บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

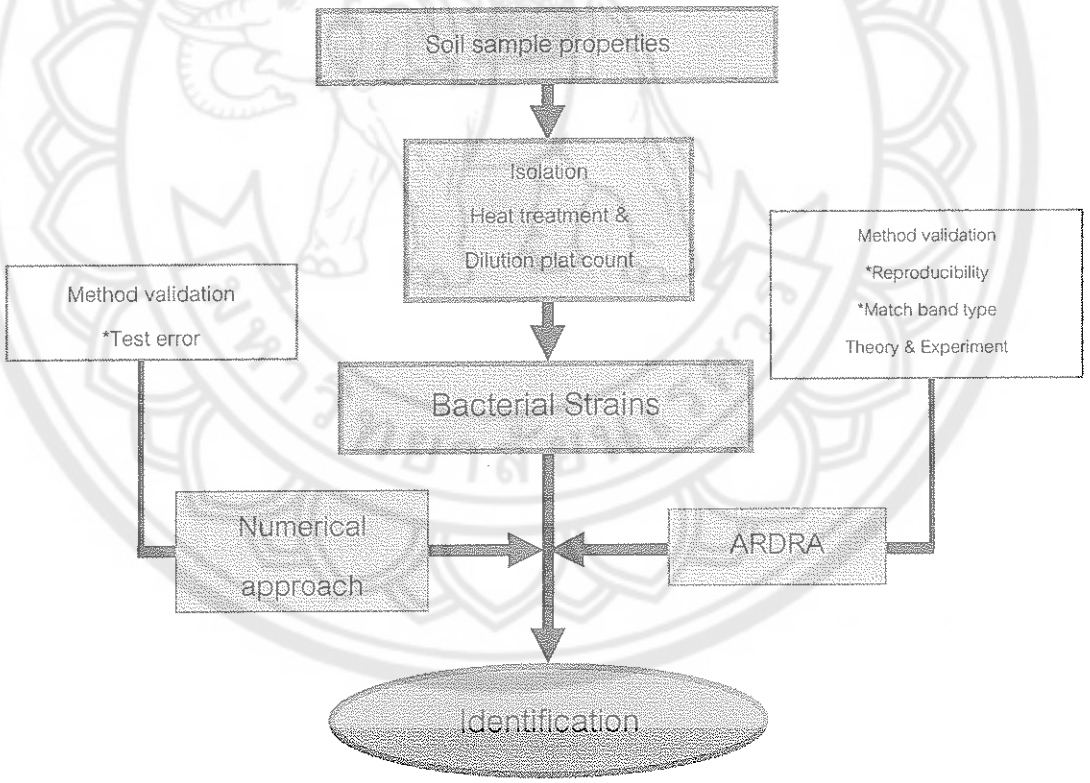
1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet)
2. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
3. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)
5. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
8. ตู้อบ (Hot air oven)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
10. เครื่องชั่งสารแบบละเอียด (Analytical balance)
11. PCR machine
12. Gel electrophoresis
13. GelDocument (Gel Doc, BioRad)
14. ฟลาสก์รูปกรวย (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
15. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
16. หลอดทดลอง
17. ลูกยาง (Pipette bulbs)
18. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
19. Pipette tip ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
20. ไมโครปิเปต (Micropipette)

แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง

1. *Bacillus cereus* ATCC11778
2. *B. megaterium* ATCC6748
3. *B. subtilis* ATCC6633
4. *Pseudomonas aeruginosa* DMST4739 (ATCC25983)
5. *Escherichia coli* ATCC25922

ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยประกอบด้วย การเก็บตัวอย่างดิน การนับจำนวนแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์เจริญในสภาวะแอโรบิก การคัดแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมร่วมกับ numerical analysis และเทคนิค ARDRA (ภาพ 9)

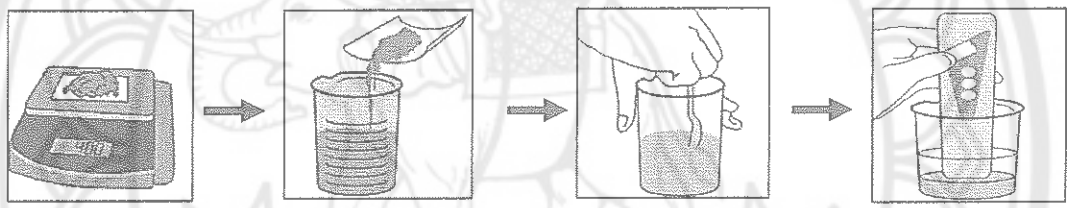


ภาพ 9 ระเบียบวิธีวิจัยโดยสรุป

การเก็บตัวอย่างดิน (Soil sampling)

เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มจากแปลงย่อยในป่าดิบแล้งในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน ของกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช แปลงย่อยละ 10 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดินที่ความลึกไม่เกิน 10 เซนติเมตร บรรจุในถุงปลอดเชื้อ บันทึกตำแหน่งตัวอย่างดินที่เก็บเป็นชื่อของแปลงย่อยและลำดับที่เก็บ รวมทั้งวันเดือนปีที่เก็บตัวอย่างดิน วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินโดยวัดค่าพีเอช (pH) (ภาพ 10) (Hendershot, Lalande and Duquette, 1993, pp.141-145) และความชื้น (Topp, 1993, pp.541-558) ทั้งนี้การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นของดิน} = \frac{100\ (\text{น้ำหนักดินเปียก} - \text{น้ำหนักดินแห้ง})}{\text{น้ำหนักดินเปียก}}$$



