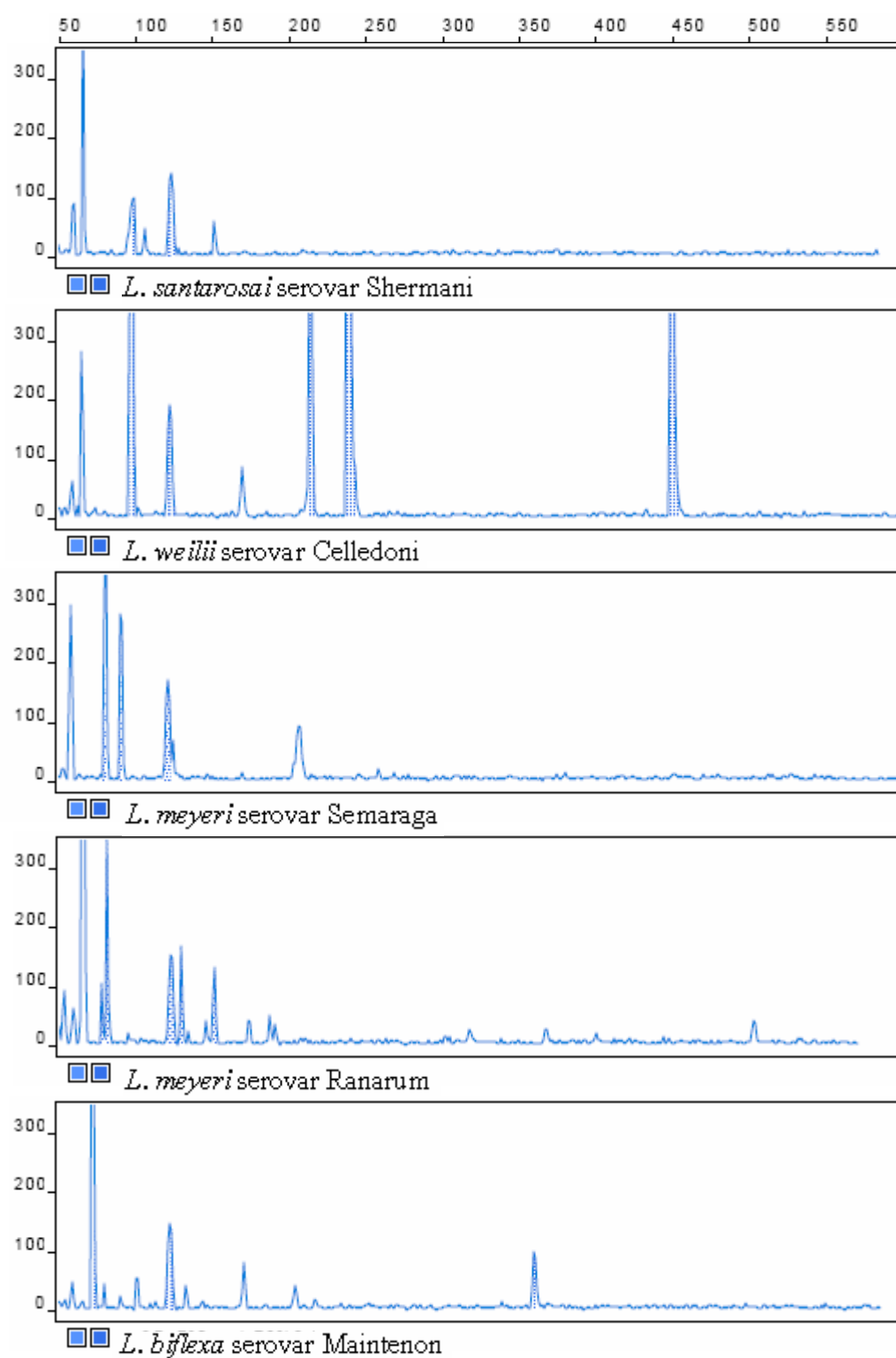
ภาพที่ 12 (ต่อ)



