ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร — **สาขา**

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา — **ภาควิชา**

เรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* species ด้วยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization

Development of Test Kit for Detection of *Salmonella* species by Paper Chromatography Dot Blot Hybridization Technique

นามผู้วิจัย นางสาววรินทร จันทร์ทองอิน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์วงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* species ด้วยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization

Development of Test Kit for Detection of *Salmonella* species by Paper Chromatography Dot Blot Hybridization Technique

โดย

นางสาววรินทร จันทร์ทองอิน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรินทร จันทร์ทองอิน 2554: การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* species ด้วยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, Ph.D. 90 หน้า

การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้ออย่างง่ายโดยอาศัยหลักการโครมาโตกราฟฟี (Chromatography) ร่วมกับ DNA hybridization สำหรับตรวจ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และง่ายต่อการใช้งานกับอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการส่วนภูมิภาค อีกทั้งเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ

Salmonella enterica serovar Typhimurium เป็นแบคทีเรียต้นแบบในการศึกษา เริ่มจากทำการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *HilA* gene และ *InvA* gene ซึ่งมีรายงานว่าเป็นยีนก่อโรค (virulence gene) สำหรับจีนัส *Salmonella* spp. ด้วยวิธี PCR โดยเลือกใช้ primer ที่มีความจำเพาะ (specific primer) 3 คู่ คือ hilA, invA1 และ invA2 พร้อมทั้งติดฉลาก PCR product ด้วยสารปลอดรังสีเพื่อใช้เป็นตัวติดตาม (probe) ในการทำปฏิกิริยา hybridization สำหรับการตรวจ DNA ด้วยเทคนิค paper chromatography dot blot hybridization (PACHA) จากนั้นสกัด DNA จากเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยวิธี chelex-100 แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ ซึ่งทราบความเข้มข้นหยดและตรึงลงบน nylon membrane strip ทำการตรวจสอบ DNA ด้วย probe ที่เตรียมไว้ ซึ่งมีความยาวแตกต่างกัน และมีความจำเพาะ (specific) ต่อบริเวณ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ในบริเวณที่แตกต่างกัน ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PACHA ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ เวลา การล้าง และการเคลือบผิวเมมเบรนที่ให้ผลการตรวจ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. มีความถูกต้อง แม่นยำ และไวต่อเชื้อมากที่สุด

ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิขณะทำ hybridize ที่ 75°C เทคนิค PACHA ให้ผลบวกต่อ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 13 serovars แต่ไม่พบผลบวกในแบคทีเรียชนิดอื่นที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม เทคนิค PACHA สามารถตรวจพบ DNA ที่มีความเข้มข้นอย่างน้อยที่สุด 100 นาโนกรัม/หยด ด้วยปริมาณความเข้มข้น probe สำหรับตรวจสอบ 1 นาโนกรัม ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค PACHA ใช้เวลาสำหรับตรวจสอบทั้งสิ้น 90 นาที เป็นวิธีที่เรียบง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะ ความไว และประหยัดค่าใช้จ่าย สามารถประยุกต์ใช้ได้กับอุปกรณ์พื้นฐานที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม นอกจากนี้ยังให้ผลบวกต่อเชื้อ *S.* Typhimurium จำนวน 9.2×10^5 CFU/ml ที่เติมลงในเนื้อไก่ที่ปราศจากเชื้อ *Salmonella* spp.

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Warintorn Jantongin 2011: Development of Test Kit for Detection of *Salmonella* species by Paper Chromatography Dot Blot Hybridization Technique. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotech, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Thaweesak Songserm, Ph.D. 90 pages.

A simple test kit developed in this study was based on paper chromatography and hybridization principles and used for detection of *Salmonella* spp. DNA in terms of rapid, specific, sensitive, accurate, simplified and cost effective kit to be used in laboratory and field.

Salmonella enterica serovar Typhimurium was used as a bacterial model for this study. DNA was extracted by Chelex-100 method. The variables of DNA concentration were used to determine the sensitivity and specificity of the new technique by dotting it on nylon strip membrane. Then, three specificity probes of *Salmonella* spp. chromosomal DNA were designed and used to detect the DNA dot in variable condition of paper chromatography dot blot hybridization technique (PACHA). The optimized condition was selected and uses it to detect *Salmonella* spp. in chicken meat.

At hybridization step, the control temperature at 75°C, all 13 *Salmonella* spp. strain DNAs were positively detected by PACHA technique. No false positive result appeared in negative bacteria control group. The estimate of *Salmonella* spp. DNA concentration for detecting with this technique was as least as 100 nano grams per dot blot and 1 nano gram of probe concentration for each strip test. Required time for the test was approximately 90 minutes. This PACHA is a simple, rapid, specific, sensitive, and economical technique and can be applied to use in general laboratory and field. Moreover, this method can detect 9.2×10^5 CFU/ml of *S.* Typhimurium in experimentally contaminated chicken meat.

_____ _____ ___/___/___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำทั้งทางด้านการศึกษา งานวิจัย การเขียนวิทยานิพนธ์ การตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในเล่มวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ ตลอดจนแรงผลักดันและการสนับสนุนด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ น.สพ. ดร. วงศ์อนันต์ ณรงค์วาณิชการ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความรู้ทั้งด้านเทคนิคการทำปฏิบัติการ แนวทางการทำวิทยานิพนธ์ แนวทางการแก้ไขปัญหาต่างๆ แนวทางการเขียนวิทยานิพนธ์ การตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในเล่มวิทยานิพนธ์ ตลอดจนแรงผลักดัน การสนันสนุนและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณ สพ.ญ. ปนันท์ ธนเจริญวัชร หัวหน้ากลุ่มงานชีวเคมีและพิษวิทยา สพ.ญ. ละณี สุขถิ่นไทย และขอขอบคุณ สพ.ญ.พัชรี ทองคำคูณ หัวหน้ากลุ่มงานแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงตลอดระยะเวลาทำวิจัย

ขอขอบคุณ น.สพ. วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ และคุณชยภัค สีบู่ นักวิทยาศาสตร์กลุ่มงานแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณพี่ๆ ในกลุ่มงานชีวเคมีและพิษวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ สำหรับคำแนะนำ กำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณอา ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษา กำลังใจและความเข้าใจแก่ข้าพเจ้า ขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีจนประสบผลสำเร็จในการศึกษาระดับปริญญาโทตามความตั้งใจ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

วรินทร จันทร์ทองอิน

มกราคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	49
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	81
ภาคผนวก ก สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	82
ภาคผนวก ข การทดลองและผลบางส่วน	87
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงคุณสมบัติของ membrane แต่ละชนิด	12
2	แสดงลำดับเบส primer hilA, invA1 และ invA2	29
3	แสดงรายชื่อเชื้อ Salmonella spp. และที่มา	33
4	แสดงรายชื่อเชื้อ non- Salmonella spp. และที่มา สำหรับใช้เป็นเชื้อกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ในกลุ่ม enteric bacteria pathogens	34
5	Reaction mixture สำหรับเตรียมปฏิกิริยา PCR	36
6	โปรแกรมปฏิกิริยา PCR เครื่อง Thermal cycler	36
7	แสดงผลการทดสอบขั้น hybridize ที่อุณหภูมิต่างๆ	56

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพแสดงโครงสร้างของ Digoxigenin – dUTP	13
2	การเตรียม probe ด้วยวิธี Nick translation	14
3	การเตรียม probe ด้วยวิธี random primer labeling	15
4	แสดงการพัฒนาเทคนิค PACHA	19
5	โครงสร้างเซลล์ของเชื้อ Salmonella spp.	24
6	แสดงตำแหน่งเซนทริโซม (CS) ของ Salmonella pathogenicity island บนโครโมโซมของ Salmonella spp.	26
7	ชุดยีนใน Salmonella pathogenicity island ขนาดยาว 40 kb บนโครโมโซมของ Salmonella Typhimurium (1) ยีน hilA (2) ยีน invA	29
8	แสดงแผนการทดลอง	32
9	แสดงตำแหน่งและขนาดของ probe ที่มีความจำเพาะต่อ genome ของเชื้อ Salmonella spp. ที่บริเวณต่าง ๆ กัน	35
10	ภาพแสดงขั้นตอนของการตรวจด้วยเทคนิค conventional dot blot hybridization เทียบกับขั้นตอนการพัฒนาเทคนิค PACHA	41
11	การพัฒนาเทคนิค PACHA	44
12	แสดง Dig labeled PCR product ของ primer invA1, invA2 และ hilA บน 1.5% agarose gel	50
13	แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของ probe ด้วยวิธี hybridization	52
14	แสดงผลการเคลือบ strip ด้วย BB2	54
15	แสดงผล PACHA เมื่อทดสอบ hybridize ที่อุณหภูมิ (A) 60°C, (B) 27 °C และ (C) 4°C	57
16	ภาพแสดงผลการตรวจสอบเชื้อด้วย probe ที่มีความยาวไม่เท่ากัน ด้วยวิธี conventional hybridization (ภาพที่ 2, 3, 4) ซึ่งมีตำแหน่งการของ DNA ดังที่ระบุในภาพ (1) และ paper chromatography hybridization (5)	62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	แสดงผลทดสอบตำแหน่งของ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบแบบ PACHA	63
18	แสดงการผลการทดสอบเทคนิค PACHA ด้วยความเข้มข้นของ probe ระดับต่างๆ	64
19	แสดงการผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA กับ S. T. DNA ที่ความเข้มข้น 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 500 ng และ 1000 ng	66
20	แสดงการผลการทดสอบหา detection limit ของเทคนิค	67

ภาพผนวกที่

1	0.5 µg of 100 bp DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 1.3% TAE agarose gel.	86
2	การทำ serial dilution	88
3	แสดง background ที่เกิดขึ้นเมื่อ strip แห้งขณะ hybridize	89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DNA	=	Deoxynucleic acid
ssDNA	=	Single strand DNA
dsDNA	=	Double strand DNA
dNTPs	=	Deoxynucleotide triphosphate
T_m	=	Melting temperature
AP	=	Alkaline phosphatase
DIG	=	Digoxigenin
SDS	=	Sodiumdodecylsulphate
NaCl	=	Sodium chloride
HCl	=	Chloridric acid
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
NSS	=	Normal saline solution
pos.	=	Possitive
neg.	=	Negative
µl	=	Microliter
ml	=	Milliliter
µg	=	Microgram
ng	=	Nanogram
pg	=	Picogram
g	=	Gram
mM	=	Milimolar
M	=	Molar
bp	=	Base pair
°C	=	Degree Celsius
Mg^{2+}	=	Magnesium
UV	=	Ultraviolet
U	=	Unit

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

NBT/BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitoblue tetrazolium
PACHA	=	Paper chromatography dot blot hybridization
min.	=	minutes
S. T.	=	*Salmonella* Typhimurium

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* species ด้วยเทคนิค Paper Chromatography Dot Blot Hybridization

Development of Test Kit for Detection of *Salmonella* species by Paper Chromatography Dot blot Hybridization Technique

คำนำ

การตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคมีความสำคัญอย่างมากต่อการตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุการป่วยหรือตายในสัตว์ หากการวินิจฉัยหาสาเหตุการป่วยในสัตว์สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำจะช่วยให้สัตว์ได้รับการรักษาอย่างถูกวิธี สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อโรคและช่วยลดความสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจอันเนื่องมาจากการระบาดของเชื้อก่อโรคได้ สำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปการตรวจสอบเชื้อก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจเช่น เนื้อเยื่อ อาหาร อุจจาระ เป็นต้น ทำโดยวิธีการมาตรฐานคือการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ตามด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน วิธีการเหล่านี้มีข้อดีคือ ให้ผลการตรวจสอบที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดคือต้องการเวลาสำหรับการทดสอบหลายวัน อีกทั้งต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดสำหรับจำแนกเชื้อ เกิดความยุ่งยากในการจัดเตรียมอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปัจจุบันเทคนิคอณูชีวโมเลกุลต่างๆได้รับการพัฒนาและนำมาใช้จัดจำแนกและตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับ DNA hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย เพราะมีความรวดเร็ว มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะสูง (specificity) แต่ข้อจำกัดของเทคนิคทั้งสองนี้คือต้องอาศัยเครื่องมือ และอุปกรณ์พิเศษ เช่น PCR thermocycler, electrophoresis, gel-documentation, hybridization incubator เป็นต้น การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียจึงทำได้เฉพาะห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อมเท่านั้นและไม่สามารถประยุกต์ใช้ได้กับทุกๆพื้นที่ อีกทั้งเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทดสอบยังมีราคาแพง ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจหากสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียในระดับ DNA ได้โดยไม่ต้องอาศัยปัจจัยดังกล่าวข้างต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่ง่ายต่อการใช้งาน สามารถใช้กับอุปกรณ์พื้นฐานที่มีภายในห้องปฏิบัติการทั่วไป และให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็วและถูกต้อง โดยใช้เทคนิค paper chromatography dot blot hybridization (PACHA) และใช้เชื้อ *Salmonella* Typhimurium ATCC10708 เป็นแบคทีเรียต้นแบบในการศึกษา หลักการของ PACHA คือให้สารละลาย probe เคลื่อนที่ผ่านบริเวณหยด DNA ทดสอบ และเกิดการเข้าคู่กัน (hybridize) ระหว่าง target DNA กับ probe ถ้าหากไม่ใช่ target DNA probe จะเคลื่อนที่ผ่านบริเวณหยด DNA ทดสอบไปและไม่เกิดการเข้าคู่กัน โดยมีลำดับขั้นตอนในการศึกษาวิจัยดังนี้ ขั้นแรกเตรียมแผ่นทดสอบโดยการหยด DNA ของ *S.* Typhimurium ลงบน nylon membrane strip และทำการตรึง DNA ด้วยการฉายแสง UV เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่สองเตรียมตัวติดตาม (probe) โดยทำการติดฉลากสารปลอดรังสีลงบน PCR product ที่จำเพาะต่อ virulence gene ในบริเวณของ hyper-invasive locus A และ invasion A ที่อยู่บน chromosomal DNA ของจีนัส *Salmonella* ขั้นที่สามทดสอบความจำเพาะของ probe กับ DNA ของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และกลุ่มควบคุมผลลบด้วยเทคนิค dot blot hybridization ขั้นที่สี่นำ probe ที่ได้มาใช้เพื่อทำการปรับสภาวะทดสอบของเทคนิค PACHA และขั้นที่ห้าทำการตรวจติดตาม probe โดยทำปฏิกิริยากับ anti-Digoxigenin ซึ่ง conjugate กับเอนไซม์ alkaline phosphatase (AP) และตรวจสอบผลด้วย substrate คือ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitoblue tetrazolium (NBT/BCIP) โดยเอนไซม์ AP จะทำปฏิกิริยาและเปลี่ยน NBT/BCIP ให้เป็นตะกอนสีม่วงแกมน้ำเงินภายใน 15 นาที สามารถสังเกตเห็นผลการตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า (Chevalie *et al*., 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* spp. ให้ง่าย รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และประหยัดค่าใช้จ่าย

2. เพื่อพัฒนาชุดทดสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยใช้เทคนิค paper chromatography dot blot hybridization สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* spp. โดยให้ผลการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. Bacterial identification

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นเวลากว่าร้อยปีที่ได้มีการศึกษาค้นคว้าและพัฒนาการตรวจหรือการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากมีแบคทีเรียบางจำพวกที่สร้างคุณประโยชน์ให้แก่มนุษย์แต่ก็มีแบคทีเรียจำนวนไม่น้อยที่ก่อให้เกิดโรคทั้งรุนแรงและไม่รุนแรง อีกทั้งยังเป็นสาเหตุของโรคระบาดทั้งในคนและสัตว์ ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพและความสูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจตามมา การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียจึงมีบทบาทสำคัญหลายด้าน ได้แก่ด้านสุขอนามัยในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ด้านการวินิจฉัยเพื่อหาสาเหตุของโรค ด้านการผลิตยาเพื่อรักษาโรครวมไปถึงการควบคุมโรคติดต่ออันอาจเกิดจากการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นด้วยการเพาะเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำแนกจากลักษณะโคโลนี ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อและแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์จึงดำเนินตามขั้นตอนการหาชนิดของแบคทีเรียต่อไป (สุวณี, 2536)

1.1 Phenotypic methods

การจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพในเบื้องต้นโดยดูจากการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (nutrient agar) โดยการสังเกตลักษณะโคโลนี ที่ขึ้น ขนาด ขอบ ผิวหน้าของโคโลนี ความหนา ความนูน เนื้อโคโลนี ความทึบ และสีของโคโลนี การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid nutrient agar) สังเกตุความขุ่น สี การเคลื่อนที่ และการผลิตก๊าซ การเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (nutrient broth) สังเกตุปริมาณแบคทีเรีย ดูการกระจายของการเจริญว่าขุ่นทั่วทั้งหลอด (turbidity) ตกตะกอน (sediment) หรือขึ้นเป็นแผ่น (pellicle) เฉพาะที่ผิว สามารถจำแนกประเภทของแบคทีเรียได้ด้วยการดูรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ว่าเป็นชนิด coccus bacillus หรือ spirochete ดูขนาด และดูลักษณะการย้อมติดสีแกรมว่าเป็นชนิดแกรมบวก (สีน้ำเงิน) หรือแกรมลบ (สีแดง) นอกจากนี้สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ซึ่งเป็นการทดสอบแบคทีเรียใน substrate ชนิดต่างๆ การหมักย่อยน้ำตาล เป็นต้น (สุวณี, 2536)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยคุณลักษณะทางกายภาพจัดเป็นวิธีมาตรฐานสากลสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อแบคทีเรียทางจุลชีววิทยา เนื่องจากวิธีการนี้ให้ผลการตรวจสอบที่น่าเชื่อถือ มีความถูกต้องและแม่นยำสูง (Amann *et al*., 1995; Blankenfeld-Enkvist and Brannback, 2002; Relman, 1998) แต่ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือต้องการเวลาสำหรับการทดสอบหลายวันจึงทำให้ทราบผลการตรวจได้ล่าช้า นอกจากนี้การตรวจเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ ต้องทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด และต้องทำการทดสอบทางชีวเคมีทำให้เกิดความยุ่งยากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Betts, 2000; Boer and Beumer, 1999) กรณีของเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยากหรือเชื้อไม่มีชีวิตทำให้ไม่สามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคได้ด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ การใช้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน และการตรวจเชื้อระดับโมเลกุลจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจวินิจฉัย

1.2 Immunological methods

วิธีการตรวจเชื้อทางวิทยาภูมิคุ้มกันอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจน (antigen) กับแอนติบอดี (antibody) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้การตรวจวินิจฉัยมีความสะดวก รวดเร็วและมีความไวต่อเชื้อเป้าหมาย เพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อที่เพาะเลี้ยงยาก (Boer and Beumer, 1999; Luo, 2005; Wolcott, 1992) การตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันสามารถตรวจสอบได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี โดยปกติแอนติบอดีสามารถผลิตได้จากสัตว์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำจากเชื้อก่อโรคชนิดหนึ่งให้ผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อดังกล่าว แล้วนำแอนติบอดีที่ได้มาใช้เพื่อการตรวจสอบ โดยแอนติบอดีที่ผลิตได้มักเป็นชนิดโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มาจากเซลล์ต้นกำเนิดที่แตกต่างกัน ดังนั้นความจำเพาะจึงแตกต่างกัน ข้อเสียประการหนึ่งของการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีคือการเกิดความผันแปรจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของตัวสัตว์ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาแอนติบอดีมาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ซึ่งช่วยให้การตรวจเชื้อด้วยวิธีการนี้มีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือมากขึ้น (Boer and Beumer, 1999) การตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ ได้แก่ เทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีจากตัวอย่าง ทั้งนี้พบว่าการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ยังคงมีความไวต่อเชื้อค่อนข้างต่ำ (Honda *et al*., 1995) สามารถเกิดการจับข้ามกัน (cross reaction) ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) อยู่บ่อยครั้ง (Moganedi *et al*., 2007) นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ต้องการเวลาสำหรับทดสอบหลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วโมง และจำเป็นต้องทำการตรวจโดยผู้มีประสบการณ์ ทั้งยังต้องการเครื่องมือพิเศษในการอ่านผล (Xu *et al*., 2005)

1.3 Genotypic methods

ในภายหลังที่มีการศึกษาค้นคว้าและเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย พร้อมกับการค้นพบเทคโนโลยีทางพันธุกรรมมากมายหลายเทคนิค เช่น เทคนิค Southern hybridization, เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) และเทคนิค Polymerase Chain Reaction จึงได้มีการนำเทคโนโลยีทางพันธุกรรมมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียอย่างแพร่หลาย การตรวจหาสารพันธุกรรมหรือ DNA ของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถตรวจได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจโดยไม่ต้องอาศัยการเพาะเชื้อ ดังนั้นจึงมีประโยชน์อย่างมากสำหรับเชื้อที่เพาะเลี้ยงยากหรืออาจต้องใช้เวลานานในการเพาะเชื้อหรือไม่สามารถเพาะเชื้อได้ รวมถึงกรณีที่ไม่มีเชื้อมีชีวิตในสิ่งส่งตรวจ การตรวจเชื้อด้วยวิธีนี้มีความไวสูงทำให้สามารถตรวจพบได้แม้มีเชื้อเพียงปริมาณน้อยในสิ่งส่งตรวจ และมีความจำเพาะสูงเนื่องจากอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถทราบผลการตรวจได้อย่างรวดเร็ว (Delabre *et al*., 1998; Mothershed and Whitney, 2006) และมีความปลอดภัยสูงเนื่องจากลดการสัมผัสกับเชื้อในห้องปฏิบัติการ (ภัทรชัย, 2551) เทคโนโลยีทางพันธุกรรมได้นำไปประยุกต์สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียอย่างหลากหลาย ในการศึกษานี้จะขอยกตัวอย่างสองเทคนิคคือเทคนิค Polymerase Chain Reaction และ เทคนิค nucleic acid hybridization

1.3.1 เทคนิค PCR กับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย

Polymerase Chain Reaction (PCR) คือเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย (Bhatia and Baru, 2007) คิดค้นขึ้นโดย Mullis และคณะในปี ค.ศ. 1986 เทคนิค PCR ได้มีการนำมาประยุกต์ ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. จากสิ่งส่งตรวจหลายชนิด (Santos *et al.*, 2001) ได้แก่ น้ำ (Delabre *et al.*, 1998) ดิน (Cheun *et al.*, 2003) อาหาร (Feng, 2001; Jenikova *et al.*, 2000) น้ำนม (Tola *et al.*, 1997) อุจจาระ (Chiu and Ou, 1996) เป็นต้น ทำให้การตรวจวินิจฉัยเชื้อนั้นง่ายและรวดเร็วขึ้น มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อมากขึ้น (Shaban and Malkawi, 2007) และสามารถทราบผลการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบโดยใช้เวลาในการตรวจประมาณ 5 ถึง 24 ชั่วโมง แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นกับสภาพความจำเพาะของสภาวะ PCR และยังไม่รวมระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเชื้อและขั้นตอนการสกัด DNA ก่อนทำ PCR (Boer and Beumer, 1999; Kuske *et al*., 1998; Lazcka *et al*., 2007; Shaban and Malkawi, 2007; Singer *et al*., 2006) ต่อมาเทคนิค PCR ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มความไวต่อเชื้อในการตรวจวินิจฉัยเช่น เทคนิค real-time PCR และ multiplex-PCR นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจสอบที่ใช้ PCR ร่วมกับเทคนิคอื่นๆอีก เช่น surface acoustic wave sensor (SAW) หรือ evanescent wave biosensor (Lazcka *et al*., 2007)

1.3.2 Nucleic acid hybridization กับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย

Nucleic acid hybridization อาศัยคุณสมบัติการจับคู่กันของ complementary ระหว่าง dsDNA มาใช้ในการตรวจสอบ โดยศึกษาข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย แล้วทำการออกแบบ DNA ตรวจสอบให้มีลำดับเบสที่ complementary กับบริเวณที่จำเพาะของ target DNA ที่ต้องการตรวจสอบพร้อมกับติดฉลากบน DNA สายสั้นนี้เพื่อใช้เป็น DNA ตัวตรวจสอบ (probe) (Karunasagar *et al*., 2002, Wolcott, 1992) ฉลากที่ติดบน probe เช่น สารชีวโมเลกุล (Biotin หรือ Digoxigenin) และ สารเรืองแสง (fluorochromes) ทำให้สามารถตรวจติดตามได้ (Blankenfeld-Enkvist and Brannback, 2002) การเข้าคู่กันระหว่าง probe กับ target DNA มีความ จำเพาะเจาะจงเมื่อมีอุณหภูมิเหมาะสม (Wolcott, 1992) ด้วยคุณสมบัติของเทคนิคที่จำเพาะเจาะจงแบบเบสต่อเบส จึงได้มีการนำเทคนิค hybridization ไปประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย (Bhatia and Baru, 2007) อีกทั้ง target DNA ที่เตรียมเพื่อใช้กับเทคนิค hybridization สามารถเตรียมได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค PCR เนื่องจากบางตัวอย่างที่นำมาตรวจมีการปนเปื้อนมาก และเจือปนกับ DNA ที่นำมาตรวจสอบจึงไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase ในปฏิกิริยา PCR ได้ (Sun *et al*., 2005; Kuske *et al*., 1998) แต่ทั้งนี้การตรวจด้วยเทคนิค PCR มีความไวต่อเชื้อมากกว่าและใช้เวลาตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิค hybridization เนื่องจากเทคนิค hybridization ต้องการเวลาประมาณ 6-24 ชั่วโมง สำหรับให้ probe กับ target DNA จับคู่กัน (Bhatia and Baru, 2007; Wolcott, 1992) เพื่อที่จะแก้ปัญหานี้ จึงได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิค hybridization อย่างหลากหลาย ให้ใช้เวลาในการทดสอบรวดเร็วขึ้นและมีความไวต่อเชื้อมากขึ้น เช่น เทคนิค reverse dot blot hybridization (Fiss *et al*., 1992; Smith *et al*., 1989) เทคนิค sandwich hybridization (Corstjens *et al*., 2003; Polsky-Cynkin *et al*., 1985) เป็นต้น ทั้งยังเป็นหลักการพื้นฐานของเทคนิค microarray อีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. Principle of Polymerase Chain Reaction technique

2.1 องค์ประกอบของเทคนิค PCR

เทคนิค PCR เป็นการสร้าง DNA สายใหม่ในหลอดทดลองจากสาย DNA ที่เป็นแม่แบบ (template DNA) จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็น DNA สายใหม่ โดยจะเกิด PCR product เป็น dsDNA ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ template DNA โดยองค์ประกอบที่สำคัญของปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ 1) primers เป็น DNA เริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ template DNA ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของ DNA ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้าง primers จำเพาะ 2) dNTPs เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ DNA สายใหม่ 3) PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย 4) DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ DNA ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับ primer 5) template DNA คือ DNA ต้นแบบที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือเป็นตัวอย่าง DNA ที่ต้องการนำมาตรวจหา DNA จำเพาะ (Newton and Graham, 1997; Sankuntaw, 2007) โดยสารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร สำหรับใส่เครื่อง thermal cycler และเมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่อง thermal cycler ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่เหมาะสม จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ PCR product ที่ต้องการเป็นจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหา PCR product จะต้องนำมาแยกหาDNA โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel และทำการย้อมด้วยสีพิเศษ โดยจะเกิดการเรืองแสง UV ของแถบ DNA (Boer and Beumer, 1999; Mothershed and Whitney, 2006; Newton and Graham, 1997; Poxton, 2005)

2.1.1 การสกัด DNA

การสกัด DNA เป็นการทำเพื่อแยกเอาเฉพาะ DNA ออกมาซึ่งมีหลักการพื้นฐานคือเริ่มด้วยการทำให้เซลล์แตก แล้วอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของ DNA โปรตีน และองค์ประกอบอื่นๆ ที่อยู่ในเซลล์เพื่อแยกให้ได้เฉพาะ DNA ออกมา สำหรับการสกัด chromosomal DNA ของแบคทีเรียนั้นเริ่มต้นด้วยการทำให้ผนังเซลล์แตกอาจจะใช้วิธีต้มหรือใช้สารเคมี จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนและผนังเซลล์เพื่อแยก DNA ออก ซึ่งทั่วไปใช้ phenol/chloroform