ภาพ 10 แสดงขั้นตอนการวัดค่าพีเอชของตัวอย่างดินโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Hendershot, Lalande and Duquette, 1993, pp.141-145

การตรวจนับจำนวน และการคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก

ตรวจนับจำนวนและคัดแยกแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก จากตัวอย่างดิน ด้วยวิธี dilution plate count ร่วมกับเทคนิค heat treatment ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Noeth, Britz and Joubert, 1988, pp.233-440) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ Dilute nutrient agar (Janssen, et al., 2002, pp.2391-2396) และ nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล คำนวณจำนวนของแบคทีเรีย สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกเป็นค่า CFU/

กรัมของตัวอย่างดิน คัดแยกแบคทีเรียโดยพิจารณาความแตกต่างของสัณฐานวิทยาโคโลนี (colony morphology) ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนผิวหน้าอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิกสายพันธุ์บริสุทธิ์ลงในอาหาร NA slant เพื่อใช้เป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เก็บรักษาแบคทีเรียเป็น long term-preserved cultures ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีกลีเซอรอล (glycerol) 15 เปอร์เซ็นต์ และแช่ใน freezer อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม หรืออนุกรมวิธานแบบนิวเมอริคัล (Numerical taxonomy)

1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร NA slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เช่น รูปร่าง ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์ การติดสีย้อมแบบแกรม (ภาคผนวก 1) ตำแหน่งและรูปร่างของเอนโดสปอร์ (ภาคผนวก 2)

3. การศึกษาคุณสมบัติการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง โดยพิจารณาเนื้อโคโลนี (colony texture) สีโคโลนี (colony culture) ผิวหน้าโคโลนี (colony surface) ขอบโคโลนี (colony margin) และความนูนของโคโลนี (colony elevation) ตามวิธีมาตรฐานของการจัดจำแนกแบคทีเรีย

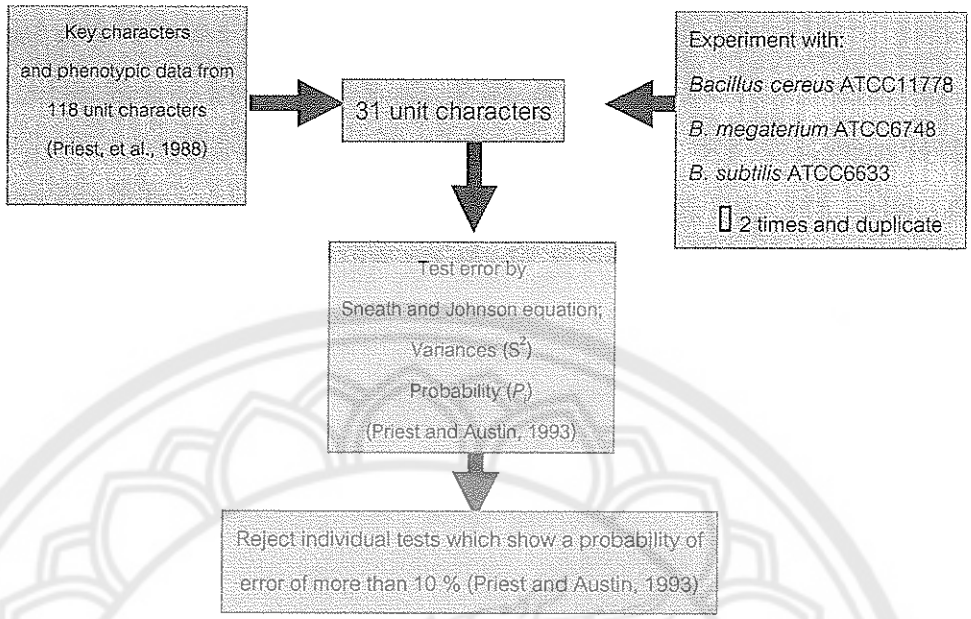
4. การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียรูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เจริญในสภาวะแอโรบิก ตามวิธีของ Reva, et al. (Reva, Sorokulova and Smimov, 2001, pp.1361-1371) ร่วมกับ Priest, et al. (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882; Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) ซึ่งเป็นวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Claus, et al. และวิธีมาตรฐานของ Gordon, et al. (O'Leary, 1990, pp.107-125) ที่แสดงรายละเอียดใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) และ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt, et al., 1994, pp.559-564) คัดเลือกการทดสอบคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) ซึ่งประกอบไปด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีจำนวน 31 ลักษณะ โดยการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่เลือกใช้คือ การย่อยแป้ง (starch degradation) (ภาคผนวก 3, 13, 25) การเจริญในสภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic growth) (ภาคผนวก 26) การหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate

fermentation test) (ภาคผนวก 14, 27) สารคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ประกอบด้วย กาแล็กโทส (Galactose), กลูโคส (Glucose), แล็กโทส (Lactose), มอลโทส (Maltose), แมนนิทอล (Mannitol), แมนโนส (Mannose), ราฟฟีโนส (Raffinose), ซาลิซิน (Salicin), ซูโครส (Sucrose), อะโดนิทอล (Adonitol), อะราบิโนส (Arabinose), เซลโลไบโอส (Cellobiose), อินโนซิทอล (meso-Inositol), แรมโนส (Rhamnose), ซอร์บิทอล (Sorbitol), ทรีฮาโลส (Trehalose) และไซโลส (Xylose) การทดสอบคะตาเลส (catalase test) (ภาคผนวก 4, 28) การทดสอบออกซิเดส (oxidase test) (ภาคผนวก 5, 29) การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) (ภาคผนวก 6, 15, 30) การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) (ภาคผนวก 7, 16, 31) การย่อยยูเรีย (urea degradation) (ภาคผนวก 20, 32) การย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) (ภาคผนวก 17, 33) การใช้ซิเตรท (citrate utilization) (ภาคผนวก 18, 34) การใช้ *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG test)