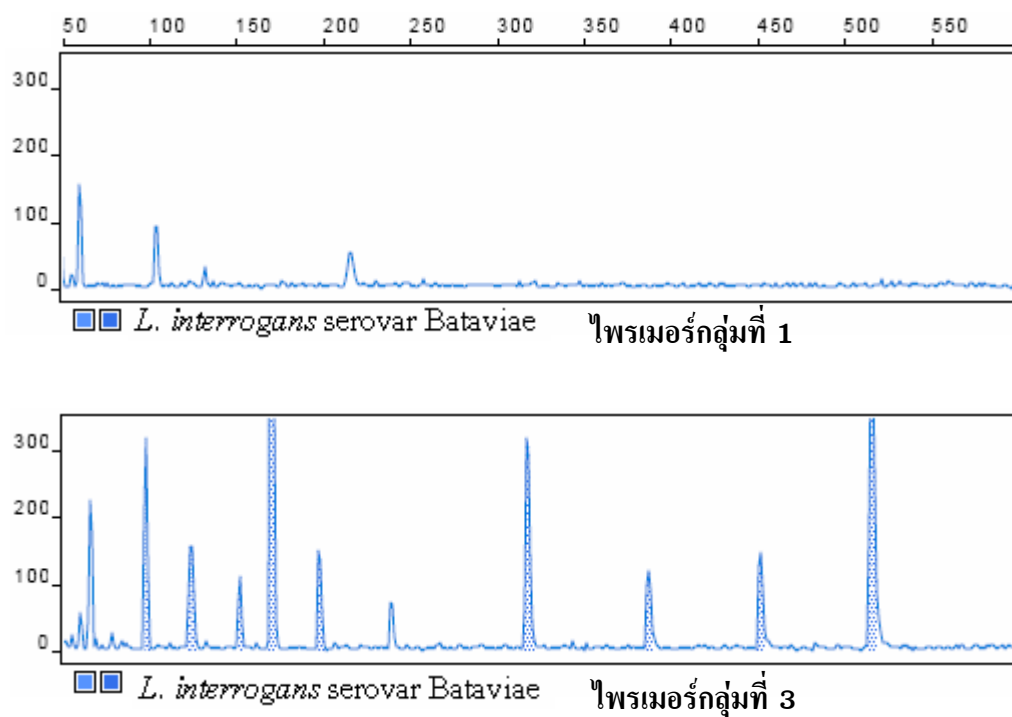
ภาพที่ 12 (ต่อ)