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Sambrook, 1989) หรือ sodium acetate (Sambrook, 1989) หรือ ammonium acetate (Sambrook, 1989) ขั้นสุดท้ายทำการตกตะกอน DNA ด้วย ethanol หรือ isopropanol (Sambrook, 1989) นอกจากนี้ยังมีชุดสกัด DNA ทางการค้าเพื่อให้การสกัด DNA จากตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจง่ายขึ้น สะดวกและรวดเร็วมากขึ้น ได้ DNA ที่มีความบริสุทธิ์สูง (Oliveira *et al*., 2005) แต่ทั้งนี้ข้อเสียของชุดสกัด DNA คือมีราคาแพง และ column ที่ใช้ในการสกัด DNAไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีกทำให้เกิดความสิ้นเปลือง (Oliveira *et al*., 2005)

Yang *et al*. (2008) ได้ทำการเปรียบเทียบการสกัด DNA 5 วิธีการด้วยกันได้แก่ ใช้ EDTA buffer, ใช้ chelex-100, ใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์, ใช้ 2% SDS และ ใช้ 10% Triton-100 ซึ่งคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่ได้จากวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธีที่กล่าวมานี้นำมาเปรียบเทียบกับ DNA ที่สกัดด้วยชุดสกัด DNA ทางการค้าโดยใช้ความสะอาดของ DNA ที่ได้และปริมาณของ DNA เพื่อเป็นตัวชี้วัด นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้จากวิธีต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR จากการศึกษาได้ข้อสรุปว่าการสกัด DNA ด้วยวิธี chelex-100 เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการสกัด DNA จากอุจจาระ ทั้งยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และรวดเร็วกว่าการใช้ชุดสกัด DNA ทางการค้า

2.2 ขั้นตอนการทำ PCR

ขั้นตอนหลักของเทคนิค PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้คือ 1) Denaturation คือการให้ความร้อนกับระบบเพื่อให้ dsDNA เกิดการแยกเป็น ssDNA 2) Annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าจับกับ DNA เป้าหมายในบริเวณที่จำเพาะ 3) Extension เป็นขั้นตอนที่เอ็นไซม์ *Taq* polymerase ทำงานโดยการเติมเบสให้กับ DNA สายใหม่อย่างจำเพาะกับ template DNA ซึ่ง DNA สายใหม่ที่เกิดขึ้นเป็นแม่แบบให้กับการเพิ่มปริมาณในรอบต่อไป ดังนั้นปริมาณ DNA เป้าหมายจึงเพิ่มขึ้นแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential) แล้วจึงนำผลผลิตของ PCR (PCR product) ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (Karunasagar *et al*. 2002; Lazcka *et al*., 2007; Newton and Graham, 1997)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR ยังคงมีข้อจำกัดในกรณีที่สิ่งส่งตรวจเป็นอุจจาระหรือมีการปนเปื้อนสูง ส่งผลให้ก่อนทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ยังต้องอาศัยการเพิ่มปริมาณเชื้อ จากตัวอย่างเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียและเพื่อเจือจางตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่มีผลต่อปฏิกิริยา PCR เช่น bilirubin และ chelating agents (Oliveira *et al*., 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจ DNA จากตัวอย่างที่มาจาก ingested material, fecal flora หรือ mammalian cells และมีการปนเปื้อนกับเชื้ออื่นที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ target DNA มากๆ ยกตัวอย่างเช่น genome ของเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Escherichai coli* ที่มีความคล้ายคลึงกันมากกว่า 90% (Feder *et al*., 2001) หากสภาวะ PCR ไม่เหมาะสมอาจเป็นสาเหตุให้การเข้าจับของ primer เกิดผิดพลาด (mispriming) และเกิดผลบวกเท็จ (false positive) ตามมา และถ้าความยาวของ mispriming amplicon ที่เกิดขึ้นเทียบเท่ากันกับ target amplicon การตรวจสอบผลดังกล่าวบน agarose gel จะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ต้องทำการตรวจสอบร่วมกับเทคนิค Southern blot hybridization (Feder *et al*., 2001) และใช้ internal nucleotide probe เพื่อตรวจติดตามจึงจะสามารถระบุผลที่ถูกต้องได้ (Feder *et al*., 2001, Stone *et al*., 1995) นอกจากนี้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ต้องอาศัยอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ จึงใช้ได้กับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมด้านอุปกรณ์และสารเคมีเท่านั้น

3. Principle of hybridization technique

การค้นพบโครงสร้างและบทบาทหน้าที่ของ DNA โดยวัตสันต์และคริคในปี 1953 DNA มีรูปร่างเป็นเกลียวคู่ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ nucleotide ที่มีเบส adenine (A), guanine (G), cytosine (C) และ thymine (T) เรียงตัวแบบซ้ำไปซ้ำมา 4 หน่วยเป็นสาย DNA สองสายที่มาเข้าคู่กัน (dsDNA) โดย dsDNA ยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดขึ้นระหว่าง A กับ T และ G กับ C จึงเป็น complementary base กัน ดังนั้น DNA ทั้งสองสายที่มาเข้าคู่กันจึงเป็น complementary strand เมื่อให้ความร้อนกับ dsDNA หรือใช้สารเคมีที่มี pH สูงจะทำให้พันธะไฮโดรเจนสลาย และ dsDNA จะกลายเป็น ssDNA (denature) ในทำนองเดียวกันเมื่อลดอุณหภูมิหรือ pH ลง พันธะไฮโดรเจนระหว่าง ssDNA ทั้งสองเฉพาะที่เป็น complementary base กัน จะถูกสร้างกลับขึ้นมาใหม่ (reanneal) เป็น dsDNA ได้ตามเดิม ด้วยคุณสมบัติของ complementary base ทำให้ ssDNA สองสายที่ไม่ได้มาจากต้นกำเนิดเดียวกัน สามารถมาเข้าคู่กันและสร้างพันธะไฮโดรเจนกันได้ และเรียกกระบวนการเข้าคู่กันระหว่าง ssDNA สองสายที่มีแหล่งที่มาต่างกันนี้เรียกว่า hybridization (Wolcott, 1992, Notermans and Wernars, 1990)

nucleic acid hybridization ที่กล่าวถึงในการศึกษาครั้งนี้เป็นประเภท filter hybridization คือ target DNA ที่ต้องการตรวจสอบ จะถูกทำให้อยู่ในสภาพ ssDNA แล้วนำมาตรึงบนแผ่นตัวค้ำจุนเช่น nylon membrane, nitrocellulose หรือ กระดาษกรอง whatman 541 โดยการใช้ความร้อนหรือการฉายแสง UV จากนั้นจะนำ membrane แช่ในสารละลาย buffer ซึ่งมี probe (DNA/RNA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ติดตาม) ละลายอยู่และเป็น ssDNA ซึ่ง buffer จะมีองค์ประกอบที่ช่วยให้ ssDNA probe กับ target DNA เกิดการเข้าคู่กันได้เป็น hybrid ของ dsDNA การตรวจติดตาม hybrid ดังกล่าวสามารถกระทำได้โดยการสืบค้น signal จากสารรังสีหรือสารปลอดรังสีที่ติดฉลากอยู่กับ probe ด้วยวิธี autoradiography, colorimetric หรือ chemiluminescent detection (วสันต์, 2536)

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการ hybridization ระหว่าง probe สายยาวกับ target DNA/RNA นั้น ควรจะอยู่ต่ำกว่าค่า T_m ของ hybrid ประมาณ 25°C โดยมีการกำหนดค่ากลางสำหรับงาน hybridization ไว้ที่ 68°C ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการล้างแผ่น membrane หลังเสร็จปฏิกิริยา hybridization เพื่อขจัด probe ที่เกาะตามแผ่น membrane อย่างไม่จำเพาะออกไปควรใช้ประมาณ T_m – (12-20°C) (วสันต์, 2536) ตามด้วยการเคลือบ membrane หรือเรียกว่า block เป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยลดการจับกันอย่างไม่จำเพาะของ probe กับบริเวณอื่นที่ไม่มี target DNA อยู่เพื่อลดการเกิด background ซึ่ง background จะส่งผลกระทบต่อการวิเคราะห์ผลในภายหลัง (Anderson, 1999)

3.1 องค์ประกอบของเทคนิค hybridization

3.1.1 membrane

membrane ที่นิยมใช้ทำ nucleic acid hybridization มี 3 ชนิด ได้แก่ nitrocellulose membrane, nylon membrane และ charged nylon membrane ซึ่ง membrane แต่ละชนิดมีความสามารถในการจับกับ nucleic acid ด้วยพันธะที่ต่างกัน (Anderson, 1999) การเลือกใช้ membrane สำหรับตรึง DNA นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของ membrane ดังแสดงในตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของ membrane แต่ละชนิด

คุณสมบัติ	Nitrocellulose	Nylon	Charged nylon
ประเภทของกรดนิวคลีอิค	DNA และ RNA	DNA และ RNA	DNA และ RNA
binding capacity	80-120 µg cm^{-2}	~450-600 µg cm^{-2}	~450-600 µg cm^{-2}
pore size	0.45 µm (DNA) 0.22 µm (<500 nt DNA) 0.1-0.22 µm (RNAs)	0.45 µm (DNA) 0.22 µm (สำหรับกรดนิวคลีอิคสายสั้น)	0.45 µm
สภาพไอออนิคที่ใช้สำหรับ transfer	เกลือความเข้มข้นสูง (High salt concentration)	ไม่จำกัดความเข้มข้นของเกลือ (Wide range salt concentrations)	ไม่จำกัดความเข้มข้นของเกลือ (Wide range salt concentrations)
วิธีการตรึง	อบที่อุณหภูมิ 80°C ยึดด้วยพันธะ noncovalent	อบที่อุณหภูมิ 80°C ยึดด้วยพันธะ noncovalent หรือฉาย UV หรือ บ่มด้วย alkali ยึดด้วยพันธะ covalelent	อบที่อุณหภูมิ 80°C ยึดด้วยพันธะ noncovalent หรือฉาย UV หรือ บ่มด้วย alkali ยึดด้วยพันธะ covalelent
ข้อดี	Low backgrounds	High binding capacity Covalent binding	High binding capacity Covalent binding
ข้อเสีย			Higher background

ที่มา: Thermo Scientific (2010)

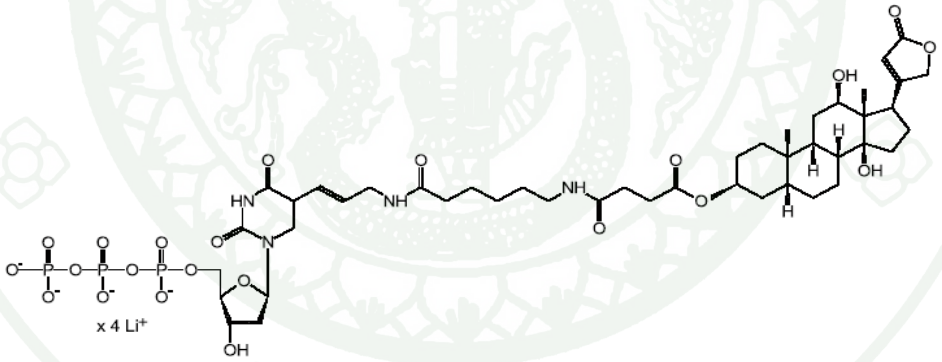
3.1.2 ประเภทของ probe และเทคนิคการเตรียม

ในอดีตการติดฉลาก DNA ได้มีการนำสารรังสีได้แก่ ^{32}P, ^{35}S หรือ ^{125}I มาติดฉลากเข้ากับสาย DNA หรือ RNA กันอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ในงานตรวจติดตาม nucleic acid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเภทต่างๆ เป็นที่นิยมในงาน hybridization เนื่องจากมีความไว และความจำเพาะเจาะจงสูง แต่มีข้อเสียคือ probe ที่ติดฉลากด้วยสารรังสีนี้จะมี half-life สั้น ทำให้สิ้นเปลืองเนื่องจากต้องเตรียมใหม่ทุกๆ 2 ถึง 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ผลจากรังสียังเป็นอันตรายต่อผู้ใช้งาน ยากต่อการจัดเก็บและกำจัด ภายหลัง hybridization เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมไปทั่วโลกการเตรียม probe จึงได้รับการพัฒนาให้เป็นแบบ nonradioactive probe ที่มีข้อดีหลายประการคือคงอายุการใช้งานได้ประมาณ 6 ถึง 12 เดือน นานกว่า radioactive probe ทำให้ไม่ต้องเตรียมทุกๆ 2 ถึง 3 สัปดาห์ ต้นทุนจึงถูกกว่า ในขณะที่ radioactive probe มี half life สั้นเช่น ^{32}P half life เพียง 34 วัน ที่สำคัญ nonradioactive probe ปลอดสารรังสีจึงไม่เป็นอันตรายหรืออาจเป็นอันตรายน้อยกว่าแม้ใช้เป็นประจำ นอกจากนี้ยังลดปัญหาเรื่องการเก็บและกำจัด radioactive probe (วสันต์, 2536)

สารติดฉลากที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันคือ Digoxigenin มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในภาพที่ 1 เป็นสารเสตรียรอยด์ที่ได้จากพืช *Digitalis pupurea* สามารถตรวจติดตามได้ง่ายและไม่เป็นอันตราย ตัวตรวจสอบจะจับกันกับโมเลกุลที่ถูกติดฉลากทาง antiDigoxigenin monoclonal antibody (McCreery, 1997)



ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างของ Digoxigenin – dUTP, alkali labile

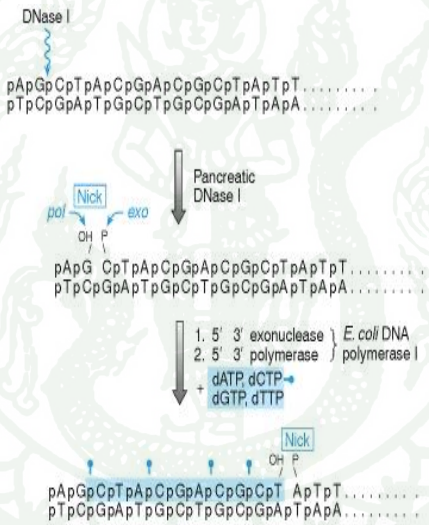
ที่มา: Roche (2006)

การเตรียม probe ที่ใช้ในวิธีการ hybridization ทั่วไปสามารถเตรียมได้หลายวิธี เช่น nick translation, random primers labeling หรือ PCR labeling สามารถเตรียมได้ทั้ง ssDNA probe หรือ dsDNA probe เมื่อจะนำมาใช้งาน probe ต้องทำให้อยู่ในรูป ssDNA probe จึงจะตรวจสอบได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) Nick translation

การติดฉลาก DNA สายยาวด้วยวิธี nick translation (ภาพที่ 2) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ประเภท คือ DNase I และ DNA polymerase I ซึ่ง DNase I ทำหน้าที่ตัด (nick) DNA ออกเป็นจุดๆ ในหลายตำแหน่งอย่างไม่จำเพาะ (random) ตำแหน่งที่ขาดบริเวณ 3' OH terminus สามารถทำหน้าที่เป็น primer ให้กับ DNA polymerase I และ DNA polymerase I จะเคลื่อนตัวย่อยสลาย DNA สายเก่าพร้อมไปกับการสร้าง DNA สายใหม่จากด้าน 5' ไป 3' ในระหว่างปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ หากเติม digoxigenin-dUTP ลงไป digoxigenin-dUTP ดังกล่าวจะถูกนำเข้าเชื่อมหรือ incorporate เข้ากับ DNA สายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้น โดยจะมี incorporation ของ digoxigenin-dUTP เข้ากับสาย DNA ประมาณ 30-50% (วสันต์, 2536)



ภาพที่ 2 การเตรียม probe ด้วยวิธี nick translation เอนไซม์ DNase I ตัดพันธะฟอสเฟตของ ssDNA พร้อมกับการเติม digoxigenin-dUTP เข้ากับสาย DNA ที่ซ่อมแซม

ที่มา: Strachan and Read (1999)

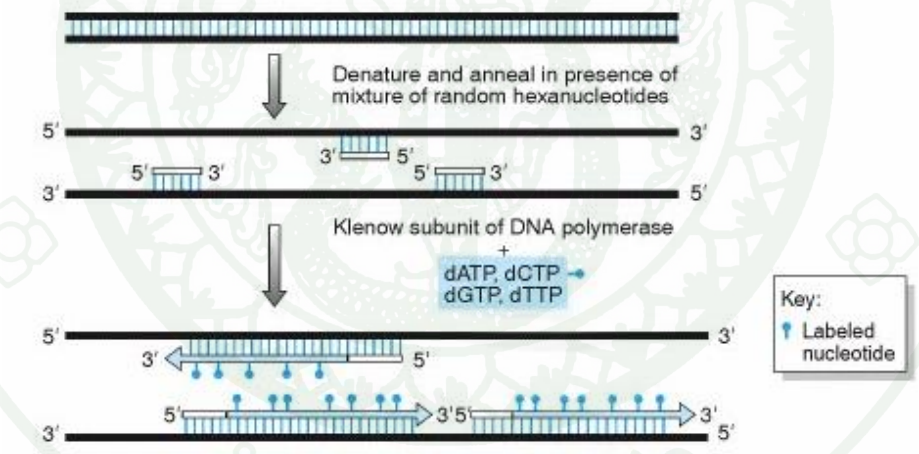
2) Random primers labeling

การติดฉลาก digoxigenin-dUTP เข้ากับสาย DNA ด้วยวิธีนี้ probe ที่ได้จะมีค่า specific activity สูง > 1×10^{9} dpm/1µg ของ DNA ตั้งต้น ทำให้มีความไวมากกว่า probe ที่ติด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฉลากด้วยวิธี nick translation เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน เนื่องจาก probe ติดฉลากด้วยวิธี nick translation จะมี specific activity เพียงประมาณ > 1×10^{8} dpm/1µg ของ DNA ตั้งต้น อีกทั้งการติดฉลากด้วยวิธี random primer labeling จะใช้ปริมาณ DNA ตั้งต้นน้อยกว่าวิธี nick translation ถึงกว่า 1 เท่าตัว นอกจากนี้ DNA ติดฉลากสายใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 10-40 เท่าของ DNA ตั้งต้น เนื่องจากมีกระบวนการ amplification เกิดขึ้นขณะติดฉลาก (วสันต์, 2536)

การติดฉลากด้วยวิธี random primer labeling เริ่มต้นด้วยการ denature ds DNA ด้วยความร้อนเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในสภาพ ssDNA จากนั้นเติม random primers (oligonucleotide) สังเคราะห์ที่มีขนาดประมาณ 6 nucleotides แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะหรือซ้ำกัน พร้อมกับเอนไซม์ klenow random primers จะเข้าเกาะ (annealing) บน ssDNA ที่ตำแหน่งต่างๆอย่างไม่จำเพาะ และทำหน้าที่เป็น primers ให้กับเอนไซม์ Klenow เข้าเกาะและเคลื่อนตัวจากด้าน 5’ ไป 3’ เพื่อสร้าง DNA สายใหม่ โดยอาศัย ssDNA เดิมเป็นแม่พิมพ์ และมี dNTP ที่ติดฉลากเป็นวัตถุดิบ (วสันต์, 2536)



ภาพที่ 3 การเตรียม probe ด้วยวิธี random primer labeling

ที่มา: Biosproject (2009)

3) การติดฉลากด้วยเทคนิค PCR

การติดฉลากพร้อมกับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR สามารถทำได้ 2 แบบ แบบที่หนึ่งติดสารติดฉลาก ไว้ที่ primer ข้างใดข้างหนึ่ง เมื่อเพิ่มปริมาณด้วย primer ดังกล่าว DNA ใหม่ที่เพิ่มปริมาณได้ก็จะมีฉลากติดอยู่ด้วย หรือแบบที่สองใช้ DIG-11-dUTP แทนที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบส dTTP เมื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR จะมีการแทรก DIG-11-dUTP แทนที่เบส T อย่างสุ่ม DNA ใหม่ที่เพิ่มปริมาณได้ก็จะมีฉลากติดอยู่ด้วย การติดฉลาก DNA ด้วยวิธีนี้สะดวกต่อการใช้งานเตรียม probe ช่วงที่ต้องการได้ และได้ probe ปริมาณสูง นอกจากนี้ยังสามารถประมาณปริมาณความเข้มข้น probe ได้โดยตรงจาก agarose gel (Roche, 2006)

3.2 ขั้นตอนการทำ hybridization

ขั้นตอนหลักของเทคนิค hybridization แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การเตรียม target DNA ลงบน membrane สามารถทำได้หลายรูปแบบ ได้แก่

1) Colony hybridization คือการนำ membrane ไปประกบกับโคโลนี ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยตรงและกำกับเครื่องหมายไว้เป็นสัญลักษณ์ให้ทราบตำแหน่ง โคโลนีของเชื้อจะติดขึ้นมาอยู่บน membrane โดยตรง ต้องทำการย่อยผนังเซลล์ด้วยด่างเพื่อให้ DNA สามารถจับกับ membrane ได้ และทำให้ DNA denature เป็น ssDNA แล้วปรับสภาพ membrane ให้เป็นกลางด้วยกรด (วสันต์, 2536)

2) Southern blot hybridization คือการย้าย (transfer) target DNA จาก agarose gel ที่ผ่านการแยกแถบ DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าสู่ membrane วิธีการนี้ใช้หลักการ capillary transfer คือให้ target DNA ค่อยๆ ซึมผ่านจากเจลขึ้นมาติดกับ membrane โดยมีสารละลายเกลือเข้มข้นเป็นสื่อกลางพา DNA ขึ้นไปให้กระดาษกรองหรือกระดาษทิชชู่เป็นตัวดูดซับสารละลายเกลือ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 6-24 ชั่วโมง แล้วทำการ denature ด้วยด่างตามด้วยการปรับสภาพ membrane ให้เป็นกลางด้วยกรด (วสันต์, 2536)

3) DNA dot blot hybridization เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว โดยทั่วไปต้องทำการ denature DNA ก่อนหยดลงบน membrane โดยตรงด้วย pipette มีข้อดีคือไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษ ทำได้ด้วยตัวเอง และประหยัดเวลา ข้อควรระวังคือต้องให้หยด DNA ที่ dot เกิดการแผ่ออกเป็นวงให้น้อยที่สุดเพื่อให้มีปริมาณ DNA ที่เข้มข้น เทคนิคนี้ได้มีการพัฒนาสู่รูปแบบทางการค้าโดยมีการนำ vacuum เข้ามาใช้ร่วมด้วยเพื่อให้ membrane ดูดซับ DNA ได้เร็วขึ้นไม่เกิดการแพร่ขยายออกเป็นวงกว้าง และ DNA ปริมาณมากสามารถรวมอยู่ตรงจุดที่ต้องการได้ ลักษณะของ dot เป็นระเบียบและเป็นรูปแบบ (block) เดียวกัน (Anderson, 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเสร็จสิ้นการ transfer DNA สามารถเลือกวิธีการสำหรับตรึง DNA ได้สองวิธี วิธีการแรกคือนำ membrane ไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อีกวิธีหนึ่งคือการฉาย (expose) แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254-312 nm. เป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที ด้วยระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 15-20 cm. DNA จะจับกับ membrane ด้วยพันธะโคแวเลนซ์ (covalence) (Anderson, 1999)

3.2.2 การทำ hybridization แบ่งได้เป็น 3 ระยะ

1) pre-hybridization หลังจากที่ตรึง DNA ไว้บน membrane เรียบร้อยแล้ว เริ่มต้นด้วยการเตรียม membrane ก่อนทำปฏิกิริยา hybridization โดยเติมสารละลายสำหรับการ hybridize (ไม่มี probe) ลงบนแผ่น membrane พร้อมทั้งจัดสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเกิด hybridize เพื่อปรับสภาพของ DNA บนแผ่น membrane ให้พร้อมจะทำปฏิกิริยา hybridize (วสันต์, 2536)

2) hybridization เป็นการเติมสารละลาย hybridize ที่มี probe ซึ่งได้ทำการ denature เป็น single-stranded เพื่อให้พร้อมสำหรับ hybridize ลงบนแผ่น membrane ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ target DNA กับ probe สามารถเข้าคู่กันได้ (วสันต์, 2536)

3) post-hybridization เป็นขั้นตอนการล้าง probe ที่ไม่สามารถจับเข้าคู่กันกับ target DNA ออกจาก membrane เพื่อลดผลจาก probe ที่ไม่ได้จับกับ target DNA (วสันต์, 2536)

3.2.3 การตรวจสอบผลการจับคู่

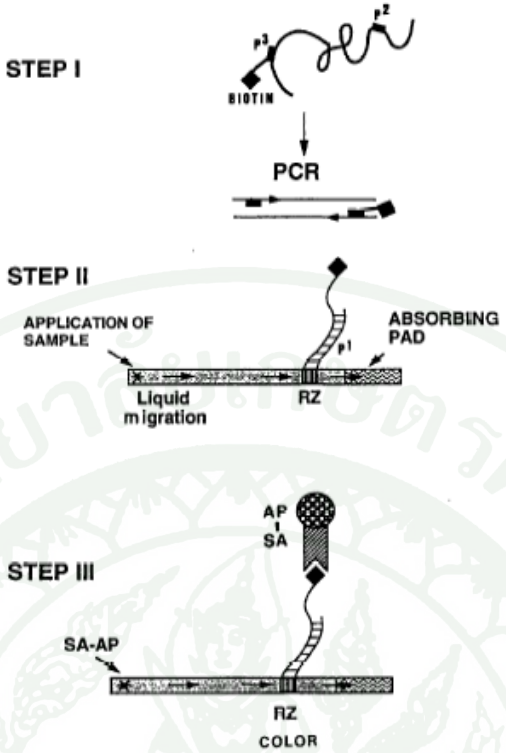
สำหรับการตรวจสอบผลการจับคู่มีหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสารที่ใช้ติดฉลากเป็น probe และชนิดของ substrate ที่ใช้ในการตรวจสอบ ในที่นี้ขอกล่าวถึงเฉพาะ NBT-BCIP ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ alkaline phosphate ทำปฏิกิริยาเมื่อ pH เหมาะสมคือที่ 9.5 และไม่ต้องการแสงเพื่อเกิดปฏิกิริยา เกิดสีม่วงแกมน้ำเงิน และสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Xu and Wilkinson, 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. Principle of Paper Chromatography technique

Paper chromatography hybridization assay (PACHA) เป็นการนำเทคนิค paper chromatography และเทคนิค DNA hybridization เข้ามารวมกัน คืออาศัยคุณสมบัติของ DNA ที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสแบบจำเพาะสองสายที่เป็น complementary กันจะต้องจับคู่กัน มาผนวกกับเทคนิค Paper Chromatography ที่ตัวทำละลายจะถูกดูดซับจากปลายด้านหนึ่งของ membrane และเคลื่อนที่ไปยังปลายอีกด้านหนึ่งด้วย Capillary force เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านหยดของสารที่ต้องการตรวจสอบ จะเกิดการแยกชั้นของสารดังกล่าวตามความสามารถการละลายได้ในตัวทำละลายขององค์ประกอบสาร หลักการของเทคนิค PACHA ที่มีรายงานอยู่ในปัจจุบันเป็นชนิด reverse dot blot hybridization โดยเริ่มต้นจากการนำ ssDNA ที่สังเคราะห์ขึ้น (oligonucleotide probe) มาตรึงลงบน nitrocellulose strip สำหรับเป็น probe จากนั้นนำ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาเป็น DNA template ในปฏิกิริยา PCR พร้อมกับเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย primer ที่ติดฉลากด้วย biotin ซึ่งจะได้ PCR product ที่ติดฉลากด้วย biotin แล้วนำ PCR product ที่ได้นี้เติมลงในสารละลาย hybridization และทำการแยก PCR product ให้เป็น ssDNA ก่อนที่จะนำปลายด้านหนึ่งของ strip ที่ตรึง DNA probe ไว้แช่ลงไป สารละลาย hybridization ก็จะซึมขึ้นไปพร้อมกับพา PCR product ขึ้นไปด้วย หากตัวอย่างทดสอบเป็นเชื้อชนิดเดียวกับ probe จะเกิด hybridize ระหว่าง PCR product กับ DNA probe ส่วน DNA ที่ไม่สามารถเกิด hybridize ได้ จะเคลื่อนที่ผ่านบริเวณของ DNA probe ไป และทราบผลการตรวจสอบโดยการตรวจติดตาม probe ที่ติดฉลากไว้ด้วย biotin จะปรากฏสีม่วงน้ำเงินบน strip (ภาพที่ 4) (Reinhartz *et al*., 1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 แสดงการพัฒนาเทคนิค PACHA: step 1 ทำการติดฉลากและเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR กับ primer (p^2) และ biotin primer (p^3), step 2 ทำการ denature PCR product (DNA labeled-biotin) แล้วนำมาทดสอบกับ oligonucleo-tide probe (p^1) ที่ตรึงอยู่บริเวณ RZ บน strip, step 3 เมื่อจุ่ม strip ลงในสารละลายของ denature PCR product จะเกิดการเคลื่อนที่ของสารละลายพร้อมกับนำพา PCR product ไปยังปลายอีกด้านหนึ่งของ strip ทำให้ผ่านบริเวณ RZ ซึ่งมี p^1 ตรึงอยู่ ถ้า PCR product ที่เคลื่อนผ่านมีลำดับเบสเหมือนกันกับ p^1 จะเกิด hybridization ที่บริเวณ RZ หากไม่มีลำดับเบสเหมือนกันจะเคลื่อนผ่าน RZ ไป ดังนั้นจึงสามารถติดตามการเกิด hybridization ได้ด้วย streptavidin-alkaline phosphatase (SA-AP) และทำปฏิกิริยากับ substrate ซึ่งจะปรากฏสีม่วงบริเวณ RZ

