สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

1) การเก็บตัวอย่างลำไส้ไก่

ทำการสุ่มฆ่าไก่เนื้อลูกผสมทางการค้า อายุ 35 วัน จำนวน 10 ตัว พร้อมเก็บตัวอย่างของเหลว ในระบบทางเดินอาหารของไก่ จากจุดกึ่งกลางของ duodenum จุดกึ่งกลางของทางเปิดท่อน้ำดี และ Meckel's diverticulum ในส่วนของ jejunum จุดกึ่งกลางระหว่าง Meckel's diverticulum และ ileocecal junction ในส่วนของ ileum และจุดกึ่งกลางของ caecum และ large intestine นำของเหลวที่ได้ใส่ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเก็บตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ – 80^{0} C.

2) การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการบดลำไส้และกากอาหารในสารละลายน้ำเกลือด้วยเครื่องปั่น บดกรองเอาแต่ส่วนน้ำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยนำของเหลวที่ได้ 300 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย extraction buffer และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำตัวอย่างมาบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้จำนวน 3 รอบ จากนั้นย่อยด้วย lysozyme และ SDS ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ต่อมาเติม proteinase K เพื่อย่อยโปรตีนและนำไปบ่มที่ 37°C นาน 2 ชม. เก็บเฉพาะส่วนใสมาสกัดดีเอ็นเอด้วยส่วนผสมของ phenol-chloroform ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดหาปริมาณและคุณภาพ ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3) การเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Kanokratana *et al.*, 2004 ดังนี้

BSF8/20 = 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

REVB = 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ 1 ปฏิกิริยา ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่สกัดจากลำไส้ไก่ 0.5 ng, 1X Buffer [75mM Tris-HCl, 20mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Tween 20) with $(NH_4)_2SO_4$] , 400 µM dNTP mix, 2 mM $MgCl_2$, ไพรเมอร์อย่างละ 0.4 µM, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase 0.05 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ทำการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (thermocycler) โดยกำหนดเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ และกำหนดปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จำนวน 35 รอบ โดยใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 1 วินาที 50°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 1 นาที 45 วินาที

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 ส.ค. 2556
เลขทะเบียน 295540
เลขเรียกหนังสือ

ตามลำดับ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสด้วย 1% อะกาโรสเจล แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นเปรียบเทียบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit

4) การโคลนยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ทำการชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 16S rDNA ที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ทางการค้าที่ใช้สำหรับการโคลนยีนด้วย T4 DNA Ligase บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชม. ถ่ายดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*1989) โดยนำเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ปริมาตร 100 µl มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ผสมชิ้นส่วน ดีเอ็นเอและพลาสสมิดเวคเตอร์ ที่ทำการตัดปลายไว้เรียบร้อยแล้ว ในสัดส่วน 1:3 ในปริมาตร 20 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (Luria-Bertani) ปริมาตร 1 ml นำไปบ่ม และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 37°C นาน 1 ชม. นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไปบน LB plate ที่มียาปฏิชีวนะเพื่อคัดเลือกเซลล์ของแบคทีเรียที่บรรจุดีเอ็นเอลูกผสมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่ถูกแทรกสอดด้วยยีน 16S rDNA ด้วยวิธี blue/white screening

5) การตรวจสอบโคโลนีที่บรรจุยีน 16S rDNA

นำโคโลนีของแบคทีเรียมาตรวจสอบ ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์โดยตรง โดยเริ่มจากการทำถอดแบบ (replica) โคโลนีที่ได้เก็บไว้เป็นระบบเพลท (master plates) และให้หมายเลขประจำโคโลนี เขี่ยโคโลนีเหล่านี้เป็นต้นแบบผสมรวมกับส่วนผสมพีซีอาร์ ประกอบด้วยสารละลาย 1X Taq Buffer, dNTP 200 µM, $MgCl_2$ 2 mM ,ไพรเมอร์ในส่วนของพลาสมิด คือ M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') และ M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') อย่างละ 0.2 µM, เอนไซม์ Taq DNA Polymerase 5 ยูนิต และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (themalcycler) กำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94°C นาน 3 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 C นาน 30 วินาที 50°C นาน 40 วินาที และ 72°C นาน 2 นาที ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C นาน 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

6) การตรวจสอบความหลากหลายของโคลนที่บรรจุยีน 16S rDNA

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยตรงจากโคโลนี 3 µl มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I และ *Hha*I อย่างละ 20 ยูนิต ตามลำดับ และปรับปริมาตรให้ได้ 20 µl ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดและจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จัดเป็นกลุ่มตามขนาดและจำนวนชิ้นที่เหมือนกัน ทำการเลือกโคลนของแต่ละกลุ่มที่เป็นตัวแทนไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

7) การวิเคราะห์ลำดับเบสและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ

วิเคราะห์นำลำดับเบสของโคลนที่เลือกได้ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16S rDNA กับฐานข้อมูลสากล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้จัดจำแนกโคลนออกเป็นกลุ่มต่างๆและสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987)

8) การขึ้นทะเบียนยีน

ทำการขอขึ้นทะเบียนลำดับเบสของแบคทีเรียชนิดใหม่ (GenBank ID) กับฐานข้อมูลสากลใน GenBank