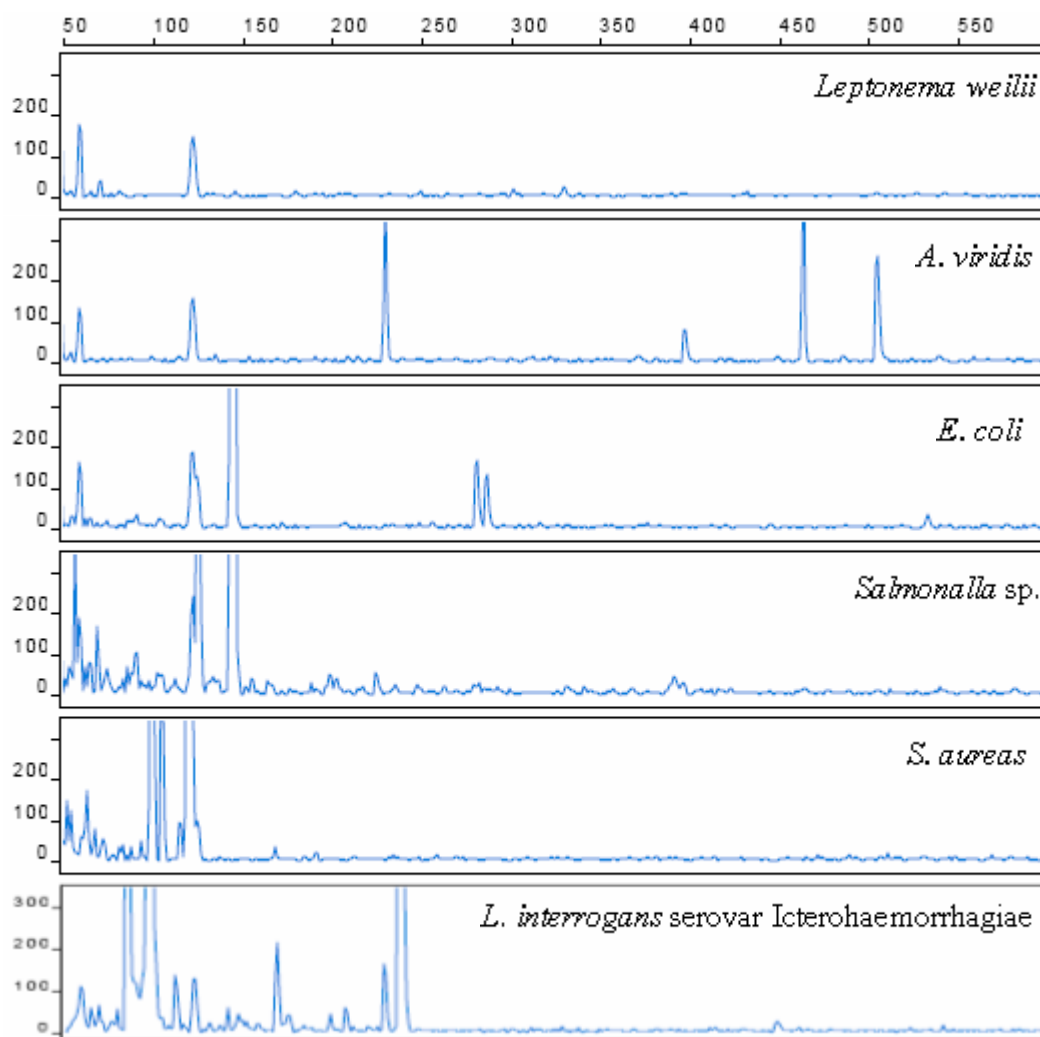
ภาพที่ 13 ขนาดผลผลิตฟิซีอาร์และเครื่องหมายโมเลกุลของไฟรเมอร์กลุ่มที่ 3 ของตัวอย่างเชื้อ เลปโตสไปราอังกิงซีโรวาร์ต่าง ๆ ที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อที่ 2 ซึ่งมีผลผลิตฟิซีอาร์เกิดขึ้น ปานกลางหรือน้อย โดยที่ แกน X แสดงถึงขนาดของซินติเอ็นเอ และแกน Y แสดงถึง ความเข้มของ fluorescence ที่วัดได้



ภาพที่ 13 (ต่อ)



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์และเครื่องหมายโมเลกุลของไพรเมอร์กลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 3 ของตัวอย่างเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Bataviae โดยที่ แกน X แสดงถึงขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอ และแกน Y แสดงถึงความเข้มของ fluorescence ที่วัดได้