ที่มา: Reinhartz *et al*. (1993)

จากการศึกษาของ Reinhartz *et al*. (1993) พบว่าเทคนิค PACHA นี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็วมากกว่า hybridization แบบเดิม และสามารถทราบผลการตรวจสอบได้โดยไม่อาศัยอุปกรณ์พิเศษ ทั้งนี้ได้นำเทคนิค PACHA มาประยุกต์ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ PCR product (Brasher *et al*., 1998; Schnitzler *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2000) เนื่องจากเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR จะต้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำ PCR product มาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และถ่ายภาพผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel-documentation) ทำให้เกิดความยุ่งยาก ทั้งยังต้องมีอุปกรณ์เครื่องมือพิเศษ ได้แก่ ชุดเตรียมเจล (gel chamber), เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) และเครื่องถ่ายภาพเจล ต้องใช้สารเคมีอันตรายเช่น เอทิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) สำหรับย้อม DNA และต้องการเวลาสำหรับวิเคราะห์ (Brasher *et al*., 1998; Schnitzler *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2000) นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวสามารถวิเคราะห์ผลได้เพียงขนาดคร่าวๆ ไม่สามารถตรวจสอบในระดับ sequence ของ DNA ได้ จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง PCR product ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากๆได้ ส่งผลให้การวินิจฉัยผิดพลาด เมื่อผลการตรวจสอบปรากฏ PCR product ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากๆ จึงมักตรวจสอบด้วยเทคนิค sourthern hybridization ตามหลังเพื่อยืนยันผล PCR (Kalogianni *et al*., 2007) ต่อมาเทคนิค PACHA จึงได้มีการพัฒนา เป็นชุดทดสอบทางการค้า เช่น GeneComb Test Kit® ของบริษัท BioRad Laboratories (Schnitzler *et al*., 1999 ; Zhang *et al*., 2000)

5. Paper chromatography hybridization assay (PACHA) application

เทคนิค PACHA ช่วยให้การตรวจ PCR product นั้นทำได้ง่ายขึ้น รวดเร็วขึ้น ทั้งยังไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษ และหลีกเลี่ยงการใช้เอทิเดียมโบรไมด์ซึ่งเป็นสารอันตรายได้ ประกอบกับสามารถอ่านผลได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น (Brasher *et al*., 1998; Schnitzler *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2000) เทคนิคนี้ จึงเป็นที่สนใจและได้มีการนำ ไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคต่างๆ ทั้ง ไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต

การตรวจ DNA ของเชื้อไวรัส human papilloma 16 ด้วยเทคนิค PACHA พบว่าสามารถตรวจพบ DNA ที่มีปริมาณ 1-5 pg ด้วยเวลาสำหรับทำ hybridization ในขั้นตอนของ PACHA เพียง 25 นาที โดยประสิทธิภาพของการเกิด hybridization ขึ้นกับความเร็วการไหล (velocity) ของ hybridization solution และปริมาณของ DNA ติดฉลากที่เคลื่อนที่ผ่านบริเวณของ DNA probe และให้ข้อสรุปว่าเทคนิค PACHA เป็น hybridization ที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ และเชื่อถือได้ (Reinhartz *et al*., 1993)

การตรวจหา microbial pathogen ในตัวอย่างหอยนางรมดิบด้วยเทคนิค PACHA ซึ่งอยู่ในรูปแบบของชุดตรวจสอบทางการค้าที่มีชื่อว่า Genecomb™ kit เพื่อแยกเชื้อ *Escherichia coli*,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Salmonella Typhimurium, *Vibrio vulnificus*, *V. cholera* และ *V. parahaemolyticus* หลังจากการทำ multiplex PCR ด้วย primer 5 คู่ โดยมีการติดฉลากที่ forward primer ด้วย biotin ดังนั้น PCR product จะมี biotin ติดอยู่ที่ปลาย 5' แล้วนำ PCR product มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA โดยสังเคราะห์ oligonucleotide เบสที่อยู่ในช่วงของลำดับเบสที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (internal sequence) หยดและตรึงไว้บน nitrocellulose membrane สำหรับเป็น probe และทำการตรวจสอบผลตามคู่มือของชุดตรวจสอบ พบว่ามีความไวต่อเชื้ออยู่ที่ 10^1-10^2 เซลล์ (Brasher *et al*., 1998)

การประยุกต์ใช้เทคนิค PACHA ตรวจแยกสปีชีส์ของเชื้อปรสิตจีนัส *Emiria* เป็นเชื้อปรสิตก่อโรค coccidiosis ซึ่งเป็นโรคระบาดเกี่ยวกับทางเดินอาหารในไก่ พบว่ามีสปีชีส์ที่ก่อโรค 7 สปีชีส์ด้วยกัน การศึกษาของ Schnitzler *et al*. (1999) เริ่มต้นโดยออกแบบ genus-specific primers และทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ DNA แม่แบบจากเชื้อ *Emiria* ทั้ง 7 สปีชีส์ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบส (alignment) เพื่อหาบริเวณที่มีความเป็น unique ของแต่ละสปีชีส์และใช้ข้อมูลนี้เพื่อออกแบบ species-specific primers สำหรับแต่ละสปีชีส์และพัฒนาบริเวณ species-specific primers ดังกล่าวให้เป็น probe เมื่อได้ DNA ที่มีความจำเพาะในแต่ละสปีชีส์อย่างแท้จริงแล้วจึงพัฒนาเป็น probe สำหรับตรวจจำแนกสปีชีส์ โดยนำ probe ไปหยดและตรึงไว้บน nitrocellulose strip และทำการตรวจแยกเชื้อทั้ง 7 สปีชีส์ด้วยเทคนิค PACHA (GeneComb Test Kit®) ดำเนินการตรวจสอบตามคู่มือของชุดตรวจสอบด้วยหลักการคร่าวๆ ดังนี้ เริ่มโดยการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ *Emiria* ด้วยเทคนิค PCR กับ genus-specific primers ที่ reverse primer มีการติดฉลากไว้ ดังนั้นจะมีสารติดฉลากอยู่ที่ปลาย 3'ของ PCR product แล้วนำ PCR product มาตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA กับ nitrocellulose strip ที่มี probe หยดเตรียมไว้แล้ว หากเกิดผลบวกจะปรากฏสีม่วงที่ตำแหน่งหยดทดสอบดังกล่าว การศึกษานี้สรุปว่าการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค PACHA นั้น สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อปรสิตทั้ง 7 สปีชีส์ในจีนัส *Emiria* ได้อย่างแม่นยำ ไม่เกิดการจับข้าม (cross-reactivity) ระหว่างสปีชีส์ และการอ่านผลง่ายกว่าการวิเคราะห์ผลจากการทำ agarose gel electrophoresis นอกจากนี้ยังใช้เวลาเพียง 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจผลด้วยเทคนิค electrophoresis ซึ่งต้องการเวลา 2-4 ชั่วโมง พบว่าการตรวจสอบ PCR product ด้วย PACHA kit ช่วยให้ทราบผลการตรวจสอบได้เร็วกว่า (Schnitzler *et al*. 1999)

การประยุกต์ใช้เทคนิค PACHA ตรวจเชื้อปรสิตหนอนตัวกลม *Onchocerca volvulus* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดตาบอด และผิวหนังอักเสบในคน เป็นเชื้อระบาดประจำถิ่นในแถบอัฟริกาและ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลาตินอเมริกา การศึกษาของ Zhang *et al*. (2000) ได้เปรียบเทียบการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค PACHA, agarose gel electrophoresis (AGE) และ hybridization enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA) พบว่าปริมาณ DNA น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วยเทคนิค PACHA, AGE และ ELISA คือ 5 ng, 10 ng และ 2 ng ตามลำดับ ความไวต่อเชื้อของทั้งสามเทคนิคประมาณค่าได้ 88%, 84% และ 91% ตามลำดับ เทคนิค PACHA ตรวจ PCR product ได้ภายใน 30 นาทีโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือและอุปกรณ์พิเศษ ทำให้การตรวจวินิจฉัยง่ายขึ้น ทั้งยังสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยโรคในภาคสนามได้ (Zhang *et al*., 2000)

อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังคงไม่สามารถตรวจจาก DNA ได้โดยตรง DNA ที่ต้องการตรวจสอบต้องผ่านการทำปฏิกิริยา PCR และจะต้องมีการติดฉลากควบคู่ไปกับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย ดังนั้นจึงทำให้การตรวจแต่ละตัวอย่างต้องมีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น และในปัจจุบัน PACHA kit ยังคงเป็นชุดทดสอบทางการค้าที่มีราคาสูง (Brasher *et al*., 1998; Schnitzler *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2000) ด้วยหลักการอันน่าเชื่อถือ และความง่ายของวิธีการตรวจสอบแบบ PACHA การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำแนวความคิดดังกล่าวมาพัฒนา เพื่อให้สามารถดำเนินการตรวจสอบได้จาก DNA ที่ทำการสกัดจากตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR เพื่อลดระยะเวลาการทดสอบ ลดการใช้อุปกรณ์พิเศษ ลดปริมาณการใช้สารเคมีที่ราคาสูง สามารถทำการตรวจสอบได้ง่าย สะดวกและราคาไม่แพง

6. ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเชื้อ *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่สามารถติดต่อกันได้ทั่วโลกจัดเป็น food born pathogen ที่สำคัญ (Jones, 2005) โดยการรับเชื้อผ่านทางการบริโภคอาหาร และน้ำที่มีการปนเปื้อน เนื่องจากเชื้อนี้พบได้ในทางเดินอาหารของสัตว์ บางครั้งจึงปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ เนื้อไก่ ไข่ ผลิตภัณฑ์นม และพบว่าสัตว์ปีกรวมทั้งผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกมากกว่า 50% ที่เป็นพาหะส่งผ่านเชื้อนี้ (Kundinger 2004) จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี 1997 พบว่าแต่ละปีมีผู้ที่ป่วยด้วยโรคนี้ถึง 16 ล้านคนและมีผู้ที่ตายด้วยโรคนี้ถึง 600,000 คนทั่วโลก (Jones, 2005)ซึ่งอาการหลักเมื่อได้รับเชื้อคือ ท้องร่วง มีไข้ อาเจียน ปวดศีรษะ และปวดท้อง โดยปกติจะแสดงอาการเมื่อได้รับเชื้อเข้าไปเป็นเวลา 6-48 ชั่วโมง และมักหายเมื่อเวลาผ่านไป 1 หรือ 2 วัน ทั้งนี้ขึ้นกับ serovar ที่ผู้ป่วยได้รับ และในบาง serovar ได้แก่ *Salmonella enterica* serovar Typhi หรือ *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A, B หรือ C จะทำให้เกิดเป็นไข้ไทฟอยด์หรือพาราไทฟอยด์ จะแสดงอาการช้าหรือเร็วขึ้นกับปริมาณเชื้อที่ได้รับเข้าไป และขึ้นกับตัวคนไข้ที่ได้รับเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วย (อังกูร, 2549) โดยส่วนมากผู้ที่ไวต่อเชื้อคือ เด็ก คนชรา และผู้ที่ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยเอดส์จะมีโอกาสป่วยด้วยโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. มากกว่าคนปกติถึง 20 เท่า (Kundinger 2004)

6.1 ลักษณะทั่วไปและพันธุกรรมของเชื้อ *Salmonella* spp.

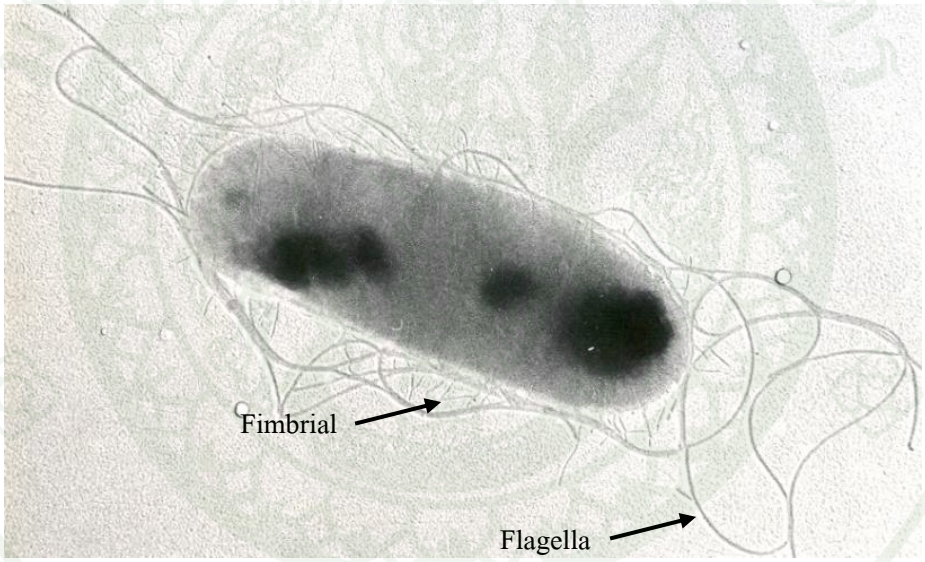
Salmonella spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล *Enterobacteriaceae* จีนัสนี้ แบ่งได้ 2 สปีชีส์ คือ *Salmonella enterica* และ *Salmonella bongori* ซึ่ง *Salmonella enterica* ประกอบด้วย 6 subgroups หรือ subspecies (subsp.) ได้แก่ I (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*), II, IIIa, IIIb, IV และ VI โดยเชื้อนี้นอกจากจะมีการแบ่งย่อยเป็น subspecies แล้ว ในแต่ละ subspecies ยังแบ่ง ย่อยออกไปอีกเป็น serovar ซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ทั้งสิ้นกว่า 2400 serovar ทั้งหมดนี้พบว่ามีเพียง *Salmonella enterica* subsp. *enterica* เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในสัตว์เลือดอุ่นรวมทั้งคน (Kim *et al.*, 2006) ส่วน subspecies ที่เหลือจะอาศัยในสัตว์เลือดเย็นและสิ่งแวดล้อม แต่ก็สามารถก่อโรคในคนได้ถ้าหากได้รับเชื้อ (อังกูร, 2549) นอกจากนี้ยังพบว่าบาง serovar สามารถปรับตัวต่อโฮสต์ได้ดีและมีความจำเพาะต่อโฮสต์ ยกตัวอย่างเช่น *Salmonella enterica* serovar Typhi ก่อโรคในคน *Salmonella enterica* serovar Dublin ก่อโรคในวัวควาย *Salmonella enterica* serovar Gallinarum ก่อโรคในสัตว์ปีก และ *Salmonella enterica* serovar Choleraesui ก่อโรคในสุกร นอกจากนี้ยังมี *Salmonella* spp. บาง serovar ที่สามารถติดต่อได้หลากหลายโฮสต์ เช่น *Salmonella enterica* serovar Enteritidis และ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ซึ่งเป็นสอง serovar ที่สำคัญที่สุดที่มีการติดต่อจากสัตว์สู่คน (WHO, 2005)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีขนาด 0.7-1.5 μm เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 mm ขอบเรียบ ผิวมัน ไม่มีสี และสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วๆไป โคโลนีจะมีลักษณะกว้าง หนา สีเทาปนขาว ชื้น ค่อนข้างกลม ลักษณะรูปโคม และเป็นเมือก ส่วนความโปร่งแสงและขนาดจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (อรุณ, 2541) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างแคปซูล (อรุณ, 2541; Cohen *et al.*, 1996) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาร์ที่ยาวและมีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) (ภาพที่ 5) ยกเว้น *Salmonella enterica* serovar Pullorum และ *Salmonella enterica* serovar Gallinarum ที่แฟลกเจลลาร์ไม่ทำงาน (Chiu and Ou, 1996) นอกจากนี้ในบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้มีการสร้าง hydrogen sulfide (H_2S) ยกเว้น *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi และ *Salmonella enterica*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

serovar Choleraesuis เป็นต้น โดยจะสร้างก๊าซ H_2S ได้เป็นจำนวนมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI agar (อรุณ, 2541)

ที่ผนังเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* spp. ยังปกคลุมไปด้วย pilli หรือมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า fimbrial ซึ่งมีลักษณะคล้ายขนสั้นๆ (ภาพที่ 5) (Chiu and Ou, 1996) ได้แก่ fimbriae type I, long polar fimbriae, plasmid-encoded fimbriae และ thin aggregative fimbriae ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการยึดติดกับเซลล์ (cellular attachment) เนื่องจาก fimbriae เป็นโครงสร้างที่ส่งเสริมให้เชื้อสามารถยึดติดอยู่กับเนื้อเยื่อลำไส้เล็กของโฮสต์ ภายหลังจึงพบว่า fimbrial เหล่านี้เป็นลักษณะทางกายภาพที่สำคัญที่ส่งผลให้ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรง ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของ fimbrial ใน *Salmonella* spp. แต่ละ serovar (Jones, 2005)



ภาพที่ 5 โครงสร้างเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* spp.

ที่มา: BioJobBlogger (2008)

โดยปกติแบคทีเรียแกรมลบจะมีเยื่อหุ้มเมมเบรนชั้นนอกซึ่งมีไลโพโพลีแซคคาไรด์ (lipo-polysaccharide) เป็นองค์ประกอบ และเช่นเดียวกันเชื้อ *Salmonella* spp. มีไลโพโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเมมเบรนชั้นนอกของผนังเซลล์ ไลโพโพลีแซคคาไรด์นี้ประกอบด้วย core domain คือ O-antigenic polysaccharide chain และ lipid A ในส่วนของ lipid A นี้จัดเป็นบริเวณอนุรักษ์ของแบคทีเรียแกรมลบทั้งหลายส่วนบริเวณ O-polysaccharide chains มีการ

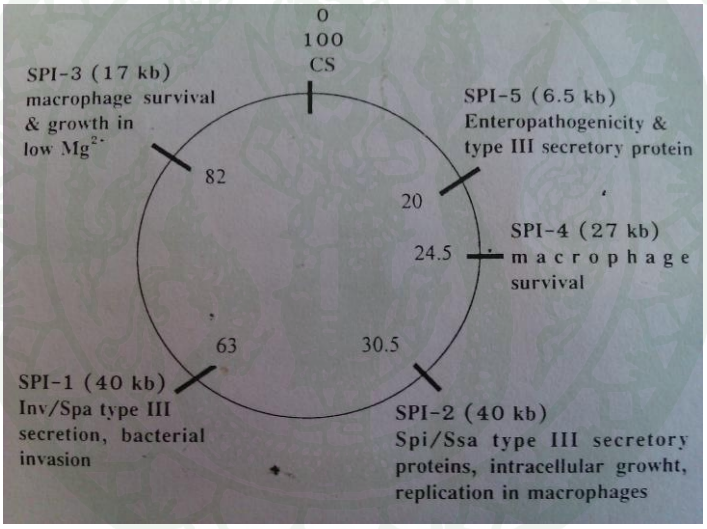
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลี่ยนแปลงได้อย่างหลากหลาย จึงใช้ O แอนติเจนสำหรับจำแนก serovar ของ *Salmonella* spp. (Chiu and Ou, 1996) นอกจากนี้ยังมี Vi แอนติเจน เป็นแอนติเจนที่คลุมอยู่รอบนอก O แอนติเจน และพบว่าโดยปกติเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มี Vi แอนติเจน จะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงกว่าเชื้อที่ไม่มี Vi แอนติเจน (อรุณ, 2541) จากความหลากหลายของลักษณะแอนติเจนแต่ละชนิดได้แก่ O แอนติเจน, แคปซูล (Vi) แอนติเจน และแฟลกเจลลา (H) แอนติเจน จึงนำคุณสมบัติด้านนี้มาใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา และใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกตาม Kauffmann-White serologic typing scheme เพื่อการจัดจำแนก serovar ต่างๆ ของเชื้อ *Salmonella* spp. (Luk *et al*. 1997; Chiu and Ou, 1996)

Salmonella spp. เป็นหนึ่งใน food born pathogen ตัวสำคัญ จึงได้มีการศึกษา เก็บรวบรวมข้อมูลในระดับ DNA และพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. โดยนำเทคโนโลยีทางพันธุกรรมเข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความรวดเร็ว ความแม่นยำ และความไวในการตรวจพบเชื้อ โดยปกติแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกจะมีกลุ่มของยีนก่อโรค ซึ่งสามารถพบได้ทั้งบนโครโมโซมของแบคทีเรียหรือพลาสมิด (plasmid) และกลุ่มยีนก่อโรคที่ว่านี้มีชื่อเรียกว่า “pathogenicity island” สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคภายในเซลล์และเข้าสู่ non-phagocytic เซลล์ได้ด้วยวงชีวิตของตัวมันเอง ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมส่วนใหญ่จึงมักเกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าสู่เซลล์ จากรายงานการศึกษาพบว่าเชื้อ *Salmonella* spp. มี pathogenicity island ขนาด 40 kb ตั้งอยู่บนตำแหน่งเซนทริโซมที่ 63 ของโครโมโซมแบคทีเรีย (ภาพที่ 6) และในภายหลังได้ให้ชื่อเรียกบริเวณดังกล่าวว่า *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) โดยที่ SPI-1 นี้จะเริ่มทำงานเมื่อเชื้อ *Salmonella* spp. บุกรุกเข้าสู่เซลล์และมีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษที่เกิดขึ้นภายในเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) นอกจากนี้ SPI-1 ยังเป็นแม่แบบของข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับโปรตีนส่วนใหญ่ใน type III secretion system (Suarez and Russmann, 1998) ซึ่ง type III secretion system เป็นระบบหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้นสามารถดำรงชีพและเพิ่มปริมาณตัวเองได้ภายในเซลล์แมคโครฟาจ และในภายหลังพบว่า type III secretion system มีบทบาทต่อการหลั่งสารโปรตีนชนิดพิเศษที่เรียกว่า type III หรือ “contact-dependent protein” ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียเข้าสู่เซลล์ยูคาริโอต ดังนั้นจึงส่งผลกระทบได้ทั้งสองด้านในเวลาเดียวกันคือผลต่อโฮสต์เซลล์ เช่น เป็นสาเหตุการเกิดเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ และผลที่เกิดภายในเซลล์แบคทีเรียคือไปกระตุ้น transcription factor ต่างๆ นอกจากเชื้อ *Salmonella* spp. แล้วยังสามารถพบ type III secretion system นี้ได้ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอีกหลายชนิดได้แก่ *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia coli*, *Chlamydia*, *Pseudomonas*, *Erwinia* และ *Xanthomonas* (Coombes *et al*., 2005; Jones, 2005; Suarez and Russmann, 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากรายงานการศึกษาในเชื้อ *Salmonella* Typhimurium พบ pathogenicity island ตำแหน่งที่ 2 ขนาด 40 kb และได้ระบุให้เป็น SPI-2 ตั้งอยู่บนเซนทริโซมที่ 30.7 ของโครโมโซมแบคทีเรีย (ภาพที่ 6) โดย SPI-2 ถอดรหัสให้ส่วนประกอบของระบบควบคุม (regulatory system) และ type III secretion system อีกชนิดหนึ่ง พบว่าการทำงานของ SPI ทั้งสองบริเวณนี้มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อในระยะต่างๆ จากรายงานการศึกษาในหนูทดลอง พบว่า SPI-1 ทำงานเมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่เซลล์ ทำให้เกิดการบุกรุกภายในลำไส้ และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อภายในเซลล์ เมื่อเชื้อเข้าสู่เซลล์ได้แล้วจึงเป็นหน้าที่ของ SPI-2 คือทำให้เชื้อสามารถดำรงชีพอยู่ภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ ทั้งนี้นอกจากการทำงานของ SPI-1 และ SPI-2 แล้วยังมีส่วนปลีกย่อยอื่นๆ เรียกว่า pathogenicity islets ได้แก่ *sifA*, *pagC, msgA*, *iviVI,* และยีนของfimbrial บางตัวที่ช่วยเสริมความรุนแรงให้กับเชื้อ *Salmonella* spp. อีก (Suarez and Russmann, 1998)



ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งเซนทริโซม (CS) ของ *Salmonella* pathogenicity island บนโครโมโซมของ *Salmonella* spp.