5. การทดสอบ Test error

ทดสอบโดยประยุกต์ใช้สมการของ Sneath และ Johnson (Sneath and Johnson, 1972, pp.377-392) ซึ่งเป็นการทดสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) กระบวนการทดสอบแสดงในภาพ 11 ทั้งนี้ทดสอบคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ 31 ลักษณะกับเชื้ออ้างอิงซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่สนใจศึกษา ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งใช้อาหารและน้ำยาทดสอบที่เตรียมแยกจากกันอย่างอิสระ และในแต่ละครั้งทำการทดสอบ 2 ซ้ำ (duplication) สมการในการทดสอบ Test error ที่สำคัญ 3 สมการคือ สมการหาค่าความแปรปรวนเฉพาะ test หรือ S_i^2 จากสมการที่ 15 ของ Sneath และ Johnson (1972) (Priest and Austin, 1993, pp.20-22) สมการหาค่าความแปรปรวนรวมของทั้งชุด test ที่ใช้ทดสอบ หรือ S^2 และสมการหาค่าความน่าจะเป็นความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นในชุด test ทดสอบหรือ P_i จากสมการที่ 4 ของ Sneath และ Johnson (1972) (Priest and Austin, 1993, pp.20-22) โดยค่าความน่าจะเป็น *Pi* ที่ยอมรับได้ต้องไม่เกิน 0.1 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ นั่นเอง (Priest and Austin, 1993, pp.20-22)



ภาพ 11 กระบวนการในการทดสอบ Test error

5.1 Variances of individual test between replicate organisms (S_i^2)

$S_i^2 = n/2t$ (Equation 15; Sneath and Johnson, 1972)

; t = number of OTUs (operational taxonomic units)

; n = corresponds to the number of OTUs with discrepancies in the test

5.2 Individual test variances

$S^2 = 1/N(S_A^2 + S_B^2 + \ldots S_N^2)$; N = the total number of test

; S_A^2, S_B^2 and S_N^2 = individual test variances for tests A, B up to N

5.3 Probability of error for an individual test (P_i)

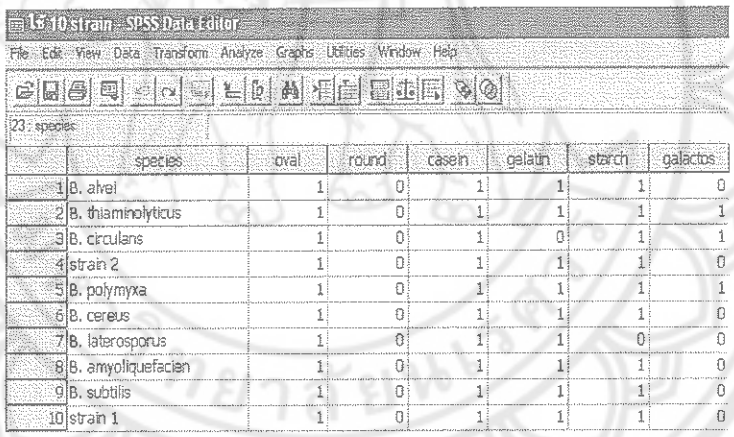
$P_i = 1/2*[1 - \sqrt{(1 - 4S^2)}]$ (Equation 4; Sneath and Johnson, 1972)

; N = the total number of test

6. การจัดกลุ่มและจัดจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

จัดกลุ่มและจัดจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมเทียบเคียงระหว่างสายพันธุ์ทดสอบกับสายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) โดยเทียบเคียงผลการทดสอบคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ตามข้อมูลของ Priest, et al. (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882) ร่วมกับแผนผังที่ประยุกต์จากวิธีการของ Reva, et al. (Reva, Sorokulova and Smimov, 2001, pp.1361-1371) วิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%similarity) ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ simple matching จัดกลุ่มโดยเทคนิค UPGMA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS (ภาคผนวก 36) โดยให้ species cut-off line ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 83 เปอร์เซ็นต์ (Priest, et al., 1988, pp.1847-1882; Sneath, et al., 1986, pp.1104-1207) การคำนวณ เปอร์เซ็นต์ความเหมือนและการจัดกลุ่มด้วย UPGMA โดยโปรแกรม SPSS ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

6.1 แปลงข้อมูลดิบจากผลบวกเป็น 1 ผลลบเป็น 0 ป้อนข้อมูลลงในตารางข้อมูลของ SPSS ดังแสดงในภาพ 12, 13 และ 14