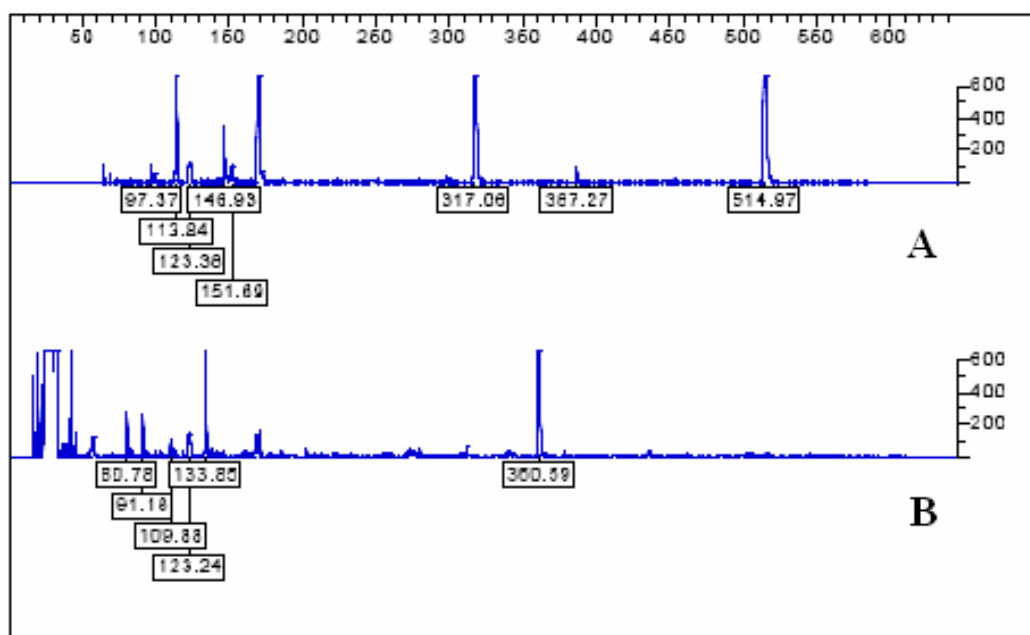
ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบขนาดผลผลิตฟลูออเรสเซนซ์และเครื่องหมายโมเลกุล ที่ได้จากไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ คือ *Leptonema weillii*, *A. viridis*, *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureas* และ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Icterohaemorrhagiae โดยที่ แกน X แสดงถึงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และแกน Y แสดงถึงความเข้มของ fluorescence ที่วัดได้

การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลโดยชุดโปรแกรม Genotyper version 2.0