ที่มา: ปฐมาพร (2548)

ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นสาเหตุก่อโรคไข้ไทฟอยด์ในคนและเป็นเชื้อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญทั้งคนและสัตว์ เนื่องจากลักษณะเฉพาะพิเศษของเชื้อนี้ที่สามารถรุกรานเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยการก่อโรคนั้นขึ้นกับสภาวะแวดล้อมและ regulator gene ต่างๆ ดังนั้นในการศึกษาทางพันธุกรรมยีนจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เชื้อสามารถรุกราน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลล์ได้ ในที่นี้จะขอกล่าวถึงยีนที่มีบทบาทสำคัญสำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. 2 ยีนด้วยกันคือ ยีน hyper-invasive locus A (*hilA*) เป็นยีนที่ทำให้เชื้อสามารถรุกรานเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ (Coombes *et al*., 2005; Jones, 2005; Cardona-Castro *et al*., 2002; Suarez and Russmann, 1998) และอีกยีนหนึ่งคือ ยีน invasion (*inv*) เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการบุกรุกเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก (epithelial cell) (Galan *et al*., 1992)

6.1.1 ความสำคัญของยีน hyper-invasive locus A (*hilA*)

ยีน *hilA* เป็นกลไกควบคุมส่วนกลาง (central mechanism) ของยีนบุกรุกตั้งอยู่ในส่วนของ SPI-1 (ภาพที่ 7) (Cardona-Castro *et al.*, 2002; Jones, 2005) มีผลกระตุ้นการแสดงออกของ SPI-1 ทั้งทางตรงและทางอ้อมที่บริเวณตำแหน่ง promoter ของ SPI-1 เนื่องจากเป็นยีนแม่แบบสำหรับองค์ประกอบของโครงสร้างเซลล์, chaperones และหลั่ง effectors โปรตีนต่างๆ ที่อยู่ใน type III secretion system ซึ่งมีความจำเป็นต่อการบุกรุกเซลล์ (Coombes *et al*., 2005; Jones, 2005; Cardona-Castro *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวควบคุมการลอกรหัส (transcriptional regulator) ในตระกูล OmpR/ToxR ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นยีนบุกรุกให้ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและ genetic regulatory factors ต่างๆ ยังถอดรหัสมาจากบริเวณควบคุมของยีน *hilA* อีกด้วย (Coombes *et al*., 2005; Jones, 2005; Suarez and Russmann, 1998) จึงส่งผลให้ยีนบุกรุกมีการปรับตัวเพื่อควบคุมยีนให้สามารถทำงานในสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ เช่น กรณีที่เชื้อ *Salmonella* spp. ตกอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ, osmolarity สูง, ระยะที่เชื้อกำลังเจริญและมีการเพิ่มจำนวนแบบเอกซ์โพเนนเชียล รวมทั้งในสภาวะที่เป็นเบสอ่อนๆ เป็นต้น (Jones, 2005) ยิ่งไปกว่านั้นยีน *hilA* ยังมีความจำเป็นต่อโคโลนีของแบคทีเรียภายนอกเซลล์ (extracellular) และบริเวณ luminal compartment ของลำไส้โฮสต์ ยีนนี้จึงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเชื้อก่อโรค *Salmonella* spp. (Pathmanathan *et al*., 2003)

จากรายงานการศึกษาเพื่อตรวจหา conserve region ของลำดับเบสภายใน *hilA* ยีนจากเชื้อ *Salmonella* spp. serovar อื่นๆได้แก่ *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* ParatyphiA, *Salmonella* ParatyphiB, *Salmonella* Pullorum ด้วยเทคนิค PCR และ hybridization พบว่าลำดับเบสของยีนก่อโรคร้ายแรงชนิดนี้มีความเหมือนกันในทุกๆ serovar (Cardona-Castro *et al.*, 2002) primer ที่ออกแบบจากบริเวณ *hilA* ยีนมีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. 100% ไม่ปรากฏผลบวกกับเชื้อ *Escherichia* ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Salmonella* spp. อย่างมาก (Pathmanathan *et al*., 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Narongwanichagarn and Mulika (2005) นำข้อมูลทางพันธุกรรมของ *hilA* ยีนของ *Salmonella* Typhimurium (Accession number U 25352) มาใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบ primer *hilA* ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PCR และพัฒนาเป็น probe สำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค hybridization พบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้ง 132 serovar และไม่พบผลบวกกับเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp. (non-*Salmonella* spp.) 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *Actinomyces* spp., *Aerococcus viridians*, *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *E. coli*, Hemolytic *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pasteurella mutocida*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptoococcus agalactiae* และ *Streptoccus suis* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า probe ที่พัฒนาขึ้นจาก *hilA* ยีนมีความถูกต้องแม่นยำ และสามารถใช้ตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ การศึกษาครั้งนี้จึงนำ primer ดังกล่าวมาใช้เพิ่มปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium (ATCC 10708) พร้อมกับติดฉลากเพื่อใช้เป็น probe สำหรับพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PACHA

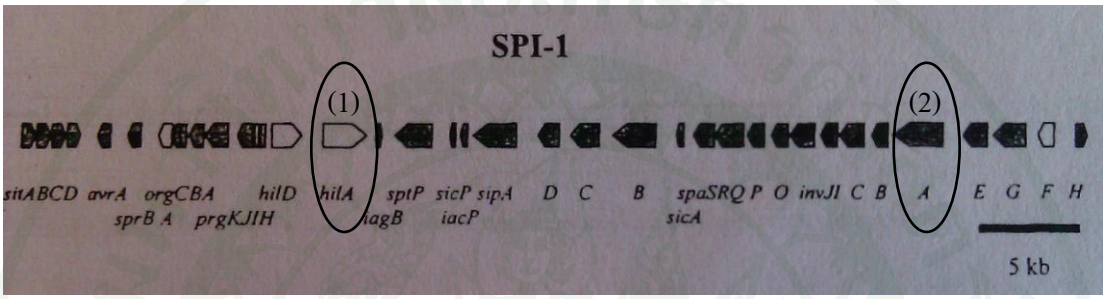
6.1.2 ความสำคัญของยีน invasion locus A (*invA*)

กลุ่มยีน invasion (*inv*) (ภาพที่ 7) เป็นกลุ่มยีนแม่แบบที่ถอดรหัสให้โปรตีนที่เป็นกลไกสำคัญในการบุกรุกเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก (epithelial cell) พบกลุ่มยีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมในส่วนของ SPI-1 ในบริเวณของกลุ่มยีน *inv* พบ invasion locus A (*invA*) เป็นยีนแรกของโอเพอรอน (operon = กลุ่มยีน) และมีรายงานว่ายีน *invA* เป็นยีนแม่แบบสำหรับถอดรหัสให้โปรตีนบางตัวที่เป็นองค์ประกอบของ type III secretion system และจำเป็นอย่างยิ่งต่อการบุกรุกเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก (Galan *et al*., 1992) เนื่องจากยีน *invA* สามารถตรวจพบได้ใน *Salmonella* spp. ทุกๆ serovar จึงจัดเป็นยีนที่มีความจำเพาะต่อจีนัส *Salmonella* ในการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PCR จึงนิยมใช้ยีนดังกล่าวเป็นยีนเป้าหมาย (target gene) (Singer *et al*., 2006)

จากความสำคัญและความจำเพาะของยีน *invA* สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp. บริเวณลำดับเบสภายในยีน *invA* จึงได้ถูกนำมาใช้เพื่อออกแบบเป็น primer สำหรับการตรวจวินิจฉัย ด้วยเทคนิค PCR และจากการทดสอบ primer (ตารางที่ 2) ที่ออกแบบจากบริเวณดังกล่าว พบว่ามีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ในทุก serovar ที่นำมาใช้ในการทดสอบ (Jenikova *et al*., 2000; Kishima *et al*., 2008; Salehi *et al*., 2005) พร้อมกับยืนยันความจำเพาะของ primer ด้วยเชื้อกลุ่ม non-*Salmonella* spp. ได้แก่ *Citrobacter freundii* , *Escherichia coli*, *Entero-bacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia* (Jenikova *et al*., 2000; Salehi *et al*., 2005) *Proteous*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

mirabilis, *Shigella sonnei* และ *Shigella boydii* (Salehi *et al*., 2005) ผลการทดสอบไม่เกิด PCR product จากเชื้อกลุ่ม non- *Salmonella* spp. (Jenikova *et al*., 2000; Kishima *et al*., 2008; Salehi *et al*., 2005) ดั้งนั้น primer ที่ออกแบบนี้สามารถใช้ตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ การศึกษาครั้งนี้จึงนำ primer ดังกล่าวมาใช้เพิ่มปริมาณเชื้อ *Salmonella* Typhimurium (ATCC 10708) พร้อมกับติดฉลากเพื่อใช้เป็น probe สำหรับพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PACHA



ภาพที่ 7 ชุดยีนใน *Salmonella* pathogenicity island ขนาดยาว 40 kb บนโครโมโซมของ *Salmonella* Typhimurium (1) ยีน hilA (2) ยีน invA

ที่มา: ปฐมาพร (2548)

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบส primer hilA, invA1 และ invA2

ชื่อยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'- 3')	ขนาดที่คาดหมาย	อ้างอิง
hilA	hilA F	TGACCGTTAGTACTAACAGC	821 bp	Narongwanichagarn and Mulika, 2005
	hilA R	CATCGAGCAAAAGATTCGC		
invA	invA1F	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT	244 bp	Jenikova *et al*., 2000
	invA1R	AGACGACTGGTACTGATCGATAAT		
invA	invA2F	TTGTTACGGCTATTTTGACCA	521 bp	Kishima *et al*., 2008
	invA2R	CTGACTGCTACCTTGCTGATG		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การตรวจแยกเชื้อ *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เจริญได้บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ เช่น blood agar, MacConkey agar มีลักษณะโคโลนีบน blood agar เช่นเดียวกับโคโลนีของแบคทีเรียในสกุล Enterobacteriaceae และให้ลักษณะโคโลนีไม่หมักย่อยน้ำตาลแลคโตส บน MacConkey agar ขนาด 2-4 mm แต่บางสายพันธุ์มีขนาดเล็กเพียง 1 mm ในการเพาะเลี้ยงแยก *Salmonella* spp. จำเป็นต้องใช้ enrichment media ได้แก่ Selenite F broth หรือ Gram negative broth (GN broth) โดยนำตัวอย่าง 0.5 g เติมลงใน broth 10 ml และอบ broth นี้ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาจึง streak ลงบน selective media อื่นๆ เช่น *Salmonella-Shigella* (SS) agar, DHL agar, xylose-lysine-deoxycholate (XLD) agar, bismuth sulfite (BS) agar, brilliant green (BG) agar, MSRV media, Rambach (Rm) agar, Hektoen enteric (HE) agar เป็นต้น (อรุณ, 2541)

โดยองค์ประกอบใน selective media สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไม่ต้องการ แต่มีสารเสริมเช่น vitamin, blood หรือ serum ร่วมกับการให้สภาวะที่เหมาะสมขณะบ่มเพาะเชื้อ เพื่อให้เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถเจริญและปรับสภาพได้ แต่จะไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่น เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SS, HE และ Rm agar มีน้ำดีเข้มข้นเป็นองค์ประกอบซึ่งมีผลไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกทุกชนิดและขัดขวางการเจริญของแบคทีเรีย coliform หลายๆ ชนิด เป็นต้น นอกจากนี้ใน selective media ยังมีสาร indicator เพื่อช่วยในการจำแนกเชื้อ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต H_2S ได้ โดยอาศัย sulfur จากกรดอะมิโนเช่น cysteine หรือสารประกอบที่มี sulfur เป็นองค์ประกอบและ H_2S ที่ถูกปล่อยออกมาจะมีลักษณะเป็นตะกอนสีดำ แต่มี *Salmonella* spp. บาง serovar ที่ไม่ผลิต H_2S เช่น *Salmonella* Typhi อีกทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriacae* หลายชนิดก็สามารถสร้าง H_2S ได้ เช่น *Citrobacter* และ *Proteus* เป็นต้น ดังนั้น H_2S จึงไม่สามารถใช้เพื่อเป็น indicator สำหรับจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ได้อย่างสมบูรณ์ (Chapman, 2006)

นอกจากนี้การจำแนกจากลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีข้อจำกัด เนื่องจากโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ปรากฏขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Escherichia coli* เพื่อให้การวิเคราะห์ผลมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น จึงต้องทำการทดสอบโคโลนีที่สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี (Singer *et al*., 2006) จึงทำให้การจำแนกเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อเกิดความยุ่งยาก ซับซ้อนและสิ้นเปลืองเวลา โดยทั่วไปต้องการเวลาถึง 7 วันจึงจะได้ผลการตรวจสอบที่เสร็จสมบูรณ์ และข้อจำกัดในเรื่องของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

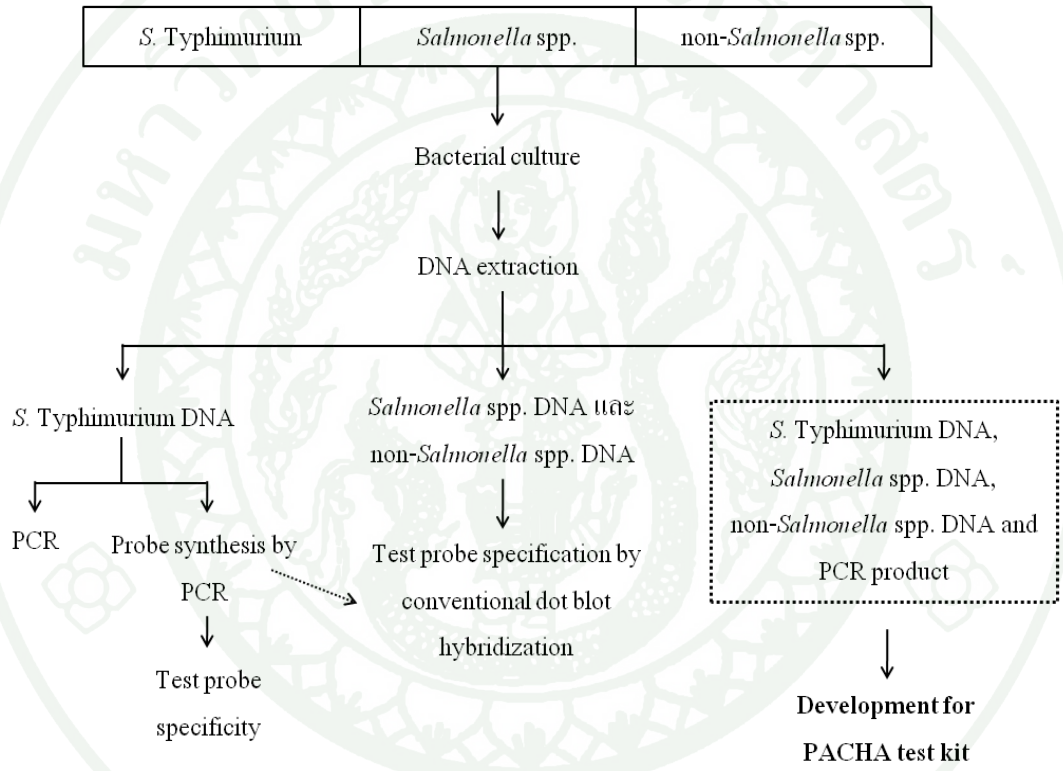
ปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ที่มีอยู่น้อยในตัวอย่างส่งตรวจ ทำให้การตรวจหาเชื้อในเบื้องต้นด้วยวิธีการเพาะเชื้อนั้นยังไม่มีประสิทธิภาพพอ และเมื่อต้องตรวจกับตัวอย่างจำนวนมากๆ พบว่าวิธีนี้ยังคงมีราคาสูง (Pathmanathan *et* al., 2003; Singer *et al*., 2006)

เนื่องจากการข้อจำกัดของตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. เช่น fluorescent antibodies, latex agglutination, enzymes-linked immunosorbent assay และ motility enrichment เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* spp. ในเบื้องต้น พบว่าเทคนิคต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็วกว่าการเพาะแยกเชื้อ แต่ขาดความจำเพาะเนื่องจากมีโอกาสเกิด cross-reaction และทำให้เกิดผลบวกปลอมจากเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเฉพาะที่คล้ายคลึงกัน ต่อมาเทคนิคทางอณูวิทยาเข้ามามีบทบาทมากยิ่งขึ้นสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Salmonella* spp. เช่น เทคนิคPCR โดยทำการออกแบบ primer ให้มีความจำเพาะต่อบริเวณของลำดับเบสที่พบได้เฉพาะ genome ของ *Salmonella* spp. เท่านั้น (unique sequence) ความจำเพาะของเทคนิค PCR กับยีนเป้าหมายทำให้การตรวจวินิจฉัยเชื้อแม่นยำมากขึ้น (Hardison, 2007; Salehi *et al*., 2005) แต่อย่างไรก็ตาม PCR ยังคงมีข้อจำกัดดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ดังนั้นการตรวจสอบหาเชื้อ *Salmonella* spp. ยังต้องการการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจเชื้อให้มีความง่ายต่อการใช้งาน สามารถตรวจได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อ สามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องมือพื้นฐานในห้อง ปฏิบัติการ และราคาไม่แพง ไว้สำหรับตรวจหาเชื้อในเบื้องต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ, สกัด DNA, นำ DNA ของเชื้อ *S.* Typhimurium มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ probe, ทดสอบความจำเพาะของ probe ที่ผลิตได้กับ DNA ของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และ non - *Salmonella* spp. (กลุ่มควบคุมผลลบ) และนำ probe ไปใช้ในการพัฒนาเทคนิค PACHA โดยมีแผนการทดลองดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงแผนการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อ และสกัด DNA จากเชื้อ *Salmonella* spp. และ non - *Salmonella* spp.

เพิ่มปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. และ non - *Salmonella* spp. ดังรายชื่อเชื้อในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 ตามลำดับ ทำการเพาะเชื้อบริสุทธิ์ใน nutrient broth (NB) (Difco, Detroit, USA) บ่มเชื้อที่ 37°C นาน 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อในอาหารเหลวอย่างละ 1 ml ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 ×g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที ดูดอาหารเหลวทิ้ง และล้าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตะกอนด้วย 0.85% NSS 1 ml และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3,000 ×g อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที (Yang *et al*., 2008)

นำตะกอนเชื้อมาสกัด DNA ด้วยวิธี chelex ซึ่งดัดแปลงจาก Yang *et al*. (2008) โดยเติม 5% Chelex-100 ในน้ำกลั่น (Sigma-Aldrich Pte Ltd., Singapore) ปริมาตร 200 µl ลงในตะกอนเชื้อผสมให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกเศษเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 ×g เป็นเวลา 5 นาที และเก็บ DNA ที่อยู่ส่วนเหนือตะกอน 150 µl ย้ายใส่หลอด microcentrifuge tube อันใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ซึ่งใช้ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. เพื่อเตรียม probe, ทดสอบความจำเพาะของ probe และเทคนิค PACHA ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงรายชื่อเชื้อ *Salmonella* spp. และที่มา

	เชื้อ	ที่มา
1	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 10708)	National Institute of Animal Health
2	*Salmonella enterica* serovar Rissen	Local strain identification
3	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium	Local strain identification
4	*Salmonella* Gr.B27	Local strain identification
5	*Salmonella* Gr.C16	Local strain identification
6	*Salmonella* Gr.C17	Local strain identification
7	*Salmonella* Gr.C18	Local strain identification
8	*Salmonella* Gr.C25	Local strain identification
9	*Salmonella* Gr.C26	Local strain identification
10	*Salmonella* Gr.C28	Local strain identification
11	*Salmonella* Gr.E22	Local strain identification
12	*Salmonella* Gr.E23	Local strain identification
13	*Salmonella* Gr.E24	Local strain identification

All local strains are identified by Center of Veterinary Research and Diagnosis, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 แสดงรายชื่อเชื้อ non- *Salmonella* spp. และที่มา สำหรับใช้เป็นเชื้อกลุ่มควบคุมผลลบ (negative control) ในกลุ่ม enteric bacteria pathogens

	เชื้อ	ที่มา
1	*Escherichia coli* (ATCC 25922)	National Institute of Animal Health
2	*Klebsiella pneumonia* (Local strain)	National Institute of Animal Health
3	*Streptococcus suis*	Local strain identification
4	*Staphylococcus aureus*	Local strain identification
5	*Staphylococcus arlettae*	Local strain identification
6	*Pseudomonas aeruginosa*	Local strain identification
7	*Eawardsiella tarda*	Local strain identification
8	*Aeromonas aeruginosa*	Local strain identification

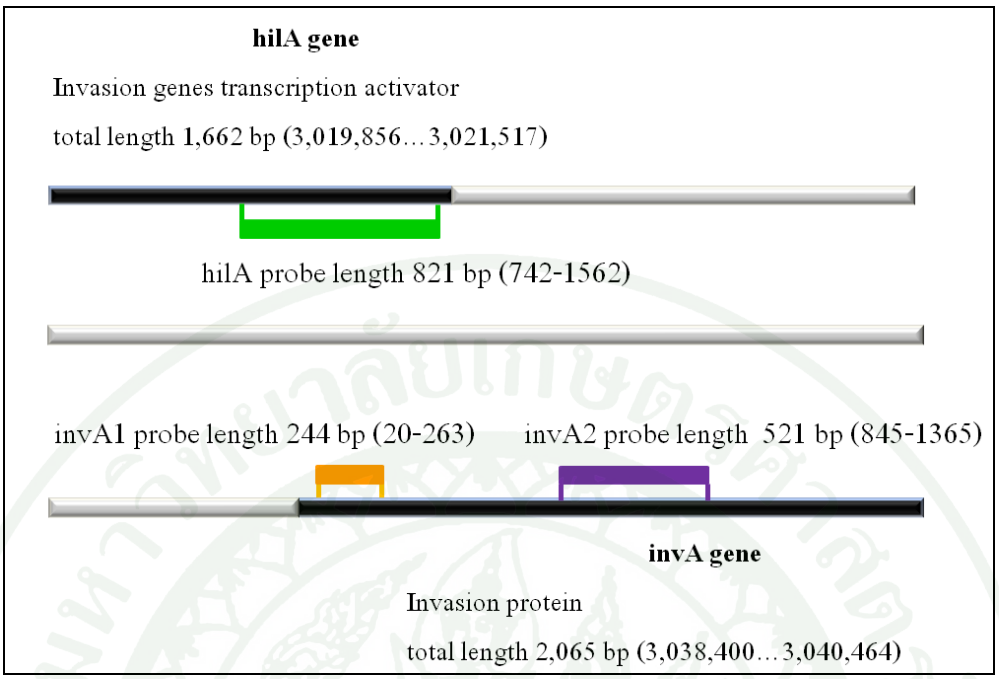
All local strains are identified by Center of Veterinary Research and Diagnosis, Faculty of Veterinary Medicine Kasetsart University.

2. การสังเคราะห์ Probe โดยวิธี PCR

การศึกษาครั้งนี้ติดฉลาก probe ด้วยเทคนิค PCR โดย primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งหมด 3 คู่ (ตารางที่ 2) primer คู่ที่ 1 (hilA) จะสร้าง probe ที่มีความยาว 821 bp (Narongwanichagarn and Mulika, 2005) primer คู่ที่ 2 (invA1) จะสร้าง probe ที่มีความยาว 244 bp (Jenikova *et al*., 2000) และ primer คู่ที่ 3 (invA2) จะสร้าง probe ที่มีความยาว 521 bp (Kishima *et al*., 2008)

สังเคราะห์ probe โดยใช้ DNA ที่สกัดจากเชื้อบริสุทธิ์ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 10708 (*S.* Typhimurium) ด้วยชุดติดฉลาก DIG labeling Mix^{PLUS} (Roche, Germany) ชุดติดฉลากนี้ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP อย่างละ 2 mM, 5.7 mM dUTP และ 0.3 mM digoxigenin-11-dUTP เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA แล้ว PCR product ที่ได้จะมี digoxigenin-11-dUTP แทรกอยู่ พร้อมใช้สำหรับเป็น probe ในการทดสอบเทคนิค PACHA ขั้นต่อไป โดยตำแหน่งของ probe ที่เลือกเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ดังแผนภาพจำลองยีน (ภาพที่ 9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งและขนาดของ probe ที่มีความจำเพาะต่อ genome ของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่บริเวณต่าง ๆ กัน ช่วงสีเขียวคือบริเวณที่เลือกเป็น hilA probe, ช่วงสีส้มคือบริเวณที่เลือกเป็น invA1 probe, ช่วงสีม่วงคือบริเวณที่เลือกเป็น invA2 probe และสีเทาขาวแสดงช่วงของลำดับเบสที่อยู่ระหว่างยีน *hilA* กับยีน *invA*

Reaction mixture (ตารางที่ 5) ประกอบด้วย 10x PCR buffer (Qiagen, USA) ปริมาตร 5 µl, 25 mM $MgCl_2$ (Qiagen, USA) ปริมาตร 3.2 µl, Dig labeling Mix^{PLUS} 5 µl, 20 µM forward primer ปริมาตร 0.64 µl และ 20 µM reverse primer ปริมาตร 0.64 µl, เอนไซม์ 5u/µl Hot start *Taq* DNA polymerase (Qiagen, USA)ปริมาตร 0.4 µl, DNA 10 ng และเติมน้ำกลั่น จนครบปริมาตรสุดท้าย 50 µl ผสมกันเบาๆ นำไป spin down แล้วจึงนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler (BioRad, USA) โดยโปรแกรมปฏิกิริยา PCR เครื่อง Thermal cycler (ตารางที่ 6) ทั้งนี้เตรียม PCR reaction สำหรับควบคุมผลบวก (control PCR) โดยใช้ dNTPs ปกติแทน Dig labeling Mix^{PLUS} , สำหรับควบคุมผลลบใช้น้ำกลั่นแทน DNA แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal cycler พร้อมกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 Reaction mixture สำหรับเตรียมปฏิกิริยา PCR

Reagent	Probe synthesis volumn (µl)	pos. control volumn (µl)	neg. control volumn (µl)	Final conc.
10× PCR buffer	5	5	2.5	1×
25 mM $MgCl_2$	3.2	3.2	1.6	1.6 mM
20 mM dNTPs	-	4	2	1.6 mM
DIG labeling Mix^{Plus}	5	-	-	200 µM dNTP
20 mM forward primer	0.64	0.64	0.32	0.25 µM
20 mM reverse primer	0.64	0.64	0.32	0.25 µM
Hot start *Taq* polymerase	0.4	0.4	0.2	U
Template DNA	1	1	-	1 ng
น้ำกลั่น	34.12	34.12	17.56	-
Total	50	50	25	

ตารางที่ 6 โปรแกรมปฏิกิริยา PCR เครื่อง Thermal cycler

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	
initial denaturation	95°C	5 นาที	
denaturation	94°C	30 วินาที	35 รอบ
annealing	58°C	30 วินาที	
extension	72°C	1 นาที	
final extension	72°C	7 นาที	
	4°C	จนกว่าจะนำออกจากเครื่อง	

ตรวจสอบขนาด PCR product ของ DIG labeled PCR และ control PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ใช้ 6 µl ของ DIG labeled PCR และ control PCR เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบขนาด PCR product กับ 1 µg DNA Ladder 100 bp (BioLabs, UK) ที่ความต่างศักย์ 100 volt นาน 30 นาที บน 1.5% agarose gel ที่มีเอทิเดียมโบรไมด์ผสมอยู่เพื่อให้ DNA เรืองแสง UV อ่านผลภายใต้เครื่อง Gel-Documentation และเก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ทดสอบความจำเพาะของ probe โดยเทคนิค conventional dot blot hybridization

ทำการทดสอบความจำเพาะของ probe ทั้งสามตำแหน่งด้วย DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. และ non- *Salmonella* spp. โดยเทคนิค conventional dot blot hybridization ดังขั้นตอนต่อไปนี้

3.1 การเตรียม membrane และ DNA สำหรับทดสอบ

3.1.1 การเตรียม DNA สำหรับทดสอบความจำเพาะของ probe ทำโดยนำ dsDNA ของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และกลุ่ม non- *Salmonella* spp. ที่สกัดจาก pure culture มา denature ให้เป็น ssDNA ด้วยการต้มในน้ำเดือด 95°C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อให้คงสภาพ ssDNA (Anderson, 1999) พร้อมกันนี้ได้หยดและตรึง denature PCR product ปกติ (pos. control) ของ primer invA 1, invA 2 และ hilA ลงบน membrane เพื่อควบคุมผลบวกสำหรับปฏิกิริยา hybridization เพราะจะสามารถเข้าคู่กันกับ probe แต่ละชิ้นได้พอเหมาะ และหากปฏิกิริยา hybridization เกิดได้อย่างสมบูรณ์ที่ตำแหน่งหยดนี้จะปรากฏ signal เป็นสีม่วงน้ำเงินภายหลังตรวจติดตามด้วย anti-Digoxigenin conjugated และ NBT/BCIP ทั้งนี้เพื่อควบคุมขั้นตอนการตรวจติดตามด้วย anti-Digoxigenin conjugated AP และการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ AP กับ NBT/BCIP ได้ทำการหยด DIG labelled PCR product (color control) ซึ่งจะปรากฏสีม่วงน้ำเงินเมื่อปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดได้อย่างสมบูรณ์

3.1.2 การเตรียม membrane สำหรับทดสอบ โดยตัด Nylon membrane (Nytran SuPerCharge and Nytran N nylon membrane, Schleicher & Schuell, Germany) ขนาดกว้าง 4 cm. ยาว 5 cm. แล้วใช้ micropipette ขนาด 0.5-10 µl หยด ssDNA ลงบน membrane ดังกล่าว โดยปริมาณ DNA สำหรับหยด ควรมีประมาณ 0.1-10 µg จากนั้นตรึง DNA กับ membrane โดยการฉายแสง UV เป็นเวลา 3 นาที (Schleicher & Schuell, Germany)

3.2 การเตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในเทคนิค conventional hybridization

3.2.1 hybridization buffer (DIG Easy Hyb) (Roche, Germany) อุ่นที่อุณหภูมิ 65°C

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 probe hybridization solution: ผสม probe กับ DIG Easy Hyb (ให้ความเข้มข้น probe สุดท้ายเป็น 20 ng/ml) และทำการ denature

3.2.3 Washing buffer

WB1 = Washing buffer 1: 2X SSC, 1% SDS

WB2 = Washing buffer 2: 0.2X SSC, 0.1% SDS

3.2.4 Blocking buffer

BB1 = Blocking buffer 1: 0.10 M Tris-HCL, pH7.5, 0.15 M NaCl

BB2 = Blocking buffer 2: 0.10 M Tris-HCL, pH7.5, 0.15 M NaCl, 2% (w/v) Blocking reagent (Roche, Germany) เท่ากับ 2 g ในสารละลาย 200 ml

