บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จากตัวอย่างอาหาร

นำตัวอย่างอาหารเช่นแหนมผักดองและนม มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl แล้วนำมาแยกเชื้อโดยใช้อาหารแข็ง MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่เติม $CaCO_3$ 0.5% บ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เลือกเฉพาะโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกด้วยการทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส คัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* sp. โดยเลือกเชื้อที่มีรูปร่างแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

3.2 การศึกษา plasmid profile ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

ทำการสกัดพลาสมิดจากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้และจากเชื้อ *Lactococcus lactis* FG2 ซึ่งมีพลาสมิดที่ทราบขนาดเพื่อใช้เป็นพลาสมิดมาตรฐาน โดยวิธีของ Anderson and McKay, (1983) ทำการตรวจสอบพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose 0.8% ตามวิธีของ Sambrook and Russell, (2001) คัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 3.0 กิโลเบส มาทำการจัดจำแนกและทดสอบความเสถียรของพลาสมิด

3.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกโดยใช้ API 50CHL kit และ16S rDNA sequencing

การจัดจำแนกเชื้อโดยใช้คุณสมบัติการหมักน้ำตาลด้วย API 50 CHL kit (bioMerieux, France) และจัดจำแนกเชื้อระดับสปีชีส์โดยใช้ซอฟแวร์ APILAB Plus version 3.3.3 ของ bioMerieux ส่วนการจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของ 16S rDNA ขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส โดยใช้ไพรเมอร์ 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1525r (5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3') (Lane, 1991) จาก Bioservice Unit (BSU) ทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden,Germany) และตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ผลผลิต PCR ที่ได้เป็นแม่แบบในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ 27f, 530f, 981f, 1325f, 1525r, 1100r, และ 530r วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง ABI310 Automate Sequencer (PE-Applied Biosystem) และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรมและฐานข้อมูลบน internet ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อ

3.4 ทดสอบความเสถียร (stability) ของพลาสมิดโดยการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติม novobiocin ที่ความเข้มข้น 700 μg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง คัดเลือกหลอดที่มีการเจริญน้อยที่สุดมาทดสอบการสูญเสียพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยสาร novobiocin

3.5 การแยกพลาสมิดขนาดที่ต้องการออกจากพลาสมิดอื่น ๆ

ทำการสกัดพลาสมิดโดยวิธีของ Anderson and McKay, (1983) แล้วนำมาแยกโดยวิธี agarose gel electrophoresis ทำการแยกพลาสมิดโดยตัดแถบวุ้นที่มีพลาสมิดขนาดที่ต้องการ แล้วนำมาสกัดพลาสมิดออกจากวุ้นโดยใช้ Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธี agarose gel electrophoresis

3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่แยกได้

นำพลาสมิดที่แยกออกจาก agarose gel มาตัดด้วยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ทั้งแบบเอนไซม์ชนิดเดียวและสองชนิด เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ *Hin*dIII *Bam*HI *Xba*I *Hae*III *Nsi*I *Cla*I *Bst*XI *Sac*I เป็นต้น แล้วทำการเชื่อมชิ้น DNA ที่ตัดได้ลงใน sequencing vector pGEM7Zf(+) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ทำการ transformation ด้วยวิธี heat shock โดยใช้ competent cell ของเชื้อ *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ทำการคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม (transformants) โดยวิธี blue/white colony selection โดยเทคนิคการโคลนนิ่งใช้ตามวิธีการของ Sambrook and Russell, (2001) แล้วใช้พลาสมิดลูกผสมที่ได้เป็นแม่แบบ (template) ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการสกัดและทำให้ DNA บริสุทธิ์ด้วย DNA purification kit (QIAGEN) ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Dye Deoxy terminator *Taq* sequencing kit บนเครื่อง PCR (model 2400 thermal cycler) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่อง ABI310 Automate Sequencer (PE-Applied Biosystem) โดยใช้ Universal primer T7 และ Sp6 และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสบนพลาสมิดที่ทรบแล้ว (walking primer) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม online เช่น chromas Lite 2.01, CAP3 Sequence Assambly Program, WWW READSEQ Sequence Conversion, ClustalW2 (EMBL-MBI), ORF finder (NCBI) และ NebCutter V.2 (New England Bio Labs) เป็นต้น การทำ homology search ใช้ฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3.7 การทดสอบการต้านทานโลหะหนัก

เขี่ยแบคทีเรียแลคติกอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีส่วนผสมของโลหะหนักความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยความเข้มข้นที่ใช้คือ คอปเปอร์ 10 - 4 0 mM นิกเกิล 200 - 7 00 mM และแคดเมียม 1-6 mM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญของแบคทีเรียแลคติกบนอาหาร

3.8 การแยกยีนต้านทานแคดเมียมจากพลาสมิดโดยวิธี Polymerase Chain Reaction

ทำการสกัดพลาสมิดจาก แล้วนำมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการต้านทานแคดเมียมโดยใช้ไพรเมอร์ cadA-R และ cadA-L ที่ออกแบบจากพลาสมิด pND302 (Liu et al., 1997) โดยใช้พลาสมิด pND302 เป็น positive control โดยในปฏิกิริยา PCR (25 µl) ประกอบด้วยพลาสมิดหรือโครโมโซมดีเอ็นเอ 100 ng ไพรเมอร์ชนิดละ 15 pmol, dNTP 0.2 mM, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 2.5 mM และ เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.5 Unit โดยมีสภาวะในการทำ PCR คือ pre denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที; เริ่มรอบ PCR ขั้น denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 20 วินาที ; annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยทำซ้ำ 25 รอบ จากนั้นเป็นขั้นตอนสุดท้าย final elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 5นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit ก่อนนำผลผลิต PCR ไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator Cycle Sequencing kit V3.1 (Applied Biosystem/Perkin-Elmer) เพื่อยืนยันว่าเป็นยีนต้านทานแคดเมียมจริง

3.9 Southern Hybridization

การทำ Southern hybridization ทำตามวิธีการของ Sambrook and Russell, (2001) ร่วมกับวิธีการที่แนะนำโดยชุด hybridization kit ECL Direct Labelling and Detection System (GEHealthcare) โดยทำการสกัด พลาสมิดและโครโมโซมจากแบคทีเรียแลคติก (Lewington et al., 1987) นำดีเอ็นเอมาแยกบน agarose gel electrophoresis ทำการย้ายดีเอ็นเอลงบนแผ่น nylon membrane โดยนำแผ่นเจลที่ได้แช่ในสารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 0.25 N เป็นเวลา 15 นาที แล้วย้ายไปล้างในน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 N เป็นเวลา 30 นาที นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนจะนำไปแช่ในสารละลาย SSC ความเข้มข้น 10X เป็นเวลา 90 นาที ย้ายดีเอ็นเอจากเจลสู่ nylon membrane โดยวิธี vacuum blotter ทำการตรวจสอบว่าดีเอ็นเอถูกชะออกจากแผ่นเจลหมดหรือไม่โดยทำการย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide ทำให้แผ่น nylon membrane แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วทำให้ดีเอ็นเอติดอยู่กับ nylon membrane โดยใช้วิธีการ UV crosslinking หลังจากนั้นทำการติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นโพรบซึ่งในที่นี้จะใช้ดีเอ็นเอที่มีส่วนของยีน *cadA* และ *cadC* ที่ตัดจากพลาสมิด pND 302