10 strain - SPSS Data Editor

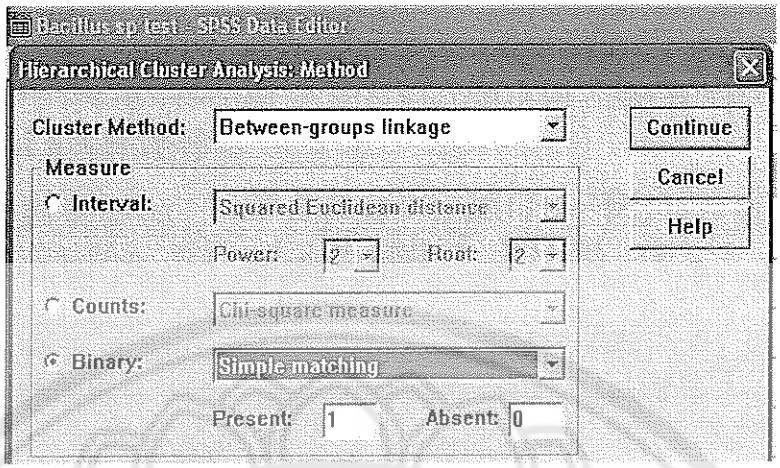
File Edit View Data Transform Analyze Graphs Utilities Window Help

23 : species

	species	oval	round	casein	gelatin	starch	galactos
1	B. alvei	1	0	1	1	1	0
2	B. thiaminolyticus	1	0	1	1	1	1
3	B. circulans	1	0	1	0	1	1
4	strain 2	1	0	1	1	1	0
5	B. polymyxa	1	0	1	1	1	1
6	B. cereus	1	0	1	1	1	0
7	B. laterosporus	1	0	1	1	0	0
8	B. amyoliquefacien	1	0	1	1	1	0
9	B. subtilis	1	0	1	1	1	0
10	strain 1	1	0	1	1	1	0

ภาพ 12 แสดงตัวอย่างการป้อนข้อมูลดิบลงในโปรแกรมสถิติ SPSS

6.2 ทำการเลือกค่าสัมประสิทธิ์ simple matching และจัดกลุ่มโดย UPGMA ซึ่งในโปรแกรม SPSS เรียกว่า Between-groups linkage ดังแสดงในภาพ 13



ภาพ 13 แสดงตัวอย่างการเลือกค่าในการคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนด้วยค่าสัมประสิทธิ์ S_{SM} และจัดกลุ่มด้วย UPGMA

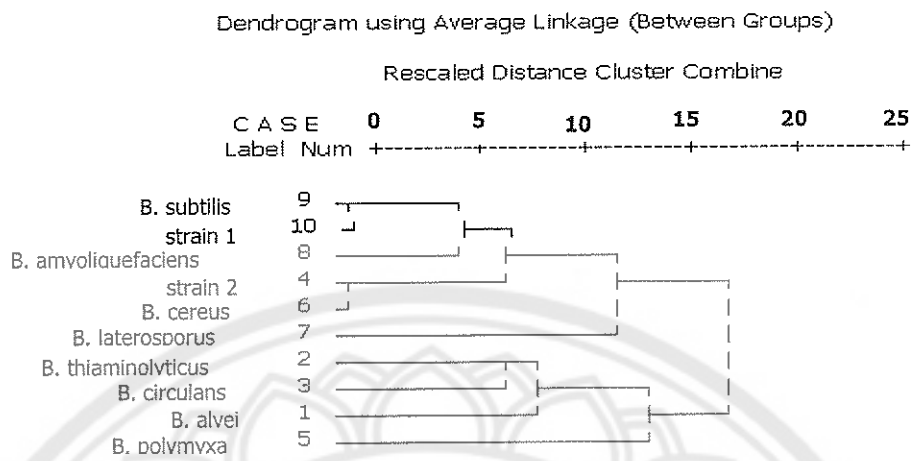
6.3 ผลการคำนวณแสดงในรูป proximity matrix และ dendrogram โดยสามารถเทียบเคียงและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามคุณสมบัติฟีโนไทป์ ดังแสดงในภาพ 14

Proximity Matrix

	Simple matching Measure									
Case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	.850	1.000								
3	.800	.850	1.000							
4	.650	.700	.550	1.000						
5	.650	.800	.750	.700	1.000					
6	.650	.700	.550	1.000	.700	1.000				
7	.700	.650	.500	.850	.550	.850	1.000			
8	.700	.650	.600	.850	.650	.850	.700	1.000		
9	.700	.750	.600	.850	.750	.850	.700	.900	1.000	
10	.700	.750	.600	.850	.750	.850	.700	.900	1.000	1.000