3.2.5 AD-AP = Antibody Conjugate Solution: 1µl anti-Digoxigenin conjugated AP (Roche, Germany), 3 ml BB2

3.2.6 DB = Detection buffer: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5

3.2.7 NBT/BCIP (Amresco, USA)

3.3 ขั้นตอนการทำ conventional hybridization

3.3.1 pre-hybridization ขั้นตอนนี้ทำเพื่อเตรียมความพร้อมให้กับ membrane และ DNA ที่ตรึงอยู่บน membrane โดยนำ membrane ใส่ลงใน hybridization incubator tube แล้วเติม DIG Easy Hyb 10 ml และปรับอุณหภูมิ เครื่อง Hybridization Incubator (SciGene, USA) ที่อุณหภูมิ 65°C หมุนเป็นเวลา 60 นาที (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA) จากนั้นเทสารละลายทิ้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.2 hybridization ขั้นตอนนี้ทำเพื่อตรวจสอบ DNA ด้วย probe ที่เตรียมได้ โดย probe จะสามารถเข้าคู่กับ target DNA เมื่อเติม probe hybridization solution 10 ml และ incubate probe กับ DNA ทดสอบไว้ค้างคืน ในเครื่อง Hybridization Incubator ที่อุณหภูมิ 65°C และหมุนด้วยความเร็วรอบ 8 rpm (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA)

3.3.3 การล้าง probe ส่วนเกิน หลัง hybridization ขั้นตอนนี้ทำเพื่อกำจัด probe ส่วนเกินที่เกาะกับ membrane ในบริเวณที่ไม่ต้องการ และ probe ที่จับผิด โดยเติม WB1 (อุ่นที่อุณหภูมิ 65°C) 10 ml เพื่อล้าง membrane ที่อุณหภูมิ 65°C หมุนด้วยความเร็วรอบ 12 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเท WB1 ทิ้ง แล้วทำการล้างรอบสองด้วย WB2 (อุ่นที่อุณหภูมิ 65°C) 10 ml เป็นเวลา 15 นาที (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA) และเท WB2 ทิ้ง

3.3.4 การ block membrane โดยใช้ BB1 เพื่อชะล้างฟองสบู่จาก SDS ที่หลงเหลือในขั้นตอนการล้างรวมทั้งปรับสภาพ membrane และตามด้วย BB2 เพื่อเคลือบผิว membrane ในบริเวณที่ไม่มี DNA ลดการจับของ AD-AP ในบริเวณพื้นที่ว่างดังกล่าวและปรับสภาพให้เหมาะต่อการตรวจจับระหว่าง DIG กับ AD-AP โดยเติม BB1, 10 ml ปรับอุณหภูมิที่ 37°C หมุนที่ความเร็วรอบ 8 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท BB1 ทิ้ง แล้วเติม BB2, 10 ml หมุนที่ความเร็วรอบ 8 rpm เป็นเวลา 60 นาที และเท BB2 ทิ้ง (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA)

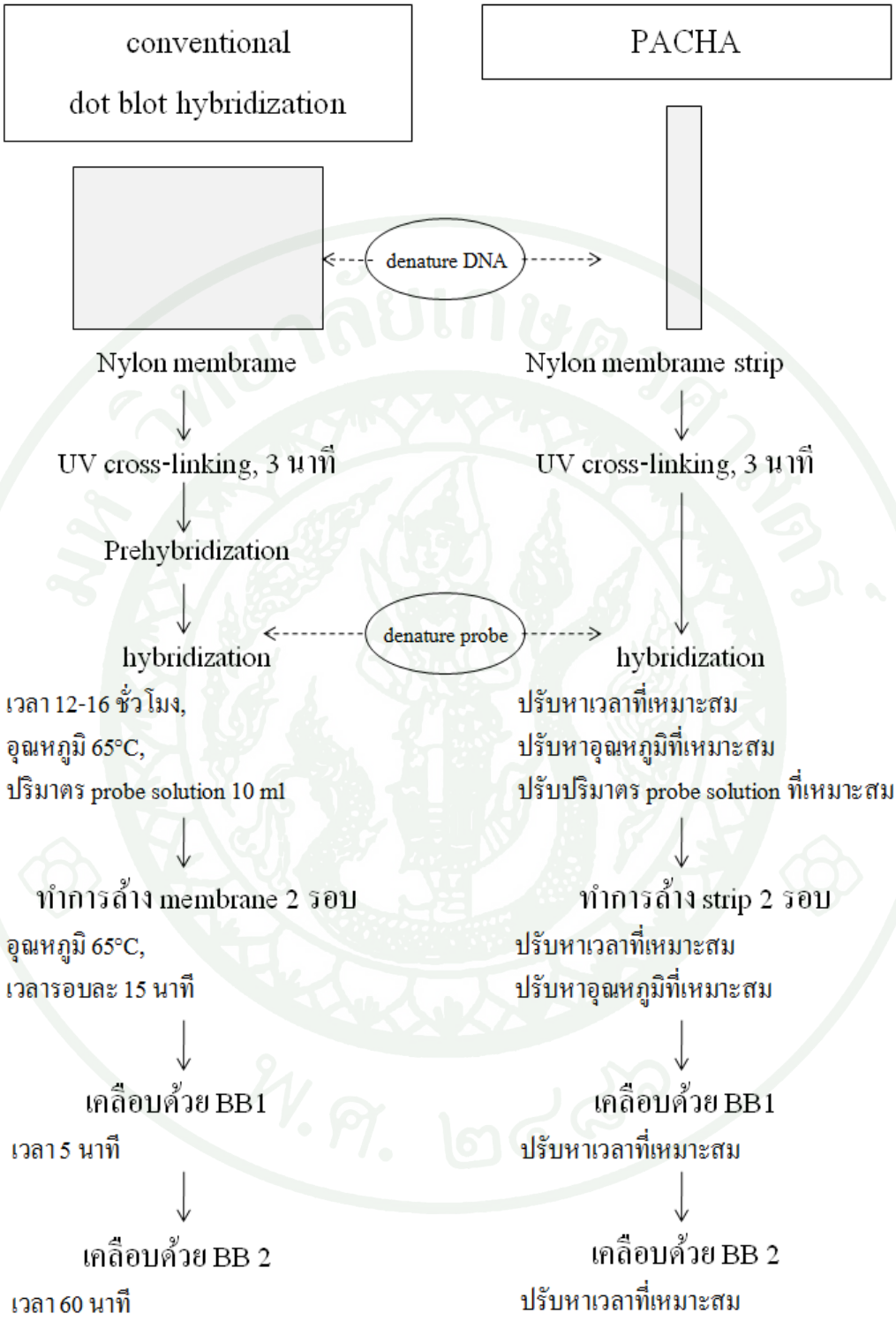
3.3.5 การตรวจติดตาม DIG ขั้นตอนนี้ทำเพื่อตรวจติดตาม DNA สายผสม (hybrid) เมื่อ target DNA เข้าคู่กับ probe ที่ติดฉลากด้วย DIG จึงทำการตรวจติดตาม DIG ด้วย anti-Digoxigenin conjugated AP (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA) ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตเห็นผลการตรวจสอบเมื่อมีการเติม substrate ให้กับเอนไซม์ AP ในภายหลัง โดยเติม AD-AP แล้วบ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ที่ความเร็วรอบการหมุน 8 rpm เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงเท AD-AP ทิ้ง ทั้งนี้เพื่อชะล้าง AD-AP ที่เคลือบ membrane บริเวณอื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง รวมทั้งเตรียมความพร้อมให้กับ DNA สายผสม และ membrane ก่อนที่จะเติม substrate ให้ทำการล้างด้วย 10 ml WB1 เป็นเวลา 5 นาที, เท WB1 ทิ้ง แล้วล้างซ้ำด้วย 10 ml WB2 เป็นเวลา 5 นาที, เท WB2 ทิ้ง แล้วตามด้วย 10 ml BB1เป็นเวลา 5 นาที, เท BB1 ทิ้ง และเคลือบ membrane ด้วย 10 ml BB2 เป็นเวลา 15 นาที, เท BB2 ทิ้ง (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.6 การทำปฏิกิริยาของ AP กับ NBT/BCIP ขั้นตอนนี้ทำเพื่อตรวจติดตามการจับของ probe ที่ตำแหน่งต่างๆ บน membrane โดยตำแหน่งที่ probe จับจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงินที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ทำให้ทราบว่า probe จับกับตำแหน่งที่มี target DNA ได้อย่างจำเพาะหรือไม่ ถ้าหากมีการจับกันอย่างไม่จำเพาะบริเวณที่มี DNA ในกลุ่มควบคุมผลลบ จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงิน การทดสอบปฏิกิริยาของ AP กับ NBT/BCIP ทำโดยการย้าย membrane ใส่ในถุงซิป (ziplock bag) แล้วเติม DB 3 ml (ท่วม membrane) เพื่อปรับ pH ให้เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของ substrate จากนั้นย้าย membrane ใส่ในถุงซิปอันใหม่แล้วเติม NBT/BCIP 3 ml (ท่วม membrane) และไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที ถึง 1 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งสังเกตุเห็นสีม่วงน้ำเงินปรากฏขึ้น

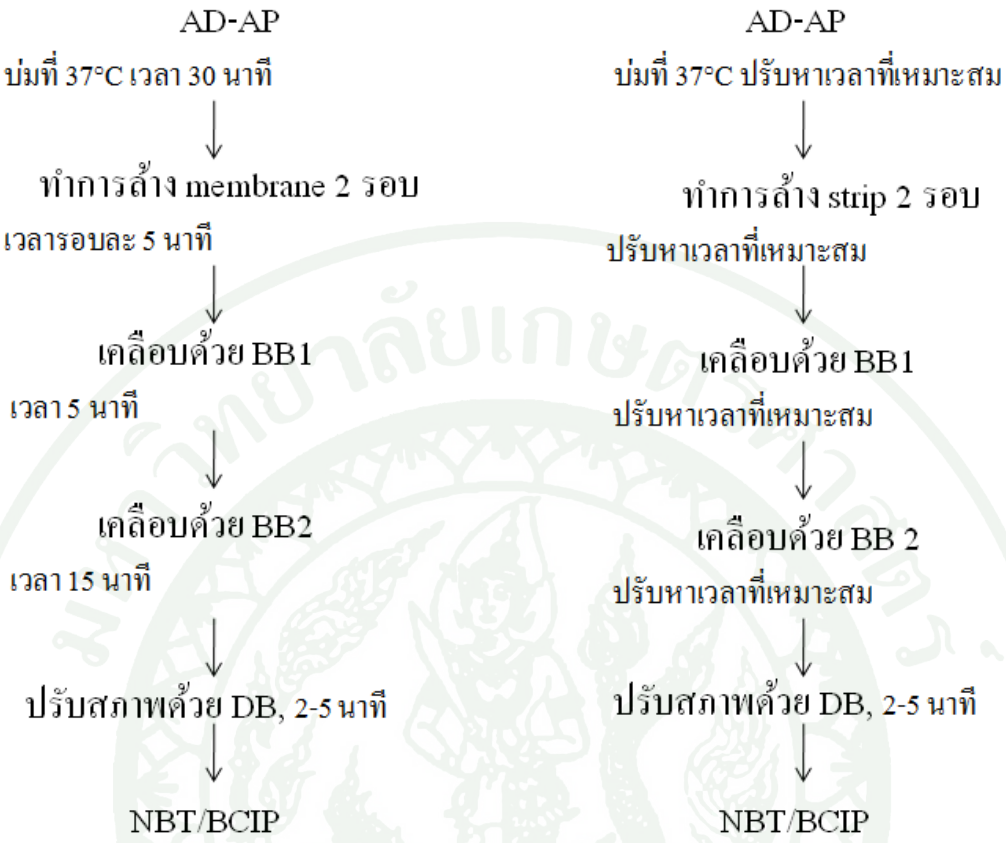
เมื่อทำการตรวจสอบความจำเพาะของ probe ที่สังเคราะห์ขึ้นจากเทคนิค PCR ด้วยวิธีการ conventional dot blot hybridization แล้ว จึงนำ probe ทั้งสามมาใช้สำหรับพัฒนา PACHA test kit ในการทดลองต่อไป เนื่องจาก PACHA test kit มีขั้นตอนการดำเนินการตรวจสอบมาจากหลักการพื้นฐานของการตรวจสอบด้วยเทคนิค conventional dot blot hybridization จึงเปรียบเทียบขั้นตอนการดำเนินการตรวจสอบของทั้งสองเทคนิคได้ดังแสดงในภาพที่ 10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ภาพแสดงขั้นตอนของการตรวจด้วยเทคนิค conventional dot blot hybridization เทียบกับขั้นตอนการพัฒนาเทคนิค PACHA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 (ต่อ)

4. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสำหรับตรวจ DNA ด้วยเทคนิค PACHA

เทคนิค PACHA ของงานวิจัยนี้ดัดแปลงจากรายงานของ Reinhartz และคณะ (1993) องค์ประกอบสำหรับพัฒนาเทคนิค PACHA มีดังนี้ (1) strip (Charge Nylon membrane) ขนาด 0.45 × 5 cm โดยหยด ssDNA ของเชื้อ *S.* Typhimurium ให้มีระยะห่างจากปลาย strip 1 cm (เป็นปลายด้านที่ใช้จุ่มในบัฟเฟอร์) หยด ssDNA ของเชื้อ *E. coli* สำหรับควบคุมผลลบ และหยด ssDNA ของ PCR product ปกติ (invA1, invA2, hilA) เพื่อเป็น DNA ควบคุมผลบวกของการเกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์ ที่บริเวณปลายด้านบนของ strip หยด probe 0.01 นาโนกรัมสำหรับควบคุมการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ alkaline phosphatase กับ NBT/BCIP ทำการตรึง DNA ดังกล่าวด้วยแสง UV ที่มีความยาวคลื่นแสง 254-312 nm โดยวางห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 15 cm เป็นเวลา 3 นาที (Schleicher & Schuell, Germany) (2) probe hybridization solution โดยผสม probe กับ DIG Easy Hyb (Roche, Germany) ทำให้เป็น ssDNA probe โดยต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที และแช่เย็นอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รวดเร็ว (Anderson, 1999) (3) เตรียม washing buffer และ blocking buffer ดังรายละเอียดในหัวข้อ 3.2 (4) ตรวจติดตาม Digoxigenin โดยแช่ strip ในสารละลาย anti-Digoxigenin conjugated alkaline phosphatase (Roche, Germany) (5) ตรวจติดตามผลโดยแช่ใน substrate ของเอนไซม์ alkaline phosphatase คือ NBT/BCIP (Amresco, USA) จะปรากฏสีม่วงน้ำเงินขึ้นมา

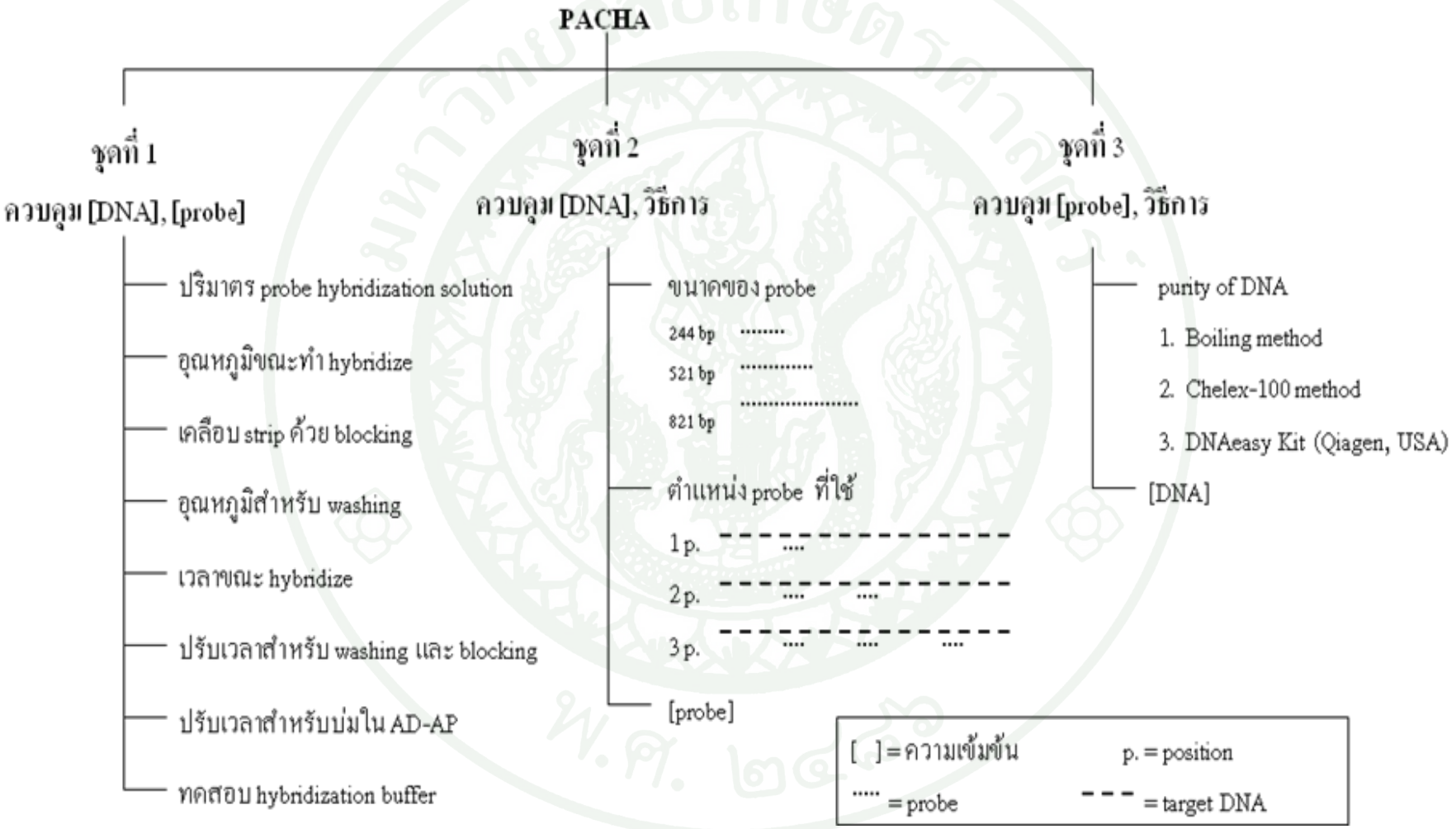
การศึกษานี้แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองดังแสดงในภาพที่ 11 เพื่อศึกษาปัจจัยได้แก่ อุณหภูมิ hybridize ความเข้มข้น DNA และความเข้มข้น probe ที่ใช้ เพื่อให้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA เกิดประสิทธิผลสูงสุด โดยแต่ละการทดสอบทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำและซ้ำละ 2 ชุด

4.1 การทดลองชุดที่ 1 เป็นการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนดำเนินการตรวจ target DNA ด้วยเทคนิค PACHA โดยควบคุมความเข้มข้น DNA และความเข้มข้น probe ที่ใช้ในการทดสอบแต่ละครั้ง เมื่อได้เงื่อนไขสภาวะตรวจสอบแบบ PACHA ที่ให้ผลดีที่สุด จึงทำการตรวจสอบเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของเทคนิค PACHA ด้วยการหาแนวทางการใช้ probe เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ในการทดลองชุดที่ 2

4.2 การทดลองชุดที่ 2 ดำเนินการตรวจ target DNA ด้วยเทคนิค PACHA ตามเงื่อนไขสภาวะตรวจสอบแบบ PACHA ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองชุดที่ 1 โดยกำหนดความเข้มข้น DNA ให้คงที่ จากนั้นทดสอบปรับเปลี่ยน probe ได้แก่ ความยาว probe ที่ใช้สำหรับตรวจสอบ (ควบคุมความเข้มข้น probe ที่ใช้ให้เท่ากัน), เพิ่มตำแหน่ง probe ที่ใช้สำหรับตรวจสอบ (ควบคุมความเข้มข้น probe ที่ใช้ให้เท่ากัน) และความเข้มข้น probe ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PACHA แล้วนำสภาวะเงื่อนไขที่ดีที่สุดของ probe ไปทดสอบกับ DNA ในการทดลองชุดที่ 3 เพื่อให้การตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PACHA มีประสิทธิภาพสูงสุด

4.3 การทดลองชุดที่ 3 ทำการทดสอบเพื่อหาความเหมาะสมของ DNA ที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA โดยกำหนดเงื่อนไขสภาวะเทคนิค PACHA และ probe ให้คงที่ จากนั้นปรับเปลี่ยน DNA ที่นำมาใช้ทดสอบ ทั้งคุณภาพและปริมาณของ DNA เพื่อให้การตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PACHA มีประสิทธิภาพสูงสุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 การพัฒนาเทคนิค PACHA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1 ชุดที่1 ควบคุมความเข้มข้น DNA และ probe เพื่อปรับสภาวะในแต่ละขั้นตอน

1) ทดสอบการเคลือบผิว membrane (block) เพื่อลด background

1.1) แช่ membrane ใน BB2 ก่อน dot DNA เป็นเวลา 20 นาที

1.2) dot DNA ลง membrane แล้วจึงแช่ membrane ใน BB2 เป็นเวลา 20 นาที

1.3) ไม่ต้องเคลือบผิว membrane

2) ทดสอบ hybridization buffer ที่ใช้สำหรับเทคนิค PACHA ได้แก่ dH_2O, 2x SSC และ Dig EasyHyb (Roche, Germany)

3) ทดสอบปริมาตร probe hybridization solution ที่ใช้ต่อ 1 strip ได้แก่ 20 µl, 50 µl, 100 µl และ 200 µl

4) ทดสอบอุณหภูมิขณะ hybridize ที่ 4°C, 27°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C

5) ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับ hybridize ได้แก่ 60 นาที, 30 นาที, 20 นาที 10 นาที และ 5 นาที

6) ทดสอบอุณหภูมิสำหรับล้าง (wash) หลังขั้นตอน hybridize ที่ อุณภูมิห้อง (27°C), 50°C, 60°C และ 70°C

7) ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้างและ block สำหรับเทคนิค PACHA ได้แก่

7.1) ไม่ล้างและไม่ block strip ทั้งหลัง hybridize และหลังจาก detect

7.2) ใช้เวลา 5 นาที สำหรับขั้นตอนล้างและ block strip หลังจาก hybridize และหลังจาก detect

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.3) ใช้เวลา 3 นาที สำหรับขั้นตอนล้างและ block strip หลังจาก hybridize และหลังจาก detect

7.4) ใช้เวลา 2 นาที สำหรับขั้นตอนล้างและ block strip หลังจาก hybridize และหลังจาก detect

หมายเหตุ ขณะล้างและ block ด้วย BB1 ต้อง vortex ตลอดเวลา ส่วน BB2 ไม่ vortex

8) ทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการ incubate กับ AD-AP ได้แก่ 10 นาที, 20 นาที และ 30 นาที

4.2 ชุดที่ 2 ควบคุมความเข้มข้น DNA และวิธีการแต่ละขั้นตอน เพื่อปรับการนำ probe ไปใช้ให้เทคนิค PACHA มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการทดลองนี้ออกแบบ probe ไว้ 3 ตำแหน่ง ดังได้อธิบายไว้ข้างต้น

1) ทดสอบเทคนิค PACHA ด้วย probe ที่มีความยาวต่างกัน ได้แก่ probe invA1 ขนาด 244 bp, probe invA2 ขนาด 521 bp และ probe hilA ขนาด 821 bp โดยควบคุมความเข้มข้น probe ที่ใช้ให้เท่ากันทั้งหมด

2) ทดสอบเทคนิค PACHA ด้วยการปรับจำนวน probe ที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยควบคุมความเข้มข้น probe ที่ใช้ให้เท่ากันทั้งหมด

2.1) ใช้ probe จำนวน 1 ตำแหน่ง คือ invA1, invA2 และ hilA

2.2) ใช้ probe จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ invA1 + invA2, invA1 + hilA และ invA2 + hilA

2.3) ใช้ probe จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ invA1 + invA2 + hilA

3) ทดสอบเพื่อปรับปริมาณความเข้มข้น probe ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบแบบ PACHA ได้แก่ 9 ng, 6 ng, 3 ng, 2 ng, 1 ng และ 0.5 ng

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 ชุดที่ 3 ควบคุมวิธีการและความเข้มข้น probe เพื่อทดสอบคุณภาพ และปริมาณของ DNA ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ PACHA

1) ทดสอบเทคนิค PACHA ด้วย DNA ที่สกัดโดยวิธีการแตกต่างกัน ได้แก่ DNA ที่สกัดด้วยวิธีต้มใน NaOH, DNA ที่สกัดด้วยวิธี chelex และ DNA ที่สกัดด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (DNAeasy kit (Qiagen, USA)) โดยควบคุมความเข้มข้น DNA ที่ใช้ทดสอบ

2) ทดสอบความเข้มข้น DNA ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PACHA โดยนำ DNA ที่สกัดด้วยวิธี Chelex มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 500 ng และ 1000 ng แล้วหยดและตรึงบน strip ทำการทดสอบกับ DNA ชุดเดียวกันนี้ด้วยวิธี conventional dot blot hybridization นี้

5. ทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PACHA

ทำการทดสอบเพื่อดูความจำเพาะของการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA โดยนำเงื่อนไขสภาวะทดสอบ PACHA ที่ดีที่สุดมาใช้ และกำหนดความเข้มข้นของ probe ที่ใช้ตรวจสอบให้เป็นค่าคงที่ คือ 2 ng จากนั้นทำการทดสอบด้วย DNA ของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และกลุ่ม non-*Salmonella* spp. ที่ทำการสดัดด้วยวิธี Chelex แล้วนำ DNA ดังกล่าวมาทำการ denature หยดและตรึง ลงบน strip ตัวอย่างละ 2 µl

6. ทดสอบ detection limit ของเทคนิค PACHA

ทำการทดสอบเพื่อดูความสามารถของการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA โดยนำเงื่อนไขสภาวะทดสอบ PACHA ที่ดีที่สุดมาใช้ และกำหนดความเข้มข้นของ probe ที่ใช้ตรวจสอบให้เป็นค่าคงที่ คือ 2 ng จากนั้นสกัด DNA จากแต่ละ dilution ของเชื้อ *S.* T. ได้แก่ 10^0 CFU/ml, 10^1 CFU/ml, 10^2 CFU/ml, 10^3 CFU/ml, 10^4 CFU/ml, 10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml, 10^7 CFU/ml และ 10^8 CFU/ml ด้วยวิธี Chelex แล้วทำการ denature DNA ดังกล่าว หยดและตรึงลงบน strip ตัวอย่างละ 2 µl ตรวจสอบ DNA ของเชื้อด้วยเทคนิค PACHA พร้อมทั้งทำการทดลองกับ DNA ชุดเดียวกันนี้ด้วยวิธี conventional dot blot hybridization โดยหยดและตรึงลงบน membrane ขนาด ตัวอย่างละ 2 µl DNA และ กำหนดปริมาณ probe ให้คงที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ประยุกต์ใช้เทคนิค PACHA กับตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดเชื้อ

นำเชื้อ *S.* T. ที่ทราบปริมาณผสมคลุกเคล้ากับเนื้อไก่ปลอดเชื้อบด 1 g สำหรับการทดสอบนี้ ใช้เชื้อ 3 dilution คือที่ 10^8, 10^7 และ 10^6 ผสมลงในเนื้อไก่ปลอดเชื้อในอัตราส่วน เนื้อไก่ : เชื้อ เท่ากับ 1 g : 1 ml ผสมให้เข้ากัน และนำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 ×g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเชื้อ ล้างตะกอน และสกัด DNA ด้วยวิธี chelex จากนั้นนำ DNA ไปตรวจสอบ ด้วยเทคนิค PACHA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การสังเคราะห์ probe ด้วยเทคนิค PCR