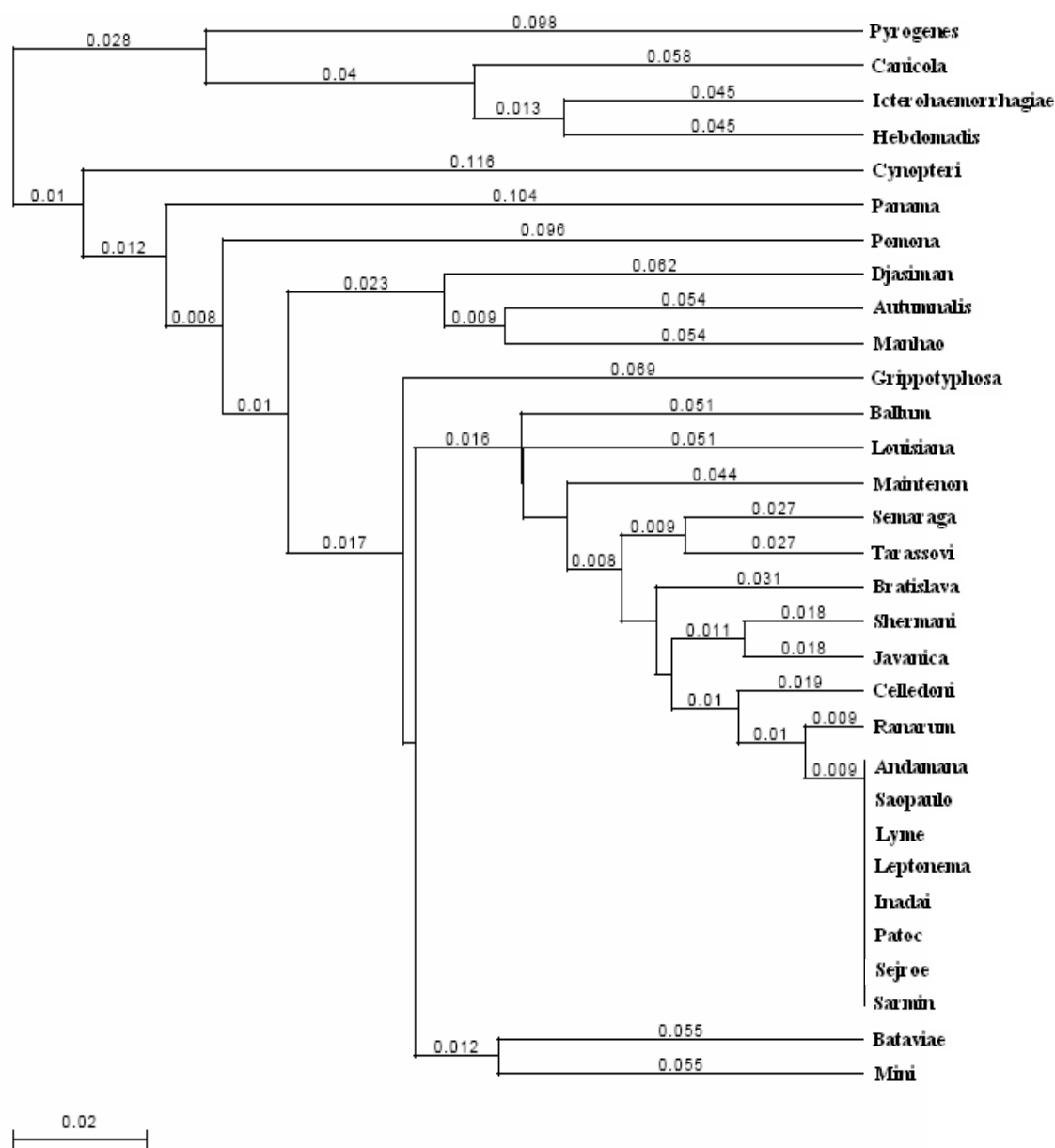
โปรแกรม GeneScan[®] 2.1 ไม่สามารถที่จะติดตามขนาดของผลผลิตพีซีอาร์หรือ peak ลงไปใน electropherogram ได้ ทำให้เกิดความไม่สะดวกในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ peak ที่เกิดขึ้น จึงได้นำโปรแกรม Genotyper version 2.0 มาติดตาม peak ที่เกิดขึ้น ทำให้มีความสะดวกในการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่ประกอบเป็นเครื่องหมายโมเลกุล ที่เกิดขึ้น ดังแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง *L. interrogans* ซีโรวาร์ Bataviae กับ *L. biflexa* ซีโรวาร์ Maintenon ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 16

การสร้าง phylogenic tree จากเครื่องหมายโมเลกุลด้วยโปรแกรม MacVector[™] 7.2.3

ผลจากนำความหลากหลายของผลผลิตพีซีอาร์และเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์กลุ่มที่ 3 มาวิเคราะห์โดยทำการสร้าง phylogenic tree ด้วยโปรแกรม clustalW version 4.1 ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ UPGMA โดยที่เมื่อทดลองนำกราฟแสดงขนาดของ peak ที่เกิดขึ้นของเชื้อเลปโตสไปราแต่ละซีโรวาร์ มาจัดเรียงตามรูปแบบของ tree ที่เกิดขึ้น พบว่าสามารถแยกเลปโตสไปราได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นหลากหลาย กลุ่มที่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นปานกลางหรือน้อย และกลุ่มที่ไม่มีผลผลิตพีซีอาร์เกิดขึ้นดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 16 การวิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยโปรแกรม Genotyper version 2.0 เพื่อประกอบเป็นเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งประกอบด้วย (A) เลปโตสไปราชนิดไม่ก่อโรค (*L. biflexa*) และ (B) เลปโตสไปราชนิดก่อโรค (*L. interrogans*) โดยที่ แกน X แสดงถึงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ และแกน Y แสดงถึงความเข้มของ fluorescence ที่วัดได้



ภาพที่ 17 การทำ phylogenetic tree จากเครื่องหมายโมเลกุลที่สร้างขึ้น ด้วยโปรแกรม clustalW version 4.1 ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ UPGMA ของเชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์ต่าง ๆ