This is a similarity matrix

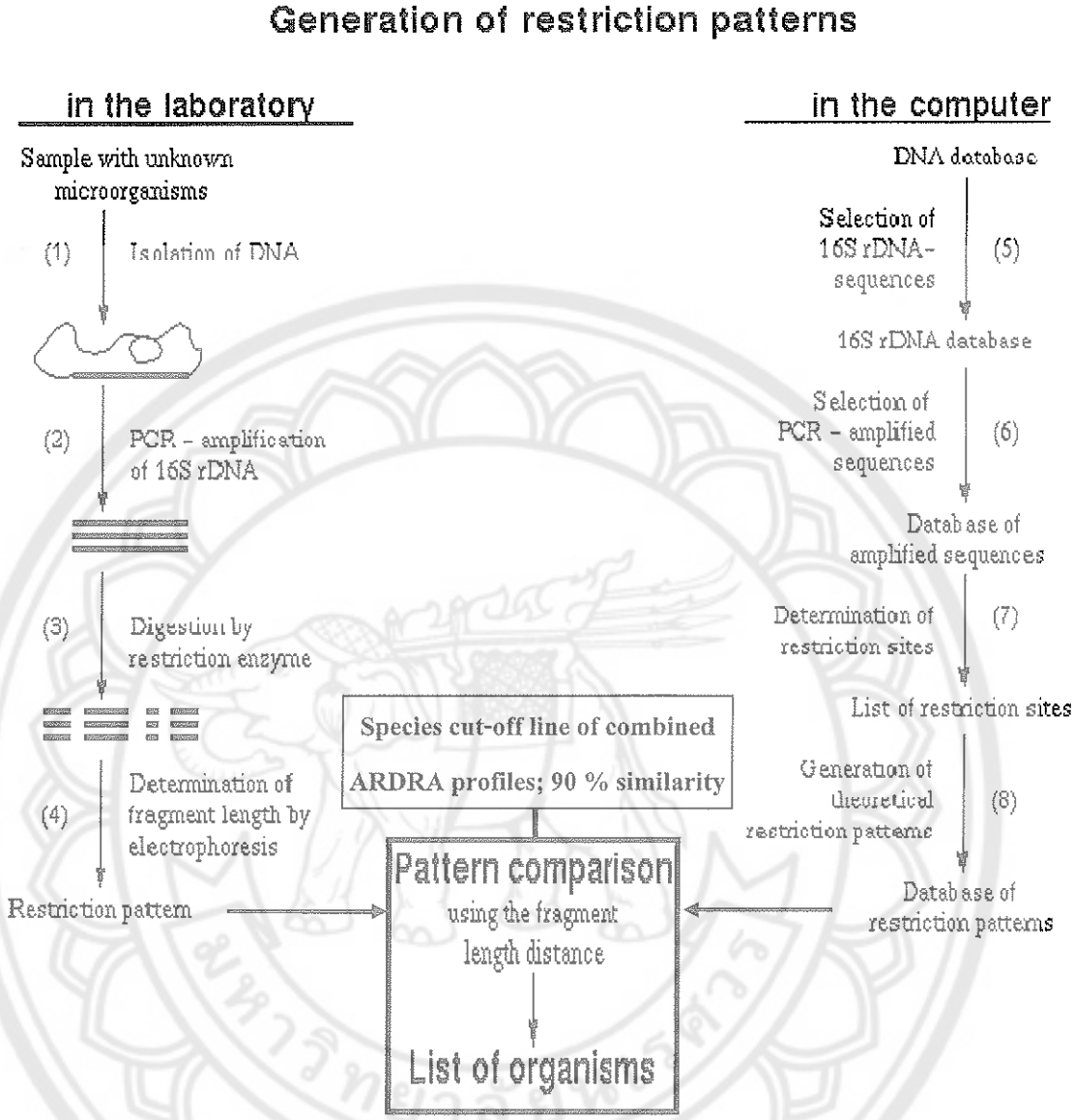
ภาพ 14 แสดง proximity matrix และ dendrogram ที่ใช้เทียบเคียงและจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยอาศัยคุณสมบัติทางฟีโนไทป์



ภาพ 14 (ต่อ)

การจัดกลุ่มและจัดจำแนกแบคทีเรียรูปท่อนสร้างเอนโดสปอร์ ที่เจริญในสภาวะแอโรบิก โดยใช้เทคนิค Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)

การจัดกลุ่มและจัดจำแนกแบคทีเรียโดยเทคนิค ARDRA ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ การสร้างรูปแบบ ARDRA จากการทดลอง และตามทฤษฎี (โดยใช้คอมพิวเตอร์) ดังแสดงขั้นตอนในภาพ 15 การจัดจำแนกพิจารณาค่า species cut-off line ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์ (Vaerewijck, et al., 2001, pp.1074-1084) ทดสอบความใช้ได้ของเทคนิค ARDRA โดยการทดสอบความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) (Vaneechoutte, et al., 1995, pp.11-15) และการเปรียบเทียบรูปแบบ ARDRA โดยพิจารณาจำนวนและขนาดของ restriction fragment ที่ได้รับจากการทดลองและตามทฤษฎี ซึ่งเรียกว่า match band type (Heyndrickx, et al., 1996b, pp.247-259) ทั้งนี้เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถนำข้อมูลจากรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี เพื่อจัดจำแนกสกุลและชนิดของสายพันธุ์ทดสอบได้หรือไม่ ขั้นตอนในการวิจัยดำเนินการดังนี้



ภาพ 15 แสดงขั้นตอนการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค ARDRA

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Hermjakob, Giegerich and Arnold, 1997, pp.131-139;

Vaerewijck, et al., 2001, pp.1074-1084

1. การสร้างรูปแบบ ARDRA จากการทดลอง

1.1 การสกัดแยกดีเอ็นเอ

สกัดแยกดีเอ็นเอจากเซลล์แบคทีเรียทดสอบ เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB (ภาคผนวก 21) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์แบคทีเรียเจริญ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นแยกควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE buffer (ภาคผนวก 8) ทำ heat treatment ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดแยกสำเร็จรูปของบริษัท Promega โดยปฏิบัติตามคำแนะนำของคู่มือปฏิบัติการของบริษัทผู้ผลิต วิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA template ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Wu, et al., 2006, pp.107-119)

1.1.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ คำนวณจากสูตร 1 A_{260} Unit of dsDNA = 50 µg/ml

1.1.2 ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยพิจารณาค่า A_{260}/A_{280}