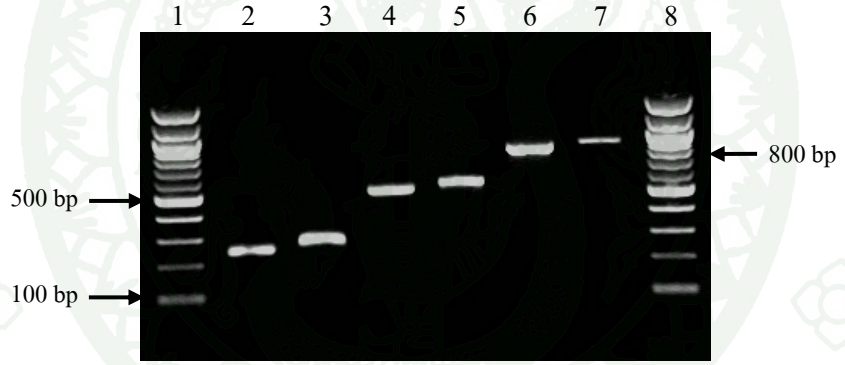
primer ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ probe เป็น *Salmonella* species specific primer คู่ที่หนึ่ง ออกแบบโดย Narongwanichagarn and Mulika, (2005) จากบริเวณของ *hilA* ยีน ส่วนอีกสองคู่ ออกแบบโดย Jenikova *et al*. (2000) และ Kishima *et al*. (2008) จากบริเวณของ *invA* ยีน ทั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะของ primer ทั้ง 3 คู่ ด้วยการทำ PCR ปกติกับ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. และ non- *Salmonella* spp. เพื่อยืนยันความถูกต้อง แม่นยำ ของ primer ผลการตรวจสอบพบว่า PCR product จากเชื้อ *Salmonella* spp. ของ primer คู่ที่ 1 (hilA) มีขนาด 821 bp primer คู่ที่ 2 (invA1) มีขนาด 244 bp และ primer คู่ที่ 3 (invA2) มีขนาด 521 bp และไม่พบว่ามี PCR product ที่เกิดจาก non- *Salmonella* spp. DNA กับ primer ทั้ง 3 คู่ สอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้ (Narongwanichagarn and Mulika, 2005; Jenikova *et al*., 2000; Kishima *et al*., 2007) สำหรับ PCR product ปกติของแต่ละคู่ primer ที่ได้นี้ ได้นำไปใช้เพื่อเป็น pos. control ของการเกิดปฏิกิริยา hybridization ในการพัฒนาเทคนิค PACHA ขั้นต่อไป

การสังเคราะห์ probe สำหรับ เชื้อ *Salmonella* spp. ด้วย primer ทั้ง 3 คู่ โดยการใช้ digoxigenin-11-dUTP (DIG-11-dUTP) เพิ่มปริมาณ *S.* Typhimurium DNA ในปฏิกิริยา PCR แทนการใช้ dTTP ใน PCR ปกติ ซึ่ง PCR product ที่สังเคราะห์ได้จะมี DIG-11-dUTP แทรกแทนที่เบส T อย่างสุ่ม ภาพที่ 12 แสดงผลการสังเคราะห์ probe ด้วยเทคนิค PCR จากการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผลของ DIG labeled PCR product ปรากฏใน lane 3 lane 5 และ lane 7 พร้อมกับผลของ control PCR product ปรากฏใน lane 2 lane 4 และ lane 6 จากภาพแถบ DNA (band) ของ Dig labeled PCR product จะอยู่สูงกว่า control PCR product เนื่องจากโมเลกุลของ DIG-11-dUTP มีขนาดใหญ่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่บน 1.5% agarose gel ทำให้ Dig labeled PCR product เคลื่อนที่ช้ากว่า control PCR product แถบ DNA จึงอยู่สูงกว่าทั้งที่ขนาด PCR product เป็น 821 bp, 244 bp และ 521 bp เท่ากันตามลำดับ จากหลักการของเทคนิค PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ไปพร้อมๆ กับการติดฉลากได้ในเวลาอันรวดเร็ว จึงได้ probe ที่มีความเข้มข้นสูงเพราะไม่ถูกจำกัดด้วยความเข้มข้น DNA ในตอนเริ่มต้นสังเคราะห์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Lion and Hass (1990) ซึ่งทำการดัดแปลงเทคนิค PCR โดยใช้ dUTP-Dig แทน dNTPs ปกติ ในปฏิกิริยา PCR เพื่อติดฉลาก DNA หรือสังเคราะห์ probe พบว่าการติดฉลากด้วยวิธี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นี้มีข้อดีที่ไม่เหมือนกับการติดฉลากด้วยวิธีอื่นดังนี้คือ (1) มีประสิทธิภาพการติดฉลากชิ้น DNA ที่มีขนาดเล็กเท่ากับ 100 bp ได้ (2) สามารถติดฉลากกับ genomic DNA ได้โดยตรง (3) สามารถใช้ติดฉลาก DNA เริ่มต้นที่มีปริมาณน้อยกว่าหนึ่งนาโนกรัมได้ (0.1-50 ng DNA template) (4) เป็นวิธีเตรียม probe ที่ใช้เวลาน้อย รวดเร็ว สามารถสังเคราะห์ probe ปริมาณมากได้อย่างจำเพาะเจาะจงภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง

นอกจากนี้ Lion and Hass (1990) ยังให้ข้อมูลสนับสนุนการใช้ DIG สำหรับติดฉลาก DNA ว่ามีคุณสมบัติเด่นคือทำให้ได้ probe ที่มีความไวสูง ตรวจสอบได้รวดเร็ว สัมผัสได้ไม่เป็นอันตรายกับผู้ใช้งาน และสามารถเก็บได้นาน จากรายงานการศึกษาพบว่าสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ไว้ใช้ได้นานอย่างน้อย 1 ปี โดยประสิทธิภาพการทำงานยังคงเหมือนเดิม ดังนั้นจึงสามารถเตรียม probe คราวละมากๆ ได้ ทั้งยังนำ probe ที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ได้ภายหลังจาก renewed denaturation



ภาพที่ 12 แสดง Dig labeled PCR product ของ primer invA1, invA2 และ hilA บน 1.5% agarose gel โดย Lane 1 คือ 100 bp DNA ladder (BioLabs, England) Lane 2 คือ PCR product ของ invA1 primers ขนาด 244 bp Lane 3คือ Dig labeled PCR product ของ invA1 primers ขนาด 244 Lane 4 คือ PCR product ของ invA2 primers ขนาด 521 bp Lane 5 คือ Dig labeled PCR product ของ invA2 primers ขนาด 521 bp Lane 6 คือ PCR product ของ hilA primers ขนาด 821 bp Lane 7 คือ Dig labeled PCR product ของ hilA primers ขนาด 821 และ Lane 8 คือ 100 bp DNA ladder (BioLabs, England)

จากการศึกษาได้ทำการประมาณปริมาณ probe ที่สังเคราะห์ได้โดยเทียบจากความเข้มแถบ DNA บน agarose gel กับความเข้มแถบ DNA ที่ปรากฏใน Lane 1 (100 bp DNA ladder) (BioLabs, England) (ภาพภาคผนวก ที่ 1) ความเข้มแถบ DNA ที่ขนาด 500 bp ของ 100 bp DNA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ladder เท่ากับปริมาณ 194 ng ดังนั้น invA1-DIG มีปริมาณประมาณ 40 ng/µl, invA 2-DIG มีปริมาณประมาณ 33 ng/µl และ hilA-DIG มีปริมาณประมาณ 13 ng/µl

สามารถทำการติดตาม probe ที่สังเคราะห์ได้ด้วยการหยดและตรึง DIG labeled PCR product ลงบน membrane แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ anti-Digoxigenin conjugated AP ร่วมกับ NBT/BCIP ซึ่งจะปรากฏสีม่วงแกมน้ำเงินหาก PCR product ที่ได้มี DIG-11-dUTP แทรกอยู่ (Roche, Germany)

2. การตรวจสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค conventional dot blot hybridization

นำ probe invA1-DIG, invA2-DIG และ hilA-DIG มาตรวจสอบความจำเพาะด้วยเทคนิค conventional dot blot hybridization กับตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเชื้อ *Salmonella* spp. และ non-*Salmonella* spp. ผลจากปฏิกิริยา hybridization (ดังภาพที่ 13) พบว่าปรากฏสีฟ้า (ผลบวก) ทุกๆ บริเวณที่หยด DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ไม่ปรากฏสีฟ้า (ผลลบ) กับบริเวณที่หยด DNA ของเชื้อ non- *Salmonella* spp. และปรากฏสีน้ำเงินเข้ม (ผลบวก) ที่เห็นได้อย่างชัดเจนสำหรับบริเวณหยดของ PCR product ปกติที่ใช้เป็น pos. control สำหรับควบคุมปฏิกิริยา hybridize เนื่องจาก probe เป็นส่วนของ PCR product ที่เป็นช่วงของลำดับเบสที่ complementary กันโดยจึงส่งเสริมให้ probe กับ PCR product เกิด hybridize กันได้ง่ายกว่า probe กับ target DNA ที่มาจาก DNA ของทั้งโครโมโซม รวมทั้งมีจำนวนชุด DNA ที่สามารถเข้าคู่กันได้ภายในบริเวณหยดที่เข้มข้นมากกว่า จึงส่งผลให้ probe เข้าจับได้ทั้งหมด signal จึงเข้มและชัดเจน ดังนั้น probe ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้สำหรับพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ด้วยเทคนิค PACHA ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

No.	DNA จากเชื้อต่างๆ
1	*S.* Typhimurium ATCC 10708
2	*S.* Rissen
3	*S.*Typhimurium
4	*S.* Gr.C16
5	*S.* Gr.C17
6	*S.* Gr.C18
7	*S.* Gr.E22
8	*S.* Gr.E23
9	*S.* Gr.E24
10	*S.* Gr.C25
11	*S.* Gr.C26
12	*S.* Gr.B27
13	*S.* Gr.C28
14	*Escherichia coli* ATCC 25922
15	*Klebsiella pneumonia*
16	*Streptococcus suis*
17	*Staphylococcus aureus*
18	*Staphylococcus arlettae*
19	*Pseudomonas aeruginosa*
20	*Edwardsiella tarda*
A1	denatured invA1 (PCR product)
A2	denatured invA2 (PCR product)
A	denatured hilA (PCR product)
+	1µ ของ probe แต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ

1	2	3	4	5	A1
6	7	8	9	10	A2
11	12	13	14	15	A
16	17	18	19	20	+

ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของ probe ด้วยวิธี conventional hybridization

หมายเหตุ แรเงาสีเทาที่ No. 1-13 คือตำแหน่งของ DNA ที่เกิดผลบวก ช่องว่าง No. 14-20 คือตำแหน่งของ DNA ที่เกิดผลลบ แรเงาลายขวางที่ A1, A2, A คือตำแหน่งของ PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

product ปกติของแต่ละ probe ที่เกิดผลบวก และ + คือตำแหน่งของ probe ที่ใช้ทดสอบสำหรับเป็น color control

3. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสำหรับตรวจ DNA ด้วยเทคนิค PACHA

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ปรับเปลี่ยนวิธีการจากเทคนิค conventional dot blot hybridization เพื่อลดระยะเวลาของวิธีการในแต่ละขั้นตอน ดังนั้นองค์ประกอบของเทคนิค hybridization ทั้งหมดจึงต้องทำการทดสอบให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับแต่ละขั้นตอน เพื่อให้การตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PACHA เกิดประสิทธิผลสูงสุด

การทดลองนี้เลือกใช้ membrane ชนิด charged nylon เนื่องจากที่ผิวหน้า (surface) ของ membrane มี amide ที่มีประจุบวกช่วยเพิ่มแรงยึดเกาะ จึงมีประสิทธิภาพในการการยึดเกาะ DNA สูง เหมาะสำหรับเทคนิคเตรียมย้าย DNA สู่ membrane โดยวิธีการหยด (dot blot) ด้วย micropipette นอกจากนี้การตรึง DNA สามารถทำได้โดยง่ายด้วยการฉายแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254-312 nm ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 15-20 cm ด้วยเวลาเพียง 3 นาที หรืออาจตรึง DNA ด้วยการอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 65°C-80°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง กรณีที่ไม่มีหลอด UV (Schleicher & Schuell, Germany)

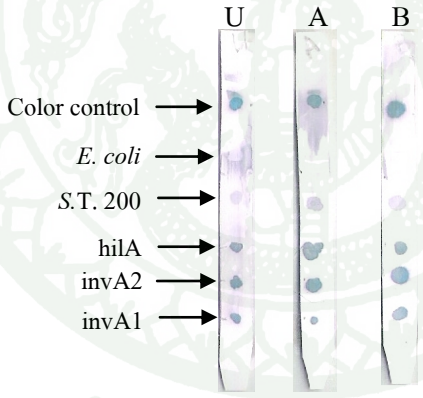
การศึกษานี้ต้องการพัฒนาชุดตรวจสอบให้สามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องมือหรืออุปกรณ์พื้นฐานที่หาได้ในห้องปฏิบัติการทั่วๆ ไป จึงตัด membrane เป็นแถบยาว (strip) ให้พอดีกับ microcentrifuge tube โดย strip นี้จะต้องจุ่มได้ถึงก้นหลอด microcentrifuge tube ซึ่งพบว่า strip ขนาด 0.45×5 cm มีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะสามารถดูดสารละลายจากปลายด้านหนึ่งสู่ปลายอีกด้านหนึ่งของ strip ได้โดยตลอด พร้อมกับทำการระบุตำแหน่งบน strip สำหรับหยด DNA ทดสอบ โดยให้ห่างจากปลาย strip 1 cm เพื่อเป็นตำแหน่งของหยด DNA ทดสอบ และเป็นปลายของด้านที่จุ่มกับ hybridization buffer

3.1 ชุดที่ 1 ผลจากการปรับสภาวะทดสอบในแต่ละขั้นตอน เพื่อให้เทคนิค PACHA สามารถตรวจเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยกำหนดความเข้มข้นของ DNA และ probe ที่ใช้เป็นค่าคงที่คือ 1000 ng และ 2 ng ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) ผลทดสอบการเคลือบผิว membrane strip เพื่อลด background

ผลทดสอบการเคลือบผิว strip ด้วย BB2 ก่อนหรือหลังหยด target DNA เพื่อช่วยลดการเกิด background ที่เป็นผลมาจากการเกาะของ probe ขณะทำ hybridize (ภาพที่ 14) พบว่าถ้าไม่เคลือบผิว strip ด้วย BB2 เกิด background สูงกว่าการเคลือบ และเปรียบเทียบการเคลือบผิว strip ทั้งก่อนหรือหลังจากหยด DNA ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้พบว่า background ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจาก strip ส่วนเหนือสารละลายมีการแห้งขณะทำ hybridize ซึ่งทำให้ probe ค้างและเกาะกับบริเวณอื่นๆ บน strip จึงปรากฏสีน้ำเงินกับบริเวณอื่นๆ ที่ไม่ใช่หยด DNA เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ membrane ชนิด positively charged nylon ซึ่งเป็น membrane ที่มีความสามารถสูงที่สุดในการยึดเกาะกับ DNA เมื่อเทียบกับชนิด nitrocellulose หรือ nylon ทั่วไป คือสามารถตรึง DNA ได้ถึง 400-500 $\mu g/cm^2$ แต่ทั้งนี้ข้อเสียของ membrane ชนิดนี้ก็คือเกิดการรบกวนจาก background ได้สูง เนื่องจากโดยธรรมชาติโมเลกุลของ DNA ที่มีประจุลบดังนั้นย่อมจับกับประจุบวกได้ดี (Anderson, 1999) การเคลือบผิว strip ด้วย BB2 ก่อนหรือหลังหยด target DNA จึงไม่เหมาะสมและจึงต้องทดสอบการล้างที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อช่วยลดปัญหานี้



ภาพที่ 14 แสดงผลการทดสอบเคลือบผิว strip ด้วย BB2 ภาพ U คือแผ่น strip ที่ไม่ได้แช่ใน BB2
ภาพ A คือแผ่น strip ที่หยด DNA ลงบน strip ก่อนแล้วจึงแช่ใน BB2 นาน 20 นาที
ภาพ B คือแผ่น strip ที่แช่ใน BB2 นาน 20 นาที แล้วจึงทำการหยด DNA ลงบน strip

2) ผลการทดสอบชนิดของ hybridization buffer ที่ใช้สำหรับเทคนิค PACHA

การทดสอบ hybridization buffer หรือเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า mobile phase ซึ่งเป็นสารละลายที่สามารถนำพา probe เคลื่อนที่ไปพร้อมๆกันได้ โดยทดสอบกับสารละลายสามชนิด ได้แก่ dH_2O, 2x SSC และ Dig EasyHyb (Roche, Germany) ผลการทดสอบเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

hybridization พบว่ามีเพียง Dig EasyHyb เท่านั้นที่เกิดผลบวก ส่วน dH_2O และ 2x SSC ไม่เกิดผลบวก ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา hybridization ต้องอาศัยบัฟเฟอร์ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญดังนี้คือ 1) ionic strength เพื่อช่วยลดแรงผลักกันระหว่าง DNA 2) ฟอร์มาไมด์ (formamide) เพื่อช่วยลดอุณหภูมิขณะทำ hybridize และ 3) dextran sulfate ที่ช่วยทำให้การจับตัวของ DNA เกิดได้เร็วขึ้น (วสันต์, 2536; Anderson, 1999; Sambrook, 1989) นอกจากองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ Dig EasyHyb จะช่วยส่งเสริมให้เกิดการ hybridize ได้ดีแล้วยังปลอดภัยจากฟอร์มาไมด์ด้วย (Roche, Germany)

3) ปริมาตรที่เหมาะสมของ probe hybridization solution สำหรับเทคนิค PACHA

จากการทดสอบหาปริมาตรของ probe hybridization solution ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PACHA โดยกำหนดความเข้มข้นของ probe และ target DNA ทดสอบเท่ากันและสภาวะทดสอบเดียวกัน กับ probe hybridization solution ปริมาตรต่างๆ ได้แก่ 20 µl, 50 µl, 100 µl และ 200 µl พบว่าตำแหน่งของบริเวณหยด target DNA ที่อยู่เหนือระดับ solution (ที่ปริมาตร 20 µl และ 50 µl) มีความเข้ม signal สูงกว่าบริเวณหยด target DNA ที่แช่อยู่ใน solution โดยตรง (ที่ปริมาตร 100 µl และ 200 µl) การใช้ probe hybridization solution ที่ปริมาตร 50 µl เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของ probe ผ่านบริเวณ DNA ทดสอบได้สูงที่สุด ส่วนที่ปริมาตร 20 µl solution เคลื่อนที่ได้ไม่ถึงปลายอีกด้านหนึ่งของ strip จึงทำให้มี probe อิสระจำนวนมากรวมตัวอยู่บริเวณที่ solution เคลื่อนที่ได้สิ้นสุดซึ่งเป็นบริเวณส่วนกลางของ strip ทำให้เกิด background ขึ้น ส่วนที่ปริมาตร 100 µl และ 200 µl บริเวณ DNA ทดสอบแช่อยู่ในสารละลายโอกาสการเคลื่อนผ่านและเข้าคู่กันจึงมีน้อย เนื่องจากการที่ตำแหน่งหยด target DNA อยู่เหนือระดับ solution เมื่อจุ่ม strip ลงใน solution จะเกิดการเคลื่อนที่ของ solution ขึ้นไปตามแนว strip ด้วยแรง capillary และเมื่อ solution ดูดซึมขึ้นไป probe เคลื่อนที่ตามไปด้วย และสามารถ hybridize กับ target DNA ได้อย่างพอดีตลอดการเคลื่อนที่ของ solution จนปลายอีกด้านหนึ่งของ strip เปียก ซึ่งเป็นการจำกัดให้ probe ต้องเคลื่อนที่ผ่านบริเวณของ target DNA โดยตรง ในขณะที่การจุ่ม strip ให้บริเวณของ target DNA แช่อยู่ใน solution โดยตรงโอกาสเข้าจับเกิดน้อยและช้ากว่า เพราะ probe สามารถเคลื่อนที่ ได้อย่างอิสระใน solution ไม่ได้ถูกจำกัดให้เคลื่อนผ่านบริเวณ target DNA เท่านั้น ดังนั้นโอกาสในการเข้าคู่กันจึงมีน้อยกว่า ซึ่งเทียบเท่ากับเทคนิค conventional hybridization ที่ต้องอาศัยการหมุนเหวี่ยงหรือการเขย่าเพื่อให้บริเวณ target DNA ได้สัมผัสกับ probe ให้มากที่สุดและต้องใช้เวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง (วสันต์, 2536)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

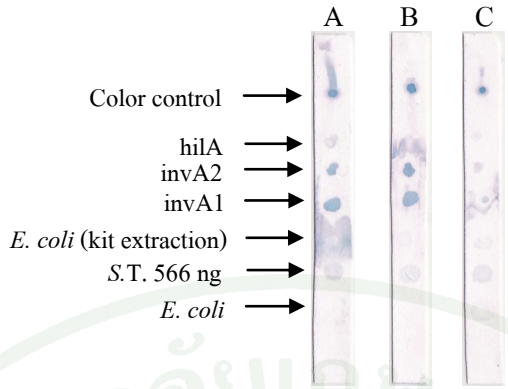
4) ผลทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับเทคนิค PACHA

การทดสอบอุณหภูมิขณะ hybridize โดยควบคุมความเข้มข้น DNA ความเข้มข้น probe และใช้ probe hybridization solution ให้คงที่คือ 566 ng, 2ng และ 50 µl ตามลำดับ ทำการจุ่ม strip ลงใน solution และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C, 27°C, 60°C, 65°C, 70°C และ 75°C ผลการทดสอบ (ตารางที่ 7) โดยเทียบเวลาการดูดซับ solution จนถึงปลายอีกด้านหนึ่งของ strip พบว่า ที่อุณหภูมิ 4°C 27°C และ 60°C การเคลื่อนที่ของ solution ใช้เวลา 35 นาที, 25 นาที และ 15นาที อุณหภูมิ 65°C, 70°C และ 75°C การเคลื่อนที่ของ solution ใช้เวลา 10 นาที, 7 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ สรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิ 75°C มีการเคลื่อนที่ของ solution เร็วที่สุด ในขณะเดียวกันเมื่อเทียบการ hybridize ของ probe กับ target DNA (ภาพที่ 15) พบว่าที่อุณหภูมิ 4°C และ 27°C เกิดผลบวกปลอมกับ neg. control คือมีการ hybridize ของ probe กับ DNA ของเชื้อ *E. coli* (cross reaction) ส่วนที่อุณหภูมิ 60°C, 65°C และ70°C เกิด cross reaction ขึ้นในบางครั้ง ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบแบบ PACHA การเคลื่อนที่ของ probe จะผ่านบริเวณ DNA ทดสอบได้โดยตรง ดังนั้นหากอุณหภูมิต่ำ โอกาสการเข้าคู่กันอย่างไม่จำเพาะจึงเกิดได้สูง ส่วนการทดสอบที่อุณหภูมิ 75°C ไม่เกิด cross reaction ซึ่งโดยปกติอุณหภูมิขณะทำ hybridize ด้วยเทคนิค conventional hybridization ต้องคำนวณจากค่า %GC ของ probe ที่ใช้มีตั้งแต่อุณหภูมิต่ำถึงสูง ได้แก่ 37°C 42°C 50°C 55°C 60°C 65°C 68°C เป็นต้น ทั้งนี้แต่ละอุณหภูมิจะมีผลต่อความจำเพาะ การเกิด signal และ background (Herzer and Englert, 2001) สำหรับเทคนิค PACHA เป็นการทำปฏิกิริยา hybridization ด้วยเวลาที่น้อยมากจึงใช้อุณหภูมิขณะ hybridize 75°C เพื่อให้เกิดความจำเพาะได้อย่างมากที่สุด

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบขั้น hybridize ที่อุณหภูมิต่างๆ

Temp (°C)	Time (min.)	Result	
		False pos.	Background
4	35	+	-
27	25	+	+
60	15	+	+
65	10	+	+
70	7	+	+
75	5	-	+

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 แสดงผล PACHA เมื่อทดสอบ hybridize ที่อุณหภูมิ (A) 60°C, (B) 27 °C และ (C) 4°C

5) ผลทดสอบหาเวลา hybridize ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PACHA

การทดสอบหาเวลา hybridize ที่เหมาะสมพบว่าที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 1 ชั่วโมง, 30 นาที, 20 นาที 10 นาที และ 5 นาที ความเข้มของ signal ที่เกิดขึ้นบริเวณ target DNA ไม่แตกต่างกัน การให้เวลา hybridize มากหรือน้อยความสามารถในการเข้าจับของ probe ยังคงเท่าเดิม และยิ่งไปกว่านั้นการให้เวลา hybridize นานเกินไปยังส่งผลให้ probe hybridization solution นั้นแห้งและเกาะติดกับ membrane จึงทำให้ probe ถูกตรึงบนพื้นผิวส่วนอื่นของ membrane ไม่สามารถชะล้างออกได้ และกลายเป็น background ที่เข้มมาก รบกวนผลการวิเคราะห์ (ภาพภาคผนวกที่ 3) ดังนั้นข้อควรระวังคือต้องไม่ให้ membrane แห้งขณะทำการทดลอง (Sambrook *et al*., 1989) สรุปเวลาในขั้นตอนการ hybridize สำหรับเทคนิค PACHA สามารถทำได้ด้วยเวลาเพียง 5 นาที นอกจากนี้การเติม Hybridization buffer (75°C) เพิ่มอีก 50 µl หลังจากการ hybridize ผ่านไป 5 นาที จะช่วยให้ probe ที่เกาะตรงพื้นผิว strip ด้านล่างถูกดูดขึ้นไปได้มากขึ้น โอกาสเกิด hybridize เพิ่มมากขึ้นและ background น้อยลงหรือไม่เกิดเลย เพราะ strip เปียกอยู่ตลอดเวลา

6) ผลทดสอบอุณหภูมิของ WB สำหรับล้าง strip ภายหลังขั้นตอน hybridize

เมื่อสิ้นสุดขั้นตอน hybridize ผิวหน้า strip ถูกเคลือบไปด้วย probe อาจมีทั้งการเข้าคู่กันอย่างไม่จำเพาะกับ non-target DNA และบริเวณที่ไม่มี target DNA ดังนั้นจึงต้องชะล้างออกไปด้วยบัฟเฟอร์ที่มีสภาวะเหมาะสมและเปรียบเทียบการล้าง strip ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ ที่อุณภูมิห้อง (27°C), 50°C, 60°C และ 70°C จากการทดสอบพบว่าที่อุณภูมิ 70°C probe ที่จับในบริเวณอื่นและจับกับบริเวณ non-target DNA ถูกชะล้างออกได้มากที่สุด ในกรณี conventional

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

hybridization การล้าง probe ส่วนเกิน หลังจาก hybridize ทำที่อุณหภูมิ 65°C ร่วมกับการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ซึ่งใช้บัฟเฟอร์ในการล้าง 2 ชนิด เริ่มด้วยบัฟเฟอร์ชนิดอ่อน (low stringency) คือ WB1 ประกอบด้วย 2X SSC และ 1% SDS คุณสมบัติของบัฟเฟอร์ชนิดนี้ช่วยให้ DNA สายผสมเสถียร และตามด้วยการล้างรอบที่สองด้วยบัฟเฟอร์ชนิดรุนแรง (high stringency) คือ WB2 ประกอบด้วย 0.2X SSC และ 0.1% SDS คุณสมบัติของบัฟเฟอร์ชนิดนี้จะไปลดความเสถียรของ DNA สายผสม ทำให้การ hybridize ที่เกิดขึ้นระหว่าง probe กับ DNA ที่มีความเหมือนหรือคล้ายกันมากๆ หลุดออกไปได้ จึงช่วยลดการจับกันอย่างไม่จำเพาะ (Anderson, 1999) สำหรับเทคนิค PACHA ทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดอ่อนทั้งสองรอบ จึงต้องอาศัยการเพิ่มอุณหภูมิเข้ามาช่วยในขั้นตอนการล้าง (Sambrook *et al*., 1989) ร่วมกับการทำงานของบัฟเฟอร์เนื่องจากคุณสมบัติของ SSC ที่ช่วยเพิ่มความเสถียรให้ DNA สายผสม พร้อมกับคุณสมบัติของ SDS ที่ช่วยลดการเกิด background เพื่อชะล้าง probe ที่เกาะอย่างไม่จำเพาะให้หลุดออกได้มากที่สุด (Anderson, 1999)

7) ผลทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการล้างและ block หลังจาก hybridize และหลังจากการตรวจสอบด้วย AD-AP

การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการล้างและ block หลังจากขั้นตอน hybridize และหลังจากขั้นตอนการตรวจสอบด้วย AD-AP ที่เวลา 5 นาที 3 นาที 2 นาที และไม่ต้องทำการล้างและ block พบว่าการล้างและ block strip ด้วยเวลา 2 นาทีสามารถกำจัด probe ที่เกาะอย่างไม่จำเพาะออกได้ และให้ประสิทธิภาพเทียบเท่ากันกับ 3 นาที และ 5 นาที หากขณะทำ hybridize รักษา strip ให้เปียกอยู่เสมอ สำหรับผลการทดสอบตัดขั้นตอนล้างและ block ออกไป คือ ไม่ทำการล้างด้วย WB1 และไม่ทำการเคลือบด้วย BB1 และ BB2 ส่งผลให้ไม่มี signal ปรากฏทั้ง DNA และ pos. control ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากสภาวะของ DNA และ probe ไม่เหมาะสม AD-AP จึงทำปฏิกิริยากับ DIG และจึงไม่มีเอนไซม์ AP ที่จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับ NBT/BCIP ให้ปรากฏสีม่วงน้ำเงินได้ นอกจากนี้พบว่าการเตรียม WB และ BB ใหม่อยู่เสมอจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการล้างและ block ทำให้ strip สะอาดมากกว่าการล้างและ block ด้วย WB และ BB ที่เตรียมไว้นานเกิน 6 เดือน

8) ผลทดสอบเพื่อหาเวลา incubate กับ AD-AP

ทำการทดสอบเพื่อหาเวลา incubate กับ AD-AP ที่สามารถส่งผลให้เกิด signal ได้ดีที่สุดภายหลังจากทำปฏิกิริยากับ NBT/BCIP พบว่าที่เวลา 10 นาที และ 20 นาทีปรากฏ signal ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แต่มีสีที่อ่อนกว่าการ incubate ที่เวลา 30 นาที ซึ่งโดยปกติสำหรับขั้นตอนนี้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค conventional hybridization ต้องการเวลา 30 นาทีร่วมกับการเขย่าอย่างเบา (NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, USA) ดังนั้นสำหรับเทคนิค PACHA ต้องการเวลาเพื่อ incubate กับ AD-AP นาน 30 นาที

ดังนั้นจากผลการทดสอบชุดที่ 1 สามารถสรุปเงื่อนไขที่ให้สภาวะที่ดีที่สุดของกระบวนการตรวจสอบแบบ PACHA ได้ดังนี้คือ

ขั้นที่ 1 เตรียม probe hybridization solution โดยผสม Dig EasyHyb กับ probe ที่ปริมาตรสุทธิ 50 µl แล้วนำไป denature

ขั้นที่ 2 จุ่ม strip ทดสอบลงใน probe hybridization solution ภายใต้อุณหภูมิ 75°C สังเกตการเคลื่อนที่ของ solution เพื่อให้ probe เคลื่อนไปยังปลายอีกด้านหนึ่งของ strip ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 15 นาที ในระหว่างนี้ควรเพิ่ม Dig EasyHyb เป็นระยะๆ ปริมาตร 50 µl เพื่อช่วยพา probe ขึ้นไปให้ได้มากที่สุด และช่วยป้องกันไม่ให้ membrane แห้ง

ขั้นที่ 3 ล้าง strip ด้วย WB1 อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) ทำซ้ำ 2 รอบ และชะล้าง strip ด้วย BB1 เป็นเวลา 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) แล้วเคลือบผิว strip ใน BB2 เป็นเวลา 2 นาที

ขั้นที่ 4 นำ strip ไป incubate กับ AD-AP เป็นเวลา 30 นาที

ขั้นที่ 5 ล้าง strip ด้วย WB1 2 รอบ รอบละ 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) และชะล้างด้วย BB1 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) เพื่อปรับสภาพ แล้วเคลือบผิว strip ใน BB2 เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นปรับสภาพ strip ด้วย DB 2 นาที

ขั้นที่ 6 เติม NBT/BCIP substrate และไว้ในที่มืดจนเกิดสี ซึ่งประมาณ 3 นาที สีของ color control จะเริ่มปรากฏขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากนั้นนำเงื่อนไขที่ให้สภาวะที่ดีที่สุดของกระบวนการ PACHA ที่กล่าวสรุปมานี้ไปใช้ในการทดสอบ PACHA ชุดที่ 2 และชุดที่ 3 เพื่อปรับเทคนิค PACHA ให้สามารถตรวจสอบ DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

3.2 ผลทดสอบชุดที่ 2 เพื่อปรับการนำ probe ไปใช้ในเทคนิค PACHA ให้มีประสิทธิภาพ โดยควบคุมความเข้มข้น DNA และวิธีการแต่ละขั้นตอนดังสรุปจากการทดสอบชุดที่ 1

1) ผลทดสอบการ hybridize ด้วย probe ที่มีขนาดต่างกัน

ผลการทดสอบการ hybridize ด้วย probe ที่มีขนาดต่างกัน โดยควบคุมสภาวะทดสอบทุกขั้นตอนให้เหมือนกัน แล้วทำการทดสอบแบบ PACHA ทั้งนี้ได้ทำการทดสอบ probe ทั้งสามในแบบ conventional hybridization ควบคู่ไปด้วย พบว่าความเข้ม signal ที่เกิดจากการตรวจสอบ DNA ของ *S.* Typhimutium ด้วย probe invA1-DIG, invA2-DIG และ hilA-DIG ซึ่งมีขนาด 244 bp, 521 bp และ 821 bp ตามลำดับ ในการทดสอบแบบ PACHA สามารถมองเห็นความแตกต่างได้ไม่ชัดเจนนัก แต่จะสังเกตเห็นได้ว่ากับหยดของ DNA *S.* Typhimutium ขนาด 100 ng ที่ตรวจสอบด้วย hilA-DIG ปรากฏ signal ได้เข้มกว่าการตรวจสอบด้วย invA1-DIG และ invA2-DIG ดังภาพ (5) ของภาพที่ 16 ทั้งนี้ผลของ conventional hybridization ที่แสดงในภาพ (2) ภาพ (3) ภาพ (4) ของภาพที่ 16 พบว่าความเข้ม signal ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วย probe invA1-DIG, invA2-DIG และ hilA-DIG ตามลำดับ มีความแปรผันตรงกับขนาดของ probe โดย probe hilA1-DIG ขนาดยาวสุดมีความเข้ม signal มากที่สุด probe invA2- DIG ขนาดกลางเข้มรองลงมา และ probe invA1-DIG ขนาดสั้นที่สุดมี signal อ่อนที่สุด ทั้งนี้การปรากฏของ signal ที่เข้มหรืออ่อนนั้นขึ้นกับจำนวนเบส dUTP-DIG ที่แทรกแทนที่เบส T ซึ่งหาก probe มีขนาดสั้น dUTP-DIG ที่แทรกได้อาจจะมีปริมาณน้อยกว่า signal จึงอ่อนกว่า ในขณะที่ probe ขนาดยาวโอกาสที่ dUTP-DIG แทรกได้มีมากว่า สรุปได้ว่าในปริมาณความเข้มข้น probe ที่เท่ากัน ปริมาณ target DNA เข้มข้นเท่ากัน การตรวจสอบด้วย probe ที่ขนาดยาวกว่ามี signal ที่เข้มกว่า probe ขนาดสั้น นอกจากนี้ probe ขนาดยาวจะช่วยเพิ่มโอกาสการเจอกันและการจดจำกันระหว่าง probe กับ target DNA ทั้งยังลดโอกาสเกิด cross reaction เนื่องจาก DNA สายผสมที่มาเข้าคู่กันอย่างไม่จำเพาะของ probe ขนาดใหญ่เกิดความไม่เสถียรมากกว่า cross reaction ที่เกิดกับ probe สายสั้นๆ ทำให้ถูกชะล้างออกได้ง่ายกว่า (Anderson, 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) ผลทดสอบตำแหน่งของ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบ DNA

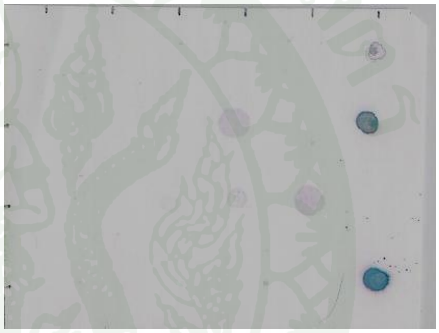
Probe 3 บริเวณที่ออกแบบมาเพื่อให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ต่างกัน ได้นำมาทดสอบดังนี้คือ 1) ใช้ probe ชิ้นใดชิ้นหนึ่ง จะเกิด hybridize ได้ 1 ตำแหน่งบน chromosomal DNA 2) ใช้ probe 2 ชิ้นพร้อมกัน จะเกิด hybridize ได้ 2 ตำแหน่งบน chromosomal DNA และ 3) ใช้ probe 3 ชิ้นพร้อมกัน จะเกิด hybridize ได้ 3 ตำแหน่งบน chromosomal DNA โดยผลการทดสอบ PACHA แสดงในภาพ (2) ของภาพที่ 17 ซึ่งทุก strip ทำการทดสอบจากสภาวะเดียวกัน จาก signal ที่ปรากฏจะเห็นความแตกต่างได้ไม่ชัดเจนนัก แต่จะสังเกตเห็นได้ว่าเมื่อตรวจสอบด้วย probe 2 ตำแหน่ง ความเข้มของ signal ที่ปรากฏเข้มมากกว่าผลจากการตรวจสอบด้วย probe 1 ตำแหน่ง การตรวจสอบด้วย probe 3 ตำแหน่งพร้อมกัน มีความเข้มของ signal ทีสังเกตได้ใกล้เคียงกับการตรวจสอบด้วย probe 2 ตำแหน่ง ทั้งนี้จากผลการทดสอบแบบ conventional hybridization พบว่าในการทดสอบด้วยการกำหนดความเข้มข้น probe ที่ใช้เท่ากัน การตรวจสอบด้วบ probe 3 ตำแหน่งดังภาพ (1) ของภาพที่ 17 ปรากฏ signal เข้มมากกว่าการใช้ probe 1 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพ (2), (3) และ (4) ของภาพที่ 16 การเพิ่มตำแหน่ง probe ที่ใช้ในการตรวจสอบทำให้ probe มีโอกาสเข้าจับกับ target DNA ได้หลายตำแหน่งไม่เกิดการแย่งจับกันของ probe ชิ้นเดียวกันที่ตำแหน่งเดียวกัน เนื่องจาก PACHA เป็นการ hybridize ที่เกิดขึ้นในเวลาสั้นมากเพียง 5 นาที ดังนั้นการเพิ่มตำแหน่งเป้าหมายให้ probe เข้าจับได้จึงเป็นการส่งเสริมให้การตรวจสอบมีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อเพิ่มมากขึ้น ทั้งยังช่วยเพิ่มความเข้มของ signal ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

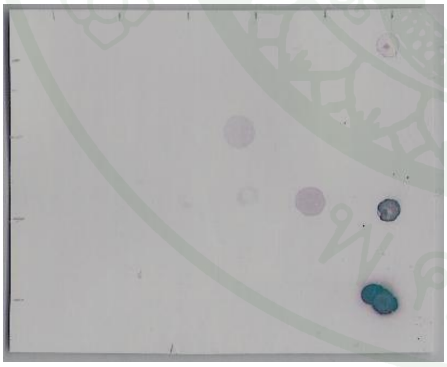
S.T. DNA (10^0 CFU)	*S*.T. DNA (10^1 CFU)	*S*.T. DNA (10^2 CFU)	*S*.T. DNA (10^3 CFU)	*S*.T. DNA (10^4 CFU)	invA1
S.T. DNA (10^5 CFU)	*S*.T. DNA (10^6 CFU)	*S*.T. DNA (10^7 CFU)	*S*.T. DNA (10^8 CFU)	*S*.T. DNA 0.1 ng	invA2
S.T. DNA 1 ng	*S*.T. DNA 10 ng	*S*.T. DNA 100 ng	*S*.T. DNA 500 ng	*S*.T. DNA 1000 ng	hilA
E. coli	*K. pneumonia*	*P.aeruginosa*	–	–	+

(1)

(2) invA1-DIG ความยาว 244 bp



(3) invA2-DIG ความยาว 521 bp

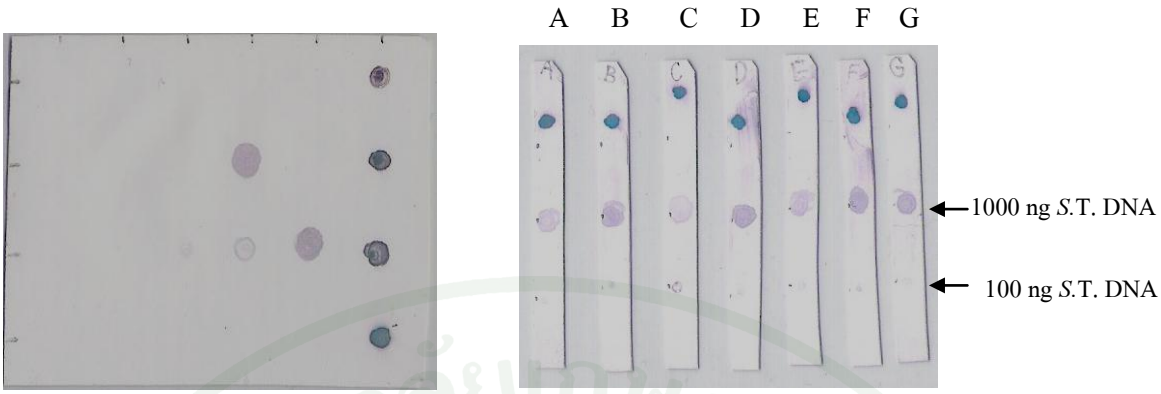


(4) hilA-DIG ความยาว 821 bp

(5) invA1-DIG, invA2-DIG, hilA-DIG

ภาพที่ 16 ภาพแสดงผลการตรวจสอบเชื้อด้วย probe ที่มีความยาวไม่เท่ากัน ด้วยวิธี conventional hybridization ภาพ (1) ภาพแสดงตำแหน่งการหยด DNA ภาพ (2) probe invA1-DIG ภาพ (3) probe invA2-DIG และภาพ (4) probe hilA-DIG และภาพ (5) แสดงผลการทดสอบเทคนิค PACHA ด้วย probe invA1-DIG, probe invA2-DIG และ probe hilA-DIG ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 แสดงผลทดสอบตำแหน่งของ probe ที่ใช้ในการตรวจสอบแบบ PACHA ภาพ (1) แสดงผล conventional dot blot hybridization ด้วย probe 3 ตำแหน่งพร้อมกัน โดยมีตำแหน่งการหยด DNA ดังที่ระบุในภาพ (1) ของภาพที่ 16 ภาพ (2) แสดงผลที่ได้เมื่อตรวจสอบด้วย probe 1 ตำแหน่ง, 2 ตำแหน่ง และ 3 ตำแหน่ง กับเทคนิค PACHA โดย ภาพ A คือ invA1-DIG ภาพ B คือ invA2-DIG ภาพ C คือ hilA-DIG ภาพ D คือ invA1-DIG + invA2-DIG ภาพ E คือ invA1-DIG + hilA-DIG ภาพ F คือ invA2-DIG + hilA-DIG ภาพ G คือ invA1-DIG + invA2-DIG + hilA-DIG

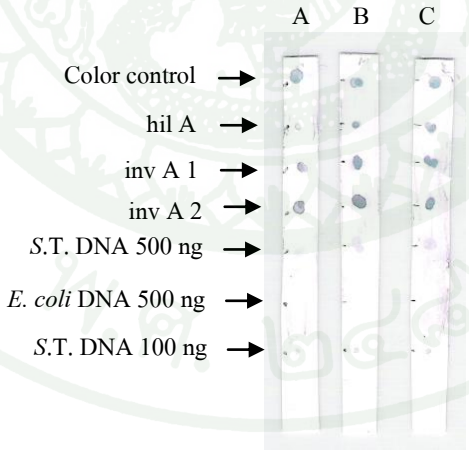
3) ผลทดสอบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ probe ที่ใช้สำหรับวิธี PACHA

การทดสอบความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของ probe เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของ probe ที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค PACHA เมื่อทำการตรวจสอบด้วย probe 3 ตำแหน่งพร้อมกัน แล้วเทคนิค PACHA เกิดประสิทธิผลสูงสุด โดยกำหนดความเข้มข้นของ *S*.T. DNA ที่ใช้และเงื่อนไขสภาวะทดสอบ PACHA ให้คงที่ และปรับเปลี่ยนความเข้มข้น probe สำหรับทดสอบดังนี้คือ 0.25 ng, 0.50 ng และ 1 ng ผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 18 พบว่า ณ ตำแหน่งของ *S*.T. DNA 500 ng ปรากฏ signal อ่อนสุดเมื่อความเข้มข้นของ probe เท่ากับ 0.25 ng และปรากฏความเข้ม signal ใกล้เคียงกันเมื่อความเข้มข้นของ probe ที่ใช้ตรวจสอบเท่ากับ 0.5 ng และ 1 ng พบว่าความเข้มข้น probe ที่มากขึ้นช่วยเพิ่มความเข้มของ signal ได้ นอกจากนี้ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ probe ทั้งสามชิ้นที่ใช้ร่วมกัน มีปริมาณเพียงพอและเหลือจนกระทั่งสามารถเคลื่อนที่ขึ้นไปจับกับหยดของ denature PCR product ของ invA1, invA2 และ hilA ที่หยดไว้บริเวณเหนือ target DNA บน strip ซึ่งเป็นหยด DNA ควบคุมความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

hybridization ของการทดสอบ ทั้งยังเป็นข้อพิสูจน์ได้ว่าปฏิกิริยา hybridization ของ probe แต่ละตำแหน่งสามารถเกิดได้อย่างสมบูรณ์

ความเข้มของ signal นั้นไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของ probe ที่ใช้เพียงอย่างเดียว ปริมาณของ target DNA ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความเข้ม signal การเพิ่มตำแหน่งให้ probe ที่เข้าตรวจสอบจึงเข้ามาช่วยเพิ่มความเข้ม signal ได้ นอกจากนี้การใช้ probe ที่ความเข้มข้นมากเกินไปอาจมีผลให้เกิด background ได้สูง เนื่องจากมี probe ส่วนเกินที่ไม่ได้ hybridize หลงเหลืออยู่จำนวนมาก และสิ้นเปลือง ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ในการศึกษาของ Rzezutka and Mizak (2003) ได้ให้ข้อสรุปว่า ความเข้มข้นสำหรับการนำ probe ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ไปใช้ในปฏิกิริยา hybridization ได้อย่างเหมาะสม อยู่ที่ระดับ 50-100 ng ต่อ hybridization buffer 1 ml เนื่องจากประสิทธิภาพของ probe ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิค PCR มีความไวต่อปฏิกิริยา hybridization มากกว่าการสังเคราะห์ probe ด้วยวิธี random prime labeling และ oligonucleotide probe จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการใช้ probe เข้มข้น 0.25 ng ต่อ hybridization buffer 50 µl ก็เพียงพอสำหรับการทดสอบ ทั้งนี้ต้องการให้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA มีความแน่นอนมากที่สุด การทดสอบขั้นต่อไปจึงใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของ probe ที่ระดับ 1 ng เพื่อให้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA มีประสิทธิภาพสูงสุด



ภาพที่ 18 แสดงการผลการทดสอบเทคนิค PACHA ด้วยความเข้มข้นของ probe ระดับต่างๆ ภาพ A คือความเข้มข้น probe 0.25 ng ภาพ B ความเข้มข้น probe 0.50 ng และภาพ C ความเข้มข้น probe 1.00 ng

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ผลทดสอบชุดที่ 3 เพื่อหาคุณภาพ และปริมาณของ DNA ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบแบบ PACHA

1) ผลทดสอบคุณภาพของ DNA ที่มีผลต่อการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA

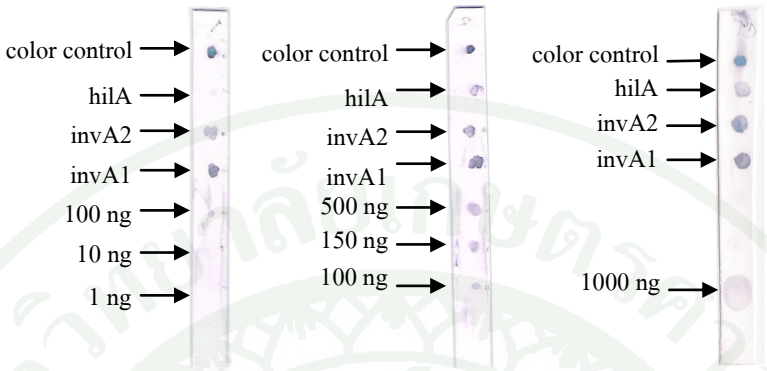
การทดสอบคุณภาพของ DNA ที่มีผลต่อการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA โดยกำหนดเงื่อนไขสภาวะทดสอบPACHAความเข้มข้นของ DNA และ probe ที่ใช้ให้ค่าคง คือ 500 ng และ 2 ng ตามลำดับ และปรับเปลี่ยนวิธีการสำหรับสกัด DNA ดังนี้คือ วิธี NaOH, วิธี chelex และวิธีสกัดด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่อหยด DNA เท่ากันหยดของ DNA ที่สกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปมี signal เข้มที่สุด DNA ที่สกัดด้วยวิธี chelex มีความเข้มรองลงมา ส่วน DNA ที่สกัดด้วยวิธี NaOH มีความเข้ม signal อ่อนสุด เนื่องจาก DNA ที่สกัดด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป มีความบริสุทธิ์สูงบริเวณของหยด DNA จึงเข้มข้นและมีปริมาณ DNA ภายในบริเวณหยดที่มากกว่า เมื่อทำการทดสอบจึงมี probe เข้าจับได้มากกว่า การจับกันระหว่าง probe กับ target DNA ไม่ถูกขัดขวางด้วยปัจจัยอื่นๆ เช่น เศษผนังเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นคุณภาพของ DNA จึงมีผลต่อการตรวจสอบแบบ PACHA สอดคล้องกับการศึกษาของ Dyson (2001) ที่พบว่าถ้าตัวอย่าง DNA เป็นชนิด crude extract คุณภาพของ DNA จะต่ำกว่า probe มีโอกาสจับกันอย่างไม่ถูกต้องมากขึ้น นอกจากนี้ยังกล่าวว่าตัวอย่าง DNA ที่ไม่บริสุทธิ์จะมีผลไปยับยั้งการ hybridize ทำให้เกิดผลลบเทียม หรืออาจเป็นกับดักที่นำไปสู่การเกิดผลบวกเทียมได้ ทั้งนี้การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปทำให้สิ้นเปลือง ส่วนวิธี chelex เป็นวิธีการสกัดที่ได้ DNA มีคุณภาพ ทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และรวดเร็วกว่าการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป การตรวจสอบแบบ PACHA จึงแนะนำให้ใช้วิธี chelex เพื่อสกัด DNA สำหรับทดสอบ

2) ผลทดสอบเพื่อหาความเข้มข้น DNA ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PACHA

ทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้น DNA ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PACHA โดยกำหนดเงื่อนไขสภาวะเทคนิค PACHA และความเข้มข้น probe ให้คงที่ คือ 2 ng แล้วปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ *S.* T. DNA ที่หยดลงบน strip ดังนี้ 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 500 ng และ 1000 ng ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ DNA เริ่มต้นที่น้อยที่สุดที่ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA แล้วปรากฏ signal ได้ เริ่มที่หยดของ DNA เข้มข้น 100 ng และจะมีความเข้มของ signal มากขึ้นเมื่อความเข้มข้น DNA ที่ทดสอบเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 19 ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค conventional hybridization พบว่าปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

DNA เริ่มต้นที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 100 ng เช่นกัน (Sambrook, 1989) ดังนั้นการตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PACHA จึงเหมาะสำหรับ DNA ที่มีความเข้มข้น 100 ng ขึ้น



ภาพที่ 19 แสดงการผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA กับ *S.* T. DNA ที่ความเข้มข้น 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 500 ng และ 1000 ng

5. ผลทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PACHA

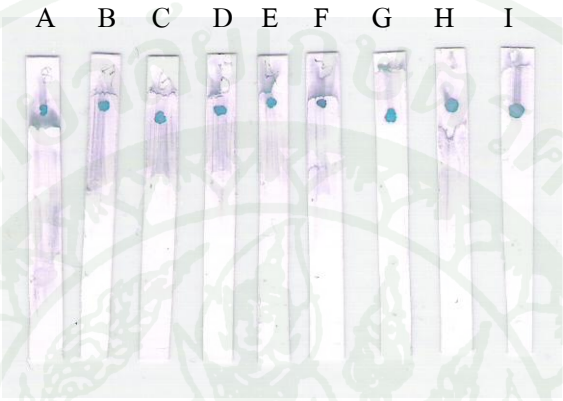
ทดสอบความจำเพาะของการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA โดยสกัด DNA ของเชื้อกลุ่ม *Salmonella* spp. และกลุ่ม non- *Salmonella* spp. ด้วยวิธี Chelex แล้วหยดและตรึง DNA บน strip ผลการทดสอบพบว่า target DNA เกิดผลบวก และ non target DNA เกิดผลลบ ไม่เกิดการจับข้ามกัน (cross reaction) เมื่อควบคุมอุณหภูมิสำหรับ hybridize ที่ 75°C สรุปเทคนิค PACHA ตรวจ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้อย่างจำเพาะภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

6. ผลทดสอบ detection limit ของเทคนิค PACHA

การทดสอบเพื่อหา detection limit สำหรับการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PACHA โดยนำเชื้อ *S.* T. ที่ทราบปริมาณจากการทำ serial dilution มาสกัด DNA ด้วยวิธี Chelex แล้วทำการตรวจสอบแบบ PACHA ด้วยสภาวะเงื่อนไขเดียวกันทุก strip พบว่าหยด DNA ที่สกัดจากเชื้อจำนวน 10^8 CFU/ml ให้ผลบวก ส่วน DNA ที่สกัดจากเชื้อจำนวนต่ำกว่านี้ไม่ปรากฏผลบวก (ภาพที่ 20) ทั้งนี้ในการทดสอบ PACHA นำส่วนของ DNA ที่สกัดได้มาหยดเพียง 2 µl ดังนั้นเมื่อทำการคำนวณย้อนกลับไปจึงคิดเป็นปริมาณของเชื้อที่เทียบเท่ากับ 9.2×10^5 CFU/ml ผลการตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค PACHA สอดคล้องกับผลการตรวจสอบ DNA ด้วยเทคนิค conventional hybridization ดัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แสดงในภาพ (1) ของภาพที่ 17 พบว่าปริมาณ DNA เริ่มต้นที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 10^8 CFU/ml เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดจากแต่ละ dilution ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณ DNA (Sigma-Aldrich Pte Ltd., Singapore) พบว่าที่ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml ได้ DNA เข้มข้นประมาณ 300 ng/µl ส่วน DNA ที่สกัดจากเชื้อจำนวนต่ำกว่านี้วัดได้ไม่ถึง 100 ng/µl



ภาพที่ 20 แสดงการผลการทดสอบหา detection limit ของเทคนิค PACHA ภาพ A คือ ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml, ภาพ B คือ ปริมาณเชื้อ 10^7 CFU/ml, ภาพ C คือ ปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml, ภาพ D คือ ปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/ml, ภาพ E คือ ปริมาณเชื้อ 10^4 CFU/ml, ภาพ F คือ ปริมาณเชื้อ 10^3 CFU/ml, ภาพ G คือ ปริมาณเชื้อ 10^2 CFU/ml, ภาพ H คือ ปริมาณเชื้อ 10^1 CFU/ml และภาพ I คือ ปริมาณเชื้อ 10^0 CFU/ml