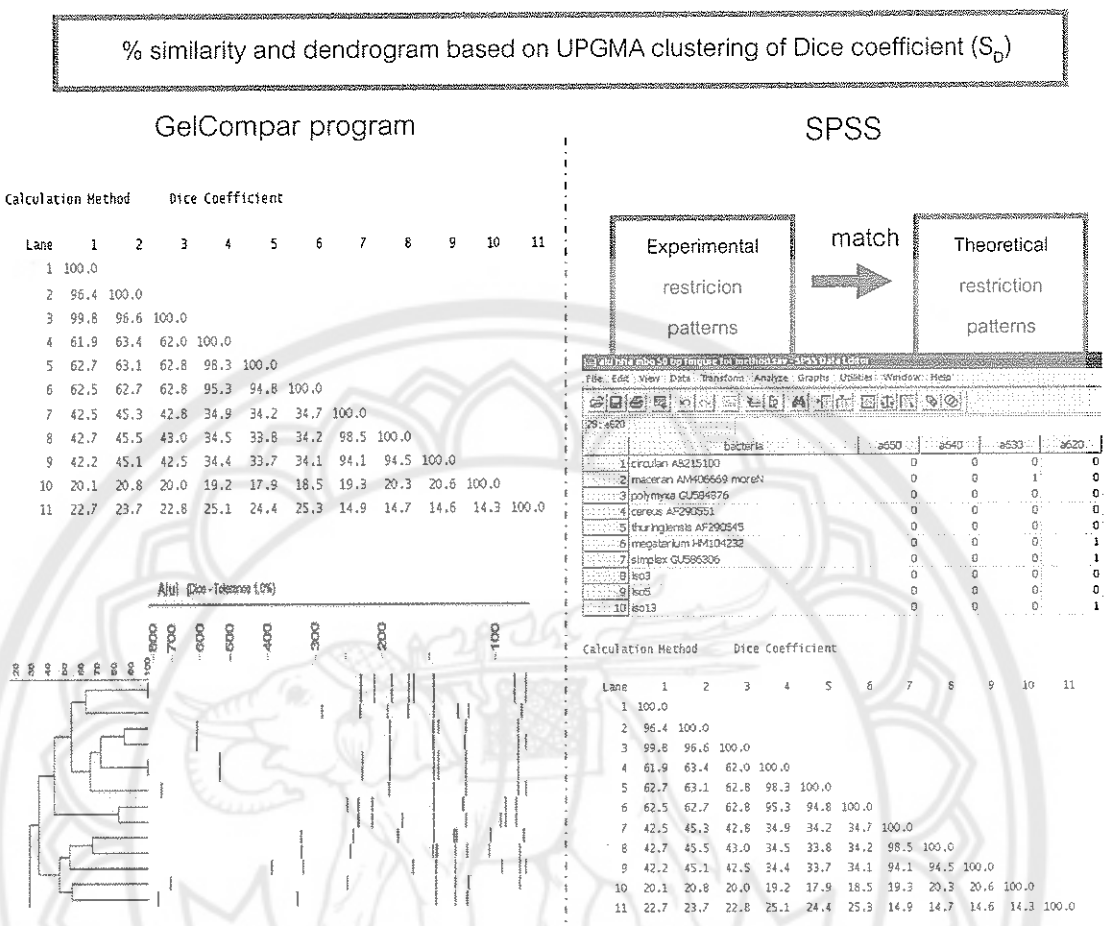
1.2 การเพิ่มปริมาณ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณ 16S rDNA ซึ่งเป็นยีนเป้าหมาย โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ forward primer 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ reverse primer 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTTACCCCA-3') เทียบกับตำแหน่ง 10-27 และ 1512-1492 ของ *Escherechia coli* 16S rDNA (Brosius, et al., 1978; Heydrickx, et al.,1995, pp.661-669) สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ predenaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 cycles โดยใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยในการทำ PCR แต่ละ reaction ใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใน 1 reaction ประกอบด้วย DNA template 2 ไมโครลิตร เติมลงใน mixed solution 48 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ dATP dGTP dCTP และ dCTP 0.2 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 1.5 ไมโครโมลาร์ primers 27f และ 1492r 1 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (Wu, et al., 2006, pp.107-119) ตรวจสอบ PCR products ที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1 เปอร์เซ็นต์ (ใน 1x TAE buffer) เทียบกับ 100 bp DNA ladder (fermentus) ที่ใช้เป็น molecular marker ร่วมกับการย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (1 µg/ml) ตรวจสอบ band ภายใต้แสง UV ถ่ายรูป gel ด้วย digital

camera system (Gel Doc, BioRad) โดย PCR product เป้าหมายมีขนาดประมาณ 1500 bp (base pair) วัดความเข้มข้นของ PCR product ตามวิธีการที่อธิบายข้างต้น