7. ผลทดสอบเทคนิค PACHA กับตัวอย่างเนื้อไก่ปลอดเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PACHA เมื่อ DNA ที่ใช้ตรวจสอบเป็น DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อไก่ปนเปื้อน โดยทำการทดลองผสมเชื้อ *S.* T. ที่ทราบปริมาณลงในเนื้อไก่ปลอดเชื้อ แล้วสกัด DNA ด้วยวิธี Chelex จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยสภาวะเงื่อนไขของเทคนิค PACHA ที่ให้ผลดีที่สุด พบว่าเนื้อไก่ที่มีเชื้อปนเปื้อนปริมาณ 9.2×10^5 CFU/ml ปรากฏผลบวก ส่วนปริมาณเชื้อปนเปื้อนที่ต่ำกว่านี้ไม่เกิดผลบวก ดังนั้นการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PACHA จึงเหมาะกับการตรวจตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของเชื้อปริมาณมาก หรืออาจมีการเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนนำมาทดสอบ (Frederickson *et al.*,1988)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PACHA เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย และสะดวกเพราะสามารถทำได้โดยการประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์พื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป การตรวจสอบด้วยสภาวะเงื่อนไขของเทคนิค PACHA ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจ DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้อย่างถูกต้อง มีความจำเพาะต่อเชื้อ ทราบผลการตรวจหาเชื้อในเบื้องต้นได้อย่างรวดเร็ว เทคนิค PACHA สามารถตรวจสอบ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยตรง ดังนั้นข้อด้อยของ PACHA คือมีความไวต่อเชื้อค่อนข้างต่ำเพราะ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างโดยตรงมีความเข้มข้นน้อย ตัวอย่างต้องมีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณมากจึงจะสามารถตรวจพบได้ ทั้งนี้เป็นข้อจำกัดพื้นฐานสำหรับความไวของเทคนิค hybridization ที่ต้องการ DNA เข้มข้นอย่างน้อย 100 ng สำหรับการเพิ่มความไวของการตรวจด้วยวิธีการ PACHA เมื่อ DNA ที่สกัดโดยตรงจากตัวอย่างมีความเข้มข้นน้อยมาก สามารถใช้เทคนิค PCR เข้ามาช่วยเพิ่มปริมาณ target DNA โดยใช้ primer ทั้ง 3 คู่ในปฏิกิริยา PCR แล้วนำ PCR product มาทำการ denature หยดและตรึงบน strip แล้วทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในปริมาณ 1-10 CFU/ml เป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจสอบ DNA นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PACHA สามารถทำได้กับ DNA ที่สกัดโดยตรงจากโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีที่สงสัยมาสกัด DNA แล้วนำ DNA มาทำการ denature หยดและตรึงบน strip จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PACHA วิธีการนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ *Salmonella* spp. ได้เช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ขั้นตอนดำเนินการสำหรับเทคนิค PACHA ทำได้ดังนี้คือ เตรียม charged nylon membrane strip ขนาด 0.45×5 cm. สกัด DNA จากตัวอย่างที่ต้องการตรวจด้วยวิธี chelex-100 จากนั้นทำการ denature DNA แล้ว หยดลงบน strip ตรึง DNA ด้วยการฉายแสง UV 3 นาที เตรียม probe hybridization solution โดยผสม Dig EasyHyb กับ probe ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 ng ในปริมาตรสุทธิ 50 µl แล้วนำไป denature จากนั้นจุ่ม strip ทดสอบลงใน probe hybridization solution ภายใต้อุณหภูมิ 75°C สังเกตการเคลื่อนที่ของ solution ตามแนว strip เพื่อให้ probe ถูกพาขึ้นไปยังปลายอีกด้านหนึ่งของ strip ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 15 นาที (ในระหว่างนี้ควรเพิ่ม Dig EasyHyb เป็นระยะๆ ประมาณ 50 µl เพื่อช่วยพา probe ขึ้นไปให้ได้มากที่สุด และช่วยป้องกันไม่ให้ membrane แห้ง) จากนั้นชะล้าง strip ด้วย WB1 ที่อุ่นที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) ทำซ้ำ 2 รอบ และชะล้าง strip ด้วย BB1 เป็นเวลา 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) แล้วแช่ strip ใน BB2 เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ strip ไป incubate กับ AD-AP เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการชะล้างด้วย WB1 2 รอบ รอบละ 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) ชะล้างด้วย BB1 เป็นเวลา 2 นาที (vortex ตลอดเวลา) แล้วแช่ strip ใน BB2 เป็นเวลา 2 นาที ทำการปรับสภาพ strip ด้วย DB เป็นเวลา 2 นาที สุดท้ายเติม NBT/BCIP substrate และไว้ในที่มืดจนสีม่วงน้ำเงินปรากฏขึ้น ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3 นาที สีของหยด color control จะเริ่มปรากฏขึ้น ส่วนสีของ DNA target จะปรากฏเร็วหรือช้านั้นขึ้นกับความเข้มข้นของ DNA ที่นำมาหยดทดสอบและความสามารถของ probe ที่เข้าจับกับ DNA target

เทคนิค PACHA สามารถตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. จากตัวอย่างได้ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml โดยความเข้มข้นของ DNA น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้คือ 100 ng และต้องการเวลาทดสอบทั้งสิ้น (ไม่รวมระยะเวลาสกัด DNA) 1 ชั่วโมง 30 นาที

แม้ว่าเทคนิค PACHA จะเป็นวิธีการตรวจหา DNA ของเชื้อ *Salmonella* spp. เบื้องต้นที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามควรทำควบคู่กับการเพาะเชื้อเพื่อให้สามารถยืนยันผลการตรวจสอบได้อย่างถูกต้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ปฐมาพร เอมะวิศษฎ์. 2548. ยีนก่อโรคบนโครโมโซมของเชื้อซัลโมเนลลา. **ว กรมวิทย พ** 47 (1): 52-58.

ภัทรชัย กีรติสิน. 2551. **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์.** ครั้งที่ 2. หจก. วี.เจ. พริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ.

วสันต์ จันทราทิตย์. 2536. การติดฉลากสารรังสีและสารปลอดรังสีเข้ากับสายดีเอ็นเอ, น. 16.1-16.57. *ใน* วัฒนาลัย บ้านปากเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์, บรรณาธิการ. **หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม" เล่มที่ II.** โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซี่ยน, มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

สุวณี สุภเวชย์. 2536. บทที่ 1 รูปพรรณ โครงสร้าง และหน้าที่, น. 1-14. *ใน* สุวณี สุภเวชย์ และ มาลัย วรจิตร, บรรณาธิการ. **แบคทีเรียพื้นฐาน.** โรงพิมพ์ศิริยอด, กรุงเทพฯ.

อังกูร เกิดพาณิช. 2549. Salmonella infection. **เวชสารแพทย์ทหารบก** 59 (4): 231-246.

อรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2541. การวินิจฉัยเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ: สถาณการณ์ปัจจุบันของโรคอาหารเป็นพิษ, น. 3-24. *ใน* กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, บรรณาธิการ. **การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การวินิจฉัยเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ: สถาณการณ์ปัจจุบันของโรคอาหารเป็นพิษ** . ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สุราษฎร์ธานี, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

Amann, R.I., W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.** 59 (1): 143-169.

Anderson, M.L.M. 1999. **Nucleic acid hybridization.** 1st ed. BIOS Scientific Publishers Limited, Biddles Ltd., Guildford, UK.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Betts, R.P. 2000. Conventional and rapid analytical microbiology, pp. 187-224. *In* M. Stringer and C. Dennis, eds. **Chilled Foods: A Comprehensive Guide.** Woodhead Publishing Limited, UK.

Bhatia, B.D. and S. Baru. 2007. Newer diagnostic tests for bacterial diseases. **Indian J. Pediatr.** 74 (7): 673-677.

BioJobBlogger. 2008. ***Salmonella* in the news again.** Available Source: http://www.biojobblog.com/salmonella.jpg, August 22, 2008.

Biosproject. **Random primer.** Available Source: http://bios-project.blogspot.com/2009/03/random -primer.html, January 13, 2010.

Blankenfeld-Enkvist, G. and M. Brannback. 2002. **Technological Trends and Needs in Food Diagnostics.** Paino-Center Oy, Helsinki.

Boer, E. and R.R. Beumer. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.** 50(1-2): 119-130.

Brasher, C.W., A. DePaola, D.D. Jones and A.K. Bej. 1998. Detection of microbial pathogen in shellfish with multiplex PCR. **Curr. Microbiol.** 37 (2): 101-107.

Cardona-Castro, N., E. Restrepo-Pineda and M. Correa-Ochoa. 2002. Detection of *hilA* gene sequences in serovars of *Salmonella enterica* subspecies Enterica. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.** 97 (8): 1153-1156.

Carter, D.J. and R.B. Cary. 2007. Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography. **Nucleic Acids Res.** 35 (10): e74.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chapman, A.M. 2006. **Characterizing *Salmonella* Fecal Shedding Among Racehorses in Louisiana.** M.S. Thesis, Louisiana State University.

Cheun, H.I., S.I. Makino, M. Watarai, J. Erdenebaatar, K. Kawamoto and I. Uchida. 2003. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. **J. Appl. Microbiol.** 95(4): 728-733.

Chevalier, J., J. Yi, O. Michel and X.M. Tang. 1997. Biotin and Digoxigenin as Labels for Light and Electron Microscopy in Situ Hybridization Probes: Where Do We Stand?. **J. Histochem. Cytochem.** 45 (4): 481-491.

Chiu, C.H. and J.T. Ou. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. **J. Clin. Microbiol.** 34 (10): 2619-2622.

Clontech. 2009. **ExpressHyb™ Hybridization Solution User Manual.** (Protocol No. PT1190-1 Version No. PR983315). Clontech Laboratories, Inc., Canada.

Cohen, H.J., S.M. Mechanda and W. Lin. 1996. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 (12): 4303-4308.

Coombes, B.K., M.E. Wickham, M.J. Lowden, N.F. Brown and B.B. Finlay. 2005. Negative regulation of *Salmonella* Pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. **PNAS.** 102 (48): 17460–17465.

Corstjens, P.L.A.M., M. Zuiderwijk, M. Nilsson, H Feindt, R.S. Sam and H.J. Tanke. 2003. Lateral-flow and up-converting phosphor reporters to detect single-stranded nucleic acids in a sandwich-hybridization assay. **Anal. Biochem.** 2003 (312): 191-200.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Delabre, K., P. Cervantes, V. Lahoussine and M. Roubin. 1998. Detection of viable pathogenic bacteria from water samples by PCR. **OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water**, Interlaken.

Dyson N.J. 2001. Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis, pp. 109-113. *In* Brown Terence, A., comp. **Essential Molecular Biology.** Oxford University Press, Oxford New York Tokyo.

Feder, I., J.C. Nietfeld, J. Galland, T. Yeary, J.M. Sargeant, R. Oberst, M.L. Tamplin, and J.B. Lunchansky. 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. **J. Clin. Microbiol.** 39 (7): 2477-2484.

Feng, P. 2001. **Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens.** Available Source: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/ bam-a1.html#author, July 13, 2006.

Fiss, E.H., F.F. Chehab, and G.F. Brooks. 1992. DNA amplification and reverse dot blot hybridization for detection and identification of mycobacteria to the species level in the clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.** 30 (5): 1220-1224.

Frederickson, J.K., D.F. Bezdicek, F.E. Brockman and S.W. Li. 1988. Enumeration of Tn5 mutant bacteria in soil by most-probable-number-DNA hybridization and antibiotic resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(2): 446-453.

Galan, J.E., C. Ginocchio and P. Costeas. 1992. Molecular and functional characterization of *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **J. Bacteriol.** 174 (13): 4338-4349.

Hardison, C.A. 2007. **Wastewater Security: Contaminant Prioritization and Rapid PCR Methods for Pathogen Detection.** M.S. Thesis, University of Pittsburgh.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Herzer, S and F.E. Englert. 2001. Nucleic acid hybridization, pp. 401-453. *In* Alan S.G., ed. **Molecular Biology Problem Solver:A Laboratory Guide.** Wiley-Liss, Inc.

Honda, T., T. Miwatani, Y. Yabushita, N. Koike and K. Okada. 1995. A novel method to chemically immobilize antibody on nylon and its application to the rapid and differential detection of two *Vibrio parahaemolyticus* toxins in a modified enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 2 (2): 177-181.

Jenikova, G., J. Pazlarova and K. Demnerova. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. **Internatl. Microbiol.** 3: 225-229.

Jones, B.D. 2005. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. **J. Microbiol.** 43 (S.): 110-117.

Kalogianni, D.P., S. Goura, A.J. Aletras, T.K. Christopoulos. 2007. Dry reagent dipstick test combined with 23S rRNA PCR for molecular diagnosis of bacterial infection in arthroplasty. **Anal. Biochem.** 361: 169–175.

Karunasagar, I., I. Karunasagar and H. Sanath Kumer. 2002. Molecular methods for rapid and specific detection of pathogens in seafood. **Aquaculture Asia** 3 (7): 34-36.

Kim, S., J.G. Frye, J. Hu, P.J. Fedorka-Cray, R. Guatom and D.S. Boyle. 2006. Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. enterica. **J. Clin. Microbiol.** 44 (10): 3608-3615.

Kishima, M., I. Uchida, T. Namimutsu, T. Osumi, S. Takahashi, K. Tanaka, H. Aoki, K. Matsuura and K. Yamamoto. 2008. Nationwide surveillance of *Salmonella* in the faeces of pigs in Japan. **Zoonoses Public Health.** 55(3): 139-144.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kundinger, M. M. 2004. **Growth and Virulence Response of *Salmonella* Typhimurium to Soluble Maillard Reaction Products.** M.S. Thesis, Texas A&M University.

Kuske, C.R., K.L. Banton, D.L. Adorada, P.C. Stark, K.K. Hill and P.J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 64 (7): 2463-2472.

Lazcka, O., F.J.D. Campo and F.X. Munoz. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. **Biosens. Bioelectron.** 22: 1205–1217.

Lion, T. and O.A. Haas. 1990. Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. **Anal. Biochem.** 188, 335-337.

Luk, J.M., U. Kongmuang, R.S.W. Tsang and A.A. Lindberg. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D Salmonellae: a rapid screening prototype. **J. Clin. Microbiol.** 35 (3): 714-718.

Luo, H. 2005. **Identification of Microorganism in Food Ecosystems and Characterization of Physical and Molecular Events Involved in Biofilm Development.** Ph.D. Thesis, Ohio State University.

McCreery, T. 1997. Diogxigenin labeling. **Molecular Biotechnology** 7 (2): 121-124

Misawa, N., K. Kwashima, H. Kawamoto and F. Kondo. 2002. Development of a combined filtration-enrichment culture followed by a one-step duplex PCR technique for the rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in human fecal samples. **J. Med. Microbiol.** 51: 86-89.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Moganedi, K.L.M., E.M.A. Goyvaerts, S.N. Venter and M.M. Sibara. 2007. Optimisation of the PCR-*invA* primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. **Water SA.** 33 (2): 195-202.

Mothershed, E.A. and A.M. Whitney. 2006. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. **Clinica. Chimica. Acta.** 363: 206-220.

Narongwanichagarn, W. and L. Mulika. 2005. Development of *Salmonella* species specific probe, *In* **Safety of Meat Milk and Egg by Thailand Department of Livestock Development for kitchen of the world ed. 19.** Department of Livestock Development, Pathumthanee.

NEN™ Life Science Products RENIASSANCE®, Random primer fluorescien labeling kit with antifluorescien-HRP, **Catalog Number NEL803**, USA.

Newton, C.R. and A. Graham, 1997. **PCR.** 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin.

Notermans, S. and K. Wernars. 1990. Evaluation and interpretation of data obtained with immunoassays and DNA-DNA hybridization techniques. **Int. J. Food Microbiol.** 11(1): 35-49.

Oliveira, C.J.B., L.F. Oliveira e Silva Carvalho, P.E.N. Givisiez. 2005. Detection of *Salmonella* enterica in porcine faecal samples by different isolating and enrichment broth cultivation-PCR methods. **RPCV.** 100 (555-556): 193-198.

Park, D. 2007. Genomic DNA isolation from biological materials, pp. 3-4. *In* E. Hilario and J. Mackay, eds. **Protocols for Nucleic Acid Analysis by Non-radioactive Probes: Methods and Protocols.** Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pathmanathan, S.G., N. Cardona-Castro, M.M. Sanchez-Jimenez, M.M. Correa-Ochoa, S.D. Puthucheary and K.L. Thong. 2003. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. **J. Med. Microbiol.** 52: 773–776.

Polsky-Cynkin, R., G.H. Parsons, L. Allerdt, G. Landes, G. Davis and A. Rashtchian. 1985. Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization. **Clin. Chem.** 31 (9): 1483-1443.

Poxton, I.R. 2005. Molecular techniques in the diagnosis and management of infectious diseases: Do they have a role in bacteriology?. **Med. Princ. and Pract.** 14 (1): 20-26.

Reinhartz, A., S. Alajem, A. Samson and M. Herzberg. 1993. A novel rapid hybridization technique: paper chromatography hybridization assay (PACHA). **Gene.** 136 (1-2): 221-226.

Relman, D.A. 1998. Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. **Emerg. Infect. Dis.** 4 (3): 382-389.

Roche, P.J. 2006. Preparation of template DNA and labeling techniques., pp. 9-16. *In* I.A. Darby and T.D. Hewitson, eds. **In Situ Hybridization Protocols.** Human Press Inc., Totowa, NJ.

Rzezutka, A. and B. Mizak. 2003. Comparative studies on sensitivity of Digoxigenin-labelled probes and detection systems confirming replication of CDV in vero cells. **Bull. Vet. Inst. Pulawy** 47: 3-8.

Salehi, T. Z., M. Mahzounieh and A. Saeedzadeh. 2005. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. **Int. J. Poult. Sci.** 4 (8): 557-559.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sankuntaw N. 2007. **Development of multiplex real-time PCR for rapid detection of the central nervous system.** Master of Science thesis, Khon Kaen university.

Santos, L.R., V.P. Nascimento, S.D. Oliveira, M.L. Flores, A.P. Pontes, A.R. Ribeiro, C.T.P. Salle and R.F.F. Lopes. 2001. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** 43(5):247-250.

Sayler, G.S., M.S. Shields, E.T. Tedford, A. Breen, S.W. Hooper, K.M. Sirotkin and J.W. Davis. 1985. Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. **Appl. Envion. Microbiol.** 49 (5): 1295-1303.

Schnitzler, B.E., P.L. Thebo, F.M. Tomley, A. Uggla and M.W. Shirley. 1999. PCR identification of chicken Eimeria: a simplified read-out. **Avian Pathol.** 28(1): 89-93.

Shaban, A.B. and H.I. Malkawi. 2007. Rapid detection of human enteric pathogens (viruses and bacteria) in water resources from Jordan using polymerase chain reaction (PCR). **J. Appl. Sci. Res.** 3 (10): 1084-1093.

Singer, R.S., C.L. Cooke, C.W. Maddox, R.E. Isaacson and R.L. Wallace. 2006. Use of pooled samples for the detection of *Salmonella* in feces by polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Invest.** 18: 319-325.

Smith, G.L.F., S.S. Socransky and C. Sansone. 1989. "Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. **Oral. Microbial. Immunol.** 4(3): 141-145.

Stone, G.G., R.D. Oberst, M.P. Hays, S. McVey, M.M. Chengappa. 1995. Combined PCR-oligonucleotide ligation assay for rapid detection of *Salmonella* serovars. **J. Clin. Microbiol.** 33 (11): 2888-2893.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Strachan, T and AP Read. 1999. **Human Molecular Genetics. 2nd ed: Chapter 5, Nucleic acid hybridization assays.** Bookshelf NCBI. Available Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov /books/NBK7567/, January 13, 2010.

Suarez, M. and H. Russmann. 1998. Molecular mechanisms of *Salmonella* invasion: the type III secretion system of the pathogenicity island 1. **Internatl. Microbiol.** 1: 197-204.

Sun, C.P., J.C. Liao, Y.H. Zhang, V. Gau, M. Mastali, J.T. Babbitt, W.S. Grundfest, B.M. Churchill, E.R.B. McCabe and D.A. Haake. 2005. Rapid, species-specific detection of uropathogen 16S rDNA and rRNA at ambient temperature by dot-blot hybridization and an electrochemical sensor array. **Mol. Genet. Metab.** 84(1): 90-99.

Thermo Scientific. 2010. **Membrane for Nucleic Acid Transfer.** Available Source: http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=Page&ID=79ADA1AA-CEA9-4738-BE1A-48B1C4706402, January 7, 2010.

Tola, S., A. Angioi, A.M. Rocchigiani, G. Idini, D. Manunta, G. Galleri and G. Leori. 1997. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.** 54(1): 17-22.

Wolcott, M. J. 1992. Advances in nucleic acid-based detection methods. **Clin. Microbiol. Rev.** 5 (4): 370-386.

World Health Organization (WHO). 2005. **Drug-resistant Salmonella.** WHO. Available Source: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/, February 17, 2008.

Xu, Q. and D.G. Wilkinson. 1999. In situ hybridization of mRNA with hapten labelled probes, p. 96. *In* D.G. Wilkinson, 2nd ed. **In Situ Hybridization.** Oxford University Press Inc., New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Xu, X., M. Jin, Z. Yu, H. Li, D. Qiu, Y. Tan and H. Chen. 2005. Latex agglution test for monitoring antibodies to avian influenza virus subtype H5N1. **J. Clin. Microbiol.** 43 (4): 1953-1955.

Yang, J.L., M.S. Wang, A.S. Cheng, K.C. Pan, C.F. Li and S.X. Deng. 2008. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. **World J. Gastroenterol.** 14 (18): 2872-2876.

Zhang, S., B.W. Li and G.J. Weil. 2000. Paper chromatography hybridization: a rapid method for detection of *Onchocerca volvulus* DNA amplified by PCR. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 63 (1, 2): 85-89.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA

5% Chelex-100

HPLC water	100	ml.
Chelex-100 resin	0.5	g.

1 N NaOH

NaOH	10	g.
น้ำกลั่น	200	ml.

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 ml.

2. สารเคมีสำหรับปฏิกิริยา hybridization

20X SSC

NaCl	35.06	g.
sodium citrate	17.64	g.
น้ำกลั่น	150	ml.

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย concentrated HCl เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 ml. แล้วฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

20% SDS

SDS	50	g.
น้ำกลั่น	200	ml.

ให้ความร้อนที่ 68°C และกวนสารละลายด้วย magnetic stirrer เมื่อละลายเข้ากันดีแล้ว ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย concentrated HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 ml. ห้าม autoclave

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1 M Tris-HCl, pH 7.5

Tris-base	30.25	g.
น้ำกลั่น	200	ml.

ปรับ pH ด้วย concentrated HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 ml. แล้วฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

5 M NaCl

NaCl	90.5	g.
น้ำกลั่น	220	ml.

ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 250 ml. แล้วฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

Washing buffer

20x SSC	50	ml.
1% SDS	5	ml.
น้ำกลั่น	445	ml.

Blocking buffer No1.

1 M Tris-HCl, pH 7.5	50	ml.
5 M NaCl	15	ml.
น้ำกลั่น	435	ml.

Blocking buffer No2.

1 M Tris-HCl, pH 7.5	50	ml.
5 M NaCl	15	ml.
blocking reagent	1	g.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำกลั่น 435 ml.

ให้ความร้อนเพื่อละลาย blocking reagent

Detection buffer pH 9.5

1 M Tris-HCl, pH 7.5	50 ml.
5 M NaCl	10 ml.
น้ำกลั่น	400 ml.

ปรับ pH ให้ได้ 9.5 และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 500 ml.

3. สารเคมีสำหรับทำ agarose gel electrophoresis

10x TBE buffer

Tris-base	54 g.
Boric acid	27.5 g.
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20 ml.

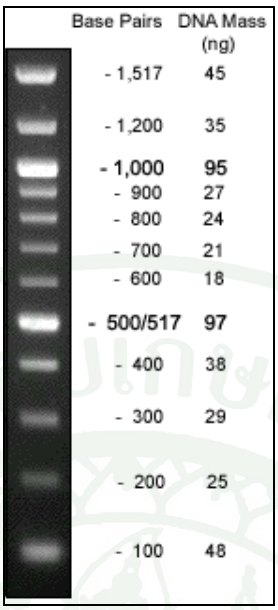
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 500 ml

1.5% agarose gel

Agarose	1.5 g.
1x TBE	100 ml.

ละลายด้วยเครื่อง microwave 2 นาที หรือจนสารละลายใส ปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงประมาณ 60°C เทลงใน tray สำหรับเตรียม gel จากนั้นใส่ comb เพื่อให้เกิดช่อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 1 0.5 µg of 100 bp DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 1.3% TAE agarose gel.

ที่มา: www.genex.cl/Pictures/NEBN3231.gif

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

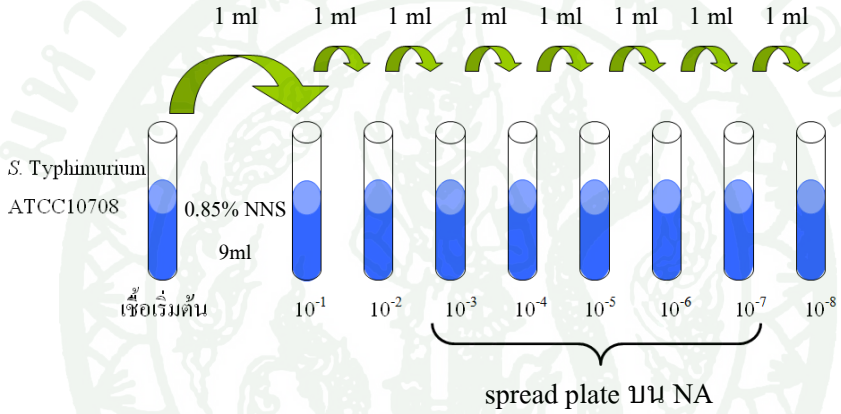
ภาคผนวก ข

การทดลองและผลบางส่วน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทำ serial dilution

ชั้ loop เขี่ยเชื้อ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC10708 จาก stock ลงใน NB โดยอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่บ่มไว้เป็นหลอดเชื้อเริ่มต้น เพื่อทำ serial dilution ดังภาพภาคผนวกที่ 2 โดยดูดเชื้อจากหลอดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 ml เติมลงใน 0.85% NNS ปริมาตร 9 ml (หลอดที่ 1) แล้วดูดเชื้อจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1 ml ไปเติมลงใน 0.85% NNS ปริมาตร 9 ml (หลอดที่ 2) ทำเช่นเดียวกันนี้จนถึงหลอดที่ 8



ภาพผนวกที่ 2 การทำ serial dilution

เมื่อได้ serial dilution ของเชื้อแล้ว นำเชื้อที่ dilution 10^{-3}-10^{-7} มาทำการ spread plate โดยดูดเชื้อมา dilution ละ 0.1 ml แล้วทำการ spread ให้ทั่วบน NA plate โดยทำ dilution ละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ จำนวนโคโลนีที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

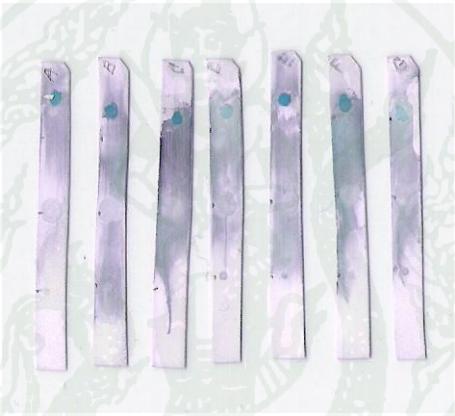
จำนวนโคโลนีที่นับได้นั้นสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{จำนวนโคโลนี (ต่อ 1 ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานเพาะลี้ยงเชื้อ}}{\text{ความเจือจากของตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัด DNA โดยการต้ม

ดัดแปลงจาก Misawa *et al*. (2002) เติม 25 mM NaOH ปริมาตร 50 µl ลงในตะกอนเซลล์ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge อันใหม่ ขั้นต่อไปทำการตกตะกอน DNA โดยการเติม 95% ethanol ปริมาตร 200 µL นำไปแช่เย็นที่ -70°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน DNA และตาก DNA ให้แห้ง ละลายด้วยน้ำกลั่นและเก็บที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน



ภาพผนวกที่ 3 แสดง background ที่เกิดขึ้นเมื่อ strip แห้งขณะ hybridize

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาววรินทร จันทร์ทองอิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2526
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2548 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร) ม.ศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี - พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	- พ.ศ. 2548-2553 ได้รับได้รับทุนการศึกษาและวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์