1.3 การวิเคราะห์รูปแบบ ARDRA ของยีน 16S rDNA

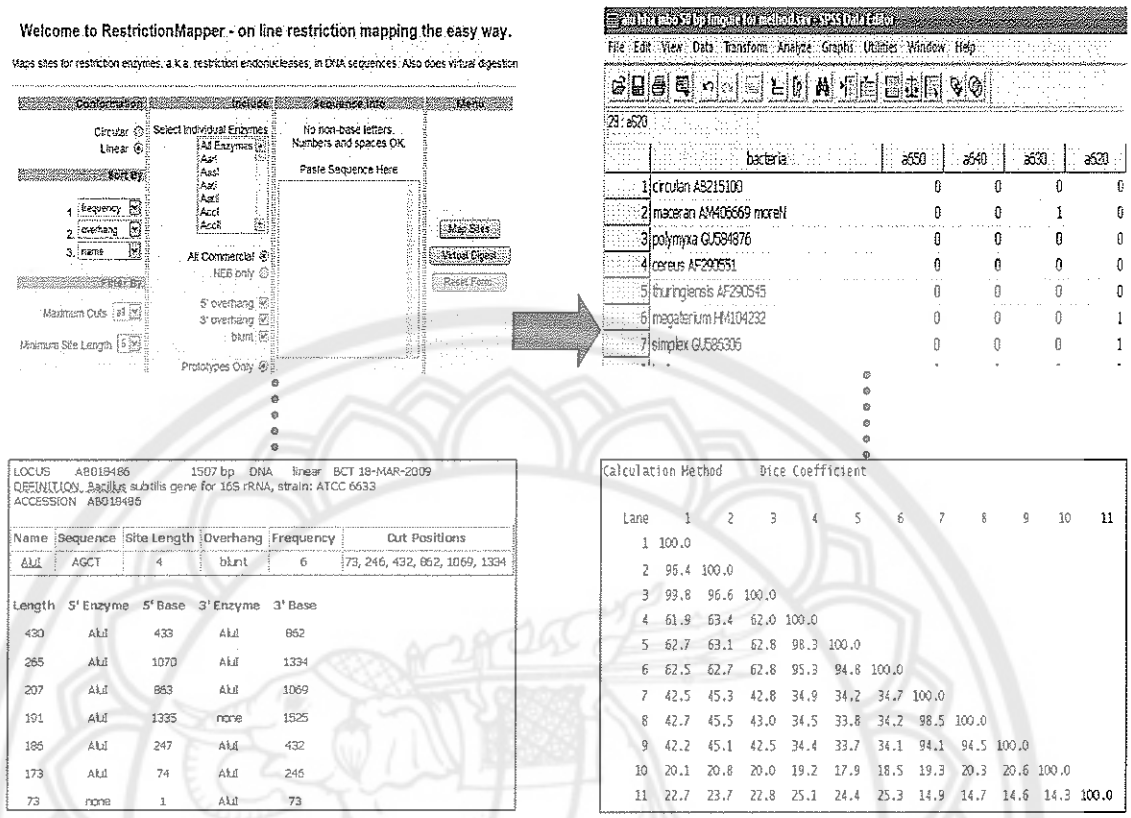
นำ PCR product ที่ได้โดยตรง มาตัดเป็น DNA fragment ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4-bp recognition site 5 ชนิด คือ *Alu*I (AG'CT) *Hha*I (GCG'C) *Msp*I (C'CGG) *Mbo*I ('GATC) และ *Rsa*I (GT'AC) (Wu, et al., 2006, pp.107-119) ปฏิกิริยาเริ่มจากตัด DNA template ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดปริมาณ 5 ยูนิต โดยในแต่ละ reaction มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ) บ่มนาน 4 ชั่วโมง ควบคุมสภาวะที่เหมาะสมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเอนไซม์ (Fermentus) ตรวจสอบ restriction fragments ด้วยการทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 3.5 เปอร์เซ็นต์ (ใน 1x TAE buffer) ซึ่งมี 50 bp DNA ladder (O'GeneRuler™ 50 bp DNA ladder, fermentus) เป็น size marker ควบคุมสภาวะที่ 80 V 500 mA นาน 60 นาที ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (1 µg/ml) ตรวจสอบ band ภายใต้แสง UV ถ่ายรูป gel ด้วย digital camera system (Gel Doc, Quantity One® Software Bio-Rad) นำรูป gel ของ restriction fragment ที่ถ่ายด้วย digital camera system มาวิเคราะห์กับ GelCompar software หรือ Quantity One software (Applied Maths, Belgium, version 3.1; Applied Maths, Quantity One Bio-Rad version 4.2.1) ผลที่ได้รับคือ รูปแบบ ARDRA ซึ่งสามารถวัดขนาด DNA fragment ที่ได้จากการทดลองด้วย GelCompar software เทียบขนาดกับ 50 bp DNA ladder จากนั้นทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความเหมือน ระหว่างรูปแบบ ARDRA โดยทำ combination ของรูปแบบ ARDRA ที่ได้รับจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด ให้ได้ผลออกมาเป็นรูปแบบ combined ARDRA (combined ARDRA profiles) โดย normalization เฉพาะ DNA fragment ที่ขนาดเท่ากับหรือสูงกว่า 100 bp (Heyndrickx, et al., 1995, pp.661-669; Heydrickx, et al.,1996b, pp.247-259) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Dice (Dice coeffient; S_D) และจัดกลุ่มด้วย UPGMA และ set ให้ band position tolerance อยู่ที่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GelCompar ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS ซึ่งจะใช้ในการเทียบเคียงผลการทดลองกับข้อมูลของรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี เพื่อเทียบเคียงในการจัดจำแนกสกุลและชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบต่อไป และในขั้นตอนสุดท้ายสร้าง dendrogram จากผลการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมใน GelCompar รายละเอียดสรุปดังแสดงในภาพ 16



ภาพ 16 แสดงขั้นตอนการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของรูปแบบ ARDRA ด้วยโปรแกรม GelCompar และโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS

2. การสร้างรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี

รูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีสร้างโดยใช้ข้อมูล 16S rDNA จาก database ของ GenBank ที่ตัด 16S rRNA gene เพื่อดูขนาดของ restriction fragment ด้วย RestrictionMapper version 3 Maplot program (ANGIS) จากนั้นวิเคราะห์เทียบกับข้อมูลขนาดของ DNA fragment ที่ได้จากปฏิบัติการ โดยการหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนและ match pattern กับรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี เพื่อเทียบเคียงและจัดจำแนกชนิด โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Dice และจัดกลุ่มด้วย UPGMA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS มีขั้นตอนแสดงไว้ในภาพ 17



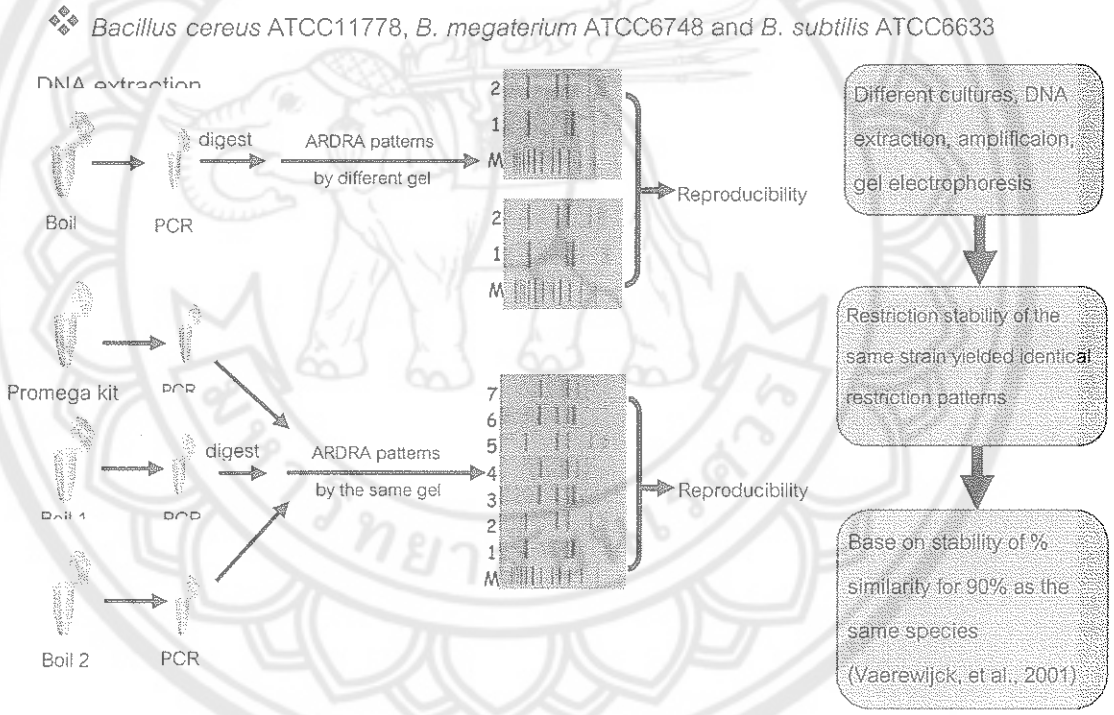
ภาพ 17 แสดงขั้นตอนการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป RestrictionMapper ในการสร้างรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎี การจัดเก็บข้อมูลรวมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างข้อมูลด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Heydrickx, et al., 1995, pp.661-669

3. การทดสอบความใช้ได้ของเทคนิค ARDRA

การทดสอบความใช้ได้ของเทคนิค ARDRA พิจารณาจากการทำซ้ำได้ในการทดสอบความคงที่ของจำนวนและขนาด restriction fragment ที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียทดสอบเดียวกัน (Vaneechoutte, et al., 1995, pp.11-15) ในสภาวะเงื่อนไขที่การสกัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการแตกต่างกัน ทำการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยใช้ปฏิกิริยา PCR ในคราวที่แตกต่างกัน ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในแต่ละครั้งซึ่งอิสระจากกัน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ใน agarose gel ต่างเจลกัน ทั้งนี้ต้องให้ผลของจำนวนและขนาด restriction fragment คงที่บนพื้นฐานของความเป็นชนิดเดียวกัน โดยต้องมีรูปแบบ combined ARDRA ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จึงสามารถสรุปถึงความใช้ได้ของเทคนิค

ARDRA รายละเอียดสรุปของการทดสอบความใช้ได้ของเทคนิคแสดงในภาพ 18 การเปรียบเทียบ DNA fragment หรือ match band type (Heyndrickx, et al., 1996b, pp.247-259) ระหว่าง restriction fragment ของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงที่ทราบชนิดแล้วกับ restriction fragment ตามทฤษฎีของแบคทีเรียชนิดเดียวกัน เพื่อพิสูจน์ให้เห็นว่า restriction fragment จากการทดลองตรงกันกับทฤษฎี จึงสามารถยอมรับข้อมูลของรูปแบบ ARDRA ตามทฤษฎีไปใช้ในการจัดจำแนกสกุลและชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ทดสอบได้ ซึ่งทำได้โดยการหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างรูปแบบ combined ARDRA จากการทดลองของแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงเทียบกับข้อมูล รูปแบบ combined ARDRA ตามทฤษฎี ซึ่งจะยอมรับการ match band type ต้องมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป



ภาพ 18 แสดงขั้นตอนในการทดสอบการทำซ้ำได้ของเทคนิค ARDRA